



PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

 Oficina Internacional

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION

EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ :</p> <p style="text-align: center;">C07K 7/23, A61K 38/09</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 98/27111</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 25 de Junio de 1998 (25.06.98)</p>						
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/CU97/00008</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 17 de Diciembre de 1997 (17.12.97)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">120/96</td> <td style="width: 33%;">17 de Diciembre de 1996</td> <td style="width: 33%;">CU</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">(17.12.96)</td> <td></td> </tr> </table> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA. (CIGB) [CU/CU]; Avenida 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600 (CU).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): BRINGAS PÉREZ, Ricardo [CU/CU]; Apartamento 32, Calle 184 #3112 e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600 (CU). BASULTO BAKER, Roberto [CU/CU]; Calle Sociedad Patriótica #6 A e/ Padre Carmelo Y Carretera Central, Rpto. "Alturas del Casino", Camagüey, CP 70300 (CU). REYES ACOSTA, Osvaldo [CU/CU]; Calle Carmen #54 e/ San Lázaro y San Anastacio, Lawton, 10 de Octubre, Ciudad de la Habana 10700 (CU). DE LA FUENTE GARCIA, José [CU/CU]; Apartamento 38, Calle 184 #3112 e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600 (CU).</p>		120/96	17 de Diciembre de 1996	CU		(17.12.96)		<p>(74) Mandatario: VAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Apto. 32, Calle 184 No. 3112 e/ 31 y 33, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 10600 (CU).</p> <p>(81) Estados designados: AU, BR, CA, KR, MX, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i></p>
120/96	17 de Diciembre de 1996	CU						
	(17.12.96)							
<p>(54) Title: VACCINE FOR THE REVERSIBLE IMMUNOCASTRATION OF MAMMALS</p> <p>(54) Título: VACUNA PARA LA INMUNO-CASTRACIÓN REVERSIBLE DE MAMÍFEROS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to the field of genetic engineering and biotechnology and particularly to the use of a peptide derived from GnRH for the immunocastration of mammals. Vaccinations tests have been carried out in mammals with the gonadotropine release hormone (GnRH), in order to elicit and immune response which neutralizes the activity of said hormone. The present invention relates to the use of a GnRH variant of mammals wherein a glycin residue has been substituted by a prolin residue in position 6: Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly. This substitution or change has induced an immune response which is superior than that of natural GnRH, when both are coupled to a same carrier protein, in experiments carried out in pigs. This same result can be expected in any other mammal since this hormone is present in all species.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>La presente invención esta relacionada con el campo de la Ingeniería y la Biotecnología y en particular con el uso de un péptido derivado de la GnRH para la inmuno-castración de mamíferos. En mamíferos, se ha ensayado la vacunación con la hormona liberadora de la gonodotropina (GnRH, siglas en ingles), con el fin de provocar una respuesta inmune que neutralice la actividad de dicha hormona. La presente invención se refiere al uso de una variante de la GnRH de mamíferos que presenta un cambio de un residuo glicina por un residuo prolina en la posición 6: Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly. Este cambio ha mostrado inducir una respuesta inmune superior a la de la GnRH natural, cuando ambas están acopladas a una misma proteína portadora, en experimentos realizados en cerdos. Este mismo resultado es de esperar en cualquier otro mamífero ya que esta hormona es conservada en todas las especies.</p>								

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	ExRepública Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

VACUNA PARA LA INMUNO-CASTRACIÓN REVERSIBLE DE MAMÍFEROS

Sector técnico

La presente invención esta relacionada con el campo de la
5 Ingeniería Genética y la Biotecnología y en particular con el
uso de un péptido derivado de la GnRH para la
inmunocastración de mamíferos.

Técnica anterior

En animales domésticos, como perros, gatos, cerdos y
10 vacunos, es frecuente la conveniencia de prevenir la
reproducción. Los métodos más frecuentemente usados son la
castración y la administración de esteroides. Ambos métodos
tienen inconvenientes, el primero requiere de personal
especializado para llevarse a cabo y es irreversible y el
15 segundo provoca efectos secundarios. Por estas razones se ha
ensayado la inmuno-castración de animales con el uso de
péptidos análogos a la GnRH conjugados con proteínas, con el
objetivo de levantar anticuerpos que neutralicen la función
de la GnRH.

20 Divulgación de la invención.

La secuencia aminoacídica de GnRH de gran número de especies
es conocida. Todas las secuencias de mamíferos reportadas
hasta hoy presentan la siguiente secuencia aminoacídica:

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

25 Por lo que esta es referida en la literatura como la GnRH de
mamíferos. En la mayoría de las secuencias conocidas,
incluyendo secuencias de aves, peces y reptiles, en la
posición 6 se encuentra un residuo aminoacídico glicina. La
glicina es el menor de los aminoácidos y provoca flexibilidad
30 en la cadena polipeptídica. La sustitución de glicina por
prolina, un residuo que confiere rigidez, puede influir en el
aumento de la respuesta inmune. Además este cambio provocaría

que este péptido resulte ajeno para el sistema inmune, estimulando la producción de anticuerpos.

La producción de anticuerpos contra la GnRH se logra conjugando la GnRH a una proteína portadora apropiada. Esta
5 conjugación se puede realizar por métodos químicos o de Ingeniería Genética. En nuestro caso hemos seleccionado para la conjugación dos proteínas portadoras ampliamente usadas con estos fines, la proteína BSA y un epítoto del toxoide del tétanos. La BSA se conjuga por un método químico conocido, el
10 epítoto del toxoide del tétanos y las variantes de GnRh se sintetizan en un solo péptido utilizando dos residuos glicina como separadores. En este caso se utiliza la síntesis química por que el tamaño del péptido así lo permite, en caso de que la proteína portadora fuera de gran tamaño la vía más
15 factible sería por Ingeniería Genética, insertando las variantes de la GnRH como parte de su secuencia aminoacídica. Este procedimiento es posible hacerlo prácticamente con cualquier proteína, de aquí que sea necesario que la presente invención quede protegida contra cualquier proteína que pueda
20 incluir la secuencia del péptido en cuestión, ya sea obtenida por síntesis química o por manipulación genética.

Novedad y ventajas de la solución propuesta.

25 Anteriormente se han introducido cambios en la posición 6 de la GnRh introduciendo D-aminoácidos y compuestos análogos a aminoácidos (Rivier et al., U.S Patent 4,215,038, Vale, Jr. Et al., US Patent 4,410,514). La novedad de esta invención consiste en la sustitución del aminoácido glicina en la sexta
30 posición de la GnRH por un L-aminoácido prolina, o sea un aminoácido que se encuentra de forma natural en las proteínas. Esta variante ha demostrado ser más efectiva que la GnRH natural cuando ambas están conjugadas a la misma proteína. El hecho de introducir un aminoácido que ocurre de

forma natural nos da además la posibilidad de incluir esta variante en construcciones genéticas, algo imposible en variantes que incluyan D-aminoácidos o compuestos análogos.

Ejemplos de realización

5 Ejemplo 1

Síntesis de los péptidos:

Todos los péptidos fueron sintetizados utilizando la estrategia Boc- en fase sólida sobre la resina 4-metilbenzohidrilamina (resina MBHA de la casa comercial BACHEM, Suiza). Los aminoácidos protegidos fueron suministrados por BACHEM. La protección de los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos fue la siguiente: Arg(Tos), Asp(OBzl), Cys(4-MeBzl), Glu(OBzl), Lys(2-Cl-Z), Trp(CHO), Tyr(Cl₂-Bzl), Thr(Bzl) y Ser(Bzl). La Asn, la Gln y la Pro se utilizaron sin protección en las cadenas laterales.

La síntesis se realizó siguiendo los pasos que se relacionan a continuación:

Paso	veces x min
Lavados con diclorometano	1 x 1
Desprotección del grupo Boc- del amino terminal	1 x 30
Lavados con diclorometano	2 x 1
Lavados con 2-propanol	2 x 1
Lavados con diclorometano	2 x 1
Neutralización de los grupos aminos	3 x 2
Lavados con diclorometano	2 x 1
Reacción de acoplamiento	1 x 60
Lavados con N, N-dimetilformamida	2 x 1
Lavados con diclorometano	1 x 1
Se repiten los pasos hasta completar la secuencia	-

Eliminación de las protecciones de
las cadenas laterales y recuperación
del péptido

La desprotección del grupo protector Boc- se realizó en todos los casos con ácido trifluoroacético (TFA) al 37.5% en diclorometano (DCM). La neutralización de los aminos libres se llevó a cabo con N, N-etildisopropilamina al 5 % en DCM. Para la reacción de acoplamiento de cada residuo se utilizó el método de activación con N, N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) *in situ*, a excepción de los aminoácidos Asn y Gln que fueron activados con DIC y 1-hidroxybenzotriazol (HOBt) en N,N-dimetilformamida (DMF).

La eliminación de las protecciones de las cadenas laterales y la liberación del péptido de la resina se realizaron en un equipo especial para este fin. El procedimiento empleado fue el conocido como "Low-High" HF. En la primera parte del procedimiento (Low HF), el sistema péptido protegido-resina se trató con la mezcla HF(25%):DMS(65%):p-Cresol(10%) durante 120 min. a 0°. En el caso de los péptidos con Trp en la secuencia, la mezcla se sustituyó por HF(25%):DMS(60%):EDT(10%):p-Cresol(5%). Posterior a este tratamiento el péptido-resina se lavó con éter dietílico, diclorometano y 2-propanol varias veces y se secó al vacío. En la segunda parte (High HF), el péptido-resina se trató con la mezcla HF(90%):Anisol(10%) durante 60 min. a 0°.

El producto crudo se lavó con éter, se extrajo con una solución de ácido acético al 30% en agua y se liofilizó.

Los péptidos se caracterizaron finalmente por RP-HPLC en una columna VYDAC C-18 (4.6x100) mm y por espectrometría de masas usando el FAB como método de ionización en un equipo JEOL HX-110HF. La purificación de los péptidos se realizó por el mismo procedimiento pero en una columna VYDAC C-18 preparativa.

Los péptidos sintetizados fueron:

- a) QHWSYGLRPG, identificado como GnRH secuencia correspondiente a la hormona liberadora de gonadotropina, la cual es estructuralmente conservada en varias especies de mamíferos incluyendo al cerdo.
- b) QHWSYGLRPGGGQYIKANSKFIGITEL, identificado como GnRH-TT, donde la hormona liberadora de gonadotropina esta conjugada en el N-terminal a un epítipo de la toxina del tétanos (residuos 830-844) (Panina-Bordingnon et al, 1989) utilizando dos glicinas como separadores.
- c) QHWSYPLRPG, nuevo péptido análogo de la GnRH, identificado como GnRHm1, donde la GnRH tiene un cambio en la posición número 6 del aminoácido glicina por una prolina.
- d) QHWSYPLRPGGGQYIKANSKFIGITEL, identificado como GnRHm1-TT.
- En este caso el péptido análogo GnRHm1 está conjugado en el N-terminal al mismo epítipo y de igual forma que el péptido GnRH-TT.

En la figura 2 se pueden observar los cromatogramas de los péptidos GnRH (figura 2a), GnRHm1 (figura 2b), GnRHm1TT (figura 2c) y GnRHm1TT (figura 2d).

PREPARACIÓN DE LOS CONJUGADOS

La conjugación de los péptidos a BSA se realizó por el siguiente protocolo:

- Pesar igual cantidad de BSA (*bovine serum albumin*, Sigma) que de péptido (3 mg).
- Disolver la BSA en 0,5 mL de 0,1 M de Na_2CO_3 en tubo de ensayo.
- Disolver aparte los 3 mg de péptido en 0,5 mL de 0,1 M de Na_2CO_3 en tubo de ensayo.
- Añadir con agitación lenta y poco a poco 3 μL de Glutaraldehído al 25 % (grado I, Sigma) a la BSA

resuspendida y posteriormente el péptido resuspendido gota a gota.

- Llevar hasta 1,5 mL con 0,1 M de Na₂CO₃.

5 - Mezclar con agitación lenta y protegido de la luz durante 12 horas a 25°C.

- Dializar contra PBS 1X durante 12 horas a 4°C.

- Llevar el volumen hasta 3 mL con PBS 1X.

- Repartir 1 mL (1 mg de péptido conjugado) para cada jeringuilla de 5 mL.

10 - Adicionar 1 mL de Adjuvante Completo de Freund (Sigma) en la primera inmunización y 1 mL de Adjuvante Incompleto para la segunda..

- Mezclar con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

15 - Conservar el inmunógeno a 4°C hasta su empleo.

Ejemplo 2

Formulación de la vacuna y vacunación.

Para la elaboración de las vacunas se empleó en cada caso 1 mg de péptido resuspendido en 1 mL de PBS 1X y emulsificado con 1 mL del Adjuvante Completo de Freund (CFA). Un mg de los péptidos GnRH-TT y GnRHm1-TT equivale a 0,4 mg de GnRH y GnRHm1 respectivamente. La emulsión agua en aceite estable se logró por agitación con el empleo de un agitador con impelente. En todos los casos los inmunógenos se prepararon momentos antes de la vacunación.

25 La segunda vacunación realizada 8 semanas después de la primera tenía la misma composición pero esta vez emulsificada con Adjuvante Incompleto.

Animales : Un total de quince cerdos machos híbridos procedentes de camadas diferentes fueron asignados al azar a cinco grupos de tres animales cada uno para el tratamiento que a continuación se describe.

Vacunación: Los cinco grupos fueron vacunados la primera vez entre las 11 y 12 semanas de nacidos y recibieron una revacunación 8 semanas más tarde. En ambas ocasiones cada animal fue inyectado intramuscularmente en el cuello con 2 mL de vacuna. Todos los animales fueron sacrificados 8 semanas después de la segunda inmunización. El primer grupo de animales fue vacunado solamente con PBS 1X y CFA y se utilizó como control negativo del experimento. Un segundo y tercer grupo se vacunaron con GnRH-BSA y con GnRH-TT respectivamente y se emplearon como controles positivos teniendo en cuenta que GnRH es la hormona endógena. Un cuarto y un quinto grupo fueron vacunados con el nuevo péptido GnRHm1 conjugado a BSA (GnRHm1-BSA) y al epítipo de la toxina del tétanos (GnRHm1-TT) respectivamente. El esquema de vacunación duró cuatro meses (enero - abril del 1996).

Ejemplo 3

Evaluaciones realizadas durante el esquema de vacunación. Comenzando desde el día 0 y cada 4 semanas hasta momentos antes del sacrificio se realizó la medición de los testículos y se verificó el peso de cada animal. Al mismo tiempo se tomaron muestras de suero por punción del seno retro-orbital para la determinación de los títulos anti-GNRH. Además en la semana 16 se comprobó durante tres días el desarrollo de los reflejos primarios de la cópula: acercamiento, monta, erección y eyaculación. La estimulación de los verracos se realizó, en unos casos con una cerda en celo natural y en otros con una cerda a la cual se le indujo el celo con gonadotropina sérica.

a) **Tabla 1.** Medición de los testículos:

GRUPO	ANIMAL	TAMAÑO DE LOS TESTÍCULOS, mm									
		semana 0		semana 4		semana 8		semana 12		semana 16	
		D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
GnRH-TT	20	39	38	42	41	55	57	52	51	76	74
	30	41	42	47	47	53	53	55	54	52	52
	36	35	37	40	38	46	46	51	51	62	58
GnRHm1-TT	15	45	43	50	49	65	64	50	46	58	62
	24	38	37	32	32	43	45	42	40	47	50
	37	45	43	49	50	56	55	nd	50	42	42
GnRH-BSA	2	44	43	44	43	52	51	50	58	74	72
	23	47	45	48	46	64	62	90	90	120	120
	25	45	43	49	50	57	57	75	74	90	88
GnRHm1-BSA	14	45	43	41	42	63	63	89	92	96	96
	16	44	45	40	40	55	54	82	84	90	90
	39	43	42	44	45	55	55	77	75	87	87
PLACEBO	1	48	46	52	51	60	59	85	83	100	98
	11	43	42	48	47	50	50	72	72	85	92
	17	48	46	50	49	62	61	82	80	98	105

nd- no determinado por imposibilidad de localizar el testículo.

D e I- testículos derecho e izquierdo respectivamente.

5

b) **Tabla 2.** Peso corporal de los cerdos

GRUPO	ANIMAL	PESO CORPORAL, Kg				
		semana 0	semana 4	semana 8	semana 12	semana 16
GnRH-TT	20	10,6	nd	29,5	42,0	54,0
	30	10,0	15,6	28,5	40,0	55,5
	36	10,8	nd	30,0	41,5	55,5
GnRHm1-TT	15	12,6	nd	33,5	43,0	58,0
	24	12,6	nd	33,0	43,0	59,0
	37	13,2	nd	37,0	50,0	61,5
GnRH-BSA	2	13,4	nd	35,2	47,5	64,0
	23	13,0	nd	33,0	47,5	61,0
	25	13,6	nd	32,7	40,5	48,0
GnRHm1-BSA	14	12,0	nd	30,5	40,0	56,0
	16	12,9	nd	27,5	42,5	48,0
	39	13,1	17,5	30,6	43,5	58,0
PLACEBO	1	16,0	nd	37,3	45,5	57,0
	11	14,5	nd	38,5	49,0	62,0
	17	17,0	24	39,5	55,0	70,0

nd- no determinado.

10

c) **Tabla 3.** Incremento del peso corporal de cada grupo durante el tiempo del experimento.

GRUPO	VALOR MEDIO PESO INICIAL	VALOR MEDIO PESO FINAL	INCREMENTO TOTAL DEL PESO
GnRH-TT	10.46 ± 0.41	55.00 ± 0.86	44.54
GnRHm1-TT	12.80 ± 0.35	59.50 ± 1.80	46.70
GnRH-BSA	13.33 ± 0.31	57.67 ± 8.50	44.34
GnRHm1-BSA	12.67 ± 0.59	54.00 ± 5.29	41.33
Placebo	15.83 ± 1.26	63.00 ± 6.56	47.17
FECHA	9 Enero 1996	29 Abril 1996	
Edad en semanas	11-12	27-28	

5 d) **Tabla 4.** Resultados de la comprobación del desarrollo de los reflejos primarios de la cópula en los cerdos inmunizados.

GRUPO	ANIMAL	REFLEJO a) ACERCAMIENTO			REFLEJO b) MONTA			ERECCION			EYACULACION		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GnRH-TT.	20	B	B	B	B	B	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	30	B(*)	B(*)	R	M	M	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	36	B	M	M	B	M	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GnRHm1-TT.	15	R	R	M	M	M	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	24	R	R	R	M	M	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	37	R	B(*)	B	M	M	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GnRH-BSA.	2	B	B	B	B	B	B	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	23	B	B	B	B	B	B	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	25	B	B	B	B	B	B	NO	SI	SI	NO	SI	NO
GnRHm1-BSA.	14	B	B	R	M	M	M	SI	NO	NO	NO	NO	NO
	16	B	B	B	B	B	B	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	39	R	B	B	R	B	B	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Placebo.	1	B	B(*)	B	B	B	B	NO	NO	SI	NO	NO	SI
	11	B	B	B	B	M	M	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	17	B	B	B	B	B	B	NO	SI	SI	NO	NO	SI

a) reflejo de acercamiento:

- 10
- B (bueno),
 - B(*), significa acercamiento agresivo,
 - R (regular),
 - M (malo), significa que no hubo acercamiento,

b) reflejo de monta:

- 15
- B (bueno), significa buen reflejo,

- R (regular), significa que el intento de monta fue pobre,

- M (malo), significa que no hubo monta.

5 Ejemplo 4

Evaluaciones realizadas después del sacrificio.

Después del sacrificio, los testículos extirpados y separados de los epidídimos fueron medidos y pesados, mientras que los epidídimos fueron solamente pesados. Dos muestras de tejido testicular y epididimal fueron fijadas para histología. Después de haber fijado la parte del medio de cada sección transversal y sagital de estos tejidos, se procedió a la inclusión en parafina y al corte de secciones de 5 μ m de espesor. La tinción se realizó por el método de hematoxilina y eosina.

a) **Tabla 5.** Medición de los testículos y pesaje de los epidídimos y testículos.

GRUPO	ANIMAL	TAMAÑO DE LOS TESTÍCULOS, mm (largo X ancho)		PESO DE LOS EPIDÍDIMOS EN GRAMOS.		PESO DE LOS TESTÍCULOS EN GRAMOS.	
		DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO
GnRH-TT	20	67x42	69x41	31.69	31.56	57.60	63.37
	30	48x27	50x28	17.42	17.78	19.46	20.86
	36	57x37	64x38	26.21	28.11	36.46	43.60
GnRHm1-TT	15	64x31	57x29	19.34	15.84	32.53	26.30
	24	48x30	51x38	27.10	27.67	28.55	32.63
	37	44x26	43x27	14.55	13.80	13.96	14.22
GnRH-BSA	2	65x40	64x40	28.50	27.74	51.47	50.21
	23	106x59	101x58	48.38	45.23	178.30	180.59
	25	67x44	67x44	36.87	36.25	66.44	66.50
GnRHm1-BSA	14	89x51	87x52	44.31	43.84	125.00	122.66
	16	82x51	81x48	30.42	29.51	100.07	93.03
	39	74x43	77x43	34.54	30.40	67.33	72.36
Placebo	1	82x52	90x55	53.11	58.42	116.33	125.23
	11	80x54	81x52	34.35	35.04	114.00	111.23
	17	92x58	94x59	53.28	51.23	159.24	163.61

20 De los resultados de la tabla anterior podemos calcular la relación peso de los testículos/peso del animal para cada testículo, obteniendo los siguientes valores y sus medias.

Tabla 6. Relación peso de los testículos/peso del animal.

	Placebo	GnRH-BSA	GnRHm1-BSA	GnRH-TT	GnRHm1-TT
Testículos derechos	2.041	0.804	2.232	1.067	0.561
	1.839	2.923	2.085	0.351	0.484
	2.275	1.384	1.161	0.657	0.227
Testículos izquierdos	2.197	0.785	2.190	1.174	0.453
	1.794	2.960	1.938	0.376	0.553
	2.337	1.385	1.248	0.786	0.231
Media	2.081	1.707	1.809	0.735	0.418

Al calcular las probabilidades asociadas al test de Student para cada par de grupo de valores obtenemos la siguiente matriz de probabilidades:

Tabla 7. Probabilidades asociadas al test de Student par los valores de la tabla 6.

	GnRH-BSA	GnRHm1-BSA	GnRH-TT	GnRHm1-TT
Placebo	0.194992	0.119628	5.84×10^{-6}	1.9×10^{-8}
GnRH-BSA		0.412618	0.023363	0.005215
GnRHm1-BSA			0.000608	2.48×10^{-5}
GnRH-TT				0.032757

10

Nota: existe diferencia significativa cuando el valor de la probabilidad asociada es menor que 0.05.

Observándose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo placebo y las dos variantes de GnRH conjugada a la BSA. Por el contrario, entre cualquiera de estos tres grupos y los grupos conjugados al epítotope de la toxina del tétanos si existen diferencias estadísticamente significativas. Y al comparar estos dos últimos grupos entre si encontramos también diferencias significativas, siendo la media de la variante GnRHm1 la mas pequeña entre todos los grupos y por lo tanto la que tiene un mayor efecto en la reducción del tamaño de los testículos.

20

Lo mismo hacemos para los epidídimos, obteniendo:

Tabla 8. Relación pesos de los epidídimos/peso del animal

	Placebo	GnRH-BSA	GnRHm1-BSA	GnRH-TT	GnRHm1-TT
Epidídimos	0.932	0.445	0.791	0.587	0.333
derechos	0.554	0.793	0.634	0.314	0.459
	0.761	0.768	0.596	0.472	0.237
Epidídimos	1.025	0.433	0.782	0.584	0.273
izquierdos	0.565	0.741	0.614	0.320	0.469
	0.732	0.755	0.524	0.506	0.224
Media	0.761	0.656	0.657	0.464	0.333

Al igual que el caso de los testículos obtenemos la siguiente
5 matriz de probabilidades:

Tabla 9. Probabilidades asociadas al test de Student par los valores de la tabla 8.

	GnRH-BSA	GnRHm1-BSA	GnRH-TT	GnRHm1-TT
Placebo	0.16702	0.134319	0.004564	0.000365
GnRH-BSA		0.495529	0.02377	0.001373
GnRHm1-BSA			0.007825	0.000201
GnRH-TT				0.038709

10 En el caso de los epidídimos se repite el mismo resultado que con los testículos. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupo placebo y los grupos conjugados a BSA, pero si entre estos y los dos grupos conjugados al péptido de la toxina del tétanos y los dos
15 grupos asociados a la toxina del tétanos presentan diferencias significativas entre si (ver figura 2), lo que implica que el cambio del residuo glicina.

Como se puede observar los resultados obtenidos con los péptidos GnRH y GnRHm1 conjugados a BSA son muy similares a
20 los obtenidos para el grupo control negativo o placebo. Esto pudiera explicarse teniendo en cuenta que la homología existente entre la albúmina bovina y la porcina es muy

elevada (80%), por lo que ésta sería reconocida como propia por los cerdos.

Al comparar el grupo GnRHm1-TT con el placebo se observa una reducción en el peso del epidídimo de 2,3 veces, una
5 reducción de 5,0 veces en el peso de los testículos, y una reducción total de 3,8 veces. Al comparar los resultados del grupo GnRH-TT con el placebo se observa una reducción en el peso del epidídimo de 1,6 veces, una reducción de 2,8 veces
10 en el peso de los testículos, y una reducción total de 2,4 veces.

A modo de conclusión podemos decir que estamos en presencia de un nuevo péptido análogo de GnRH el cual resulta ser entre 1,4 y 1,8 veces más efectivo que la propia hormona endógena estando ambos conjugados al epítipo universal de la toxina
15 tetánica.

Descripción de las figuras.

Figura 1: Testículos de los grupos placebo (izquierda), GnRH-
20 TT (centro) y GnRHm1-TT (derecha). Es evidente el efecto producido en los dos grupos conjugados a la toxina del tétanos. Entre estos dos grupos también se puede observar un mayor efecto de la variante GnRHm1-TT.

Figura 2. Cromatogramas de los péptidos a)GnRH, b)GnRHm1,
25 c)GnRH TT y d) GnRHm1TT. En todos los casos se utilizó una columna de fase reversa C18 VYDAC (4,6 x 100 mm) con un gradiente de 5-60 % de acetonitrilo (0,05 % de TFA) en agua (0,1 % de TFA) en 35 min. Los péptidos se detectaron a una longitud de onda de 226 nm.

LISTA DE SECUENCIAS

- (1) INFORMACION GENERAL:
- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
- (B) DIRECCION: Ave. 31 entre 158 y 190, Playa
- 10 (C) CIUDAD: Ciudad de La Habana
- (D) PROVINCIA: Ciudad de La Habana
- (E) PAIS: Cuba
- (F) CODIGO POSTAL (ZIP): 10600
- (G) TELEFON: 53 7 218466
- 15 (H) TELEFAX: 53 7 218070/336008
- (ii) TITULO DE LA INVENCION: PREPARADO VACUNAL PARA LA INMUNO-CASTRACION REVERSIBLE DE MAMIFEROS.
- 20 (iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 1
- (iv) FORMA DE LECTURA COMPUTARIZADA:
- (A) TIPO DE MEDIO: Floppy disk
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatible
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (EPO)
- (vi) DATOS DE SOLICITUD DE PRIORIDAD:
- 30 (A) NUMERO DE SOLICITUD: CU 120/96
- (B) FECHA DE SOLICITUD: 17-DEC-1996
- (2) INFORMACION PARA LA SEC ID NO. 1:
- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LENGTH: 10 aminoácidos

15

(B) TIPO: aminoacídica

(C) CADENA: simple

(D) TOPOLOGIA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLECULA: peptídica

(iii) HYPOTHETICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (A) ORGANISMO: Mutante de la hormona deliveradora
de Gonadotropina.

(C) AISLAMIENTO: Mamíferos

(xi) DESCRIPCION DE LA SEC ID NO. 1:

15

Glu His Trp Ser Tyr Pro Leu Arg Pro Gly
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que inhibe la liberación de gonadotropina caracterizado porque contiene la secuencia aminoacídica:
Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly
- 5 2. Un péptido según la reivindicación 1 caracterizado porque está compuesto solo de L-aminoácidos.
3. Un péptido o proteína caracterizado porque contiene como parte de su secuencia aminoacídica la secuencia descrita en la reivindicación 1.
- 10 4. Un preparado vacunal caracterizado porque contiene un péptido o proteína como los descritos en las reivindicaciones 1, 2 y 3, que sea utilizado para la inmunocastración de mamíferos.

Figura 1

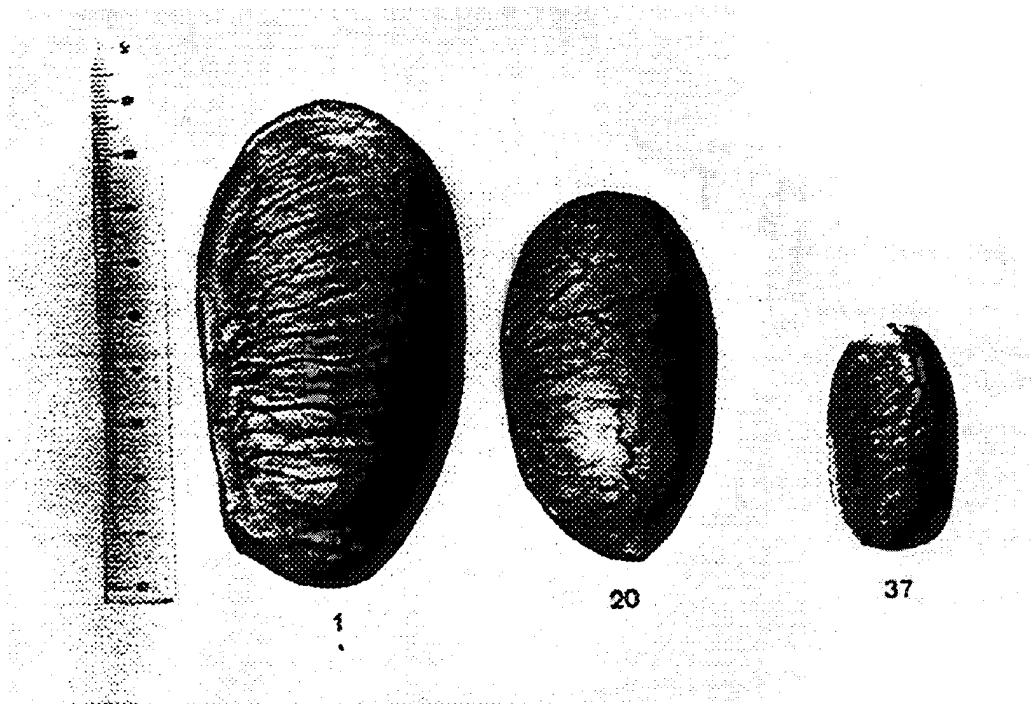
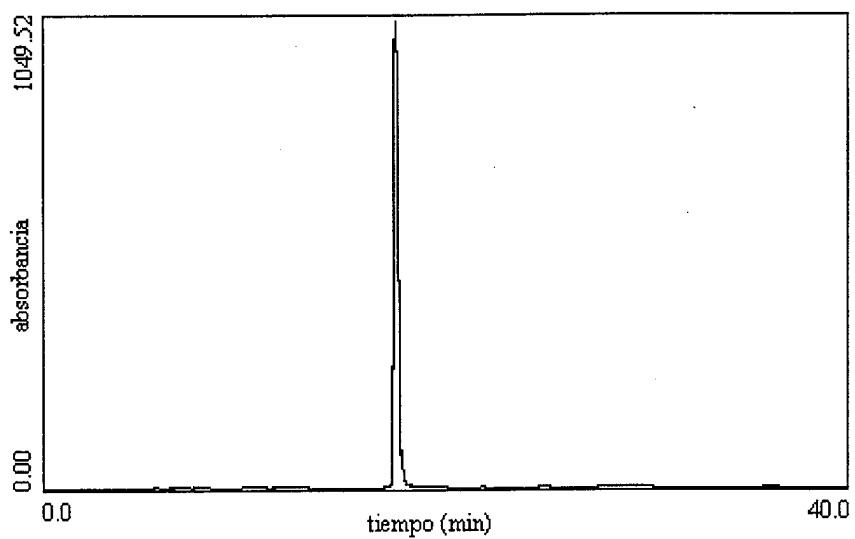


Figura 2

a)



b)

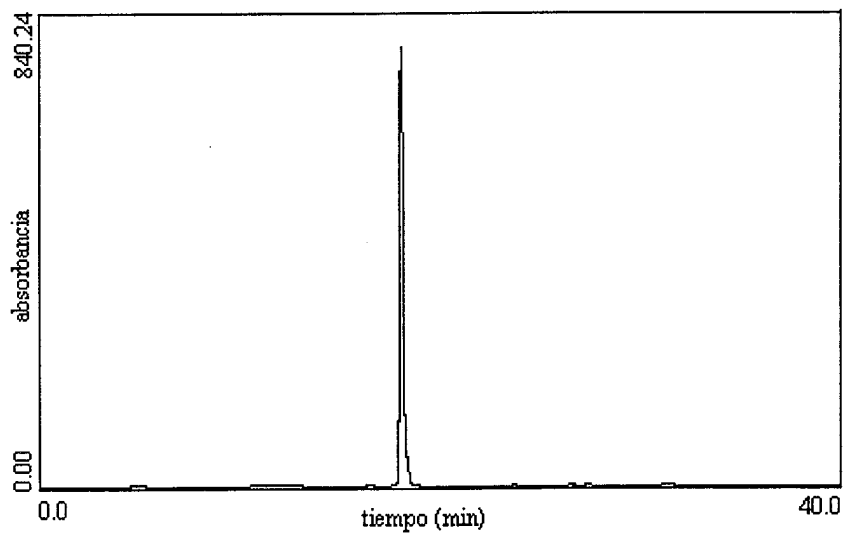
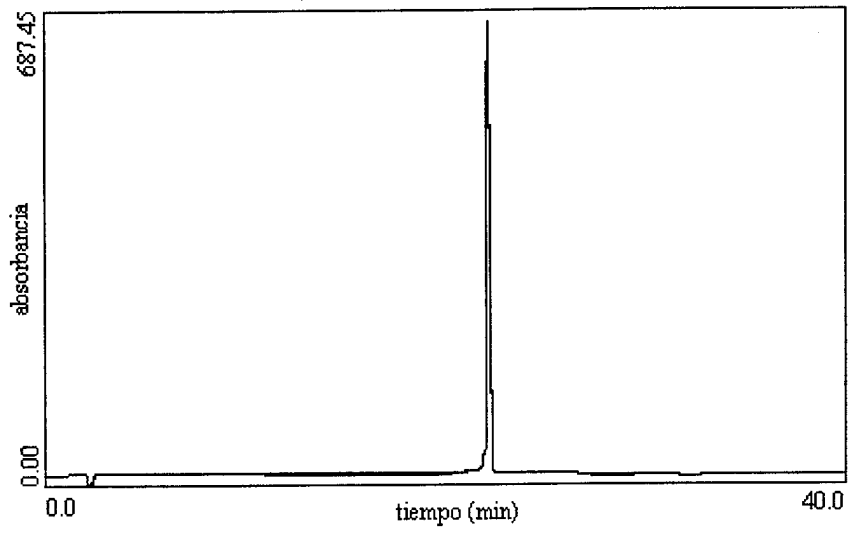
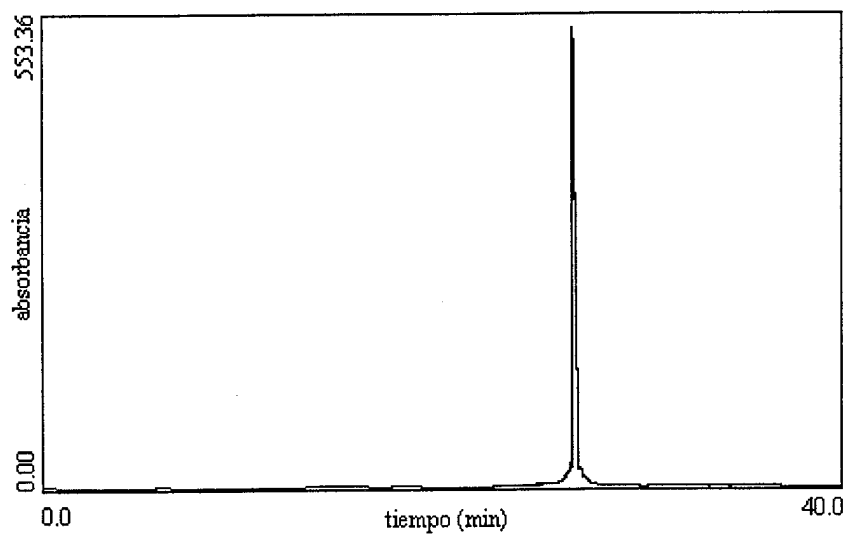


Figura 2 (continuación)

c)



d)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/CU 97/00008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K7/23 A61K38/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 88 05308 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 28 July 1988 whole document, esp. claim 1 ---	1-4
Y	WO 92 19746 A (CSL LTD) 12 November 1992 whole document esp. example 1 and claims ---	1-4
Y	WO 88 00056 A (VICTORIA STATE) 14 January 1988 whole document, esp. Tables and claims ---	1-4
A	EP 0 501 882 A (RHONE MERIEUX) 2 September 1992 whole document, esp. claim 22 -----	1-4

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 1998

Date of mailing of the international search report

27. 03. 98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kronester-Frei, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/CU 97/00008
--

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8805308 A	28-07-88	AU 602187 B	04-10-90
		AU 1101788 A	10-08-88
		ZA 8800149 A	28-06-88

WO 9219746 A	12-11-92	AU 634379 B	18-02-93
		AU 1649592 A	21-12-92
		AU 7617791 A	19-11-92

WO 8800056 A	14-01-88	AU 7642387 A	29-01-88
		DK 114588 A	03-05-88
		EP 0274496 A	20-07-88
		JP 1500900 T	30-03-89

EP 0501882 A	02-09-92	FR 2673377 A	04-09-92
		FR 2685333 A	25-06-93
		CA 2081660 A	02-09-92
		WO 9215330 A	17-09-92
		SK 328092 A	05-01-95
		US 5573767 A	12-11-96
		MX 9207129 A	30-06-94

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 97/00008

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

CIP⁶ C07K7/23 A61K38/09

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ C07K A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	WO 88 05308 A (COMMW SCIENT IND RES ORG) 28 Julio 1998 (28.07.98); el documento completo, en particular. reivindicacion 1 ---	1-4
Y	WO 92 19746 A (CSL LTD) 12 Noviembre 1992 (12.11.92); el documento completo. ejemplo 1 y reivindicaciones ---	1-4
Y	WO 88 00056 A (VICTORIA STATE) 14 Enero 1998 (14.01.98) el documento completo, en particular. Tables y reivindicaciones ---	1-4
A	EP 0 501 882 A (RHONE MERIEUX) 2 Septiembre 1992 (02.09.92); el documento completo, en particular. reivindicacion 22 -----	1-4

En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

Véase el Anexo de la familia de patentes.

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
 - "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
 - "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
 - "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
 - "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

12 Marzo 1998 (12.03.98)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

27 Marzo 1998 (27.03.98)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

S.P.T.O.

Funcionario autorizado

Facsimil N°

Teléfono N°

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU 97/00008

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 8805308 A	28-07-88	AU 602187 B	04-10-90
		AU 1101788 A	10-08-88
		ZA 8800149 A	28-06-88

WO 9219746 A	12-11-92	AU 634379 B	18-02-93
		AU 1649592 A	21-12-92
		AU 7617791 A	19-11-92

WO 8800056 A	14-01-88	AU 7642387 A	29-01-88
		DK 114588 A	03-05-88
		EP 0274496 A	20-07-88
		JP 1500900 T	30-03-89

EP 0501882 A	02-09-92	FR 2673377 A	04-09-92
		FR 2685333 A	25-06-93
		CA 2081660 A	02-09-92
		WO 9215330 A	17-09-92
		SK 328092 A	05-01-95
		US 5573767 A	12-11-96
MX 9207129 A	30-06-94		
