



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 402**

51 Int. Cl.:

C07K 7/23 (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 38/09 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01975026 .4**

86 Fecha de presentación : **11.09.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1317478**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

54 Título: **Discriminación entre GnRH-I y GnRH-II.**

30 Prioridad: **12.09.2000 US 659983**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **PEPSCAN SYSTEMS B.V.**
Edelhertweg 15
8219 PH Lelystad, NL

72 Inventor/es: **Meloen, Robert, Hans;**
Oonk, Hendrica, Berendina y
Turkstra, Jouwert, Anne

74 Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

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

DESCRIPCIÓN

Discriminación entre GnRH-I y GnRH-II.

5 La invención se refiere a isoformas de GnRH. La GnRH-I (descrita habitualmente en la literatura como GnRH) es un pequeño péptido, con una longitud de 10 aminoácidos (decapéptido), procedente del hipotálamo. La secuencia de aminoácidos GnRH-I (SEQ ID NO:1) se puede presentar por el siguiente código de tres letras:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

10 o el código correspondiente de una letra, donde pE es ácido piroglutámico y # es amida

pE H W S Y G L R P G #

15 La GnRH-I actúa en la hipófisis induciendo un aumento de la liberación de Hormona Estimulante del Folículo biológicamente activa (FSH) y de Hormona Luteizante (LH) en la sangre, las cuales a su vez estimulan el desarrollo de los testículos y la síntesis de esteroides testiculares en los animales macho en crecimiento. En los animales hembra en crecimiento, se estimula el desarrollo de los ovarios y los folículos en su interior, la síntesis de esteroides ováricos y la ovulación.

20 Se sabe que la GnRH-I, cuando se acopla a una proteína de soporte, puede utilizarse para vacunar animales. Dicha vacunación puede realizarse por razones diferentes, que están relacionadas con la función natural de la GnRH-I. Como se sabe, una reducción drástica de la LH y/o la FSH en la sangre inhiben la producción de esteroides testiculares o andrógenos y de esperma en los testículos del macho, y la formación de esteroides ováricos o progestágenos y de estrógenos y la maduración del folículo en el ovario de las hembras. Dicha reducción en las cantidades de andrógenos, progestágenos y estrógenos en la sangre, hasta un nivel comparable al que se puede obtener quitando los testículos o los ovarios mediante castración, se puede conseguir inmunizando de modo efectivo el animal contra la GnRH-I. En los animales machos, en muchos casos, los testículos parecen desarrollarse lentamente o no desarrollarse en absoluto, con ausencia de síntesis de andrógenos (hormonas esteroideas masculinas) y ausencia de formación de espermatozoides.

30 En los animales hembra, la actividad de los ovarios parece disminuir, con la ausencia de síntesis de estrógenos y progestágenos (hormonas esteroideas femeninas), e inhibición de la maduración de los folículos y la ovulación.

Recientemente se ha comunicado en un informe, que se encuentra presente una segunda forma de GnRH (GnRH-II) en el cerebro de primates (Lescheid *et al.* Endocrinol. 138 (1997) 5618-5629) y que se clonó un gen para esta segunda molécula de GnRH a partir de una biblioteca genética humana (GnRH-II, (SEQ ID NO:2) (White *et al.* PNAS USA 95 (1998) 305-309). La GnRH-I de mamíferos (SEQ ID NO:1) apenas se expresa fuera del cerebro. Se conocen al respecto unas pocas excepciones. La GnRH I se encuentra presente en el endometrio de mujeres con ciclo menstrual (Casan *et al.*, Fertil. Steril. 1998, 70, 102-106) y se expresa durante el embarazo en la placenta humana (Kelly *et al.* DNA cell Biol. 1991, 10,411-421). Se halló mRNA de GnRH en ovarios, testículos, timo, placenta e hipotálamo de la

40 rata (Oikawa *et al.*, Endocrin., 1990, 127, 2350-2356). Se detectó la expresión de GnRH en tejido inmune (bazo, timo y linfocitos de cerdos (Weesner *et al.*, Life Sci, 1997, 61, 1643-1649).

La GnRH-II se expresa en muchos tejidos fuera del cerebro y se encuentra en concentraciones especialmente elevadas en los riñones, la médula ósea y la próstata. La presencia de GnRH-II en diversos tejidos distintos del cerebro sugiere que la GnRH-II puede tener múltiples funciones. Además, la estructura estrictamente conservada del péptido de GnRH-II en diversas especies de vertebrados sugiere que este neuropéptido posee bioactividades vitales. Hasta la fecha sin embargo, las funciones de GnRH-II son prácticamente desconocidas. Diversos tipos de linfocitos diferenciados, como linfocitos T y B y mastocitos, producen péptidos similares de GnRH y similares a GnRH. Números importantes del último tipo de células se encuentran presentes en los riñones, la médula ósea y la próstata, contribuyendo quizás a la elevada expresión de GnRH-II en estos tejidos. La GnRH-II parece menos involucrada en la reproducción que la GnRH-I. En el ratón hipogonadal, ratón que carece del gen de GnRH-I, se encuentran presentes células que producen GnRH-II en la misma distribución que en el ratón normal, pero esto no es suficiente para inducir un desarrollo gonadal normal en estos ratones (Chen *et al.*, FEBS Letters 435 (1998) 199-203). No obstante, los macacos en fase luteal del ciclo menstrual mostraron un notable aumento en las concentraciones de hormona luteinizante del plasma tras la administración intravenosa de GnRH-II, pero este incremento no se pudo inducir durante la fase medio folicular (Lescheid *et al.* Endocrinol. 138 (1997) 5618-5629).

55

La invención presenta un péptido que comprende por lo menos dos secuencias de decapeptidos de GnRH acopladas, elegido dentro del grupo formado por:

60 *AHWSYkLRPGAHWSYkLRPGC#, pEHWAYkLRPGQHWAYkLRPGC#
 pEHWSAkLRPGQHWSAkLRPGC#, pEHWSYkARPGQHWSYkARPGC#
 65 pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC#, pEHWSYkLRAGQHWSyLRAAGC# y
 pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC#

donde # es amida y * es un acetilo capaz de producir una respuesta inmunológica contra formas de Hormona de Liberación de Gonadotropina (GnRH) que recibe también el nombre de Hormona de Liberación de Hormona Luteinizante (LHRH). La invención ofrece también composiciones y vacunas inmunogénicas, productos farmacéuticos y otros preparados medicinales basados en dicho péptido.

La invención ofrece además la utilización de este tipo de vacuna o preparado medicinal en un método de inmunización de un mamífero contra la GnRH para influir en las características de comportamiento o reproducción de dicho mamífero, y en un método para mejorar la calidad de la carne de los cerdos. La invención también presenta un péptido, que puede inducir una respuesta inmunogénica selectiva contra la GnRH-I o la GnRH-II. Además, la invención presenta anticuerpos contra la GnRH-I y/o GnRH-II, composiciones que comprenden estos anticuerpos y la utilización de los péptidos en composiciones farmacéuticas o en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata.

La invención permite ahora entender que con unas secuencias peptídicas que permiten discriminar entre los diferentes tipos de GnRH, se podrá hacer un uso más adecuado y eficiente de la variación o diferencia en la respuesta inmunológica a los diferentes tipos de GnRH. Más particularmente, la invención permite entender que se pueden obtener mejoras en la eficacia y la selectividad de las vacunas contra la GnRH-I. La inmunización contra la GnRH-I es eficaz para neutralizar la GnRH-I y su resultado son unos niveles de gonadotropina reducidos y el bloqueo de la síntesis de esteroides gonadales. No obstante, no se conoce nada sobre los posibles efectos fisiológicos de los anticuerpos producidos contra GnRH-I sobre la función de GnRH-II. Como la GnRH-II se sintetiza y secreta principalmente en los riñones, los anticuerpos cultivados contra GnRH-I que interaccionan con GnRH-II pueden afectar la función renal. Para evitar los posibles efectos secundarios de la inmunización contra GnRH-I sobre la función renal, sería deseable dirigir la respuesta antigénica de una vacuna de inmunocastración específicamente hacia GnRH-I y evitar posibles efectos secundarios nocivos debidos a neutralización de GnRH-II no gonadal.

Si lo que se necesita es anular la capacidad reproductora solamente, generalmente con el comportamiento sexual acompañante de una especie, sería preferible pensar en una vacuna de inmunocastración que neutralizara específicamente la GnRH-I. De ahí el deseo de llegar a una inmunización selectiva contra la(s) Hormona(s) de Liberación de Gonadotropina, de preferencia selectiva contra GnRH-I.

En la medicina veterinaria, una inmunización eficaz al 100% contra la GnRH-I se podría utilizar para la esterilización de, por ejemplos pequeños animales domésticos, como gatos y perros, machos y hembras, o para el tratamiento de la agresividad en perros y toros, vacunándolos simplemente en lugar de someterlos a una cirugía drástica como la castración o la ovariectomía. Otras de las razones en las que puede pensarse para inmunizar contra la GnRH-I son la prevención del celo en animales hembra tales como perros, gatos y vacas y la agitación en animales machos que se van engordando para el matadero.

En la sanidad humana, la inmunización contra la GnRH-I y/o la GnRH-II se puede utilizar en el tratamiento de cáncer de próstata y cáncer de mama, y si es preciso, en el tratamiento de algunas formas de carcinoma de pituitaria. En el cáncer de próstata, sería más deseable neutralizar tanto la GnRH-I como la GnRH-II ya que la última isoforma está también altamente expresada en el tejido prostático.

Otros de los usos de la vacuna contra la GnRH-I es el campo de la cría de ganado, particularmente el engorde de cerdos para el matadero. La carne de los cerdos macho, sexualmente maduros tiene un olor típico, el denominado olor a verraco. En los testículos del cerdo sexualmente maduro, se forman muchos C19-delta-16 esteroides que se almacenan en el tejido graso del animal (Patterson, J. Sci. Food Agric 19 31-38 (1968); Brooks en Pearson, J. Anim. Sci. 62, 632-645 (1986); Claus, Zeitschrift. Tierzüchtg. Züchtungsbiol. 93, 38-47 (1976); Claus, Acta Endocrinol. (Copenh.) 91, Suple. 225, 432-433 (1979)). Estos esteroides son principalmente responsables de la formación del olor desagradable parecido al de la orina, cuando se calienta la carne (Fuchs, Swedish J. Agric. Res. 1, 233-237 (1971); Bonneau, Livest. Prod. Sci. 9 687-705 (1982)). Debido a este olor desagradable, la carne de los cerdos macho sexualmente maduros resulta por lo general no adecuada para el consumo y no apta para la exportación. Debido a que aproximadamente el 10% de los cerdos macho que llegan a matadero son ya sexualmente maduros antes de la matanza, esto supone una gran pérdida potencial para la industria de cría de cerdos.

Con el fin de controlar y evitar estas pérdidas, casi todos los cerditos macho se castran cuando son jóvenes, sometiendo a una operación quirúrgica que se ejecuta por lo general sin ninguna forma de anestesia. Aparte del aspecto poco agradable de esta castración para el animal, esto conduce también a infecciones, inhibición del crecimiento y una calidad final de la carne inferior a la de un animal intacto, por lo menos mientras dicho animal intacto no ha desarrollado el olor a verraco (Walstra, Livest. Prod. Sci. 1, 187-96 (1974)).

Una alternativa que tiene en cuenta al animal consiste en la reducción de la concentración de GnRH-I en la pituitaria del cerdo por medio de la inmunización contra la GnRH-I, la denominada inmunocastración. Esta reducción en los niveles de GnRH-I conduce a una reducción en la concentración de FSH y LH biológicamente activo que, a su vez, inhibirá el desarrollo de los testículos en los animales en crecimiento e inhibirán la síntesis de esteroides testiculares, inclusive androstenona, testosterona y estrógenos. Este método evita la aparición del olor a verraco en los cerdos macho en el momento de la matanza y hace innecesaria la castración quirúrgica ya que los niveles de androstenona se han reducido a niveles bajos o no detectables (Oonk *et al.*, 1995, Livestock production Science 42, 63-71).

Uno de los requisitos estrictos que tiene que cumplir una vacuna aceptable contra el olor a verraco reside en que, en casi todos los cerdos se retrasa el desarrollo de los testículos de tal forma que la aparición del olor a verraco no se habrá producido en el momento de la matanza y que, en el caso de que la vacuna no reduzca el desarrollo de los testículos en un animal, esto se puede detectar fácilmente al presentar unos testículos de tamaño demasiado grande comparado con los cerdos sometidos con éxito a inmunocastración.

En la bibliografía existente y en las solicitudes de patente anteriores relacionadas con las propiedades contra la fertilidad de las vacunas contra la GnRH-I, los resultados de las vacunaciones a menudo parecen ser variables. En la mayoría de los estudios descritos, un pequeño porcentaje de los animales vacunados no responde a la vacunación o se necesitan grandes dosis de vacuna, vacunaciones múltiples o adyuvantes comercialmente inaceptables desde el punto de vista comercial para producir el efecto deseado (Hoskinson *et al.*, 1990, Austr. J. Biotech. 4, 166-170; Falvo *et al.*, (1986) J. Anim. Sci. 63: 986-994; Clarke *et al.*, 1998, Endocrinology 139, 2007-2014; Adams T.E. and B.M. Adams, Feedlot performance of sters and bulls active immunized against Gonadotropine-Releasing Hormona, J. Anim. Sci. 1992, 70: 1691-1698; Brown *et al.*, Immunization of sheep against GnRH-I early in life: effects of reproductive function and hormones in rams, Journal of reproduction and Fertility (1994) 101, 15-21; Ferro *et al.*, Immunological castration using a Gonadotropine-releasing Hormona analogue conjugated to PPD, Food and agricultura) immunology, 1995, 7, 259-272; US patent 4,608,251; Int. Patent appl. WO 88/05308).

Algunos estudios sugieren una eficacia del 100% de una vacuna contra la GnRH-I, pero la vacuna no se probó en un gran número de animales (Ladd *et al.*, (1994), Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against Luteinizing Hormona releasing hormona, Biology of Reproduction 51, 1076-1083; J.G. Manns and S.R. Robbins (1997). Prevention of boar Saint with a recombinant based GnRH vaccine, In: Boar Saint entire male pigs, Proceedings of a meeting of the EAAP working group "Production and Utilisation of Meat from Entire Male Pigs", EAAP Publication n° 92, 137-140;); otros estudios hablan de la eficacia de la vacuna como valor medio de los animales tratados ya que los valores individuales no muestran una diferencia clara entre los controles inmunizados y los no tratados (Bonneau *et al.*, J. Anim. Sci. 72 14-20 (1994); Hennesy *et al.*, 1997. Elimination of boar taint; a comercial boar taint vaccine for male pigs. IN: Bonneau, M., Lundström, K. and Malmfors, B. (Eds.), Boar taint in entire male. Wageningen Pers. Wageningen. EAAP Publication n° 92., 141-145).

La dificultad en la preparación de este tipo de vacunas probablemente se debe al fenómeno de tolerancia. Las sustancias "propias" tales como las hormonas no se reconocen como extrañas sino que son toleradas por el sistema inmune. Normalmente, no se producen anticuerpos contra las sustancias propias. Para que una vacuna tenga éxito, debe ser suficientemente "extraña". Únicamente si la vacuna es suficientemente extraña el sistema inmune no tolerará la vacuna y se inducirá la producción de anticuerpos. Por el contrario, sin embargo, los anticuerpos deben ser todavía capaces de reconocer la hormona y por consiguiente la vacuna no puede ser demasiado "extraña".

Como estas son condiciones mutuamente excluyentes, hasta hace poco se dudaba de que se pudieran preparar tales sustancias. Un intento de producir vacunas peptídicas de tipo GnRH consistió en el reemplazo de la Gly en la posición 6 del decapeptido GnRH-I por un aminoácido dextro rotatorio (D-Tryp; Chaffaux *et al.*, Recueil de Médecine Vétérinaire 161(2), 133-145, 1985). Sin embargo, se demostró que una preparación de vacuna que contenía este péptido GnRH modificado tenía un rendimiento incluso menor que el decapeptido GnRH-I normal (sol. patente Europea 464,124 A).

Recientemente, se ha demostrado de modo definitivo que es posible inducir una respuesta de anticuerpos eficaz en todos los individuos vacunados contra la GnRH-I (Meloan *et al.*, Vaccine 12, 741-746 (1994). En estos experimentos, los cerdos se vacunaron dos veces con una vacuna de GnRH-I que se aparta del tipo clásico de vacuna de GnRH-I (GnRH-I acoplada con una proteína de soporte, en adyuvante de Freund), en particular la vacuna de GnRH-I en tandem (Patente Europea 0464124). En dicha publicación, se describe un péptido que se caracteriza porque comprende al menos dos secuencias de GnRH-I en tandem (SEQ ID NO:3) según la fórmula general

$Z^1\text{-Glx-His-Trp}^1\text{-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro[-Gly-X-Gln-His-Trp}^2\text{-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro]}_n\text{-Gly-Z}^2$,

en la que los aminoácidos se denominan de acuerdo con el código de tres letras, Trp¹ y Trp² son triptófano (Trp) o triptófano formilado (N(indol)-formil-triptófano), n es un número que tiene un valor de al menos 1, X es un enlace directo o un grupo espaciador entre los aminoácidos Gly y Gln, Z¹-Glx es pGlu (ácido piroglutámico) o Gln que tiene unida una cola que comprende uno o más aminoácidos adicionales, y Gly-Z² es Gly-NH₂ o Gly que tiene unida una cola que comprende uno o más aminoácidos adicionales. En esta fórmula general, Z puede ser un enlace directo entre los aminoácidos glicina y glutamina, es decir, estos aminoácidos están interconectados directamente sin un enlace intermedio (mediante el enlace peptídico normal). La invención de la vacuna de GnRH-I en tandem también comprende péptidos en los que las secuencias de GnRH-I están interconectadas mediante espaciadores. La naturaleza del grupo espaciador puede variar en gran medida, desde uno o más aminoácidos a una cadena hidrocarbonada más corta o más larga y otros grupos compuestos o moléculas. En la fórmula general anterior, Z¹-Glx preferiblemente representa pGlu (ácido piroglutámico), pero también puede representar Gln que tiene unida una cola que comprende uno o más aminoácidos adicionales, que se usa, por ejemplo, para el acoplamiento del péptido a una proteína de soporte. En la fórmula general anterior, Gly-Z² representa por ejemplo Gly-NH₂, o Gly que tiene unida una cola que comprende uno o más aminoácidos adicionales, que se utilizan por ejemplo para el acoplamiento del péptido a una proteína de soporte. De preferencia, Gly-Z² representa Gly-Cys-NH₂, añadiéndose la cisteína C terminal en relación con un posible acoplamiento del péptido a una proteína de soporte.

Por el documento WO 96/40755 y por Oonk *et al.*, Vaccine 16 (11-12), 1074-1082, 1998, se sabe que el principio dímero-tandem aplicado a una variante de la molécula de GnRH-I dio como resultado una vacuna altamente eficaz en diversos adyuvantes suaves, particularmente Specol y doble emulsión de aceite y resultaba también eficaz en dosis reducidas. En este caso, la variante de la molécula de GnRH-I estaba formada por sustitución del sexto aminoácido Gly del decapeptido por un aminoácido(D-) dextro rotatorio, D-Lys tras lo cual el péptido resultante se dimerizaba y acoplaba a un compuesto de soporte común, ovalbúmina. Mientras tanto, una vacuna que utilizaba aminoácido D y sustituciones de Gly en la posición 6 del original y un solo decapeptido de GnRH-I con un aminoácido D disminuía la inmunogenicidad comparado con la secuencia original de GnRH-I (Chaffaux *et al.*, Recueil de Medicine Vétérinaire 161(2), 133-145, 1985), dichas sustituciones con aminoácido D aplicadas a una vacuna de GnRH-I dímero-tandem fueron capaces de generar preparados de vacuna de GnRH-I todavía más inmunogénicos. No obstante, el método de vacunación requería una dosificación repetida de la vacuna para que fuera completamente eficaz. La necesidad de una dosificación de refuerzo adicional para conseguir esencialmente un 100% de eficacia en la vacunación de mamífero contra la GnRH-I constituye una desventaja de los péptidos conocidos. Comprobamos también que en algunos casos la utilización del tandem-dímero (D-Lys⁶) GnRH-I (es decir el tandem-dímero GnRH-I con y sin la sustitución D-Lys⁶) tuvo como resultado cantidades muy reducidas aunque todavía medibles de testosterona, no deseable y que supone una desventaja del tandem-dímero (D-Lys⁶)GnRH-I.

La presente invención presenta secuencias de péptidos que comprenden por lo menos dos secuencias de decapeptido de GnRH acoplados, elegidos dentro del grupo formado por:

*AHWSYkLRPGAHWSYkLRPGC#, pEHWAYkLRPGQHWAYkLRPGC#

pEHWSAkLRPGQHWSAkLRPGC#, pEHWSYkARPGQHWSYkARPGC#

pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC#, pEHWSYkLRAGQHWSyLRAAGC# y

pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC#

donde # es una amida y * es acetilo y que proporciona alternativas al D-Lys⁶ GnRH-I en tandem cuando se aplica en vacunas que dan como resultado vacunas eficaces para la inmunocastración.

Uno de los aspectos de la presente invención es la determinación de la medida en que los aminoácidos en la secuencia de GnRH-I en tandem se pueden modificar, siendo la GnRH-I en tandem sustituida resultante todavía capaz de producir una respuesta inmunogénica a GnRH-I suficiente para la inmunocastración. Por consiguiente, la invención presenta la generación de una secuencia de péptidos que puede inducir la producción de anticuerpos contra GnRH-I, suficientemente competitivos también tanto en cantidad como en actividad.

Otro aspecto de la presente invención es ofrecer una secuencia de péptidos que induce selectivamente la producción de anticuerpos contra la GnRH-I, al mismo tiempo que no induce ninguna respuesta inmune o muy poca a la GnRH-II. Una realización preferida de ésta es una secuencia de péptidos que no solamente induce selectivamente la producción de anticuerpos contra GnRH-I sino que resulta también eficaz en la inmunocastración, quedando reducida o inexistente una respuesta inmune a la GnRH-II.

Los presentes inventores han descubierto que en la secuencia de péptidos de GnRH-I en tandem de la invención se pueden sustituir varios aminoácidos, con el resultado de una reducción en la semejanza a la auto-hormona, al mismo tiempo que retiene o incluso aumenta la aptitud del péptido para producir anticuerpos de fijación de GnRH-I. Asimismo, algunas sustituciones de aminoácidos en la secuencia de péptidos de GnRH-I dan como resultado una respuesta inmune selectiva respecto de GnRH-I y una respuesta inmune reducida o inexistente a la GnRH-II.

En un aspecto de la invención, ciertas secuencias de péptidos de GnRH-I en tandem modificadas proporcionan vacunas que no solamente son capaces de reducir el crecimiento de los testículos en los animales macho sino que pueden también reducir esencialmente los niveles de testosterona hasta un grado que no puede ser determinado por técnicas convencionales.

Además, las vacunas preparadas a partir de estas secuencias de péptidos expresan una actividad que en la mayoría de los casos eliminaron la necesidad de la segunda inmunización de refuerzo, como ocurre con la GnRH-I en tandem D-Lys⁶ convencional, para conseguir una actividad esencialmente del 100%. Una actividad o eficacia del 100% en los términos de la presente invención se define como un nivel de testosterona prácticamente indetectable con las técnicas convencionales tras una sola vacunación.

Una de las características más notables de la presente invención es que los anticuerpos producidos por estas vacunas de GnRH-I alternativas discriminan entre GnRH-I y GnRH-II. Por consiguiente, los péptidos según la invención expresan una actividad incrementada o retenida frente a GnRH-I, mientras que al mismo tiempo se encuentra una respuesta inmune o inexistente a GnRH-II. Esto permite el desarrollo de péptidos que expresan un efecto inverso, es decir, que expresa una actividad incrementada o retenida contra GnRH-II mientras que al mismo tiempo expresan una respuesta inmune reducida o inexistente a GnRH-I. Esta respuesta específica a GnRH-II se podría utilizar para

ayudar a suprimir la embrio-implantación en mamíferos en los que la preñez no es deseada o lo es muy poco. Además, utilizando una respuesta específica GnRH-II de este tipo, se pueden reducir por regulación los niveles de FSH con el resultado de una fertilidad global reducida.

La invención se refiere en un aspecto a un péptido que comprende una secuencia de decapeptidos de GnRH-I en tandem modificada, donde la vacunación con el péptido en una dosificación adecuada, permite un nivel de testosterona prácticamente no detectable.

La invención se refiere también a un péptido que comprende al menos dos secuencias de decapeptidos de GnRH-I acoplados, opcionalmente acoplados mediante un espaciador, que permite una respuesta inmunogénica que permite a su vez la discriminación eficaz entre GnRH-I y GnRH-II.

Los péptidos según la invención son bastante similares a la hormona pero al mismo tiempo más “foráneos” al sistema inmune y tienen una capacidad incrementada para inducir la producción de anticuerpos dirigidos contra la hormona.

Una característica de la invención es que se pueden dimerizar unidades tandem individuales para seguir potenciando su inmunogenicidad sin perder la posibilidad de acoplar el péptido o la composición de péptidos a una proteína compuesto de soporte.

Se pueden utilizar las técnicas para la dimerización y el acoplamiento del tandem a un soporte similar a los descritos en el documento WO 96/40755. También se pueden utilizar en la presente invención péptidos que contienen únicamente una parte de las secuencias de péptidos GnRH-I ó II. Como ejemplos de los mismos se pueden citar nonapéptidos y undecapéptidos.

Los ligantes que se utilizan en los péptidos según la invención se puede elegir entre los ligantes descritos en otras partes de la presente solicitud o ligantes tales como ligantes SMCC u otros conocidos en el estado de la técnica.

Se utilizan ligantes para acoplar dos o más secuencias de péptidos dimerizados. El aminoácido que se utiliza para sustituir el aminoácido en las secuencias de péptidos en tandem es de preferencia un aminoácido relativamente sencillo como la alanina. En una realización preferida, el aminoácido diferente es alanina. También se pueden usar otros aminoácidos para sustituir el aminoácido en la secuencia de decapeptidos en tandem. De preferencia, únicamente se realizan sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas son sustituciones de aminoácidos en las cuales se sustituyen aminoácidos “bulky” por aminoácidos “bulky”, aminoácidos aromáticos por aminoácidos aromáticos etc. Estos conceptos son conocidos por los expertos en la materia.

Se pueden colocar espaciadores entre los péptidos según la invención. Esto permite la formación de multímeros. En el estado de la técnica se conocen espaciadores adecuados.

Figura 1

Competición para fijar GnRH yodado con antisuero por parte de GnRH (círculos abiertos), GnRH-II (círculos sólidos), péptido de control (cuadrado sólido) y ningún péptido (asterisco). El suero se diluye 1/10000 y se añaden concentraciones crecientes de péptidos (0,25, 2,5 25 pmol) por pocillo. En los gráficos A-C se muestran sueros con capacidad creciente de fijación de GnRH-II. Eje horizontal: cantidad de péptido (pmol por pocillo); eje vertical: capacidad de fijación (recuentos por minuto).

Figura 2

Porcentaje de GnRH-I yodado desplazado por GnRH-I (figura 2A) y GnRH-II (figura 2B) para sueros de animales individuales (cada barra representa un animal) tras la inmunización con péptidos dímero-tandem G6k-GnRH con sustituciones de alanina según se indica debajo de cada grupo de barras. El antisuero obtenido tres semanas después de la inmunización de refuerzo (10 semanas después de la vacunación) se diluyó 1:100 a 1:10000. Se añadió GnRH-I y GnRH-II para el desplazamiento en 250 pmol por ml de concentración.

Figura 2A

Eje horizontal: péptidos utilizados para la inmunización

Eje vertical: porcentaje de desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-I

Figura 2B

Eje horizontal: péptidos utilizados para la inmunización

Eje vertical: porcentaje de desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-II

Figura 3

Porcentaje de GnRH-I yodado desplazado por GnRH-I (figura 3A) y GnRH-II (figura 3B) para sueros de animales individuales (cada barra representa un animal) tras la inmunización con péptidos G6k-GnRH-tandem-dímero con sustituciones de alanina tal como lo se indica debajo de cada grupo de barras. El antisuero se obtuvo en el momento de la inmunización de refuerzo (7 semanas después de la vacunación) y se diluyó de 1:100 a 1:10000. Se añadió GnRH-I y GnRH-II para el desplazamiento en una concentración de 250 pmol por ml. No se incluyen datos de H2A y W3A ya que los valores de anticuerpo eran demasiado bajos para medir el desplazamiento.

Figura 3A

Eje horizontal: péptidos utilizados para la inmunización

Eje vertical: porcentaje de desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-I

Figura 3B

Eje horizontal: péptidos utilizados para la inmunización

Eje vertical: porcentaje de desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-II

Figura 4

Eficacia de inmunocastración de diversos grupos de cerdos inmunizados con péptidos GnRH-tandem-dímero (62 μ g) conjugado con ovalbúmina Specol utilizados como adyuvante. El péptido inicial era GnRH tandem (Cys-OH) dímero (abreviado Cys-OH). De este péptido, se utilizaron para la inmunización todos los péptidos scan de alanina. La eficacia de la inmunocastración se determinó sobre una escala de 1 a 4 (1=no se produjo inmunocastración, 2=una minoría de los cerdos fue inmunocastrada, 3=una mayoría de los cerdos fue inmunocastrada, 4=todos los cerdos fueron inmunocastrados).

Figura 5

Porcentaje de GnRH-I yodado desplazado por GnRH-I (fig. 5A) y GnRH-II (fig. 5B) para sueros de animales individuales (cada barra representa un animal) tras inmunización con péptidos GnRH-tandem-dímero con sustituciones de alanina según lo indicado por debajo de cada grupo de barras. El antisuero obtenido 3 semanas después de la inmunización de refuerzo (10 semanas después de la vacunación) se diluyó 1:100 a 1:10000. Se añadió GnRH-I y GnRH-II para el desplazamiento en concentración de 250 pmol por ml.

Figura 5A

Eje horizontal: péptidos utilizados para la inmunización

Eje vertical: porcentaje de desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-I

Figura 5B

Eje horizontal: péptidos utilizados para la inmunización

Eje vertical: porcentaje de desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-II

Los péptidos según la invención comprenden por lo menos dos secuencias de decapeptidos GnRH acoplados, elegidos dentro del grupo formado por

*AHWSYkLRPGAHWSYkLRPGC#, pEHWAYkLRPGQHWAYkLRPGC#
 pEHWSAkLRPGQHWSAkLRPGC#, pEHWSYkARPGQHWSYkARPGC#
 pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC#, pEHWSYkLRAGQHWSYkLRAAGC# y
 pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC#

donde # es amida y * es acetilo.

Los péptidos según la invención están relacionados con la fórmula general dada por (SEQ ID NO:4) o por el siguiente código de una letra:

pEHWSYkLRPGQHWSYkLRPGC#

En esta fórmula general, Q representa Gln y puede ir precedido de X, donde X representa un espaciador. Varios de estos aminoácidos han sido sustituidos por otros aminoácidos. En las fórmulas, se indica la posición de la sustitución. Las mayúsculas en negrita y subrayadas representan aminoácidos levorrotatorios, las letras en minúsculas representan aminoácidos dextrorrotatorios, p. ejem. K:L-Lys; k:D-Lys. Se ha determinado posteriormente su respuesta inmunogénica cuando se acoplan a un soporte, por lo general ovalbúmina, aunque se pueden utilizar otros soportes como KLH, BSA.

Se puede ver claramente que la secuencia del péptido GnRH-II (SEQ ID NO:2) determina cuál de los aminoácidos puede sustituirse, de modo que sea todavía posible una discriminación eficaz basada en la respuesta inmune entre las dos secuencias GnRH-I y GnRH-II.

Para determinar si los anticuerpos obtenidos por las vacunas GnRH según la presente invención discriminaban entre GnRH-I y GnRH-II, se realizó un ensayo de fijación de anticuerpo GnRH con el objeto de determinar si se producían anticuerpos frente a péptido GnRH-I-tandem-dímero o si sus análogos de sustitución de alanina interaccionan con GnRH-II o carecen de unión con GnRH-II. Se pre-incubaron diluciones de suero con GnRH-I, GnRH-II, un péptido de control o ningún péptido. A continuación, se añadió GnRH-I yodado para competir con los péptidos pre-incubados para la fijación a los anticuerpos.

Este procedimiento se realizó para el suero recogido antes y después de la inmunización de refuerzo, ya que la especificidad de los anticuerpos puede aumentar tras la inmunización de refuerzo.

Cuando se utilizaron los péptidos según la invención como el conjugado con ovalbúmina (OVA conjugado) y se compararon con los controles, todos mostraron eficacia en la inmunocastración de jóvenes cerdos macho. La comparación con el conocido G6k-GnRH tandem dímero OVA conjugado (véase tabla 1) mostró que los péptidos según la invención presentaban una eficacia comparable o similar aunque había disminuido su semejanza con la auto-hormona GnRH-I. Los péptidos según la invención dan una respuesta inmunogénica que permite la discriminación eficaz entre GnRH-I y GnRH-II. Estos péptidos dieron como resultado unos testículos pequeños y unos niveles bajos de testosterona. Más específicamente, los péptidos que expresan un peso bajo de testículos y un nivel bajo de testosterona, son R8A, G10A y S4A. Los péptidos preferidos basados en la selectividad inmunológica entre GnRH-I y GnRH-II son S4A y pE1A.

En una realización preferida, el péptido se elige dentro del grupo formado por pEHWAYkLRPGHWAYkLRPGC# (SEQ ID NO:5), pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC# (SEQ ID NO:6) y pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC# (SEQ ID NO:7).

Se elige todavía mejor dentro del grupo formado por pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC # (SEQ ID NO:6); y pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC# (SEQ ID NO:7).

En los péptidos según la invención, la dimerización puede realizarse por ejemplo a través del terminal carboxilo o a través del terminal amino. Se pueden dimerizar por ejemplo dos unidades tandem mediante un puente de disulfuro o tioéter. Para dimerizar las secuencias tandem se puede utilizar el Cys en la posición 21, o se puede sintetizar Cys antes que el ácido glutámico en la posición 1. También se pueden encontrar en el estado de la técnica otros métodos para dimerizar o multimerizar las unidades tandem GnRH. Si el Cys en la posición 21 está involucrado en la dimerización y por consiguiente no se encuentra disponible para el acoplamiento, es probablemente posible utilizar otro aminoácido del tandem que se pueda acoplar. Si la dimerización o multimerización tiene por consecuencia la pérdida de zonas accesibles donde se puede conjugar un compuesto de soporte, es suficiente con restringir la elección de aminoácidos de sustitución a unos aminoácidos con una cadena lateral apropiada. Este aminoácido de sustitución puede ser por ejemplo L o D-Lys, L o D-Glu u otro aminoácido que contiene una cadena lateral que permite el acoplamiento a un compuesto de soporte. Se han sometido a prueba tanto las sustituciones L como las D y se ha visto que tienen el mismo efecto.

La invención ofrece además una composición que comprende un péptido en forma inmunogénica. Como todo experto sabe, existen varios métodos para producir una forma inmunogénica de una sustancia que, por sí misma no es inmunogénica. Una posibilidad consiste en acoplar un péptido según la invención a una proteína de soporte adecuada. Una proteína de soporte adecuada es la ovalbúmina, KLH o BSA. En un péptido en tandem se puede utilizar adecuadamente una cisteína en/o el Terminal-C para un acoplamiento químico. En el péptido tandem-dímero, el acoplamiento se puede realizar también utilizando la cadena lateral sin más o la modificada de (D-)lisina, (D-)glutamina, u otro aminoácido modificado que sustituye aminoácidos de la secuencia de péptidos. Los expertos en la materia conocen bien los métodos de acoplamiento así como las proteínas de soporte adecuadas.

Según la invención, se prefiere una composición que se caracteriza porque comprende un conjugado inmunogénico de una proteína, como ovalbúmina y un péptido o composición de péptidos.

Se puede utilizar una composición según la invención en forma de vacuna. Para ello, la composición se puede producir en una forma que permita la administración. Con la administración de una vacuna según la invención, se genera una respuesta inmunogénica contra GnRH, de preferencia una respuesta inmunogénica contra GnRH-I.

La invención ofrece por lo tanto también un método de inmunización de un mamífero contra GnRH-I, mediante la vacunación del mamífero con una vacuna según la invención. En una realización preferida, la invención ofrece un método para la inmunización selectiva de un mamífero contra GnRH-I, con una vacuna según la invención.

5 La preparación de vacuna según la invención se puede combinar, por supuesto, con al menos un inmunoadyuvante. Los expertos en la materia conocen bien los inmunoadyuvantes adecuados. Una realización preferida según la invención puede ser Specol o una emulsión doble de aceite, pero se pueden utilizar otros adyuvantes que no provocan ninguna reacción secundaria o solamente una reacción suave. La invención se puede utilizar en métodos para la inmunización de individuos elegidos dentro de una amplia gama de vertebrados y particularmente mamíferos, contra
10 la GnRH-I. En una realización preferida de la invención, la vacuna se puede administrar en una sola dosis, que tiene la misma eficacia que las vacunas conocidas actualmente, que se tienen que administrar en forma de dos dosis. La inmunización contra la GnRH-I, de preferencia selectiva, se podría utilizar por ejemplo para la esterilización de, por ejemplo, pequeños animales domésticos como gatos y perros machos y hembras, o para el tratamiento de la agresividad en perros machos y toros. Otras razones de inmunización contra la GnRH-I con la presente invención son la
15 prevención del celo en animales hembras como perros, gatos y vacas así como evitar o tratar la agitación en animales machos que se están engordando para el matadero. En la sanidad humana, se puede utilizar la inmunización con GnRH, de preferencia selectiva contra GnRH-I o GnRH-II en el tratamiento de cáncer de próstata y cáncer de mama y, si es preciso, en el tratamiento de algunas formas de carcinoma de la pituitaria.

20 Una realización preferida es un método para mejorar la calidad de la carne de cerdos, donde se vacuna a los cerdos con una preparación de vacuna según la invención. La invención se ilustra en la siguiente parte experimental.

1. Inmunocastración de cerdos

25 *Materiales y métodos*

Materiales

El acetonitrilo (ACN) era de calidad gradiente HPLC-S, la N-metilpirrolidona (NMP), diisopropiletilamina (DIEA),
30 dimetilformamida (DMF), ácido trifluoracético (TFA) y piperidina eran de calidad de síntesis de péptidos y se obtuvieron todos en Biosolve (Valkenswaard, NL). Los N-hidroxi-benzotriazoles (HOBt) y 2-(1H-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) se obtuvieron en Richelieu Biotechnologies Inc. (Hamon, Canadá). El benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato (Py BOP) se obtuvo en Novabiochem (Laufelfingen, Suiza). El tioanisol (TA), etanoditiol (EDT), dimetilsulfóxido (DMSO), pentano y dimetilaminopiridina (DMAP) eran de
35 calidad proanálisis y se obtuvieron en Merck (Darmstadt, Alemania). El dietileter se purificó sobre una columna de óxido de aluminio básico activado. Los derivados y resinas de aminoácidos se obtuvieron en Bachem Feinchemicalien AG (Bubendorf, Suiza).

Síntesis peptídica múltiple (MPS)

40 Se programó un Hamilton Microlab 2200 para suministrar disolventes de lavado y reactivos a un soporte para tubos con 40 columnas individuales de 4 ml con filtro, que contenían 30 mmol de resina para la síntesis peptídica. Las columnas se drenaron después de cada etapa al vacío. El ciclo de acoplamiento se basó en la química Fmoc utilizando etapas de acoplamiento dobles:

- 45 1. Lavado NMP (1 ml)
2. 30% (v/v) piperidina/NMP (3 minutos, 0,5 ml)
- 50 3. 30% (v/v) piperidina/NMP (17 minutos, 0,5 ml)
4. Lavado NMP (5 x 1 ml)
5. Acoplamiento doble (2 x 30 minutos)
- 55 6. Lavado NMP (2 x 1 ml)

Etapas de acoplamiento: se trasladaron al recipiente de reacción Fmoc-aminoácidos en NMP (0,4 M, 0,25 ml), HBTU/HOBt (0,45 M, 0,22 ml) en DMF, y DIEA (2 M, 0,2 ml) en NMP y se dejaron reaccionar durante 30-50
60 minutos. La mezcla de reacción se drenó y se repitió una vez el proceso de acoplamiento.

Después del acoplamiento del último aminoácido, el grupo Fmoc se separó con 30% piperidina/NMP, los péptidos se lavaron, se acetilaron en 30 minutos, utilizando NMP/anhídrido acético/DIEA 10/1/0,2, se lavaron nuevamente y se secaron. Los péptidos se desprotegieron y separaron en dos horas en una mezcla de 1,5 ml de TFA/fenol/TA/agua/EDT
65 10/0,75/0,5/0,5/0,25 (reactivo K). La mezcla de separación se filtró, se lavó la resina con 0,5 ml TFA y el péptido se precipitó añadiendo 13 ml de pentano/dimetiléter 1/1. Tras la centrifugación, se extrajo el precipitado nuevamente con pentanol/dietiléter. El precipitado se secó, se disolvió en ACN/agua 1/1 y se liofilizó. Este procedimiento proporciona, según el peso molecular, de 25 a 70 mg de péptido.

ES 2 280 402 T3

En el cuadro 1 se recogen las secuencias peptídicas sintetizadas en código de aminoácido de una sola letra.

CUADRO 1

Secuencia de aminoácidos en código de una sola letra de péptidos sintetizados

Péptido	secuencias de aminoácidos
G6kGnRH-tandem ¹	pEHWSYkLRPGHWSYkLRPGC# (SEQ ID NO:9)
pE1A-G6k-GnRH-tandem	*AHWSYkLRPGA ¹ HWSYkLRPGC# (SEQ ID NO:10)
S4A-G6k-GnRH-tandem	pEHWAYkLPGQHWAYkLRPGC# (SEQ ID NO:5)
Y5A-G6k-GnRH-tandem	pEHWSA ¹ kLRPGQHWSA ¹ kLRPGC# (SEQ ID NO:11)
L7A-G6k-GnRH-tandem	pEHWSYkARPGQHWSYkARPGC# (SEQ ID NO:12)
R8A-G6k-GnRH-tandem	pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC# (SEQ ID NO:6)
P9A-G6K-GnRH-tandem	pEHWSYkLRAGQHWSYLRAGC# (SEQ ID NO:13)
G10A-G6k-GnRH-tandem	pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC# (SEQ ID NO:7)
pE= ácido piroglutámico; *= acetilo; # = amida; k=d-lisina, = Gly en posición 6 en la secuencia GnRH nativa sustituida d-lisina.	
1 para fines ilustrativos solamente	

HPLC Analítico

Para el análisis de péptidos usamos un sistema (electrospray) LC-MS que consta de dos bombas Waters modelo 510, un controlador de ardiente Waters modelo 680, un autoinyector Waters CISP 712 y un detector de serie de fotodiodos Waters 991. El espectrómetro de masas era un Micromass Quatro II sq, que se usó en modo ion positivo. Los productos se analizaron en un gradiente lineal de 10% ACN/agua con 0,05% TFA hasta 70% ACN/agua con 0,05% TFA en 30 minutos sobre una columna Waters Delta Pak C18-100Å (3,9 X 150 mm, 5 mm) a un 1 ml/min y 215 nm. Todos los productos tenían una pureza comprendida en 40 y 70% según superficie del pico.

Dimerización

Se dimerizaron productos crudos disolviendo los productos en DMSO al 20% en agua. El pH se ajustó a 5-6 con NH₄HCO₃ al 1%, manteniendo una solución transparente. La corrección del pH se hizo con ácido acético al 1%. Después de agitar a temperatura ambiente durante al menos 5 horas, se almacenaron los productos a -20°C hasta la purificación.

HPLC Preparativo

Las purificaciones de péptidos se realizaron usando un cromatógrafo líquido Waters Prep 4000, equipado con un módulo Waters RCM con dos cartuchos PrePak más cartucho guard (40 x 210 mm ó 25 x 210 mm) rellenos de material delta-Pak C18-100Å (15 mm). En general, las purificaciones se realizaron utilizando los mismos eluyentes que en el HPLC analítico, pero con una velocidad de gradiente de 0,5% ACN/min y un caudal de 40 ó 100 ml/min. Se detectaron péptidos en 215-230 nm utilizando un espectrofotómetro Waters 586 con una célula preparativa. Los péptidos se liofilizaron y se determinó la pureza que era de por lo menos 90%.

Preparación de conjugado

Para la conjugación por medio de N-etil-N=-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto ("EDC") a albúmina de huevo de pollo ("OVA") se disolvió un peso igual del péptido y de la proteína de soporte separado en agua milliQ y se mezclaron bien ambas soluciones. Después se disuelve un exceso de 10 X basado en equivalentes en peso, de EDC en agua milliQ. Posteriormente, se añade lentamente esta solución a la solución de péptido/OVA, agitando de forma continua; el pH de esta solución final es 5. Después de al menos 6 horas de agitación lenta el producto se dializó (límite de MP 10000) frente a un exceso (300 veces de agua milliQ durante dos días. Se refrescó el agua dos

ES 2 280 402 T3

veces al día. La carga se calculó a partir de un análisis comparativo de los aminoácidos del conjugado y la proteína de soporte. El análisis de los aminoácidos se realizó utilizando un sistema Waters Pico-Tag después de la hidrólisis en una estación de trabajo Pico-Tag utilizando HCL 6N a 150°C durante 1 hora, y derivación con isotiocianato de fenilo.

- 5 Según el análisis de los aminoácidos, los conjugados contenían entre 0,3 y 0,5 mg de péptido por mg de proteína de soporte, con la excepción del conjugado P9A-GnRH-tandem-dímero que contenía solamente 0,16 mg de péptido por mg de ovalbúmina.

- 10 La abreviatura del conjugado P9A-GnRH-tandem-dímero OVA es G6K-TD. Los conjugados con sustituciones de alanina son abreviados por el aminoácido en la secuencia de GnRH nativa que se sustituye. Su posición y un A por la sustitución de alanina. Por ejemplo el conjugado pE1A-G6k-GnRH-tandem-dímero OVA es pE1A.

Preparación de la emulsión

- 15 Se utilizó como fase oleosa (Bokhout *et al.*, 1981) Specol (Special Oil Phase, ID-DLO, Lelystad, Países Bajos) constituido por dos detergentes en un aceite mineral ligero. Las emulsiones de agua-en-aceite (WIO) se prepararon utilizando un Ultra Turrax (Janke y Kundel, Staufen, Alemania) con una barra de agitación. La fase oleosa Specol (5 partes v/v) se llevó a un recipiente de cristal de 25 ml y se añadió lentamente la fase acuosa (4 partes v/v) que constituía el conjugado en agua milli Q mientras se agitaba la emulsión. Después de añadir la fase acuosa, la emulsión se agitó
20 durante medio minuto con la misma velocidad de rotación (15000 rpm). Las emulsiones se almacenaron durante la noche a 4°C para comprobar la estabilidad y se administraron a los animales al día siguiente.

Animales

- 25 En el experimento participaron lechones machos, de aproximadamente 10 semanas de edad. Los cerditos híbridos se alojaron en espacios con semi-rendijas y se les permitió acceso *ad libitum* a la comida y al agua.

Inmunización

- 30 Se asignaron aleatoriamente los cerditos a los tratamientos, 6 o 7 cerditos por tratamiento. Se inyectó a todos los animales 2 ml de emulsión que contenía los conjugados GnRH tandem-dimerizados (es decir 62 µg de péptido) o una emulsión sin antígeno. Las inyecciones se administraron por vía intramuscular en el cuello, al comienzo del experimento (día 0) y 7 semanas más tarde (después de la vacunación). Trece semanas después de la inmunización (después de la vacunación) se mataron todos los animales.

35

Medidas y toma de muestras de sangre

- Se pesaron los animales el día 0 y el día 7 y 13 semanas después de la vacunación. Se determinaron el tamaño de los testículos midiendo la longitud de los testículos con un calibre vernier el día 0 y 7, 10 y 13 semanas después. Los
40 tamaños de los testículos se registraron como media de ambos testículos.

- Se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena jugularis los mismos días que se midieron los tamaños de testículos y también 4 semanas después de la inmunización inicial. Las muestras de sangre se mantuvieron durante la noche a 4°C y el día siguiente se obtuvo suero por centrifugación (1500 g, 15 minutos). Se almacenaron muestras
45 de suero a -20°C hasta el ensayo.

Evaluación después de la matanza

- Después de la matanza se extirparon los testículos, se disecaron libres de epididimos y se pesaron. Se registraron
50 los pesos de los testículos como media de ambos testículos.

Anticuerpos de péptidos

- Los anticuerpos de los péptidos utilizados para la inmunización se determinaron con ELISA. Los péptidos se
55 recubrieron en los pocillos de una placa de microvaloración utilizando glutardialdehído (GDA). Se recubrió el GDA hasta la superficie de los pocillos por incubación con 0,2% GDA en tampón de fosfato de 0,1 M (pH 5) durante 4 horas a temperatura ambiente. Las placas se enjuagaron 3 veces durante 10 minutos con tampón de fosfato 0,1 M (pH 8). Se recubrió 1 microgramo de péptido en 100 ml de tampón de fosfato (0,1 M, pH 8) por pocillo, incubando durante 3 horas a 37°C. Las placas se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Las placas descongeladas se enjuagaron tres
60 veces durante 10 minutos con agua milli Q que contenía 8,2 g NaCl, 1,15 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,20 g NaH₂PO₄·2H₂O y 5 ml de una solución Tween 80 al 10% en agua por litro de agua.

- Se dejó reaccionar con los péptidos recubiertos durante 1 hora a 25°C diluciones de suero en serie de los sueros anti-peptídicos. Después de enjuagar 3 veces 10 minutos se introdujo cabra-anticerdo IgG acoplado con peroxidasa de
65 rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca) como segundo anticuerpo durante 1 hora y se utilizó como sustrato ABTS (Boehringer, Mannheim, Alemania) ((259 ml (2 g/100 ml) en 10 ml de tampón sustrato con 20 ml H₂O₂ (solución 3%)). Se midió la absorción a 405 nm.

ES 2 280 402 T3

Anticuerpos de GnRH

Se determinaron los anticuerpos de GnRH en la forma descrita por Meloen *et al* (Vaccine 12, 741.746 (1994)). Se dejó interaccionar diluciones en serie de los antisueros de cerdo con ¹²⁵I-GnRH. Los valores/títulos se expresan con porcentaje de unión de ¹²⁵I-GnRH con una dilución de suero dada.

Testosterona

Se determinaron los niveles de testosterona en el suero utilizando un kit Coat-a-Count que se compró en DPC laboratories, Los Angeles, CA.

Resultados

Tamaño y peso de los testículos

Siete semanas después de la primera inmunización, se pudieron observar ya los efectos de la inmunocastración al medir el tamaño de los testículos. Tres tratamientos (R8A, G10A y G6k-TD) a penas mostraron incremento alguno (<10 mm) del tamaño medio de los testículos en el momento del refuerzo. Estos tratamientos tuvieron éxito con pesos de testículos en el momento de la matanza de 70 g o menos. Otros tratamientos que fueron eficaces en términos de pesos reducidos de testículos son: pE1A y S4A, mientras que en el grupo Y5A, L7A y P9A, 2, 1 y 1 animales no respondieron a las inmunizaciones respectivamente (Cuadro 2). El peso de los testículos individuales de animales inmunocastrados no superaron los 70 g, lo cual supone una diferencia clara entre los animales inmunocastrados y los no inmunocastrados.

CUADRO 2

Eficacia de los diversos tratamientos según el peso de los testículos (g)

Tratamiento	peso ind. testic(g)	peso testic.(g) (media(rango))	Nºresp./total
G61-TD	10, 10, 10, 12, 16, 70	10 (10-70)	6/6
pE1A	16, 18, 33, 36, 53, 55, 65	36 (16-65)	7/7
S4A	10, 14, 15, 36, 40, 43, 69	36 (10-69)	7/7
Y5A	15, 19, 34, 33, 69, 210, 235	44 (15-235)	5/7
L7A	12, 13, 15, 20, 24, 29, 195,	20 (12-195)	6/7
R8A	10, 10, 12, 15, 17, 19, 19	15 (10-19)	7/7
P9A	8, 90, 20, 23, 31, 57, 300	23 (8-300)	6/7
G10A	11, 13, 14, 14, 15, 30, 39	14 (11-39)	7/7
Controles	150, 173, 204, 206, 236	204 (150-236)	0/5

Respuesta anticuerpo

Los valores medios de anticuerpos contra los péptidos utilizados para la inmunización se dan en el cuadro 3. El valor medio de anticuerpos de cerdos tratados con H2A y P9A son inferiores al valor de anticuerpo peptídico de otros tratamientos.

Los valores de anticuerpos de animales individuales contra los diversos péptidos oscilaron entre 2 y 4. Dentro de un tratamiento, los animales que no fueron inmunocastrados mostraron el valor anti-peptídico inferior. Los animales tratados con H2A y W3A no fueron inmunocastrados pero había valores importantes de anti-peptídicos.

Los porcentajes de fijación de anticuerpos GnRH en dilución de suero 1/2000 fueron indetectables o bajos en los grupos H2A y W3A. No obstante, con una dilución de suero 1/200 se podían detectar anticuerpos en los sueros de todos los animales del grupo H2A y 3 animales del grupo W3A.

Los animales con valores medios bajo de anticuerpo GnRH no fueron inmunocastrados. Los valores de anticuerpos elevados dieron siempre como resultado animales castrados con éxito. El peso de los testículos de animales con valores de anticuerpos intermedios oscilaba entre 15 y 300 g.

ES 2 280 402 T3

Los valores medios de anticuerpos GnRH por tratamiento mostraron una clara relación con el peso de los testículos (media) por tratamiento (cuadro 3).

Testosterona

Los niveles de testosterona de animales tratados con éxito eran bajos y disminuyeron después de la segunda inmunización. No obstante una mayoría (n=31) de los animales presentaba un efecto de la castración tan pronto como 4 semanas después de la inmunización inicial, mostrando niveles no detectables de testosterona. El peso de los testículos de estos animales oscilaba entre 8 y 36 gramos.

La mayoría de los animales quedaron por tanto inmunizados de modo eficaz tras la administración de una sola dosis.

Aunque los niveles de testosterona en la matanza eran bajos para todos los animales inmunocastrados, dos animales con pesos de testículos de 65 y 70 gramos presentaban niveles considerables de testosterona suero, de 3,80 a 1,18 pmol/ml respectivamente.

Los péptidos que dieron como resultado un peso de testículos bajo combinado con niveles no detectables de testosterona se consideran los péptidos más eficaces para la inmunocastración de cerdos. Estos péptidos son S4A, R8A y G10A.

Los niveles de testosterona en la matanza de cerdos no inmunocastrados oscilaban entre 0,46 y 48,91 pmol/ml.

CUADRO 3

Efecto de los diversos tratamientos en el peso medio de los testículos, valoración de anticuerpos de los péptidos, porcentaje de fijación de anticuerpos de GnRH y niveles de LH y de testosterona en el suero

Trat.	Peso test. media (rango)	Valor. antipép. 10 wpv	GnRH fijación (media)	Testosterona (pmol/ml) a 13wpv (media (rango))
G6k-TD	11 (10-70)	3,32	17,2	n.d. (n.d.-1,18)
pE1A	36 (16-65)	3,24	15,7	n.d. (n.d.-3,80)
S4A	36 (10-69)	3,19	16,9	n.d. (n.d.)
Y5A	44 (15-235)	2,92	11,3	n.d. (n.d.-9,44)
L7A	20 (12-195)	3,52	17,6	n.d. (n.d.-48,91)
R8A	15 (10-19)	3,34	17,7	n.d. (n.d.)
P9A	23 (8-300)	2,62	15,8	n.d. (n.d.-11,57)
G10A	14 (11-39)	3,19	17,6	n.d. (n.d.)

wpv= semanas después de la vacunación, n.d. = no detectable.

II. Sustitución de D-aminoácido por L-aminoácido

Se sustituye D-lisina (k) en las posiciones 6, 16, 27 y 37 en un dímero tandem por una L-lisina (K) y se somete a prueba el péptido resultante (Cuadro 4).

G6k-GnRH-tandem: pEHWSYkLRPGQHWSYkLRPGC# (SEQ ID NO:9)

G6k-GnRH-tandem: PEHWSYKLRPGQHWSYKLRPGC# (SEQ ID NO:14)

CUADRO 4

5	Trat.	Peso test. media (rango)	N° resp./ total	Valor. antipép. a 10wpv	Fijación GnRH (media)	Testosterona (pmol/ml) a 13wpv (media (rango))
10	G6k-TD	11 (10-70)	6/6	3,32	17,2	n.d. (n.d.-1,18)
	G6K-TD	21 (9-175)	5/6	2,70	15,6	n.d. (n.d.-5,26)
15	Control	204 (150-236)	0/5	n.d.	n.d.	2,05 (0,65-9,35)
	n.d.: No detectable					

La sustitución de D-lisina por L-lisina no altera la eficacia del antígeno de la vacuna.

20

III. Discriminación entre GnRH-I y GnRH-II

Se realizó un radioinmunoensayo competitivo de fijación de anticuerpos GnRH con el objeto de determinar si los anticuerpos producidos contra G6K-GnRH-tandem (SEQ ID NO:9) péptido dímero o sus análogos de sustitución de alanina interactúan con GnRH-II o carecen de interacción con GnRH-II. Se preincubaron diluciones de suero con GnRH-I, GnRH-II, un péptido de control o sin péptido. Seguidamente se añadió GnRH-I yodado para competir con los péptidos preincubados para interactuar con los anticuerpos.

Este procedimiento se realizó para suero recogido antes y después de la inmunización de refuerzo, ya que la especificidad de los anticuerpos puede aumentar después de la inmunización de refuerzo debido a la maduración del anticuerpo.

Materiales y cuerpos

Unas muestras de suero 7 semanas después de la vacunación y de la extracción 10 semanas después de la vacunación (3 semanas después de la inmunización de refuerzo) se diluyeron 1/100-1/10000 en PBS con BSA al 0,4% (tampón de dilución). Se pusieron 50 µl de dilución de suero en placas de micropocillos y se añadieron 25 µl de solución peptídica (0, 0, 25, 2,5 ó 25 pmol de péptido tampón de dilución por pocillo). Se dejó que la mezcla incubara durante 24 horas a 4°C. Al día siguiente se añadieron 25 µl de GnRH yodado (aproximadamente 13000 cpm) y después de almacenar durante la noche (4°C) se separó péptido no ligado de péptido ligado con carbón vegetal. Después de la centrifugación se separó el sobrenadante se recontó y se calculó el porcentaje de GnRH yodado ligado a los anticuerpos.

Resultados

Se determinó la fijación de anticuerpos GnRH-I yodado para los sueros de todos los tratamientos con excepción de H2A y W3A, sueros obtenidos a las 7 semanas tras la vacunación. La competición con GnRH-I dio como resultado una reducción drástica de la fijación de GnRH-I yodado (ver fig. 1), mientras que el desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-II era altamente variable. Según lo esperado, ninguno de los antisueros interaccionó con el péptido de control.

Para los sueros de 10 semanas después de la vacunación: en los sueros de casi todos los tratamientos, el GnRH-I yodado fue desplazado por GnRH-I en más de un 80% (figura 2A). La competición por parte GnRH-II para la fijación de anticuerpos a GnRH-I yodado dio como resultado un desplazamiento total o parcial del GnRH-I yodado en casi todos los sueros de los tratamientos R8A, P9A, G10A y G6k-TD y en la mitad de los sueros de los tratamientos Y5A y L7A (figura 2B). No obstante, los anticuerpos de prácticamente la totalidad de los animales del grupo pE1A, H2A, W3A y S4A carecían completamente de interacción con GnRH-II y eran por lo tanto específicos de GnRH-I.

Los resultados de los estudios de desplazamiento de los sueros anteriores al refuerzo (7 semanas después de la vacunación) eran diferentes de los de los sueros 10 semanas después de la vacunación. Nuevamente, los sueros de todos los tratamientos (con la excepción de H2A y W3A, debido a valores bajos de anticuerpo) reconocieron la GnRH-I como determinada por desplazamiento de GnRH-I yodado por GnRH-I (figura 3A). Sin embargo, en contraste con los sueros de 10 semanas después de la vacunación (figura 2) la mayoría de todos los sueros de todos los tratamientos, inclusive pE1A y S4A, reconocieron GnRH-II (figura 3B). Por consiguiente, los sueros de 7 semanas después de la vacunación de pE1A y S4A no son específicos de GnRH-I pero queda plenamente establecida la especificidad para la GnRH-I y no la GnRH-II a las tres semanas después de la inmunización de refuerzo (10 semanas después de la vacunación).

ES 2 280 402 T3

Los resultados de fijación de anticuerpo obtenidos con los sueros anteriores al refuerzo fueron diferentes de los sueros de 10 semanas después de la vacunación. Los antisueros de los tratamientos pE1A y S4A han sido sometidos a ensayo para determinar su aptitud para reconocer GnRH-I o GnRH-II (ver figura 3). Para los dos péptidos, los sueros de 10 semanas después de la vacunación de 6 de cada 7 animales no fijaban GnRH-II. De los sueros pE1A obtenidos antes de la inmunización de refuerzo, 4 de cada 7 animales mostraron fijación/interacción con GnRH-II. Dos sueros no reconocieron GnRH-II y un suero no mostró ninguna interacción con GnRH. Los resultados de los sueros al refuerzo S4A contradicen los resultados de los sueros de 10 semanas después de la vacunación. Los sueros anteriores al refuerzo de todos los animales del grupo S4A reconocieron GnRH-II, siendo similar tanto para GnRH-I como para GnRH-II la inhibición de la capacidad de fijación de GnRH yodado.

IV. Inmunocastración de cerdos con conjugados GnRH-tandem-dímero

De forma similar al scan de alanina descrito en el Ejemplo I, se sintetizaron péptidos de sustitución de alanina del péptido GnRH-tandem (Cuadro 5). Los péptidos se dimerizaron, se purificaron y conjugaron con OVA según lo descrito anteriormente.

CUADRO 5

Secuencias de aminoácidos de los péptidos

Péptido	secuencia de aminoácidos
GnRH-tandem ¹ :	pEHWSYGLRPGQHWSYGLRPGC#
pE1A-GnRH-tandem ¹ :	*A-----A-----#
H2A-GnRH-tandem ¹	-A-----A-----#
W3A-GnRH-tandem ¹	--A-----A-----#
S4A-GnRH-tandem ¹	---A-----A-----#
Y5A-GnRH-tandem ¹	----A-----A-----#
G6A-GnRH-tandem ¹	-----A-----A-----#
L7A-GnRH-tandem ¹	-----A-----A-----#
R8A-GnRH-tandem ¹	-----A-----A-----#
P9A-GnRH-tandem ¹	-----A-----A-----#
G10A-GnRH-tandem ¹	-----A-----A-----#

pE=ácido piroglutámico; *=acetilo; #=amida; -=aminoácido en esta posición no difiere del aminoácido en la misma posición en GnRH-tandem.

¹ se da únicamente para fines ilustrativos.

Cuatro o cinco cerdos por grupo se inmunizaron con 62 µg de equivalente peptídico de los conjugados en adyuvante Specol. En la figura 4 se presenta la eficacia de la inmunocastración de los conjugados.

Los valores de anticuerpos dirigidos contra los péptidos, que se utilizaron para la inmunización, fueron bajos para los cerdos tratados con pE1A, H2A y R8A mientras que se evaluaron anticuerpos antipéptido elevados para los grupos W3A, S4A, Y5A y G10A. Los valores de anticuerpo contra GnRH-I concordaban con los valores de anticuerpo de antipéptido con la salvedad de que los valores de anticuerpo de los cerdos tratados con W3A; se determinaron en estos animales anticuerpo antipéptido elevados; no obstante se comprobó que la capacidad de fijación de los anticuerpos a GnRH-I yodado era reducida.

V. Discriminaron entre GnRH-I y GnRH-II de antisueros GnRH-tandem-dímero

Se observó la fijación de anticuerpo de GnRH-I yodado en un radio-inmuno-ensayo para los sueros 10 semanas después de la vacunación (diluidos 1/10-1/10000) de todos los animales tratados con los péptidos GnRH-tandem-dímero con sustitución de alanina. La competición con GnRH-I dio como resultado una drástica reducción de la fijación de GnRH-I yodado. En los sueros de casi todos los tratamientos, la GnRH-I yodada fue desplazada por GnRH-I en más del 80% (figura 5A).

ES 2 280 402 T3

El desplazamiento de GnRH-I yodada por GnRH-II fue muy variable entre los grupos. Dio como resultado un desplazamiento total o parcial de la GnRH-I yodada en casi todos los sueros de los tratamientos Y5A, L7A, R8A, P9A y TD (figura 5B), mientras que para la mayoría de los sueros de los tratamientos restantes únicamente se determinó un desplazamiento parcial de GnRH-I yodada por GnRH-II o incluso ningún desplazamiento en absoluto.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende por lo menos dos secuencias de decapeptido de GnRH acopladas elegidas dentro del grupo formado por:

*AHWSYkLRPGAHWSYkLRPGC#, pEHWAYkLRPGQHWAYkLRPGC#
 pEHWSAkLRPGQHWSAkLRPGC#, pEHWSYkARPGQHWSYkARPGC#
 pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC#, pEHWSYkLRAGQHWSyLRAAGC# y
 pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC#

donde # es amida y * es acetilo.

2. Péptido según la reivindicación 1, que permite una respuesta inmunogénica que permite discriminar entre diferentes tipos de GnRH, de preferencia entre GnRH-I y GnRH-II.

3. Péptido según la reivindicación 1, que permite un nivel de testosterona prácticamente no detectable después de la vacunación con el péptido en una dosificación adecuada.

4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el péptido se elige dentro del grupo formado por

pEHWAYkLRPGQHWAYkLRPGC#, pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC#, y
 pEHWSYkLRPAQHWSYkLRPAC#, preferentemente seleccionado
 dentro del grupo formado por pEHWSYkLAPGQHWSYkLAPGC#,
 y pEHWSYkLRAQHWSYkLRPAC#

donde # es amida.

5. Péptido según la reivindicación 1-4, que está dimerizado o multidimerizado.

6. Péptido según la reivindicación 5, conjugado con un compuesto de soporte.

7. Péptido según la reivindicación 6, donde el compuesto de soporte es una proteína.

8. Vacuna que comprende un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Vacuna según la reivindicación 8, que comprende además un adyuvante.

10. Vacuna según la reivindicación 9, donde el adyuvante es una fase oleosa de emulsión agua-en-aceite o una doble emulsión de aceite.

11. Vacuna según las reivindicaciones 8-10 suficientemente activa para su administración en una sola dosis para la inmunocastración esencial de cerdos.

12. Anticuerpos contra GnRH-II que se pueden obtener mediante un método que comprende una etapa donde se genera una respuesta inmune a un péptido según las reivindicaciones 1-7.

13. Vacuna contra GnRH-II que comprende un péptido según las reivindicaciones 1-7.

14. Composición para el tratamiento de cáncer de próstata que comprende un péptido según la reivindicación 1-7.

15. Péptido según las reivindicaciones 1-7, que se utiliza como medicamento.

16. Utilización de un péptido como el definido en las reivindicaciones 1-7 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de próstata.

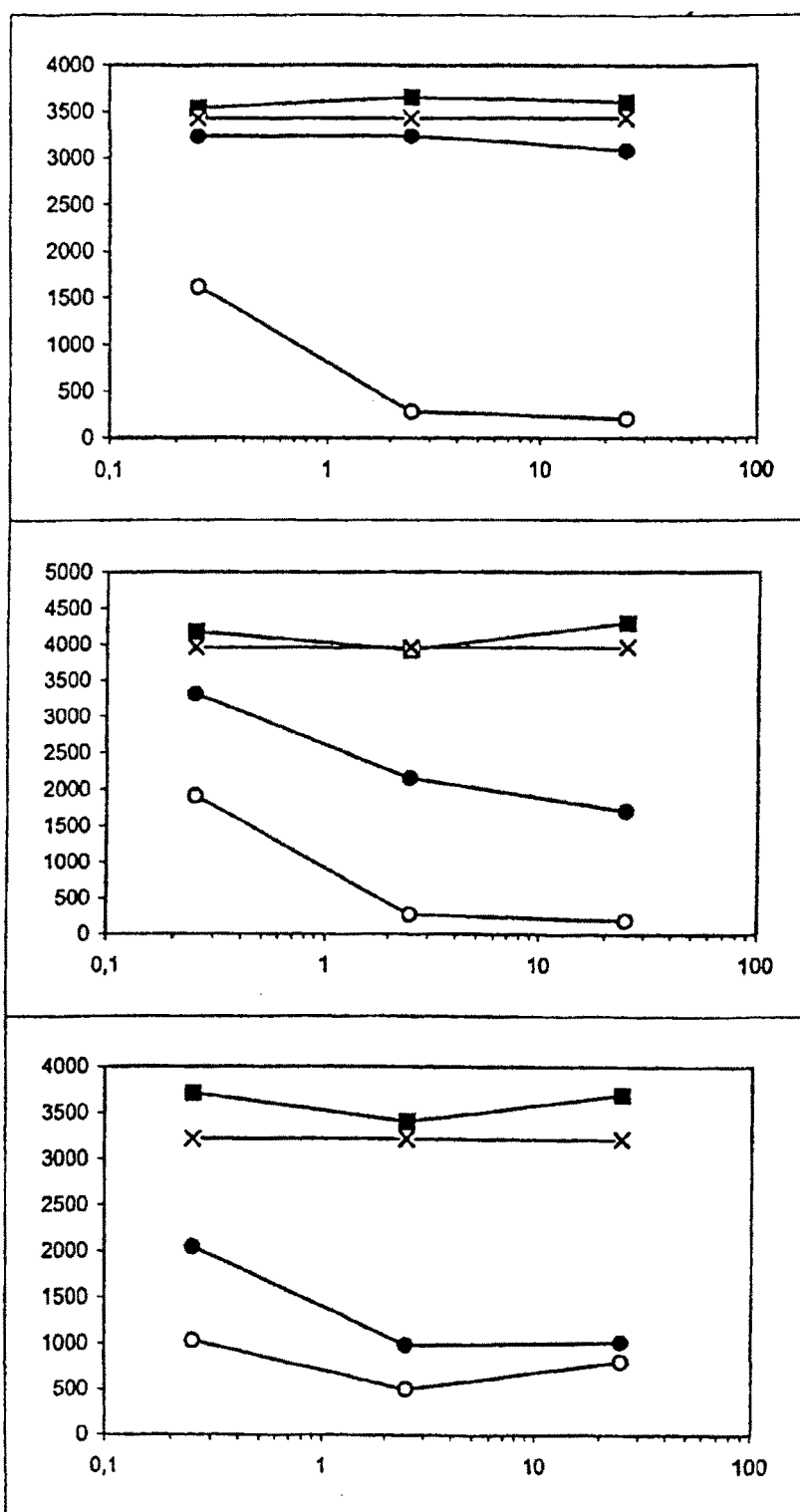
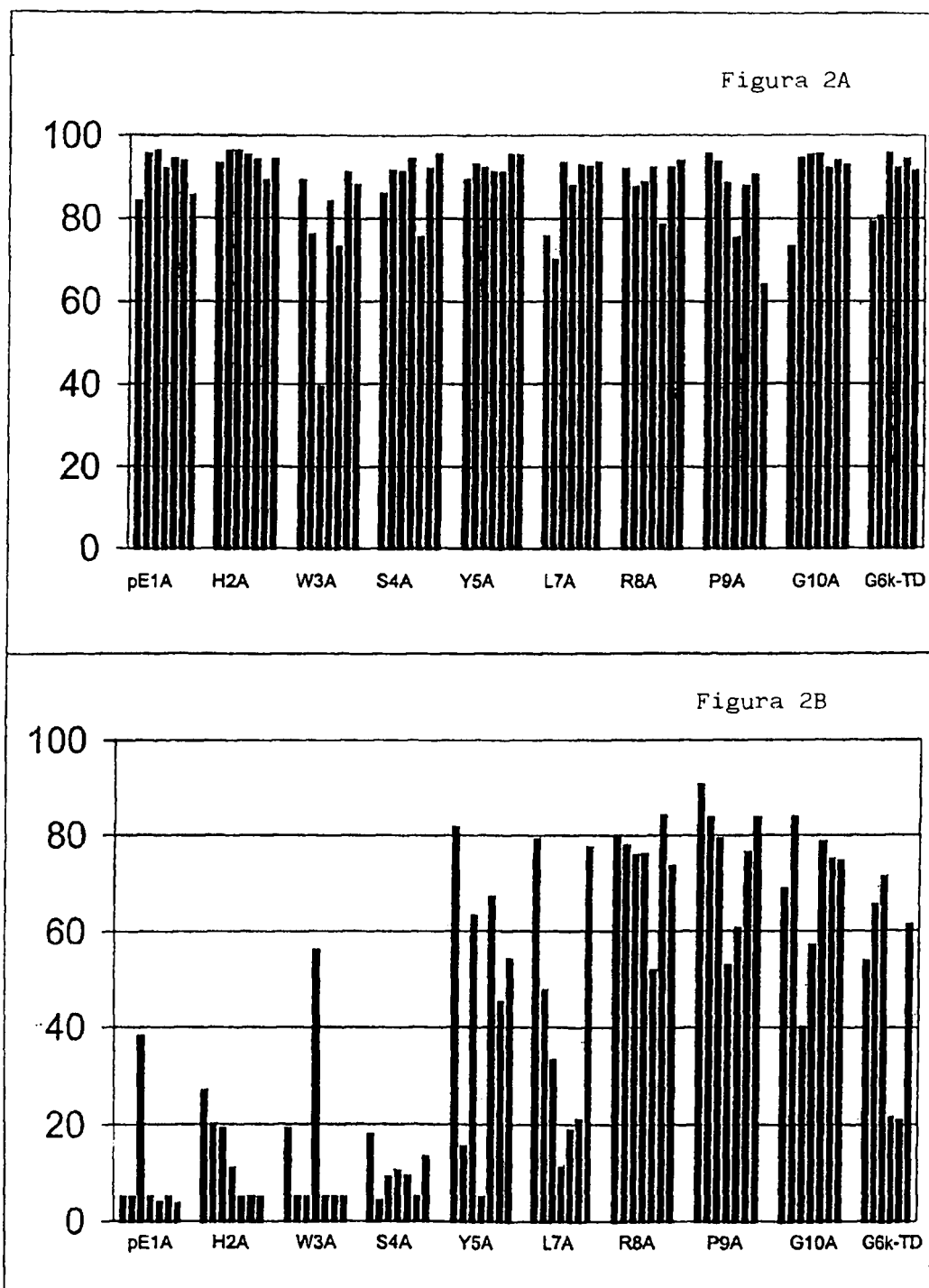
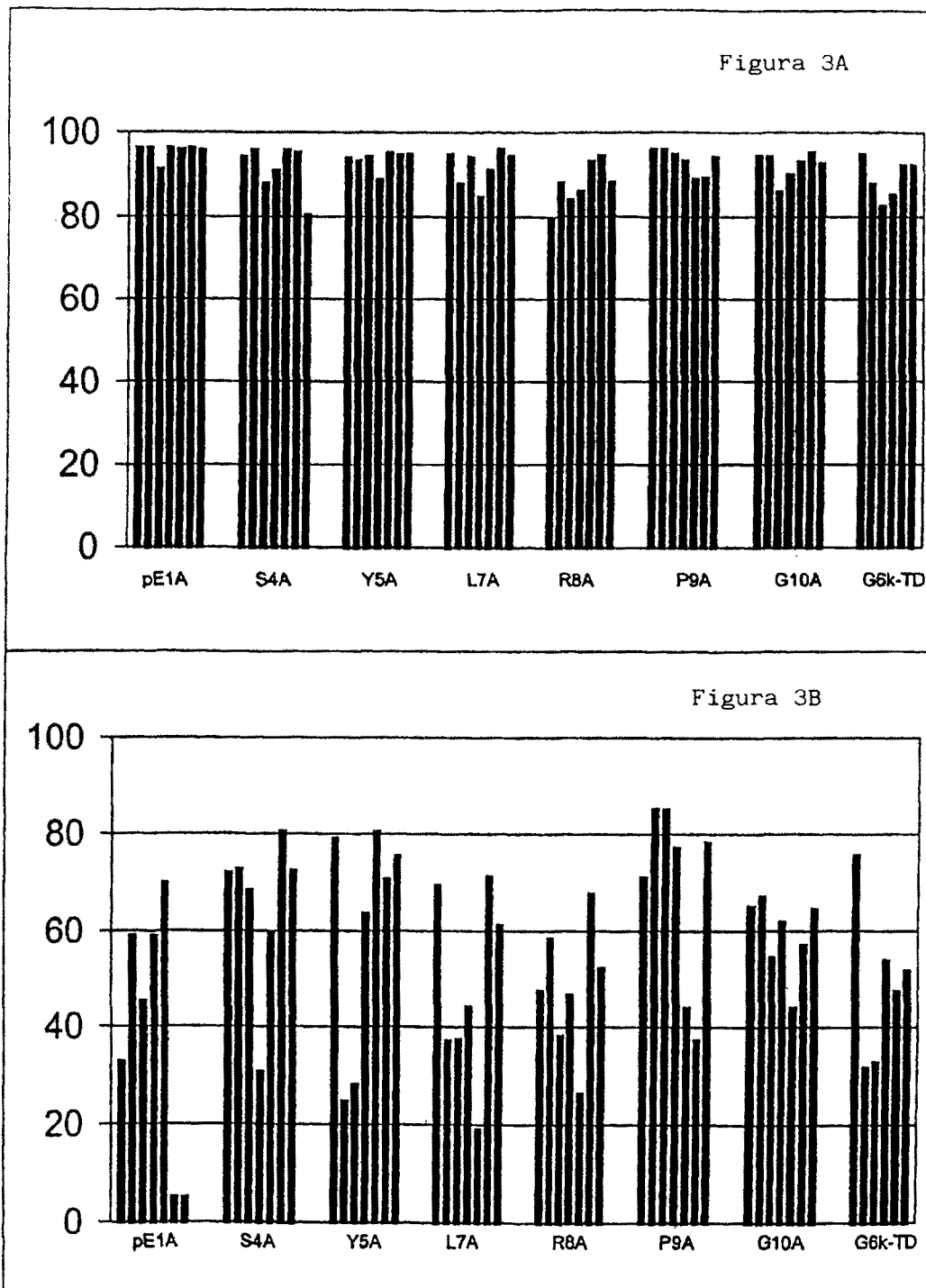
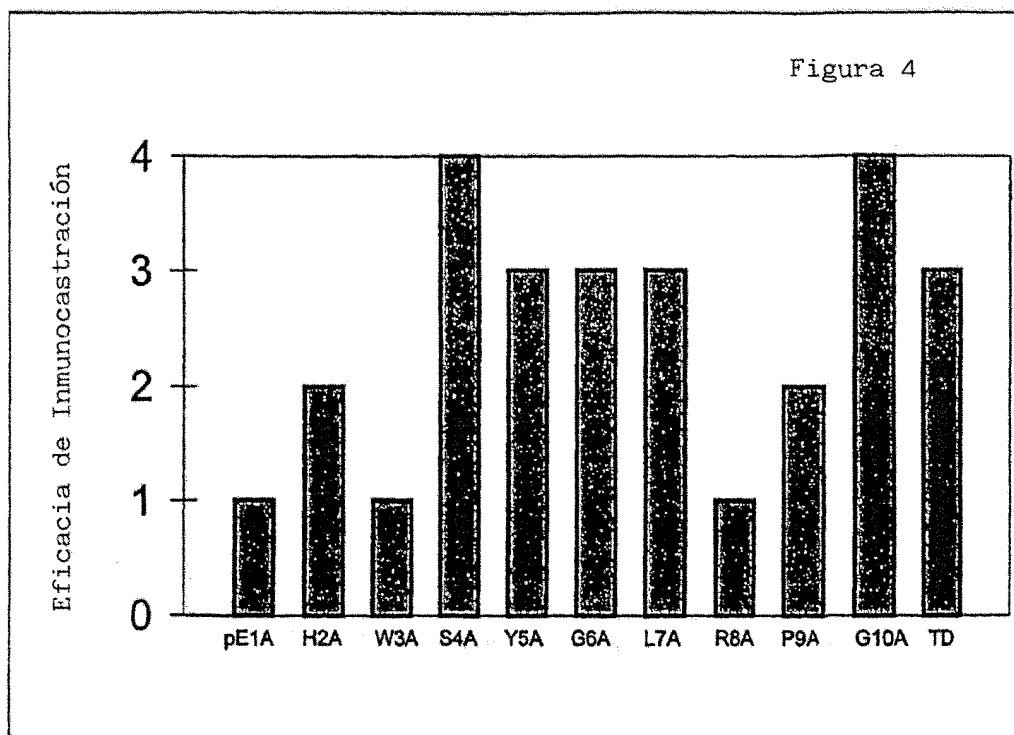
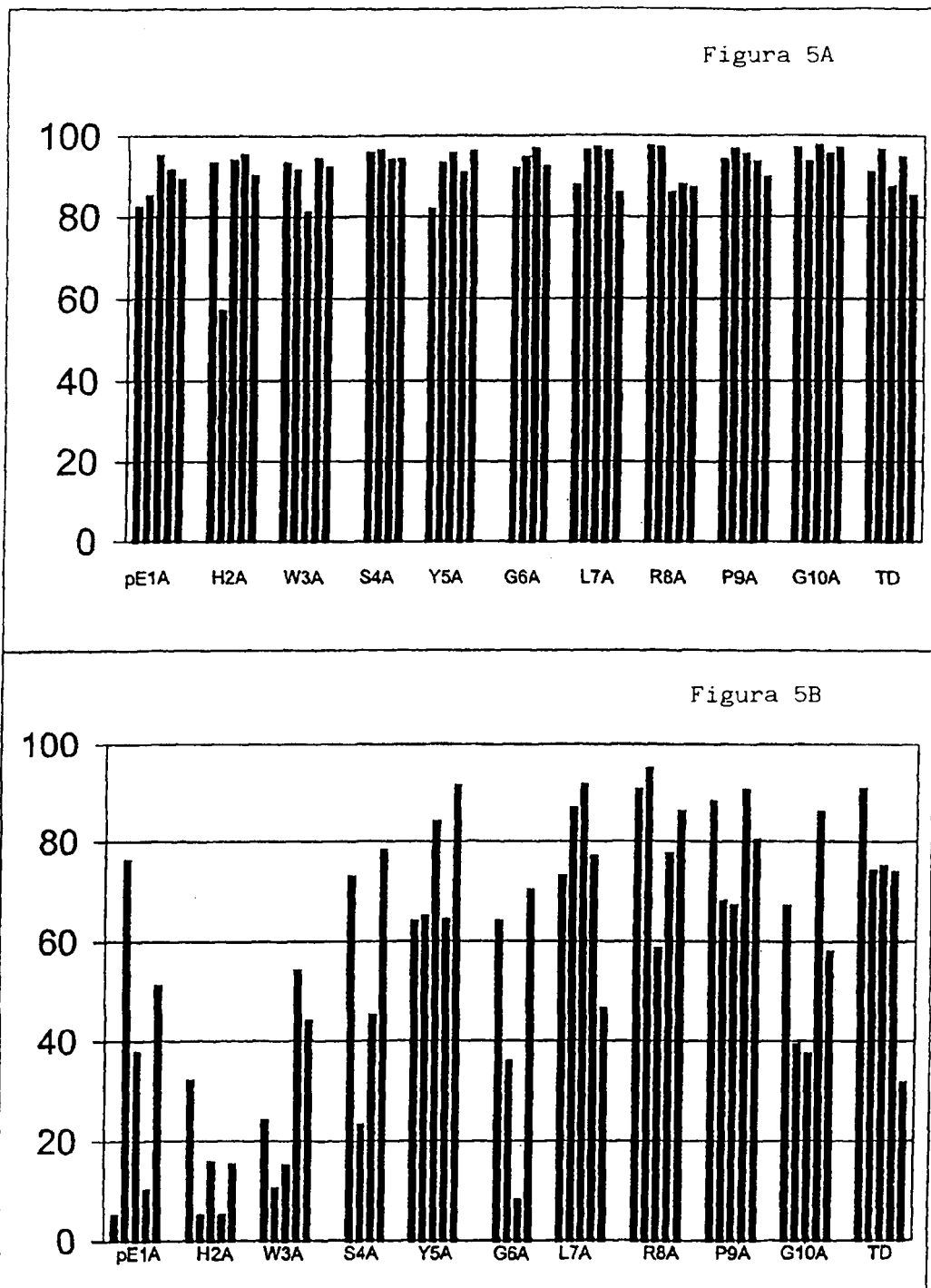


Figura 1









ES 2 280 402 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ID-Lelystad, Instituut voor Dierhouderij en Diergozondheid B.V. Meloen, Robert H. Oonk, Hendrica B. Turks-
tra, Jouwert A.
- 5 <120> Discriminación entre GnRH-I y GnRH-II
- <130> P20700PC10
- <140> PCT/NL01/00666
- 10 <141> 2001-09-11
- <150> US 09/659,983
- <151> 2000-09-12
- <160> 22
- 15 <170> Ver patente 2.1
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial.
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: la secuencia de aminoácidos de GnRH-I
- 25 <220>
- <221> SITIO
- <222> (1)..(11)
- <223> /nota="x en posición 1 representa ácido piroglutámico, x en posición 11 representa amida"
- 30 <440> 1
- Xaa His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Xaa
- 35 1 5 10
- <210> 2
- <211> 21
- 40 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> descripción de secuencia artificial: vacuna tandem-GnRH-I
- 45 <220>
- <221> SITIO
- <222> (1)..(21)
- 50 <223> /nota="X en posición 1 representa ácido piroglutámico o Gln, X en posición 11 representa un enlace directo o un grupo espaciador entre los aminoácidos Gly y Gln, X en posición 21 representa Gly-NH₂ o Gly"
- <400> 2
- 55 Xaa His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Xaa Gln His Trp Ser Tyr
- 1 5 10 15
- Gly Leu Arg Pro Xaa
- 20
- 60 <210> 3
- <211> 22
- <212> PRT
- 65 <213> Secuencia artificial
- <220>

ES 2 280 402 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido según la invención
 <220>
 <221> SITIO
 5 <222> (1)..(22)
 <223> /nota="x en posición 1 representa ácido piroglutámico, K en posición 6 y 16 son aminoácidos levorrotatorios (L-Lys) o aminoácidos dextrorrotatorios (D-Lys), X en posición 22 representa amida"
 10 <400> 3
 Xaa His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 15 Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20
 <210> 4
 20 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: realización preferida
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(22)
 30 <223> /nota="X en posición 1 representa ácido piroglutámico, K representa D-Lys y X en posición 22 representa amida"
 <400> 4
 35 Xaa His Trp Ala Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ala Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20
 40 <210> 5
 <211> 22
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: realización preferida
 50 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(22)
 55 <223> /nota="X en posición 1 representa ácido piroglutámico, K representa D-Lys y X en posición 22 representa amida"
 <400> 5
 60 Xaa His Trp Ser Tyr Lys Leu Ala Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Ala Pro Gly Cys Xaa
 20
 65 <210> 6
 <211> 22

ES 2 280 402 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: realización preferida
 <220>
 <221> SITIO
 10 <222> (1)..(22)
 <223> /nota="X en posición 1 representa ácido piroglutámico, K representa D-Lys y X en posición 22 representa amida".
 <400> 6
 15
 Xaa His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Ala Gln His Trp Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Arg Pro Ala Cys Xaa
 20
 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: un D-Lys⁶-tandem-GnRH dímero
 <220>
 30 <221> SITIO
 <222> (1)..(22)
 <223> /nota="x en posición 1 representa amida, K representa D-Lys"
 35 <400> 7
 Xaa Glu His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr
 1 5 10 15
 40 Lys Leu Arg Pro Gly Cys
 20
 <210> 8
 45 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Descripción de secuencia artificial: pE1A-G6k-GnRH-tandem
 <220>
 <221> SITIO
 55 <222> (1)..(22)
 <223> /nota="x en posición 1 representa acetilo, K representa D-Lys y X en posición 22 representa amida"
 <400> 8
 60
 Ala His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Pro Gly Ala His Trp Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20
 65
 <210> 9

ES 2 280 402 T3

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Y5A-G6k-GnRH-tandem
 <220>
 10 <221> SITIO
 <222> (1)..(22)
 <223> /nota="x en posición 1 representa ácido piroglutámico, K representa D-lisina, x en posición 22 representa amida"
 15 <400> 9
 Xaa His Trp Ser Ala Lys Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Ala Lys
 1 5 10 15
 20 Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20
 <210> 10
 25 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: L7A-G6k-GnRH-tandem
 <220>
 <221> SITIO
 35 <222> (1)..(22)
 <223> /nota="x en posición 1 representa ácido piroglutámico, K representa D-lisina, X en posición 22 representa amida"
 40 <400> 10
 Xaa His Trp Ser Tyr Lys Ala Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Lys
 1 5 10 15
 45 Ala Arg Pro Gly Cys Xaa
 20
 <210> 11
 <211> 22
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: P9A-G6k-GnRH-tandem
 <220>
 <221> SITIO
 <222> (1)..(22)
 60 <223> /nota="X en posición 1 representa ácido piroglutámico, K representa D-lisina, x en posición 22 representa amida"
 65

ES 2 280 402 T3

<400> 11

5 Xaa His Trp Ser Tyr Lys Leu Arg Ala Gly Gln His Trp Ser Tyr Lys
1 5 10 15
Leu Arg Ala Gly Cys Xaa
20

<210> 12

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: GnRH-tandem

<220>

<221> SITIO

20 <222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 1 representa ácido piroglutámico, y X en posición 22 representa amida"

<400> 12

25 Xaa His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Gly
1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
20

30

<210> 13

<211> 23

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: pE1A-GnRH-tandem

40 <220>

<221> SITIO

<222> (1)..(23)

45 <223> /nota="x en posición 1 representa acetilo y X en posición 23 representa amida"

<400> 13

50 Xaa Ala His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Ala His Trp Ser Tyr
1 5 10 15
Gly Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
20

55 <210> 14

<211> 22

<212> PRT

<223> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: H2A-GnRH-tandem

<220>

65 <221> SITIO

<222> (1)..(22)

<223> /nota="x en posición 22 representa amida"

ES 2 280 402 T3

<400> 14

5 Glu Ala Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gln Ala Trp Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20

<210> 15

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: W3A-GnRH-tandem

<220>

<221> SITIO

20 <222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 22 representa amida"

<400> 15

25 Glu His Ala Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gln His Ala Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20

30

<210> 16

<211> 22

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: S4A-GnRH-tandem

40 <220>

<221> SITIO

<222> (1)..(22)

45 <223> /nota="x en posición 22 representa amida"

<400> 16

50 Glu His Trp Ala Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ala Tyr Gly
 1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20

55 <210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Y5A-GnRH-tandem

<220>

65 <221> SITIO

<222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 22 representa amida"

ES 2 280 402 T3

<400> 17

5 Glu His Trp Ser Ala Gly Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Ala Gly
 1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20

210> 18

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: G6A-GnRH-tandem

<220>

<221> SITIO

20 <222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 22 representa amida"

<400> 18

25 Glu His Trp Ser Tyr Ala Leu Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Ala
 1 5 10 15
Leu Arg Pro Gly Cys Xaa
 20

30

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: L7A-GnRH-tandem

40 <220>

<221> SITIO

<222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 22 representa amida"

45

<400> 19

50 Glu His Trp Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
Ala Arg Pro Gly Cys Xaa
 20

<210> 20

55 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: R8A-GnRH-tandem

<220>

<221> SITIO

65 <222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 22 representa amida"

ES 2 280 402 T3

<400> 20

5 Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Ala Pro Gly Gln His Trp Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
Leu Ala Pro Gly Cys Xaa
 20

<210> 21

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: P9A-GnRH-tandem

<220>

<221> SITIO

20 <222> (1)..(22)

<223> /nota="X en posición 22 representa amida"

<400> 21

25 Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Ala Gly Gln His Trp Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
Leu Arg Ala Gly Cys Xaa
 20

30

<210> 22

<211> 22

35 <212> PRT

<223> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: G10A-GnRH-tandem

40 <220>

<221> SITIO

<222> (1)..(22)

45 <223> /nota="X en posición 22 representa amida"

<400> 22

50 Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly
 1 5 10 15
Leu Arg Pro Ala Cys Xaa
 20

55

60

65