

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 702**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 7/23** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2010 E 10721286 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2431052**

54 Título: **Proteína para inmunocastración de mamíferos**

30 Prioridad:

**15.04.2009 CL 9002009**

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

**12.06.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CHILE (100.0%)  
Avenida Libertador Bernardo O'Higgins No. 1058  
Santiago 8330111, CL**

72 Inventor/es:

**SÁENZ ITURRIAGA, LEONARDO ENRIQUE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 467 702 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteína para inmunocastración de mamíferos

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la Ingeniería Genética y Biotecnología y, en particular, al uso de un polipéptido que incorpora la secuencia de aminoácidos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-I) para la inmunocastración de mamíferos.

### Breve resumen de la invención

10 El polipéptido de la presente invención es un polipéptido quimérico o glicopéptido, formado por la fusión de la secuencia de aminoácidos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-I) o sus variantes, y una secuencia teórica no derivada de patógeno que mejora la inmunogenicidad de GnRH. La presente proteína de fusión, su versión glicosilada, así como sus repeticiones en tándem, pueden usarse junto con distintos tipos de adyuvantes para la inmunoneutralización de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-I) generando un bloqueo de la esteroidogénesis, ovogénesis y espermatogénesis en distintas especies animales.

### Comentarios de la técnica anterior

15 Las capacidades reproductivas de ambos sexos en la mayoría de las especies animales sufren fluctuaciones cíclicas temporales gracias a los efectos que generan las hormonas sexuales sobre las gónadas y el sistema reproductor en general. La hormona liberadora de gonadotropina o GnRH desempeña un papel central en este proceso.

20 La hormona GnRH-I es un decapeptido que posee una secuencia de aminoácidos evolutivamente muy conservada y común para la mayoría de los mamíferos. La GnRH-I se libera desde la porción mesiobasal del hipotálamo y entra en el torrente sanguíneo, donde en la hipófisis induce la liberación de LH y FSH desde células gonadotrofas. Durante varios años se ha tratado de generar inmunoneutralización de la hormona GnRH-1 como control de la esteroidogénesis, ovogénesis y espermatogénesis. El bloqueo de GnRH y la concomitante disminución en los niveles de gonadotrofinas tiene variadas aplicaciones, es así que en medicina humana la disminución en la producción de andrógenos de pacientes con carcinoma prostático ha sido blanco de tratamiento durante varios años.

25 Por otro lado, en medicina veterinaria el bloqueo de la capacidad reproductiva con mínimos efectos secundarios de animales de compañía o especies silvestres que puedan significar plagas ha sido un amplio tema de investigación y desarrollo. En el ámbito de la producción animal, la castración quirúrgica de machos es un procedimiento rutinario para evitar un comportamiento sexual agresivo o evitar que la carne adquiera características organolépticas indeseables por el efecto de las feromonas. En todos estos escenarios, la utilización de una vacuna capaz de

30 bloquear la función de la hormona GnRH-I constituye una importante herramienta.

El efecto de diferentes vacunas contra la hormona GnRH se ha evaluado en un gran número de especies animales, utilizando un variado tipo de moléculas asociadas a la GnRH junto con distintos tipos de adyuvantes. La mayoría de éstos enfoques se basan en la síntesis química de haptenos uniendo GnRH a una molécula altamente inmunogénica como albúmina bovina (BSA), ovoalbúmina (OVA), toxoide tetánico (TT) o hemocianina (KLH) (Sad, Chauhan et al. 1993; Beekman, Schaaper et al. 1999; Dunshea, Colantoni et al. 2001; Miller, Gionfriddo et al. 2008). Sin embargo, un fenómeno de dominancia antigénica se ha descrito, en la que estas proteínas "vehículo" suprimen la respuesta hacia epítomos de la molécula de interés luego de sucesivas inmunizaciones, en un mecanismo de tolerancia al antígeno GnRH (Sad, Gupta et al. 1991; Sad, Gupta et al. 1991; Sad, Talwar et al. 1991). La supresión de epítomos puede ser resultado de un defecto en la presentación del hapteno por linfocitos B específicos desarrollando una respuesta inmunitaria de tipo "colaboradora" 2 (Th2) (Renjifo, Wolf et al. 1998). La exclusión de epítomos con alta antigenicidad, como ha sido planteado en la presente invención, reduce el riesgo de supresión antigénica y favorece una respuesta inmunitaria a favor del antígeno GnRH, lo que permite su utilización en repetidas inmunizaciones eficientemente. Otros impedimentos al utilizar el modelo de proteínas "vehículo", es el alto costo en síntesis y conjugación de los antígenos.

45 La tecnología de ADN recombinante ha sido usada para crear moléculas de GnRH repetidas en tándem, unidas a diferentes secuencias proteicas como inmunógenos para linfocitos T colaboradores (Hannesdottir, Han et al. 2004; Jinshu, Jingjing et al. 2004; Khan, Ferro et al. 2007; Zhang, Xu et al. 2007; Khan, Ogita et al. 2008). Proteínas recombinantes con múltiples insertos de GnRH han demostrado que la inmunogenicidad se ve incrementada con el número de secuencias GnRH insertadas [15], y puede utilizar esta ventaja al incorporar un mayor número de repeticiones del péptido de fusión en la formulación. Múltiples epítomos de células B o T como lipopéptidos (Pam3Cys) o diferentes secuencias peptídicas de patógenos como *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium*, virus respiratorio sincitial o virus influenza, flanqueando secuencias de GnRH han sido utilizados en variados modelos "vacunales" y han demostrado efectividad (Khan, Ferro et al. 2007). En relación a esto, el presente antígeno no

incorpora secuencias de patógenos que puedan interferir en el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria contra la secuencia de GnRH, ya que la secuencia intergénica utilizada entre las repeticiones de GnRH se ha diseñado para mejorar la antigenicidad de la secuencia de GnRH.

5 En este sentido, el documento US 2005/0239701 A1 está dirigido al uso como vacuna de multímeros de GnRH  
 10 unidos a proteínas "vehículo" o fragmentos de ellas como toxinas bacterianas, y al uso de vectores recombinantes que incorporan secuencias genéticas que codifican para multímeros de GnRH, solos o en combinación con secuencias genéticas que codifican proteínas "vehículo" tales como el fragmento de toxina tetánica C. Dichos vectores recombinantes están dirigidos a modificar la conducta sexual, la fertilidad o ambos, en vertebrados por medio de la inducción de una respuesta inmunitaria que altera la función sexual fisiológica normal. La presente invención no incorpora secuencias génicas o peptídicas de proteínas "vehículo", ni tampoco corresponde a multímeros de GnRH solos, ya que incorpora una secuencia intergénica no asociada a patógenos o proteínas "vehículo" que funciona mejorando la inmunogenicidad de GnRH como antígeno, además esta secuencia posee la potencialidad de ser glicosilada cuando la proteína recombinante se expresa en sistemas eucariotas capaces de realizar modificaciones post- traduccionales a las proteínas.

15 La publicación internacional WO 01/85763 divulga péptidos quiméricos con eficacia inmunogénica que comprenden la secuencia de la hormona GnRH y mezclas de epítomos para células T "colaboradoras" obtenidos desde diferentes patógenos o péptidos con inmunogenicidad conocida como la toxina tetánica, *Plasmodium falciparum*, o la proteína F del virus del Sarampión, para la producción de títulos de anticuerpos anti-GnRH.

20 En general, la mayoría de las publicaciones en que se divulga la utilización de proteínas de fusión, el método se enfoca a la utilización de secuencias de patógenos que funcionan como epítomos de linfocito T-"Colaborador", unidos a distinto número de repeticiones de GnRH o como en el caso de una síntesis química las repeticiones de GnRH unidas a una molécula inmunogénica *per se*. Ejemplo de esto es el documento "Use of recombinant gonadotropin-releasing hormone antigens for immunosterilization of beef heifers", Journal of Animal Science, 2006; 84(2): 343- 50, Geary TW, Grings EE, MacNeil MD, de Avila DM, Reeves JJ.

25 Un gran número de estudios se han realizado en cerdos y ganado para investigar el uso de la inmunización contra GnRH como método para mejorar la tasa de crecimiento y el producto cárneo obtenido de los animales. Ver por ejemplo, Adams and Adams, J. Animal Sci. (1992) 70:1691-1698; Caray and Bonneau, CR. Acad. Sc. Paris (1986) 303:673-676; Chaffaux et al, Recueil de Medicine Veterinaire (1985) 161:133-145; Finnerty et al., J. Repro. Fétil. (1994) 101:133-343. La castración elimina la fuente de esteroides anabólicos endógenos y la conversión alimenticia se torna menos eficiente, los animales necesitan comer más para generar canales del mismo peso y producen mayor cobertura grasa. En este sentido, se ha demostrado que el crecimiento de un animal entero es más eficiente que el de un animal castrado. La presencia de esteroides sexuales en el animal actúan como anabólicos naturales, permitiendo que este animal tenga un mejor desempeño en crecimiento y desarrollo muscular, gracias a una mejora sustancial en la eficiencia de conversión alimenticia. La mejor eficacia en la conversión alimenticia, tiene además implicaciones ambientales positivas a nivel mundial ya que se traduce en un menor consumo de alimento con menos presión para las tierras agrícolas y reducción en la producción de desechos, promueve una industria más sustentable usando menos alimento y generando menos desechos por cada kilogramo de carne producido. El objetivo de muchos de estos estudios ha sido el permitir a los animales crecer como machos en forma intacta aproximándose al final de la etapa de engorda, para luego someterlos a una castración inmunológica. El uso de vacunas anti-GnRH ha sido propuesto como una alternativa viable para mantener en producción machos sin castrar, los cuales son vacunados al final de la etapa productiva, permitiendo la metabolización de las hormonas sexuales y su olor asociado. Varias patentes se encuentran adjudicadas, las cuales abordan esta problemática (US Pat. No 4.975.420 1990; US Pat . No. 6.045.799 2000; US Pat. No. 6.761.890 BI 2004; entre otras) sin embargo, en ellas las moléculas utilizadas como antígenos son conjugaciones químicas de la secuencia de aminoácidos de la hormona GnRH a una molécula "vehículo". En este sentido, la solicitud de patente US 2005/0239701 A1 protege el uso de un esquema de vacunación a dos dosis 4 a 8 semanas antes del sacrificio del animal para asegurar la efectividad de la vacuna, por un corto periodo de tiempo, esto limita la aplicación de vacunas contra GnRH en las cuales su efectividad sea escasa y que necesiten revacunaciones para lograr los títulos de anticuerpos neutralizantes para bloquear el efecto hormonal.

50 De esta misma forma, los siguientes artículos científicos también se refieren a la conjugación de la secuencia GnRH y una molécula "vehículo" :

Beekman, N. J-, W. M. Schaaper, et al. (1999). "Highly immunogenic and fully synthetic peptide-carrier constructs targeting GnRH." Vaccine 17 (15-16): 2043-50. Indica que para usar péptidos como vacunas sintéticas tienen que ser acopladas a una proteína "vehículo" para hacerlas más inmunogénicas. Sin embargo, la eficiencia del acoplamiento entre la proteína "vehículo" y una proteína es difícil de controlar con respecto a la densidad de carga del péptido. Esto hace que estas proteínas "vehículo" sean poco adecuadas en la práctica. Se han reportado intentos por encontrar moléculas "vehículo" o sistemas de entrega que permiten un acoplamiento fácil o la incorporación de péptidos, densidad de carga reproducible y productos bien definidos . Los autores han comparado

varias construcciones prometedoras o sistemas de entrega por inmunización de cerdos macho utilizando un péptido GnRH en tándem como construcción polilisina ramificada, un lipo-tioéster, una lipo-amida o un conjugado KLH en CFA, y el péptido lipoamida en un complejo inmunosimulador (ISCOM) . Los autores encontraron que las construcciones de lipo-tioéster y de polilisina ramificada constituían las moléculas "vehículo" más efectivas para la inducción de anticuerpos contra GnRH e inmunocastración en cerdos.

Khan, M. A., K. Ogita, et al. (2008). "Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility." *Vaccine* 26 (10): 1365-74. Plantea que la investigación en inmunización activa contra la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-I) ha ganado aceptación como medio para controlar la reproducción y comportamiento en animales de corral, compañía o salvajes. Muchos estudios describen el uso de múltiples copias del mismo péptido en alineación y conjugación con una proteína "vehículo" mayor para aumentar la respuesta inmunitaria del péptido. Sin embargo, los problemas que resultan de la supresión del epítipo de la proteína "vehículo" han disminuido el interés en el uso de materiales genéticos que inicien una óptima respuesta inmune. En el estudio realizado por los autores, una vacuna de 533 bases de pares de ADN se construyó en pcDNA5-HisB que codifica epítipos de GnRH-I-T-colaborador-V5 de 18,871 kDa de proteínas de fusión. Se encontraron células transfectadas COSÍ con la construcción de vacuna que liberan proteína de fusión en el sobrenadante de cultivo. La construcción de vacuna (100 µg/ratón) en solución salina administrada en el músculo cuádriceps anterior de ratas ICR machos y hembras estimuló la respuesta al anticuerpo IgG antígeno específico. Los niveles de testosterona en los machos vacunados se redujeron significativamente ( $p = 0,021$ ) . Se notó una reducción significativa en los implantes uterinos después del apareamiento entre machos inmunizados y hembras control ( $p = 0,028$ ) como también en hembras inmunizadas y machos control ( $p = 0,004$ ). El examen histológico de las gónadas tanto de los machos como de las hembras en estudio en la semana 13 mostró atrofia del epitelio seminífero y supresión de foliculogénesis.

Miller, L. A., J. P. Gionfriddo, et al. (2008) . "The single- shot GnRH immunocontraceptive vaccine (GonaCon) in White-tailed deer: comparison of several GnRH preparations. " *Am J Reprod Immunol* 60 (3): 214-23. Indica que el problema es la necesidad de una inyección de un agente GnRH contraceptivo que sea única, efectiva, multi-anual para controlar la reproducción en la población sobre abundante de venado de cola blanca. El método de estudio en esta investigación se refiere a dos conjugados GnRH, GonaCon (GnRH-KLH) y GonaCon-B (proteína GnRH-Blue®) , que se prepararon en emulsión como formulaciones de vacuna immunoanticonceptivas de una inyección y dos inyecciones. Además, el conjugado de proteína GnRH-KLH fue liofilizado y suspendido en adyuvante AdjuVac para producir una formulación de quinta vacuna. Cada formulación fue administrada a un grupo de cinco venados de cola blanca hembra adulto cautivas. El desempeño reproductivo de las hembras tratadas fue monitoreado por 5 años para determinar la eficacia comparativa de los distintos tratamientos. El resultado obtenido del estudio indica que la longevidad de la respuesta contraceptiva (2 a 5 años) fue influenciada fuertemente por el diseño del antígeno conjugado, el adyuvante utilizado, y la forma de entrega de la vacuna. Los autores concluyeron que las formulaciones de una y dos inyecciones de GonaCon y GonaCon-B produce contracepción multi- anual en venado de cola blanca hembra adulto. GonaCon-B produce un efecto contraceptivo más duradero.

Sad, S., V. S. Chauhan, et al. (1993). "Synthetic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) vaccines incorporating GnRH and synthetic T-helper epitopes." *Vaccine* 11 (11): 1145-50. Se refiere al desarrollo de una vacuna contra la hormona que libera la gonadotropina (GnRH) como método inmunológico para el tratamiento de hipertrofia prostática, basándose en la observación de que la inmunización activa contra GnRH lleva a la producción de anticuerpos anti-GnRH que resultan en la disminución de la glándula prostática . Los autores han investigado la regulación de las respuestas anticuerpo anti-GnRH por las moléculas "vehículo". En estudios previos, los autores han demostrado que el uso de moléculas de grandes proteínas como "vehículos" limita el uso de tales vacunas debido a los problemas potenciales de la supresión anti-hapténica inducida por el vehículo. En este estudio, los autores demuestran que los epítipos de linfocitos T colaboradores sintéticos pueden usarse como "vehículos" para la generación de respuesta de anticuerpos anti- GnRH.

El document de Saenz et al; titulado "Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide based vaccine" *International Journal of Pharmaceuticals*, Elsevier BV, NL, vol. 369, n°1-2, 18 Marzo 2009, pags. 64-71 desvela una proteína de fusión que comprende repeticiones de los residuos de aminoácido 24-33 del polipéptido de rata GnRH-I de la secuencia QHWSYGRPG. El documento desvela una vacuna veterinaria que comprende dicha proteína de fusión y su uso en inmunocastración.

Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, el uso de adyuvantes inmunopotenciadores ha permitido lograr efectos "de vacuna" de largo plazo utilizando una sola dosis de vacuna, por lo tanto, utilizando el antígeno de la presente invención en distintas formulaciones permite modificar el esquema de vacunación.

## 55 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Muestra la respuesta inmunitaria contra la proteína recombinante denominada GnRXG/Q, de la presente invención, medida mediante la técnica de ELISA, como un alza de inmunoglobulinas IgG, en los animales vacunados

versus el control, observadas como densidad óptica específicas contra el péptido recombinante GnRXG/Q en animales inmunizados, utilizando un adyuvante acuoso en la formulación. La dilución de suero utilizada fue de 1:250 y el tamaño de la muestra de 10 individuos por grupo. Los animales se inmunizaron al día 0 y 15. En la Figura 1 -■- corresponde a Control PBS y -▲- corresponde a GNRXG/Q + Adyuvante .

5 Figura 2. Muestra la disminución en la concentración sérica de testosterona, medida mediante la técnica de ELISA, en animales inmunizados con la proteína recombinante denominada GnRXG/Q, de la presente invención, versus control a los días 0 y 15 en un número de 10 individuos por grupo. En la Figura 2 -■- corresponde a Control PBS y -▲- corresponde a GNRXG/Q + Adyuvante .

10 Figura 3. Muestra la respuesta inmunitaria contra la proteína recombinante denominada GnRXG/Q, de la presente invención, como un alza de inmunoglobulinas específicas, medida mediante la técnica de ELISA, utilizando diferentes adyuvantes en la formulación, en un ensayo de 15 semanas. Los animales (n=5) se inmunizaron al día 0 y 30 y el alza en inmunoglobulinas se evaluó hasta el día 110. En la Figura 3 -■- corresponde a control PBS, -▲- corresponde a GNRXG/Q + Chi-H MW, -Δ- corresponde a GNRXG/Q + Chi-L MW, y -●- corresponde a GNRXG/Q + CFA.

15 Figura 4. Muestra la atrofia testicular provocada por la inmunización con la proteína recombinante denominada GnRXG/Q, de la presente invención y un adyuvante en su formulación. En A se observan testículos de un ratón control (1) y de un ratón inmunizado con el péptido GnRX G/Q (2) en la parte inferior de la fotografía se observa una escala en centímetros; en B se observan cortes histológicos de los testículos bajo dos nivel de amplificación .

20 Figura 5. Muestra la disminución en la concentración de testosterona sérica, medida mediante la técnica de ELISA, en caninos inmunizados con el péptido recombinante denominada GnRXG/Q, de la presente invención, en asociación con un adyuvante. Los animales (n=7) se inmunizaron al día 0 y 30 y se evaluó el efecto de la vacuna durante 3 meses .

25 Figura 6. Gel de poliacrilamida SDS al 10% donde se muestra la proteína recombinante denominada GnRX G/Q, de la presente invención, repetida en tándem, purificada desde un extracto total de proteínas bacterianas, con un peso aproximado de 29 kiloDalton

### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención comprende el diseño, la expresión y la purificación de la siguiente proteína recombinante (Secuencia SEC ID N°1 y Secuencia SEC ID N°2, ver listado de secuencias) con una estructura primaria que incorpora la secuencia de aminoácidos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-I) fusionada a una secuencia teórica glicosilable y con actividad inmunogénica, que no incluye secuencias de patógenos o de proteínas "vehículo" en su estructura.

En las secuencias SEC ID N°1 y SEC ID N°2, se observa en negrita la secuencia peptídica de la hormona GnRH-I de 10 aminoácidos, fusionada a la secuencia teórica glicosilable de 14 aminoácidos, este péptido quimérico de 24 aminoácidos ha sido denominado **GnRX G/Q**.

35 Otro aspecto de la invención comprende la vacuna que comprende el péptido denominado GnRX G/Q, para ser utilizado solo o en una repetición en tándem, el procedimiento para producir la vacuna, su uso y método para la inmunocastración de mamíferos .

La secuencia "teórica" puede estar flanqueando la secuencia de GnRH-I en cualquier orden (extremo amino o carboxilo del péptido, Secuencia SEC ID N° 1 y SEC ID N°2).

40 Otro aspecto de la invención comprende la construcción, véanse las secuencias SEC ID N°3 y SEC ID N°4 del listado de secuencias, formado por el péptido quimérico GnRX G/Q repetido en tándem 10 veces y que se observa como proteína recombinante migrando electroforéticamente en un gel de SDS PAGE al 10 % en la figura 6.

45 Otro aspecto de la invención comprende secuencias de nucleótidos y los correspondientes vectores. Las secuencias de nucleótidos fueron diseñadas por genética inversa para ser utilizadas como templados en la expresión recombinante del péptido GnRX G/Q, las que fueron insertadas en vectores de expresión procariotas y eucariotas (secuencias SEC ID N°5 y SEC ID N°6, ver listado de secuencias), resultando la proteína de la secuencia SEC ID N°7 (ver listado de secuencias) que se indica en el listado de secuencias.

La presente proteína ha sido concebida como una proteína de fusión recombinante o quimérica, en la que se puede encontrar la secuencia de aminoácidos de GnRH como un porcentaje de la molécula total (40%), el porcentaje restante (60%) corresponde a una secuencia diseñada a partir del análisis bioinformático de distintos péptidos, diseñándose una secuencia única que permite mejorar la inmunogenicidad del segmento correspondiente a la secuencia de GnRH, evitando la incorporación de segmentos inmunodominantes como inmunógenos derivados de patógenos, toxinas o proteínas "vehículos", lo que la diferencia de otras moléculas patentadas en la técnica anterior.

La secuencia diseñada posee una notable hidrofobicidad e incorpora una secuencia consenso que puede ser O-glicosilada en sistemas de expresión proteica eucariote como levaduras o células de insecto. Esta modificación está orientada a mejorar la antigenicidad del péptido para aumentar la capacidad de ser reconocida por el sistema inmune. Además, la incorporación de este segmento glicosilable diferencia la presente proteína de otras proteínas de fusión, que incorporan GnRH, al tratarse el presente glicopéptido de un proteoglicano. En consecuencia, el sistema inmune reconocerá íntegramente la molécula como un hapteno y no solamente a un segmento inmunogénico de ésta. Otro aspecto de la invención comprende el procedimiento para preparar la proteína de fusión, donde la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína recombinante (secuencia SEQ ID Nos. 5 y 6) ha sido insertada en un vector de expresión con promotor inducible para bacterias *E. coli* B121 (pQE 801, Qiagen) o un vector con promotor inducible para levaduras *S. cerevisiae* (pYES, invitrogen). La proteína ha sido purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni sefarosa, lo que permite eliminar posibles contaminantes del sistema de expresión, principalmente pirógenos, tales como (Lipopolisacarido (LPS)).

Esta secuencia "teórica" ha sido diseñada utilizando los siguientes 10 algoritmos bioinformáticos que evalúan las propiedades de hidrofobicidad, hidrofiliidad y antigenicidad de una secuencia peptídica: 1) Algoritmo de Hidrofobicidad Fauchere-Pliska, el cual genera un perfil de propiedades utilizando una escala de hidrofobicidad basada en particiones experimentales octanol/agua de amidas de N-acetil aminoácidos de cada residuo a pH neutro; 2) Algoritmo de hidrofiliidad de Goldman/Engelman/Steitz, el cual genera un perfil de propiedades calculando los residuos no polares en  $\alpha$ -hélices; 3) algoritmo de hidrofobicidad de Janin, el que genera un perfil de propiedades de hidrofobicidad basado en la fracción molar de ocurrencias de residuos ocultos o expuestos en proteínas conocidas; 4) algoritmo de hidrofobicidad de Kyte Doolittle, el que genera un perfil de propiedades de hidrofobicidad e hidrofiliidad basado en valores de kyte Doolittle para residuos individuales en regiones internas o externas de una proteína globular; 5) Algoritmo de hidrofobicidad de Manavalan, el que genera un perfil de propiedades basado en la hidrofobicidad de un residuo individual modificado por la presencia de otros residuos en un radio de 8 angstrom; 6) Algoritmo de hidrofiliidad de von Heijne, el que genera un perfil de propiedades usando una escala que refleja la energía libre de transferencia estimada cuando una  $\alpha$ -hélice se mueve de una fase acuosa a una no polar; 7) algoritmo de antigenicidad de Hopp and Woods, la escala de Hopp- Woods fue diseñada para predecir la localización de determinantes antigénicos en una proteína, asumiendo que estos están expuestos en la superficie de una proteína y se localizan donde existen regiones hidrofílicas; 8) algoritmo de antigenicidad de Parker, esta herramienta predice la presencia de determinantes antigénicos por la presencia de áreas de gran hidrofobicidad local usando una escala basada en los tiempos de retención en HPLC de péptidos modelos; 9) Algoritmo de antigenicidad del índice de protrusión, esta herramienta genera un perfil de propiedades utilizando un Índice de protrusión que es una escala de antigenicidad basada en el estudio de proteínas con estructura 3D conocida; y 10) algoritmo de antigenicidad de Welling, esta herramienta calcula un valor de antigenicidad como el log del cociente entre el porcentaje de una muestra con conocidas regiones antigénicas y el porcentaje de proteínas promedio.

Diferentes secuencias de aminoácidos fueron evaluadas en su potencial capacidad de mejorar la antigenicidad e hidrofiliidad de la secuencia para GnRH-I cuando se encuentran fusionadas en el extremo amino o carboxilo terminal de GnRH, así como en repeticiones en tándem, comparándola con una secuencia de GnRH-I repetida en tándem sin la presencia de secuencias intergénicas. Utilizando los parámetros antes mencionados, se diseñó la secuencia de aminoácidos  $\text{NH}_2$ -**GPPFSGGGGPPFSA-COOH**, la cual presenta una puntuación de hidrofobicidad en la mayoría de los algoritmos, superior a 0 y mayor que el de la secuencia GnRH-I. Del mismo modo por su condición hidrofóbica, presenta una escasa antigenicidad permitiendo, al analizar la molécula global, que la antigenicidad de la secuencia GnRH-I mejore considerablemente comparada con una secuencia de GnRH-I repetida en tándem sin secuencias intergénicas. En su diseño se incorporó la secuencia señal consenso **SGGG**, que corresponde a un sitio de O-glicosilación, el cual es susceptible de recibir esta modificación postraduccional cuando la proteína es expresada en levaduras u otras células eucariotas. Este tetrapéptido que posee la secuencia general Ser-Gly-Xaa-Gly (donde Xaa puede ser cualquier aminoácido) corresponde a un sitio de reconocimiento para la incorporación de un glicosaminoglicano (Burdon M., et al., 1987). Por último en el diseño de esta secuencia se consideró la exclusión de similitudes con secuencias de patógenos o proteínas "vehículo". Para esto, se realizó un análisis de búsqueda y alineamiento de esta secuencia con bases de datos presentes en GenBank utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Toll. En ninguna de ellas se encontró la secuencia la y Ib de la presente invención.

Para la fabricación y expresión de la proteína recombinante, la secuencia de nucleótidos de doble hebra fue ligada para lograr repeticiones en tándem, y posteriormente, insertada en vectores de expresión en procariontes y eucariotas inducibles por IPTG o glucosa. La proteína recombinante obtenida posee un marcador de 6 repeticiones de histidina,

lo que permite su purificación desde otras proteínas endógenas del hospedero por medio de cromatografía de afinidad con níquel o cobalto.

- 5 Otro aspecto de la invención comprende las secuencias de nucleótidos en las cuales se varia el codón a utilizar en la traducción, los cuales pueden generar el mismo péptido quimérico, como se observan en las secuencias SEQ ID Nos.8-13 del listado de secuencias.

### **Antecedentes técnicos de la Invención**

- 10 Para probar la efectividad de la proteína de la presente invención, específicamente aquella de la Secuencia SEC ID N°7 en su capacidad de bloquear la esteroidogénesis, ovogénesis y espermatogénesis en animales de laboratorio, a través de la inmunoneutralización de GnRH, la proteína generada y purificada antes mencionada ha sido inoculada en animales de laboratorio en cantidades de 50 a 500 µg en un adyuvante oleoso, particularmente el Adyuvante completo o incompleto de Freund o un adyuvante experimental, específicamente quitosano, analizándose distintos parámetros como son la capacidad de los animales de formar anticuerpos contra la proteína, su actividad reproductiva, espermatogénesis, ovogénesis y niveles de andrógenos .

#### Experimento 1

- 15 La molécula como vacuna se aprobó en un tamaño de muestra de 18 animales de laboratorio, obteniéndose diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en cuanto al efecto fisiológico esperado y la respuesta inmunitaria adaptativa con el grupo control, utilizando distintos adyuvantes. (véase la Figura 1 a 4) .

- 20 Diez ratones macho de 8 semanas de edad se inmunizaron con 100 µg de la proteína recombinante GnRX G/Q (secuencia SEC ID N°7) en 100 µl de un adyuvante comercial, particularmente Adyuvante completo de Freund, a los días 0 y 15 por vía subcutánea. Se extrajo sangre de los animales cada 15 días para evaluar la efectividad de la vacuna y su capacidad para elevar títulos de inmunoglobulinas contra la hormona GnRH-I. En la Figura 1 se observa el alza en los niveles de inmunoglobulinas específicos contra la hormona GnRH-I, medida mediante la técnica de ELISA, de los animales inmunizados, en relación al control. En la Figura 2 se observa disminución de los niveles de testosterona sérica, medida mediante la técnica de ELISA, de los animales inmunizados con la proteína recombinante GnRX G/Q antes mencionada comparados con un grupo control. Al finalizar el ensayo los animales fueron sacrificados y ambos testículos fueron comparados macroscópica y microscópicamente con un grupo de animales control (Fig 4.).
- 25

#### Experimento 2

- 30 Quince ratas macho de 8 semanas de edad, fueron inmunizadas con 100 µg de la proteína recombinante GnRX G/Q en 200 µl de un adyuvante comercial, específicamente Adyuvante completo de Freund, y 2 adyuvantes experimentales, particularmente Quitosano de alto y bajo peso molecular, al 0,5% v/v, a los días 0 y 30 de experimentación. Se extrajo sangre de los animales cada 15 días, evaluando el efecto de la vacuna en el alza de inmunoglobulinas específicas contra la hormona GnRH-I en el tiempo medida mediante la técnica de ELISA (Fig 3) .

#### Experimento 3

- 35 Siete perros macho adultos mestizos se inmunizaron con 200 µg de la proteína recombinante GnRX G/Q (secuencia 3c) en 1 ml de un adyuvante comercial, particularmente adyuvante incompleto de Freund, los días 0 y 30. Se extrajo sangre de los animales cada 30 días para evaluar el efecto de la vacuna en los niveles plasmáticos de testosterona. En la figura 5 se observa la disminución de los niveles de testosterona en el tiempo a valores cercanos a la castración quirúrgica (0,1 ng/ml) , medida mediante la técnica de ELISA.

### **40 LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> UNIVERSIDAD DE CHILE

<120> Proteína de fusión para inmunocastración, secuencias de ADN que codifican para la misma, vacuna que la comprende, uso de la misma en inmunocastración de mamíferos, procedimiento para la producción de dicha vacuna y procedimiento para preparar la proteína de fusión.

- 45 <130> 900-2009

<150> CL 900-2009

<151> 2009-04-15

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> péptido sintético

<400> 1

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
1 5 10 15

10 Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> péptido sintético

15 <400> 2

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His  
1 5 10 15

Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
20

<210> 3

<211> 240

<212> PRT

20 <213> péptido sintético

<400> 3



ES 2 467 702 T3

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg  
 20 25 30

Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
 35 40 45

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
 50 55 60

Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg  
 65 70 75 80

Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
 85 90 95

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg  
 115 120 125

Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
 130 135 140

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg  
 165 170 175

ES 2 467 702 T3

Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
 180 185 190

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
 195 200 205

Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg  
 210 215 220

Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
 225 230 235 240

<210> 4

<211> 240

<212> PRT

5 <213> péptido sintético

<400> 4

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His  
 1 5 10 15

Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly  
 20 25 30

Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
 35 40 45

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His  
 50 55 60

Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly  
 65 70 75 80

Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
 85 90 95

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His  
 100 105 110

ES 2 467 702 T3

Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
130 135 140

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His  
145 150 155 160

Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly  
165 170 175

Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
180 185 190

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His  
195 200 205

Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly  
210 215 220

Gly Pro Pro Phe Ser Ala Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly  
225 230 235 240

<210> 5

<211> 72

<212> ADN

5 <213> oligonucleótido sintético

<400> 5

cagcactgga gctacggcct gcgccccggc ggccccccct tcagcggcgg cggcggcccc  
60

cccttcagtg ca  
72

<210> 6

<211> 72

10 <212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 6

ES 2 467 702 T3

ggccccccct tcagcggcgg cggcggcccc cccttcagcg cccagcactg gagctacggc  
60

ctgcgccccg gc  
72

<210> 7

5 <211> 48

<212> PRT

<213> péptido sintético

<400> 7

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg  
20 25 30

Pro Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Gly  
35 40 45

10 <210> 8

<211> 72

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 8

cagcactggg cctacgggtc gcgtccgggt ggcccgccgt tctccgggtg tggtgggtccg  
60

ccgttctccg ct  
72

15

<210> 9

<211> 72

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

20 <400> 9

caacactggt cttacggttt gagaccaggt ggtccacat tctctggtgg tggtggtcca  
60

ccattctctg ct  
72

<210> 10

<211> 72

<212> ADN

5 <213> oligonucleótido sintético

<400> 10

cagcactggt cctacggcct ccgcccgggc ggcccgcct tctccggcgg cggcggcccg  
60

ccggttctccg cc  
72

<210> 11

10 <211> 72

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 11

cagcactggt cctacggctt gcgtccgggt ggtccgcct tctccggtgg tggtggtccg  
60

ccggttctccg gt  
72

15 <210> 12

<211> 72

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 12

cagcactggt cctacggcct ccgcccgggc ggcccgcct tctccggcgg cggcggcccg  
60

ccggttctccg gc  
72

20

<210> 13

ES 2 467 702 T3

<211> 72

<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 13

caacactggg cttacgggtt gagaccaggt ggtccacat tctctgggtg tgggtggcca  
60

ccattctctg gt

5 72

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> péptido sintético

10 <400> 14

Gly Pro Pro Phe Ser Gly Gly Gly Gly Pro Pro Phe Ser Ala  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína de fusión, en la que dicha proteína comprende (i) la secuencia de aminoácidos primaria de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) como se define mediante Gln-His-Trp-ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly fusionada a (ii) una secuencia con capacidad inmunogénica que contiene sitios de O- glicosilación y definida por Gly-Pro-Pro-Phe-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-Pro-Phe-Ser-Ala, en la que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 1 y 2 o una o más repeticiones de la misma.
- 2.- Una proteína de fusión acuerdo a la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende la SEC N° 7.
- 10 3. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha proteína de fusión comprende la secuencia señal SGGG, correspondiente a un sitio de O-glicosilación, capaz de recibir la modificación postraduccional cuando la proteína se expresa en levaduras u otras células eucariotas.
4. La proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha proteína de fusión es una proteína de fusión quimérica o recombinante, en la que la secuencia de aminoácidos de GnRH corresponde al 40% de la molécula total y la secuencia que contiene un sitio de O-glicosilación corresponde al 60% de la molécula total.
- 15 5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de acuerdo con la reivindicación 1.
6. La secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho ácido nucleico tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N° 8-13.
- 20 7. Una vacuna veterinaria, en la que dicha vacuna comprende la proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6 y uno o más adyuvantes veterinariamente aceptables.
8. La vacuna veterinaria de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha vacuna comprende entre 50-500 µg de la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 9.- La vacuna veterinaria de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha vacuna comprende entre 100-200 µg de la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 10.- La vacuna veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha vacuna comprende 100 µg de la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 11.- La vacuna veterinaria de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha vacuna comprende 200 µg de la proteína de fusión recombinante de acuerdo con la reivindicación 1.
- 30 12. Una vacuna veterinaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-11 para su uso en inmunocastración animal.
13. Procedimiento de producción de una vacuna veterinaria de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que dicho procedimiento comprende mezclar la proteína de la reivindicación 1 o secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 con uno o más adyuvantes veterinariamente aceptables.
- 35 14. Procedimiento de preparación de una proteína de fusión de acuerdo con un cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho procedimiento comprende fusionar la secuencia de aminoácidos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH-I) definida por Gly-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly con una secuencia que contiene sitios de O-glicosilación que tienen actividad inmunogénica y que consiste en la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Pro-Phe-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro-Pro-Phe-Ser-Ala para obtener una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 1 y 2 o una o más repeticiones de la misma.
- 40

Figura 1

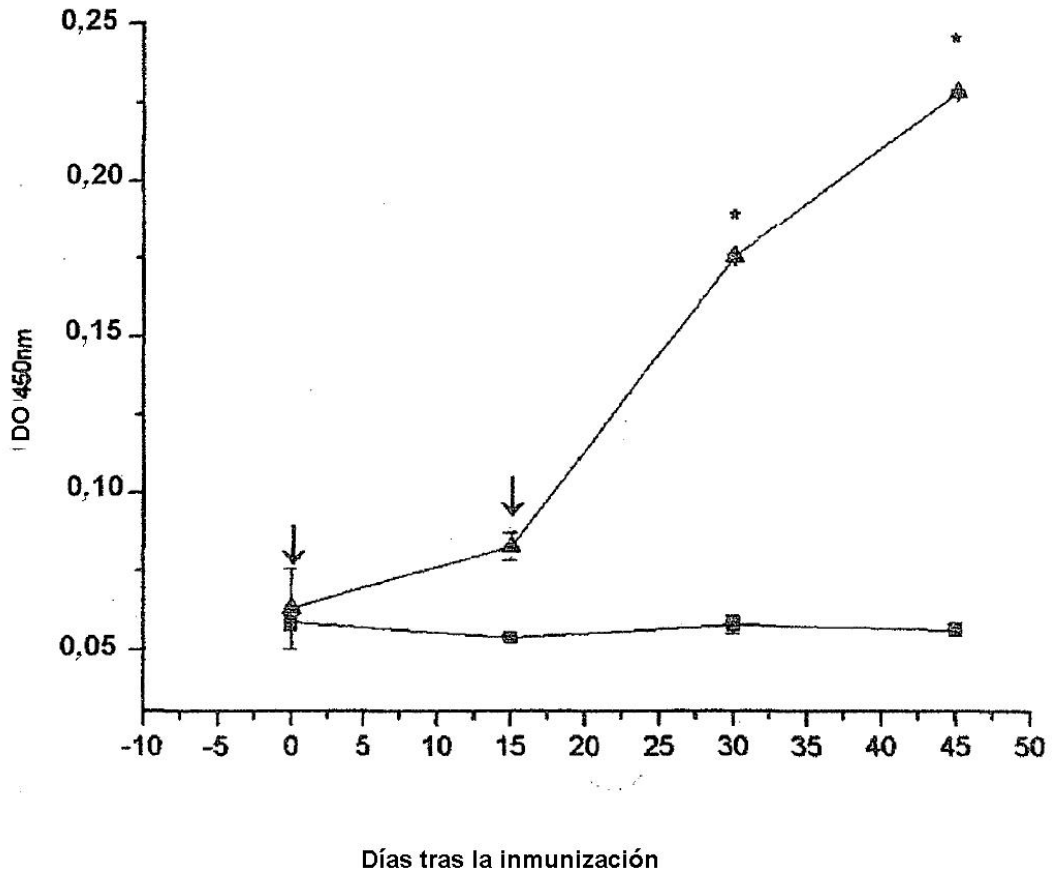




Figura 2

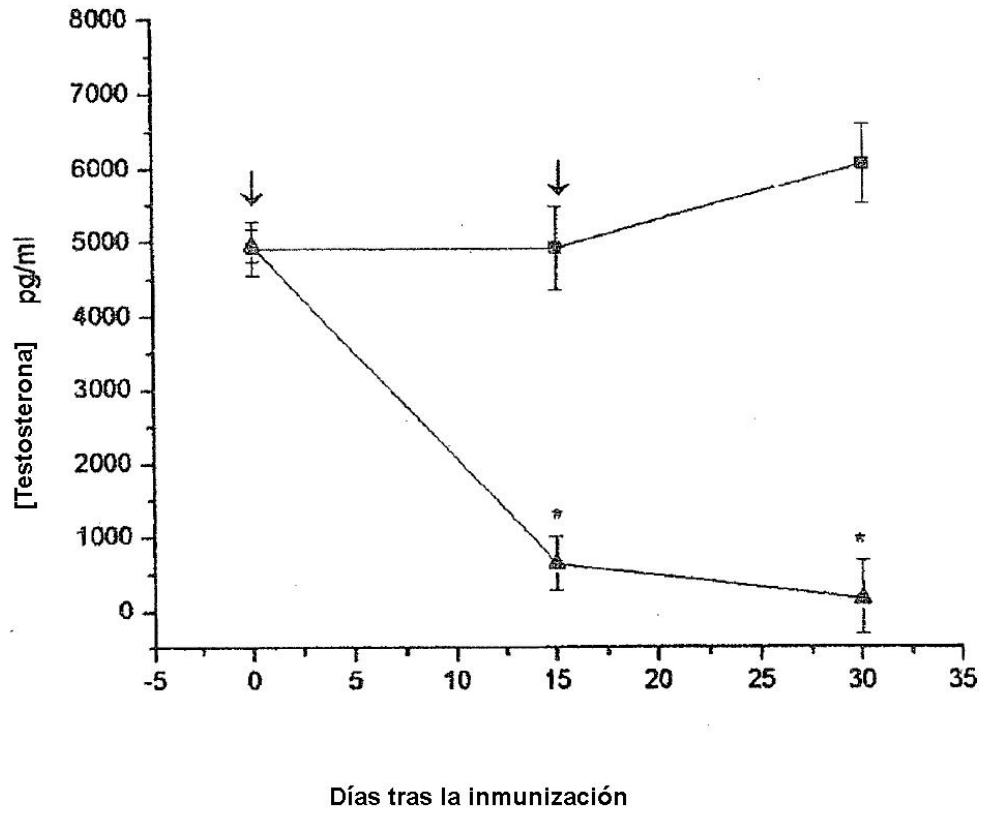


Figura 3

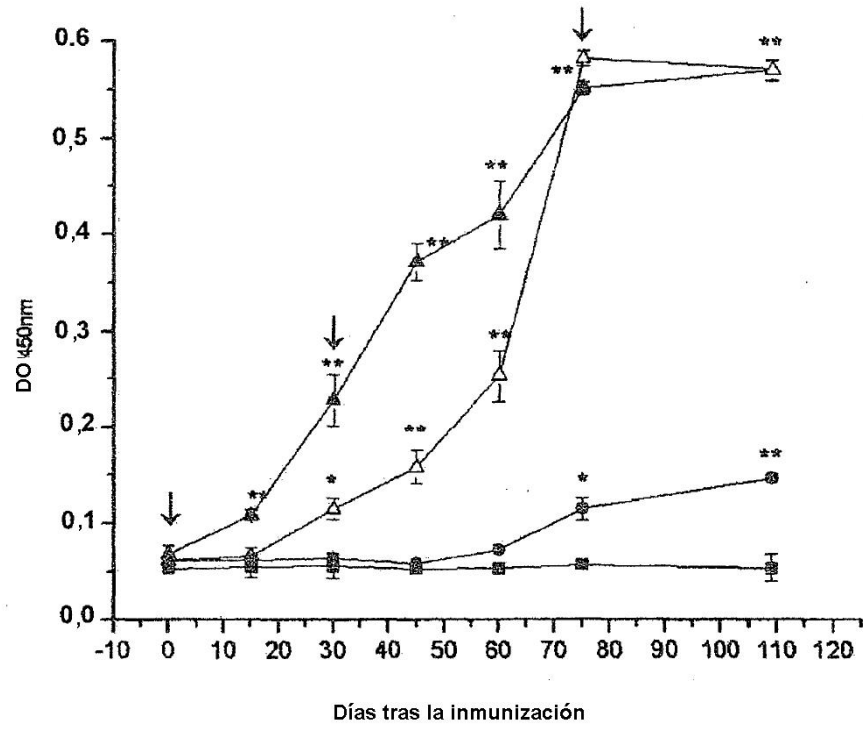


Figura 4

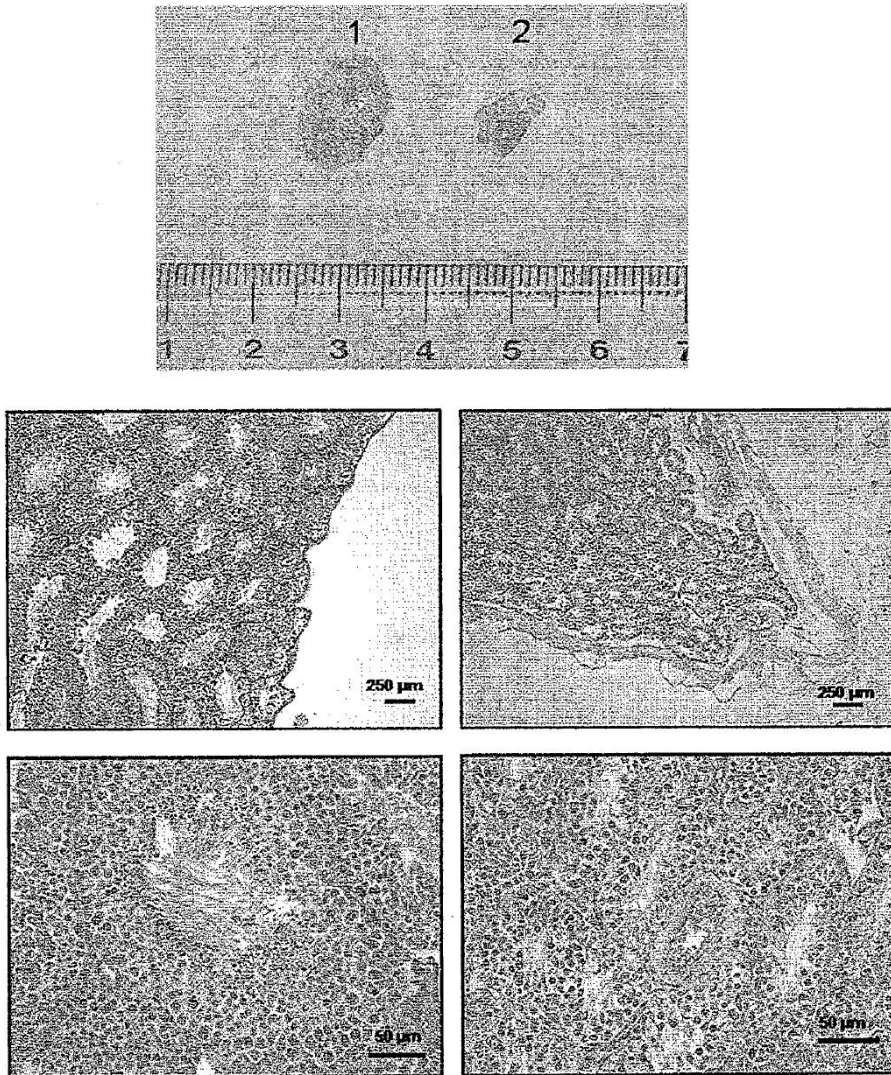


Figura 5

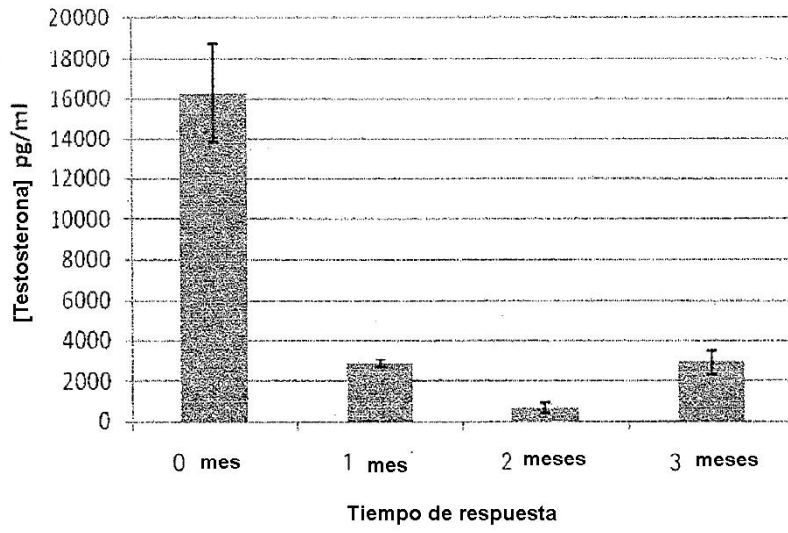


Figura 6

