

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99 991

REQUERENTE: PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED, britânica,
com sede em 48 Stockport Road, Marple,
Cheshire SK6 6AB, Inglaterra

EPÍGRAFE: "ANÁLOGOS DA HORMONA DE LIBERTAÇÃO DE GONADOTRO-
PINA PÍSCEA E VACINAS E COMPOSIÇÕES VETERINÁRIAS
QUE OS CONTEM E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"

INVENTORES: Robert Vincente Fishleigh e Barry Robson, resi-
dentes na Inglaterra

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Grã-Bretanha em 9 de Janeiro de 1991, sob o N.º. 9100468-9.

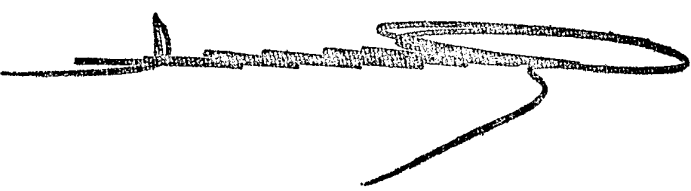


Descrição referente à patente de invenção de PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED, britânica, industrial e comercial, com sede em 48 Stockport Road, Marple, Cheshire SK6 6AB, Inglaterra, (inventores: Robert Vincent Fishleigh e Barry Robson, residentes na Inglaterra), para "ANÁLOGOS DA HORMONA DE LIBERTAÇÃO DE GONADOTROPINA PÍSCIA E VACINAS E COMPOSIÇÕES VETERINÁRIAS QUE OS CONTEM E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO".

DESCRIÇÃO

A presente invenção refere-se a análogos prolongados da hormona de peixe referida como hormona de libertação da gonadotropina píscia (pGnRH) e por vezes chamada hormona libertadora de hormona luteinizante píscia (pLHRH). Em particular, refere-se a análogos de pGnRH formados por adição à extremidade C da sequência de ácidos aminados da pGnRH nativa de uma curta sequência de ácidos aminados compreendendo um resíduo de cisteína ou tirosina, de modo a que a conformação em solução não é substancialmente modificada, aos seus conjugados com polipeptídeos adequados para criar anticorpos anti-pGnRH e a métodos para imunizar peixes.

A criação comercial de peixes é uma indústria em rápido crescimento a nível mundial. A Europa Ocidental, a América do Norte e do Sul, o Canadá e as costas do Oriente



te são todos grandes produtores de peixe, notavelmente de salmão. Por exemplo, os E.U.A. produziram 185 000 toneladas de salmão em 1989, enquanto o seu mercado de bagre se aproximou destes valores. A Noruega, por outro lado, o maior produtor de salmão do Atlântico na Europa Ocidental, produziram 120 000 toneladas em 1989/90. Calcula-se que o mercado mundial de salmão crescerá a uma média de 7,5% cada ano até ao fim do século e envolverá um volume de negócios no valor de 2000 milhões de libras esterlinas por ano. Prevê-se o desenvolvimento comercial da perca e do rodovalho e, a longo prazo, do halibute e do bacalhau, enquanto presentemente a Europa é o maior produtor de goraz e de perca, sendo a carpa produzida por aquacultura tanto na Europa de Leste como na África.

Em aquacultura há uma grande necessidade de controlar a maturação sexual dos peixes para prevenir o seguinte: desvio do crescimento somático para as gónadas; perda de qualidade da carne; e aparecimento de características sexuais secundárias comercialmente indesejáveis. Isto é particularmente verdadeiro no caso dos salmonídeos, onde a maturação sexual dos alevins de salmão e dos salmões jovens precoces (normalmente estádios imaturos de desenvolvimento) pode ter efeitos económicos graves ao suspender o crescimento do salmão num tamanho não comercial, e obrigando à colheita dos salmões jovens durante um período curto, desta forma reduzindo o seu valor comercial. Adicionalmente, há um desejo para inibir a fertilidade dos peixes de criação se eles se extraviarem dos viveiros e contribuírem para linhagens de genes naturais.

Existem problemas logísticos associados à colheita dos peixes sexualmente maduros. Estes peixes não podem ser vendidos e invariavelmente uma certa percentagem de peixes tornam-se maduros antes dos outros, sendo que os machos têm predominantemente a tendência para a maturação precoce. A separação dos peixes sexualmente maduros dos peixes imaturos é um processo dispendioso e demorado. Uma vez começada a maturação dos peixes, ela decorre mais ou menos ao mesmo tempo e ao mesmo ritmo, o que torna a colheita uma tarefa extremamente difícil. Segue-se que um método para controlar a maturação dos peixes por fases seria claramente um benefício.



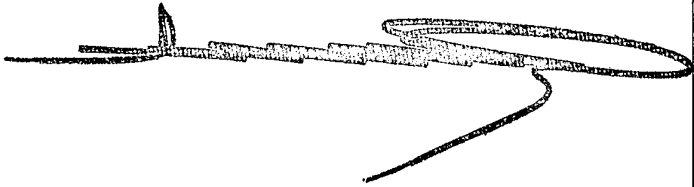
O peso ideal para se proceder à colheita do salmão, por exemplo, muitas vezes não é atingido devido à maturação precoce, obrigando a uma colheita sub-ótima dos peixes. O controlo da maturação evitaria colheitas sub-ótimas e permitiria uma optimização completa do tamanho.

Até agora a forma mais eficaz para assegurar que a maturação sexual não ocorre era a criação de peixes estéreis. Apesar de numerosas tentativas experimentais esta técnica ainda não foi conseguido para populações com dimorfismo sexual.

Vários métodos têm sido usados para controlar a maturação sexual em peixes incluindo a castração cirúrgica, triploidização e controlo do sexo (das quais as duas últimas são técnicas genéticas). Foram feitas tentativas no passado para castrar peixes cirurgicamente mas foram abandonadas devido à grande despesa que implicavam e ao trauma que tais procedimentos provocam nos peixes.

A triploidia é um método que origina a presença de três conjuntos de cromossomas num indivíduo, o que induz a esterilidade nos peixes triplóides, tanto machos como fêmeas. No entanto, existem várias desvantagens associadas à triploidia. Em primeiro lugar, é um processo difícil e demorado que se arrasta durante um longo período. Os ovos para a triploidia têm de ser de alta qualidade para sobreviver aos tratamentos necessários. Embora os peixes resultantes pareçam ser inteiramente viáveis, a taxa de sobrevivência inclui perdas de 15 a 20% em média, sendo o ritmo de crescimento dos peixes triplóides ligeiramente inferior aos dos peixes diplóides fora da época da desova. Durante a preparação para a desova existe uma grande diferença entre os triplóides machos e fêmeas, desenvolvendo os machos testículos quase normais e todas as características sexuais secundárias associadas, enquanto os triplóides fêmeas não desenvolvem ovários significativos e têm uma aparência juvenil durante o tempo natural de desova.

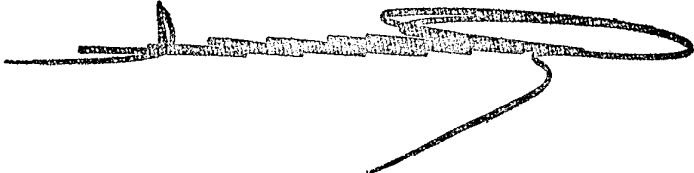
A aplicação com sucesso da triploidia induzida requer a combinação desta com uma técnica exclusiva das fêmeas, que não é comercialmente económica. São também desvantagens associadas aos triplóides o facto de estes não cresce



rem bem em competição com diplóides no mesmo tanque, e as fêmeas triplóides não tendem a mostrar qualquer superioridade no crescimento sobre fêmeas diplóides em maturação.

Os peixes são altamente dimórficos, isto é, podem mudar de macho para fêmea e vice-versa, e a mudança de sexo pode ser controlada. Um dos sexos é normalmente preferível para propósitos de criação, por exemplo do ponto de vista da velocidade de crescimento. O rodovalho e a enguia são exemplos de peixes em que as fêmeas crescem até tamanhos muito superiores aos dos machos. Nas espécies salmonídeas os machos e as fêmeas juvenis crescem mais ou menos à mesma velocidade, mas os machos desenvolvem mais tarde características indesejáveis. Na maturação, os machos param de crescer, perdem a cor, tornam-se agressivos e são de fraco valor, seja para fins de alimentação ou desportivos. Igualmente, os machos em maturação da truta arco-íris de criação e das espécies de salmão do Atlântico, uma vez colocados numa cultura de água do mar, não conseguem efectuar os ajustamentos necessários à água salgada e morrem. Um método de mudança de sexo para obter populações exclusivamente compostas de fêmeas pode ser aplicado, mas envolve a incorporação de hormonas na alimentação dos peixes, tornando estes peixes inadequados para comida. Outros métodos para controlar a fertilidade dos peixes, tais como irradiação, quimioesterilização e administração de hormonas, têm-se mostrado até agora pouco seguros e economicamente desvantajosos ou inadequados para uso em peixes destinados à mesa.

Métodos imunológicos para controlar a maturação sexual têm apresentado alguns sucessos em mamíferos. No entanto, os estudos das respostas hormonais e imunológicas de mamíferos não podem formar uma base firme para a investigação da fisiologia pífcea. Os peixes são animais de sangue frio e o seu sistema imunitário varia sob diferentes condições. A temperatura tem um efeito marcado nas respostas imunitárias nos peixes, sendo que quanto mais alta é a temperatura dentro da gama fisiológica, mais alto é o nível da resposta imunológica. Temperaturas fisiologicamente baixas retardam a taxa de produção de anticorpos e podem inibir o estabelecimento da memória imunológica, onde os linfócitos T parecem ser particularmente



sensíveis.

Para além disso, o sistema imunitário dos peixes é influenciado por hormonas que podem variar sazonalmente. Os níveis de hormonas são modificados pelo stress implicado pelo manuseamento e transferência dos peixes, ou por fraca qualidade da água, como no caso de um baixo conteúdo em oxigénio. Durante a transformação fisiológica do salmão que acompanha naturalmente a sua primeira descida ao mar e a maturação sexual, dois períodos de profundas mudanças hormonais, os peixes são mais vulneráveis às doenças, devido a uma redução no número de linfócitos.

Adicionalmente, os peixes apenas produzem um tipo de moléculas de anticorpo, IgM, enquanto nos mamíferos foram já identificadas cinco classes principais de anticorpos.

Igualmente, o sistema endócrino dos peixes é substancialmente diferente do dos mamíferos. Por exemplo a hormona libertadora da gonadotropina, que é produzida por salmonídeos, tais como o salmão e a truta por exemplo, tem a sequência:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH₂ (Sherwood et al, 1983; "Characterisation of a teleost GnRH", PNAS USA 80: 2794-2798) que difere nas posições 7 e 8 quando comparada com a LHRH de mamífero.

Descobrimos agora uma classe de análogos de GnRH pífcea que pode ser conjugada com uma molécula portadora adequada e usada para imunizar peixes de tal forma que os anticorpos surgidos contra o imunogénio reagem entre si com alta afinidade e neutralizam a GnRH endógena.

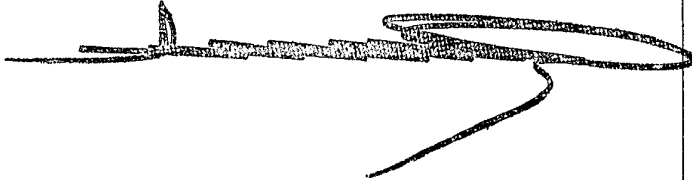
De acordo com um aspecto da presente invenção, é proporcionado um análogo da GnRH pífcea com a seguinte sequência de ácidos aminados:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z em que W representa Gly ou um ácido aminado D,

X representa uma ligação, ou um ou mais ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes,

Y representa Cys ou Tyr ou está ausente,

e



Z está ausente ou representa um ou mais ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes ou uma cadeia peptídica contínua ou descontínua, sendo a ou cada descontinuidade uma porção ligante polifuncional de um ácido aminado não α ou de um ácido aminado retro-inverso com a condição de que quando W é Gly e X e Y estão ausentes Z está presente.

De preferência, o resíduo na posição W é Gly, que é o resíduo que ocorre naturalmente, e o resíduo que maior vantagem oferece na posição Y é Cys, porque proporciona uma conjugação mais específica e conveniente com uma proteína portadora que pode ser obtida com um Tyr C-terminal.

De preferência X representa um número relativamente pequeno de resíduos, por exemplo um a quinze, de preferência, um a oito, de modo especialmente preferido um a três e de modo ainda mais especialmente preferido apenas um. Apesar de poder estar presentes na posição X qualquer ácido aminado ou vários ácidos aminados, Gly é o resíduo de ácido aminado preferido. Naturalmente, outros ácidos aminados, de preferência com pequenas cadeias laterais tais como Ala, Ser, Asn e Val, podem estar presentes na posição X e qualquer resíduo de ácido aminado nesta posição está incluído dentro do âmbito da presente invenção. Deve-se também notar que quando mais do que um resíduo está incluído na posição X, os resíduos podem ser iguais ou diferentes, tal como por exemplo:

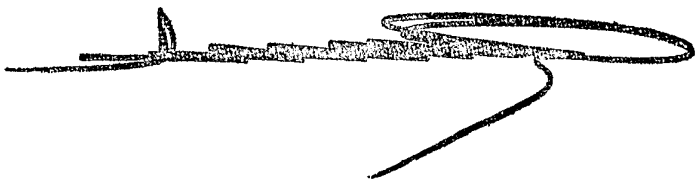
pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-Gly-Ala-Y-Z.

Deve ficar claro que as pGnRH nas quais nenhum resíduo de ácido aminado ocorre na posição X estão incluídas dentro do âmbito da presente invenção.

Em formas de concretização preferidas da pGnRH de acordo com a presente invenção, não existe nenhum resíduo de ácido aminado na posição Z e uma forma de concretização particularmente preferida do análogo de acordo com a presente invenção tem a seguinte sequência:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-Gly-Cys.

No entanto, os nossos estudos mostraram que a inclusão de ácidos aminados adicionais na posição Z não vai ter de uma maneira geral efeitos significativos nas preferências de conformação da parte restante da molécula. Se uma



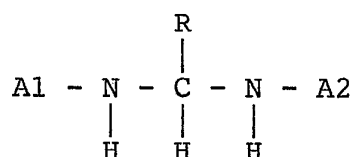
tal extensão em Z for incluída, então em formas de concretização preferidas da presente invenção, a extensão irá incluir um ou mais segmentos de sequência de proteína com a capacidade de actuar como um epítopo de célula T. Por exemplo, segmentos de sequência de ácidos aminados da fórmula geral 1-2-3-4, em que 1 é Gly ou um ácido aminado carregado (por exemplo Lys, His, Arg, Asp ou Glu), 2 é um ácido aminado hidrófobo (por exemplo Ile, Leu, Val, Met, Tyr, Phe, Trp, Ala), 3 pode ser ou um ácido aminado hidrófobo (conforme definido acima) ou um ácido aminado polar não carregado (por exemplo Asn, Ser, Thr, Pro, Gln, Gly) e 4 é um ácido aminado polar (por exemplo Lys, Arg, His, Glu, Asp, Asn, Gln, Ser, Thr, Pro), parecem actuar como epítopos de células T pelo menos nalguns casos (Rothbard, J.B. & Taylor, W.R. (1988). Um padrão de sequências em comum com os epítopos de células T. The EMBO Journal 7(1): 93-100). De modo semelhante os segmentos podem apresentar a sequência 1'-2'-3'-4'-5', em que 1' é equivalente a 1 conforme definido anteriormente, 2' a 2, 3' e 4' a 3, e 5' a 4 (ibid). Ambas as formas estão incluídas numa forma geral conforme definido em baixo:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-S-T-S',

em que T denota um segmento da sequência peptídica contendo um ou mais epítopos de células T (de preferência menos do que cinco) que podem ser do tipo definido no parágrafo anterior ou podem ser de outra estrutura e que podem ser separados por segmentos espaçadores de qualquer comprimento e qualquer composição, e S e S' (podendo qualquer dos quais ser opcionalmente e independentemente omitido) representam segmentos espaçadores de sequência de ácidos aminados de qualquer comprimento e qualquer composição. De preferência, S compreende menos do que cinco resíduos de ácidos aminados em comprimento e compreende por exemplo resíduos seleccionados de entre Gly, Ala, Pro, Asn, Thr, Ser ou ligantes polifuncionais tais como ácidos aminados não α . S' é de preferência menos do que dez resíduos de ácidos aminados e pode incluir ligantes polifuncionais tais como ácidos aminados não α . As porções de S' são de preferência retiradas do grupo definido anteriormente para S. É possível que S' represente uma proteína completa, obviando deste modo a necessidade de conjugação com uma proteína portadora.

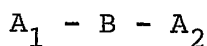
Deve-se notar que quando Z está ausente, os epítomos de células T supramencionados podem ocorrer na posição X.

Estão também incluídos dentro do âmbito da presente invenção derivados do análogo básico no qual Z é ou inclui um ácido aminado "retro-inverso", por exemplo uma amina bifuncional possuindo um grupo funcional correspondente a um ácido aminado. Por exemplo um análogo de acordo com a presente invenção e contendo um ácido aminado retro-inverso pode ter a fórmula:



em que R é qualquer grupo funcional, de preferência Gly, e A1 e A2 são de preferência cada um uma cópia de um dos análogos aqui definidos (mas não necessariamente iguais) ligados pela sua extremidade C-terminal. Em formas de concretização particularmente preferidas, o Tyr ou Cys na posição Y em A1 ou A2 devem ser substituídos por qualquer tipo de ácido aminado que não seja o resíduo na posição correspondente da outra cópia, ou alternativamente pode ser omitido. A conjugação deste dímero é assim efectuada através da cadeia lateral de um ou de outro (e opcionalmente de ambos) dos resíduos na posição Y. Alternativamente, A1 e/ou A2 podem ser pGnRH natural e o R do ácido aminado retro-inverso pode ser Cys ou Tyr. Os epítomos da célula T podem opcionalmente ser incluídos no segmento Z conforme discutido anteriormente.

Os análogos podem ter a fórmula:



em que B é um ácido aminado retro-inverso e A₁ e A₂ são iguais ou diferentes e têm a sequência:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z'

em que W, X e Y possuem os significados anteriormente definidos e Z' possui o significado anteriormente definido para Z com a excepção de que não inclui um ácido aminado retro-inverso.

A modificação retro-inversa de peptídeos



envolve a inversão de uma ou mais ligações peptídicas para criar análogos mais resistentes do que a molécula original à degradação enzimática e proporciona uma via conveniente para a geração de imunogênios ramificados que contêm uma alta concentração de epítomos para um imunogênio de dimensão média a grande. A utilização destes compostos em síntese em solução em grande escala de análogos retro-inversos de peptídeos biologicamente activos de cadeia curta possui grandes potencialidades.

Outro aspecto da presente invenção proporciona um processo para a preparação de um análogo de GnRH píceo com a seguinte sequência de ácidos aminados:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z

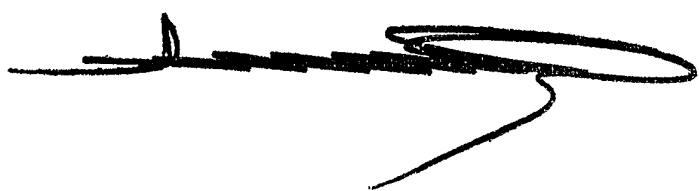
em que W representa Gly ou um ácido aminado D,

X representa uma ligação, ou um ou mais ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes,

Y representa Cys ou Tyr ou está ausente, e

Z está ausente ou representa um ou mais ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes ou uma cadeia peptídica contínua ou descontínua, sendo a ou cada descontinuidade uma porção ligante polifuncional de ácido aminado não α ou um ácido aminado retro-inverso com a condição de que quando W é Gly e X e Y estão ausentes Z está presente, compreendendo o processo as etapas de acoplamento dos resíduos usando técnicas químicas, biológicas e/ou recombinantes conhecidas per se e isolamento do análogo.

Os análogos de acordo com a presente invenção podem ser sintetizados por técnicas de síntese peptídica correntes. Pode por exemplo ser usada a síntese peptídica em fase sólida (SPFS) introduzida por Merrifield em 1963 (J. Am. Chem. Soc. 85, 2149). Neste método, liga-se de forma covalente uma cadeia peptídica que se pretende prolongar através da sua extremidade C a um suporte sólido insolúvel. A síntese é levada a cabo pela adição sucessiva de ácidos aminados na sequência desejada. Todas as etapas intermediárias de purificação, que são necessárias para a síntese na solução, são reduzidas neste caso a simples lavagens, uma vez que a maior parte dos produtos secundários



dários de reacção e de degradação se encontram dissolvidos na mistura de reacção. As vantagens da SPFS são a velocidade, a relativa facilidade de implementação e o facto de ser um método que pode ser parcialmente ou completamente automatizado. É possível produzir várias dezenas de gramas de peptídeo usando SPFS.

A SPFS, de acordo com o seu desenvolvimento por Merrifield em 1963, pode ser brevemente descrita como compreendendo quatro fases:

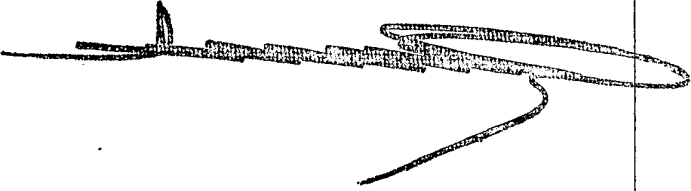
(A) Um primeiro ácido aminado protegido é ligado ao suporte sólido por uma ligação covalente que permanece estável ao longo da síntese;

(B) Um grupo amina livre do resíduo ligado é regenerado por desprotecção sob condições nas quais os grupos protectores de quaisquer grupos funcionais de cadeias laterais são estáveis;

(C) O seguinte ácido aminado protegido é emparelhado com o primeiro por condensação para dar origem à formação de uma ligação amida. Os passos B e C são repetidos até a síntese ficar completa;

(D) No fim da síntese, o peptídeo é libertado do suporte sólido e todos os grupos protectores das cadeias laterais dos ácidos aminados são removidas.

Têm sido descritas na literatura um número considerável de combinações de grupos protectores de ácidos aminados. No entanto, actualmente, só duas dessas combinações são correntemente usadas. A primeira é a combinação de terc-butoxicarbonilo (Boc)/benzilo que foi usada por Merrifield desde 1963 e que continua ainda a ser a mais geralmente utilizada. Mais recentemente, o sistema fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)/terc-butilo, desenvolvido por Sheppard et al, tem registado um campo de aplicação cada vez mais vasto (Sheppard, R C, 1986. Science Tools. The LKB Instrument Journal 33, 9). Exemplos adicionais incluem o método de Fmoc-poliamida usando a resina de fase sólida desenvolvida por Arsady, R. et al (J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1981 1, 529-537), protecção por fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) dos ácidos aminados incorporados (Atherton, E. et al, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1983 L 65-73) e derivados de 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) (ver, por exemplo, Atherton, E et al (1985) J. Chem. Soc. Chem. Comm. 165).

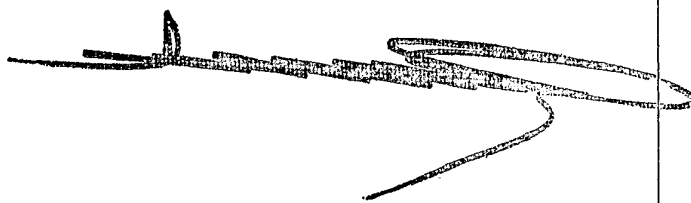


Também se consideram incluídas dentro do âmbito desta invenção as moléculas de ADN e de ARN que codificam, através do código genético, para as sequências de quaisquer dos análogos peptídicos aqui descritos. Moléculas semelhantes têm sido sintetizadas em sistemas idênticos e estão descritas na literatura (ver por exemplo Pedido de Patente Europeia Nº. 85307311.2).

Deve notar-se que os análogos que incorporam derivados de ácidos aminados retro-inversos não podem ser preparados directamente usando um sistema como o referido. No entanto, os análogos básicos podem-no, e podem ser purificados e quimicamente ligados aos ácidos aminados retro-inversos usando química orgânica de peptídeos padrão. Um procedimento novo, prático e conveniente para a síntese em fase sólida em resina do tipo poliamida de peptídeos retro-inversos foi descrita recentemente [Gazerro, H., Pinori, M. & Verdini, A.S. (1990). Um novo procedimento geral para a síntese de fase sólida de peptídeos retro-inversos. In "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis" Ed. Roger Epton. SPCC (UK) Ltd, Birmingham, Reino Unido].

De preferência, o análogo é conjugado com uma molécula portadora para proporcionar um conjugado do análogo. Qualquer portador de pequenas moléculas ou macro-molecular ou microorganismo pode ser usado, mas os seguintes são preferidos entre os portadores convencionais: hemocianina de Megathura crenulata (KLH), albumina de soro de bovino (BSA), gamaglobulina de galinha (CGG), toxóide do tétano (TT), toxóide da difteria (DPT), derivado de proteína purificada de tuberculina (PPD), dipeptídeo de muramil (MDP), inibidor de tripsina de soja (STI), e toxina da cólera ou a sua subunidade B. Note-se que a iniciação com a vacina BCG pode ser vantajosa no caso da PPD (Lachmann, P. et al., 1986. In "Synthetic Peptides as Antigens", Ciba Foundation Symposium 119 pp. 25-40).

São particularmente preferidos como portadores para os análogos de LHRH aquando da autoimunização dos peixes os seguintes microorganismos ou seus antigénios macro-moleculares que são componentes das vacinas para peixes: Aeromonas salmonicida (furunculose), Yersinia ruckeri (ERM) e uma mistura



de Vibrio anguillarum e Vibrio ordalii (vibriose).

Recentemente, foram ensaiados cinco tipos básicos de vacina para protecção contra a furunculose que é causada pelas bactérias não móveis Gram-negativas Aeromonas salmonicida: células inteiras mortas ou desintegradas (bacterinas), produtos celulares extra (ECP) e toxóides de ECP, células inteiras mortas em combinação com ECP, vacinas vivas atenuadas e antigénios purificados. Para além disso, têm sido usados para protecção pífcea soros hiperimunes, para certos antigénios, criados em peixes ou mamíferos. Igualmente, tem sido produzida uma vacina com sucesso (ou bacteriana) contra a "redmouth" entérica (ERM) causada pela bactéria móvel gram-negativa Yersinia ruckeri que compreende culturas bacterianas completas inactivadas por formalina. As vacinas comerciais da vibriose correntes no hemisfério norte contêm misturas das espécies mais comuns, V. anguillarum e V. ordalii. Estas vacinas são culturas inactivadas simples contendo misturas de células inteiras e ECP.

Um aspecto adicional da presente invenção proporciona uma vacina compreendendo um análogo ou um conjugado de um análogo da pGnRH, de acordo com a presente invenção, e um excipiente aceitável do ponto de vista veterinário.

Estas vacinas podem ser usadas para autoimunizar os peixes, e um aspecto adicional da presente invenção proporciona um método para inibir o desenvolvimento sexual em peixes que compreende a administração de um análogo ou um conjugado de um análogo da pGnRH aos referidos peixes numa quantidade eficaz para produzir um teor de anticorpos anti-pGnRH suficiente para reduzir significativamente a eficácia biológica da pGnRH endógena.

A conjugação de análogos contendo Cys ou Tyr na posição Y pode facilmente ser feita usando reagentes e procedimentos bem descritos na literatura. Por exemplo, a N-8-maleimidobutiriloxissuccinimida (Calbiochem) pode ser usada para conjugar através de uma ligação de tioéter análogos de GnRH pífcea contendo um resíduo de Cys na posição Y a cadeias laterais de lisina da proteína portadora, enquanto uma ligação de diazo pode ser formada com N-(4-diazofenil)-maleimida para a conjugação de análogos contendo um resíduo de Tyr na posição Y.



Os peptídeos e os conjugados podem rapidamente ser purificados até ao grau necessário usando métodos bem conhecidos da técnica incluindo, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência, electroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio-poliacrilamida e cromatografia líquida de rápido desempenho.

O conjugado portador de peptídeos de acordo com a presente invenção pode ser usado para o seguinte:-

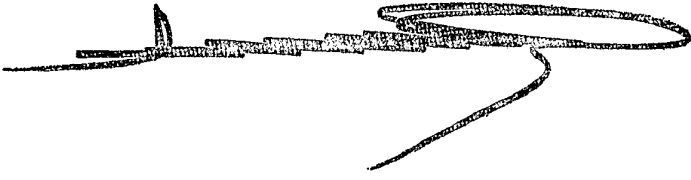
- 1) Imunizar qualquer animal para desenvolver anticorpos anti-GnRH pífcea para usos especificados em seguida;
- 2) Autoimunizar peixes contra a GnRH com o fim de:
 - tornar mais lento, suspender ou inverter o desenvolvimento sexual
 - controlar, limitar ou eliminar a fertilidade
 - tratar tumores pífceos dependentes da GnRH
 - empreender investigações fisiológica/veterinárias pífceas;
- 3) Como agente de diagnóstico para a presença de anticorpos anti-GnRH pífcea em, por exemplo, amostras de soro.

Fazem também parte da presente invenção anticorpos anti-GnRH pífcea desenvolvidos contra o análogo. Podem ser usados por exemplo:-

- 1) Como elementos de investigação para explorar a fisiologia/-imunologia pífcea;
- 2) Como imunogénios para desenvolver anticorpos anti-idiótipo;
- 3) Para imunização passiva com o fim de:
 - alcançar retardamento, suspensão ou regressão efémeros no desenvolvimento sexual
 - realizar um controlo efémero de fertilidade
 - tratar tumores pífceos dependentes da GnRH
 - interferir por outras formas com a actividade da GnRH pífcea

(A imunização passiva pode ser efectuada através de administração de anticorpos policlonais, monoclonais ou de domínio simples criados em espécies de peixes ou de mamíferos) e

- 4) Como agentes de diagnóstico para a presença de GnRH pífcea em, por exemplo, amostras de soro.



É evidente que os anticorpos anti-idiótipo mencionados anteriormente em 2) são parte da presente invenção.

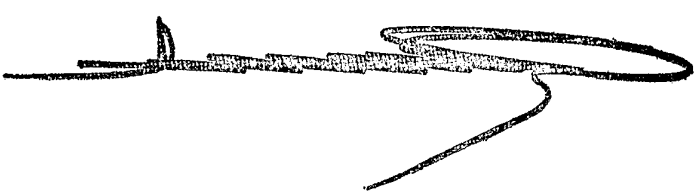
A preparação de anticorpos policlonais ou monoclonais, de formas quiméricas e piscizadas de tais anticorpos (ver, por exemplo, Morrison et al. (1984) PNAS (USA) 81, 6851-6855; Riechmann et al. (1988) Nature 332, 323-327) e de anticorpos de domínio simples (ver, por exemplo, Ward, E.S., Gussow, D., Griffiths, A.D., Jones, P. e Winter, G. (1989) Nature 341 544-546), que se ligam especificamente a um polipeptídeo sintético de acordo com a presente invenção, pode ser levada a cabo por meios convencionais e, conforme referido anteriormente, tais anticorpos são considerados como fazendo parte da presente invenção.

No que respeita à detecção de anticorpos anti-GnRH píceas ou de GnRH píceas, o especialista na matéria aperceber-se-á de uma variedade de técnicas de análise imunológica conhecidas da técnica, inter alia, análise de sanduíche, análises competitiva e não competitiva e o uso de marcação directa e indirecta. De preferência, um conjunto ("kit") para a detecção de anticorpos anti-GnRH píceas compreenderá um análogo ou um conjugado de um análogo de acordo com a presente invenção, meios para a marcação e um suporte sólido.

Existem vários métodos para a administração de vacinas a peixes: por exemplo por injeção, por via oral e por imersão.

A injeção intraperitoneal é o método mais eficaz de vacinação e adicionalmente permite o uso de adjuvantes que aumentam a magnitude da resposta imunológica. As desvantagens são a necessidade de anestésiar e manusear os peixes, o que causa stress e ocupa muita mão de obra. No entanto, usando seringas repetidoras e uma linha de produção em série, é possível injectar 1000 peixes por hora. No entanto, não pode ser usado em peixes muito abaixo de 15 g.

A vacinação oral é adequada para administração em massa a peixes de todos os tamanhos e não implica stress devido ao manuseamento. No entanto, existem limitações intrínsecas por serem necessárias grandes quantidades de vaci-



nas, aumentando o custo e a incerteza quanto à dosagem individual. As vacinas orais têm fraca potência o que tem como resultado níveis de protecção baixos ou inconsistentes. Muito do trabalho de administração oral tem sido levado a cabo com vacinas para a vibriose.

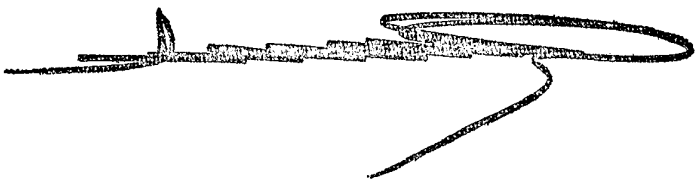
A Imersão Directa (I.D.), que é a técnica preferida, é simples e rápida necessitando apenas de alguns segundos de exposição à vacina. Este método está agora automatizado e foi desenvolvida uma modalidade de 'banho' ou 'jacto' para as vacinas da vibriose e EMR, e implica simplesmente verter a vacina para tanques contentores. Apesar de este método consumir maior quantidade de vacina e necessitar de uma exposição mais longa (cerca de uma hora), que implica oxigenação da água e uma vigilância atenta dos peixes para evitar o stress, não necessita de tanta mão de obra como a injeção.

Pode ser vantajoso imunizar com uma mistura contendo (i) um determinado conjugado de um análogo com mais do que um tipo de molécula portadora, e/ou (ii) mais do que um tipo de conjugados de análogos com a mesma molécula portadora. Para além disso, qualquer dos análogos peptídicos, os seus conjugados ou respectivas misturas podem ser administrados em qualquer adjuvante adequado ou sistema de administração, e mais do que um adjuvante ou sistema de administração podem ser combinados para formar uma denominada "super-mistura". Os adjuvantes e sistemas de administração preferidos incluem hidróxido de alumínio, microesferas, lipossomas, micélios, niossomas, ISCOMS, lipoproteína de Brauns e células completas ou componentes de vacinas de peixes microbianas.

A presente invenção será agora descrita por meio de exemplos não restritivos.

EXEMPLO 1

Uma forma prolongada na extremidade carboxi de pGnRH de acordo com a presente invenção é sintetizada usando metodologias Fmoc de fase sólida padrão. O peptídeo é cindido a partir da resina na presença de ácido trifluoroacético e efectua-se a purificação subsequente por filtração de gel,



cromatografia de permuta iônica e cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa. O peptídeo é conjugado com uma variedade de portadores por MBS (éster de m-maleimida de benzoil-N-hidroxisuccinimida).

Já foi demonstrado que a gamaglobulina de galinha (CGG) é um bom portador na truta arco-íris para outras vacinas e é usada neste exemplo. Usa-se igualmente PPD uma vez que é um portador comprovado em estudos com mamíferos (apesar de ser necessária imunização prévia com BCG).

O análogo de pGnRH é acoplado com o portador numa razão molar de peptídeo:proteína de 30-40:1 e injetam-se três concentrações diferentes intraperitonealmente na truta arco-íris.

A resposta do anticorpo do soro resultante é monitorizada semanalmente durante 10 semanas por análise imunológica de enzimas (ELISA) usando Ig anti-truta monoclonal conjugada com Peroxidase de Rábano Bastardo (HRP). Nalguns testes neste exemplo são efectuadas preimunizações com portador ou por meio de adjuvantes ou injeções de reforço com o fim de determinar um protocolo óptimo para a produção de anticorpos anti-pGnRH.

EXEMPLO 2

O protocolo óptimo determinado no Exemplo 1 é usado para imunizar um grupo de trutas arco-íris potencialmente em maturação. A resposta do anticorpo é monitorizada como no Exemplo 1 juntamente com monitorização da velocidade de crescimento e da produção de esteróides sexuais (por exemplo testosterona). No fim da experiência os peixes são mortos, as gónadas removidas e pesadas para determinar o índice gonadosso-mático (GSI). As gónadas são então fixadas para posterior estudo histológico por microscopia óptica. Os peixes imunizados apresentam um GSI significativamente melhor que o de peixes de controlo não tratados.



EXEMPLO 3

Imunização da truta arco-íris em maturação com o análogo prolongado da hormona dos salmonídeos libertadora da gonadotropina acoplado com derivado de proteína purificado da tuberculina (sGnRHa-PPD).

Métodos

a) Conjugação de sGnRH-Gly-Cys com PPD

Dialisou-se de um dia para o outro PPD de tuberculina (1,008 mg/ml + conservante de fenol, Evans Limited) em condutas de celulose benziolada contra NaCl a 0,9% à temperatura de 12°C para remover o fenol. O PPD foi então concentrado a 4,032 mg/ml com polietileno-glicol (PG 20000) durante 1,5 horas. A solução de PPD (2,5 ml contendo 10,08 mg de PPD) foi misturada durante 1 hora à temperatura ambiente com 1,08 mg de N-maleimidobutiriloxissuccinimida (GMBS) em 5,04 µl de dimetil-formamida (DMF) e em seguida foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-25M PD-10 e foi eluída com 3,5 ml de Tampão A (NaH_2PO_4 0,05 M, NaCl 0,14 M, pH 7,0). Adicionados ao PPD gota a gota 4,687 ml de sGnRH-Gly-Cys 3 mg/ml dissolvida em água destilada e em seguida Tampão A (isto é 14,0616 mg de sGnRH-Gly-Cys). A solução foi misturada durante 2 horas à temperatura ambiente sob nitrogênio e determinou-se de forma contínua o conteúdo em tiol livre. O conjugado foi dialisado de um dia para o outro contra água destilada em condutas de celulose benziolada a 12°C e em seguida armazenou-se a -20°C até ser necessário.

b) Análise de Tiol Livre

O conteúdo em tiol livre do conjugado foi determinado usando o reagente 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e padrões de glutatíon reduzido. Usou-se uma versão reduzida da análise de Ellman em placa de micro-titulação, na qual se adicionaram 2 µl de DTNB 10 mM e 250 µl de PBS (pH8) a 50 µl da amostra e se determinou a absorção a 405 nm após 10 minutos.

c) Truta arco-íris e regime de imunização

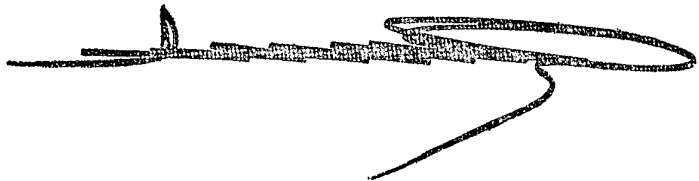
Cento e trinta trutas arco-íris em maturação (comprimento $\approx$ 30 cm) foram marcadas individualmente usando várias combinações de marcas de congelação. Anotou-se o comprimento e o peso de cada peixe e colheu-se uma amostra de san-gue de 600 μ l para determinar níveis de anticorpo de soro de preimunização. Para além disso, analisaram-se os níveis de este-róide do soro para determinar o sexo do peixe. Os peixes foram divididos em dois grupos e receberam sGnRH-Gly-Cys-PPD ou sali-na administrada intraperitonealmente em Adjuvante Completo de Freund (FCA). Os grupos tratados e de controlo foram divididos em machos e fêmeas. Os machos foram mantidos à luz e temperatu-ra ambientes. As fêmeas foram ainda subdivididas em dois grupos: um à luz e temperatura ambientes (com variações mas a 14°C ou abaixo desta temperatura) e o outro à luz ambiente e a 14°C. Os peixes no último grupo foram usados para avaliar o efeito da temperatura nos títulos do anticorpo anti-sGnRH-Gly-Cys e quais quer diferenças resultantes na maturação dos peixes. Ao longo da experiência, em quatro intervalos semanais, pesaram-se e sangraram-se os peixes marcados individualmente. Os soros foram analisados para determinação do anticorpo Anti-sGnRH-Gly-Cys por ELISA (usando sGnRH-Gly-Cys-BSA) e das hormonas esteróides 17- β -estradiol e/ou 11-cetotestosterona por RIA.

d) Análise de esteróides

Determinaram-se as concentrações de 17- β -estradiol (E2) e de 11-cetotestosterona (11-CT) em soros de peixes em maturação por análises radioimunológicas. Nesta análise um esteróide marcado por isótopos radioactivos liga-se a uma quantidade limitada de anticorpo específico do esteróide, e esta interacção é parcialmente inibida pela adição de esteróide não marcado.

e) Optimização de análise por ELISA para determinação de anti-sGnRH-Gly-Cys

Conjugou-se GnRH-Gly-Cys de salmonídeo com Albumina de Soro de Bovino (BSA) para uso em análise por ELISA. Combinaram-se 10 mg de BSA em 0,5 ml de Tampão A mais 1



mg de GMBS em 5 ul de DMF e em seguida conjugaram-se com 6,246 mg de sGnRH-Gly-Cys. Análises de ELISA em tabuleiro de xadrez permitiram a escolha de uma concentração de revestimento de sGnRH-Gly-Cys-BSA adequada para a ELISA para a determinação de anti-sGnRH-Gly-Cys na experiência de maturação.

Resultados

i) Títulos dos anticorpos anti-sGnRH-Gly-Cys

Os títulos dos anticorpos anti-sGnRH-Gly-Cys 8 semanas após a imunização com sGnRH-Gly-Cys-PPD (20 ug de sGnRH-Gly-Cys/peixe, i.p. em FCA) aumentaram em relação ao grupo de controlo conforme é evidenciado no Quadro 1 (machos e fêmeas).

Quadro 1: Títulos médios dos anticorpos anti-sGnRH-Gly-Cys ($\log_2 \pm EP$)

	4 semanas após a imunização	8 semanas após a imunização
Grupo de sGnRH-Gly-Cys-PPD, n = 65	1,42 $\pm$ 0,17	4,33 $\pm$ 0,37
Grupo de controlo, n = 65	1,03 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,08

ii) Níveis de soro de 17- β -estradiol durante a maturação da truta arco-íris: efeito da imunização com sGnRH-Gly-Cys-PPD

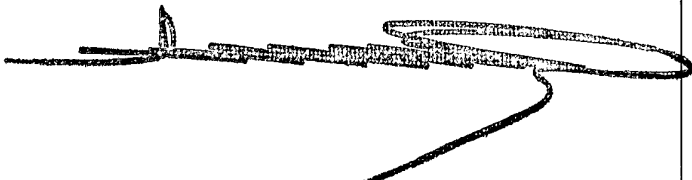
Os níveis de soro de 17- β -estradiol continuaram a aumentar na truta fêmea em maturação à mesma velocidade no grupo tratado e no grupo de controlo até 4 semanas após a imunização, conforme é mostrado no Quadro 2. 8 semanas após a imunização, o nível de 17- β -estradiol no grupo de controlo continuava a aumentar à mesma velocidade. No entanto, o grupo de fêmeas em maturação com sGnRH-Gly-Cys-PPD tinha níveis de 17- β -estradiol significativamente mais baixos do que as fêmeas em maturação de controlo ($p < 0,05$: teste t) 8 semanas após a imunização.

Quadro 2: Níveis médios de soro de 17- β -estradiol (ng/ml $\pm$ EP) durante a maturação da truta arco-íris e efeito da imunização com sGnRH α -PPD

	Antes da imunização	4 semanas após a imunização	8 semanas após a imunização
grupo de tratado	7,35 $\pm$ 0,77 n = 26	16,85 $\pm$ 1,57 n = 23	21,04 $\pm$ 2,29 n = 23
GRupo de controlo	5,85 $\pm$ 0,39 n = 23	16,36 $\pm$ 1,33 n = 21	28,38 $\pm$ 2,61 n = 18

iii) Correlação entre os títulos dos anticorpos e os níveis de esteróides.

Torna-se evidente que o incremento nos títulos dos anticorpos após a imunização com sGnRH-Gly-Cys-PPD tem uma correlação com um incremento significativamente mais reduzido nos níveis no soro de 17- β -estradiol em trutas arco-íris em maturação. Os dados mostram que o pGnRH-Gly-Cys-PPD possui uma actividade retardadora do começo da maturidade sexual na truta arco-íris fêmea.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Análogo de GnRH (hormona de libertação de gonadotropina pífcea) caracterizado por possuir a sequência de ácidos aminados:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z
em que W representa Gly ou um ácido aminado D,

X representa uma ligação ou um ou vários ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes,

Y representa Cys ou Tyr ou está ausente, e

Z está ausente ou representa um ou vários ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes ou uma cadeia peptídica continua ou descontínua, sendo a descontinuidade ou cada descontinuidade uma fracção ligante polifuncional não formada por ácidos aminados α ou um ácido aminado retro-inverso com a condição de que quando W e Gly e X e Y estão ausentes Z está presente.

- 2ª -

Análogo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por W ser Gly.

- 3ª -

Análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2, caracterizado por Y ser Cys.

- 4ª -

Análogo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por X ser um ou vários resíduos de glicina.

- 5ª -

- 21 -



- 5a -

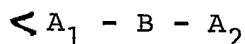
Análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizado por X ou Y conterem pelo menos um epítopo de uma célula T.

- 6a -

Análogo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por Z conter um ácido aminado retro-inverso.

- 7a -

Análogo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por ter a fórmula:



em que B é um ácido aminado retro-inverso e A_1 e A_2 são iguais ou diferentes e possuem a sequência:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z'

em que W, X e Y possuem os significados anteriormente definidos na reivindicação 1 e Z' possui o significado anteriormente definido para Z na reivindicação 1 excepto em que não inclui um acido aminado retro-inverso.

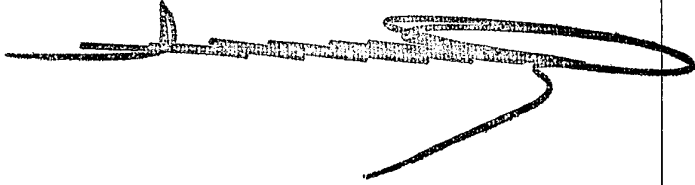
- 8a -

Análogo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a sequência:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-Gly-Cys.

- 9a -

Análogo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por estar conjugado com
• uma molécula de suporte.
•
•



- 10ª -

Vacina caracterizada por conter um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 ou um análogo conjugado de acordo com a reivindicação 9 em conjunto com um excipiente veterinário aceitável.

- 11ª -

Conjunto (kit) para a detecção de anticorpos anti-GnRH píscea numa amostra caracterizado por conter um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 ou um análogo conjugado de acordo com a reivindicação 9, meios de rotulagem e um suporte sólido.

- 12ª -

Utilização de um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 9 para a preparação de um medicamento para retardar, fazer parar ou fazer regredir o desenvolvimento sexual em peixes ou para controlar a fertilidade de peixes.

- 13ª -

Processo para a preparação de um análogo de GnRH píscea que possui a sequência de ácidos aminados:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z

em que W representa Gly ou um ácido aminado D,

X representa uma ligação ou um ou vários ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes,

Y representa Cys ou Tyr ou está ausente, e

Z está ausente ou representa um ou vários ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes ou uma cadeia peptídica contínua ou descontínua, sendo a descontinuidade ou cada descontinuidade uma fracção ligante polifuncional não formada por ácidos aminados α ou um ácido aminado retro-inverso com a condição de que quando W é Gly e X e Y estão ausentes Z está presente,



caracterizado por compreender as fases de acoplar os resíduos usando técnicas químicas, biológicas e/ou recombinantes conhecidas em si e isolar o análogo.

- 14a -

ADN que codifica para um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 5 ou com a reivindicação 8, caracterizado por o análogo ser uma cadeia peptídica contínua.

- 15a -

Anticorpo ou um fragmento de ligação de um antigênio caracterizado por se ligar de modo específico a um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8.

- 16a -

Conjunto (kit) para a detecção de GnRH pífcea numa amostra caracterizado por conter um anticorpo ou um fragmento de ligação de um antigênio de acordo com a reivindicação 15, meios de rotulagem e um suporte sólido.

- 17a -

Utilização de um anticorpo ou de um fragmento de ligação de um antigênio de acordo com a reivindicação 15 para a preparação de um medicamento para retardar, fazer parar ou fazer regredir o desenvolvimento sexual em peixes ou para controlar a fertilidade de peixes.

- 18a -

Processo para a preparação de um anticorpo ou de um fragmento de ligação de um antigênio de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por compreender a imunização de um animal com um análogo de acordo com qualquer das rei-

vindicações 1 a 8 ou um análogo conjugado de acordo com a reivindicação 9 e o isolamento do anticorpo formado ou das células que produzem o anticorpo.

- 19a -

Anticorpos anti-idiotipo caracterizado por serem específicos em relação a um anticorpo ou a um fragmento de ligação de um antígeno de acordo com a reivindicação 15.

- 20a -

Processo para a imunização de um peixe em relação a GnRH pífcea a fim de retardar, fazer parar ou fazer regredir o desenvolvimento sexual, ou controlar, limitar ou eliminar a fertilidade caracterizado por compreender a fase de administrar ao peixe uma quantidade eficaz de um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 ou um análogo conjugado de acordo com a reivindicação 9 ou um anticorpo ou um fragmento de ligação de um antígeno de acordo com a reivindicação 15.

- 21a -

Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por se imergir o peixe em água que contem um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 ou um análogo conjugado de acordo com a reivindicação 9 ou um anticorpo ou um fragmento de ligação de um antígeno de acordo com a reivindicação 15.

- 22a -

Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por se administrar oralmente um análogo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 ou um análogo conjugado de acordo com a reivindicação 9 ou um anticorpo ou um fragmento de ligação de um antígeno de acordo com a reivindica

ção 15.

A requerente reivindica a prioridade do pedido britânico apresentado em 9 de Janeiro de 1991, sob o Nº. 9100468-9.

Lisboa, 8 de Janeiro de 1992.

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

RESUMO

"ANÁLOGOS DA HORMONA DE LIBERTAÇÃO DE GONADOTROPINA PÍSCEA E
VACINAS E COMPOSIÇÕES VETERINÁRIAS QUE OS CONTEM E PROCESSO
PARA A SUA PREPARAÇÃO"

A invenção refere-se a análogos de GnRH (hormona de libertação de gonadotropina) píscea caracterizados por possuírem a sequência de ácidos aminados:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-W-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-X-Y-Z

em que W representa Gly ou um ácido aminado D,

X representa uma ligação ou um ou vários ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes,

Y representa Cys ou Tyr ou está ausente, e

Z está ausente ou representa um ou vários ácidos aminados que podem ser iguais ou diferentes ou uma cadeia peptídica contínua ou descontínua, sendo a descontinuidade ou cada descontinuidade uma fracção ligante polifuncional não formada por ácidos aminados ou um ácido aminado retro-inverso com a condição de que quando W e Gly e X e Y estão ausentes Z está presente, bem como ao processo para a sua preparação.

O análogo pode ser conjugado com um suporte e usado, por exemplo, a fim de retardar a ocorrência da maturação sexual e promover o crescimento.

•
•
•