

PÉPTIDO DE GnRH MODIFICADO Y CONJUGADO DEL MISMO PARA INMUNOCASTRACIÓN DE MAMÍFEROS, MÉTODO DE FABRICACIÓN, COMPOSICIÓN Y KIT

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuentra dentro de los campos de Biología Molecular, Ciencias Médicas e Inmunología, en particular se refiere a preparaciones para fines médicos. En particular, la presente invención se refiere al péptido modificado de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y su conjugado para la inmunocastración de mamíferos, en particular cerdos, al método de fabricación del antígeno de GnRH modificado
10 y conjugado, a una composición y a un kit que comprende dicha composición de vacuna.

FUNDAMENTOS DE LA INVENCION

La GnRH es secretada por la glándula pituitaria y actúa como la principal hormona reproductiva al regular la liberación de dos hormonas gonadotrópicas principales, la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH). A su vez, la LH y la FSH
15 inducen el desarrollo de gónadas y la liberación de esteroides sexuales.

Las vacunas de GnRH estimulan la producción de anticuerpos para inactivar la GnRH endógena. La respuesta inmune anti-GnRH inhibe la liberación de LH y FSH, que son necesarias para el desarrollo y mantenimiento de las gónadas – testículos en el hombre y los ovarios en la mujer. Por lo tanto, la reducción de los niveles de LH y FSH conduce a la
20 pérdida de la función reproductiva.

El desarrollo de técnicas de inmunocastración basadas en la generación de la respuesta inmune a la GnRH es un desafío debido al hecho de que la GnRH es un péptido corto (10 aminoácidos de longitud) y se encuentra naturalmente circulando en el cuerpo. Por lo tanto, dicho péptido es reconocido por el sistema inmunitario como una "autoproteína".
25 Para superar estos problemas, la GnRH se ha conjugado con diversas moléculas antigénicas, tales como, por ejemplo, proteínas de transporte, también llamadas proteínas portadoras.

Las vacunas disponibles con tales construcciones/moléculas han dado como resultado diferentes niveles de éxito en diversas especies, pero la baja inmunogenicidad
30 sigue siendo una dificultad técnica que debe superarse.

Entre las ventajas que aporta la inmunocastración porcina se encuentra la reducción del olor sexual de los cerdos machos. El olor está relacionado con la madurez sexual y la producción de hormonas de los machos porcinos, lo que hace que la carne de animales no castrados no sea apta para el consumo (BABOL *et al.*, 1998). Así, el consumo de carne de
35 cerdo de animales no castrados está condicionado a su procesamiento. Más particularmente, se sabe que el olor sexual ocurre por la acumulación o asociación de los siguientes compuestos: androstenona (5 α -androst-16-en-3-ona) y escatol (3-metilindol). Por lo tanto, en la producción porcina actual, la mayoría de los animales destinados al sacrificio son machos castrados quirúrgica o inmunológicamente (HENNESSY *et al.*, 1997).

La castración quirúrgica (gonadectomía) de cerdos macho jóvenes es un procedimiento común dentro de la producción porcina en todo el mundo (THUN *et al.*, 2006). Además, el sacrificio de cerdos no castrados estaba prohibido en Brasil por el artículo 104 del Reglamento de Inspección Sanitaria e Industrial de Productos de Origen Animal (RIISPOA). En Brasil, la última legislación vigente sobre castración quirúrgica en cerdos es
45 la Instrucción Normativa N° 113, de 1 de junio de 2018, del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA). Esta instrucción normativa establece las condiciones para la castración quirúrgica de cerdos, con el objetivo de promover el bienestar animal y garantizar la calidad de los productos de origen animal. Sin embargo, los animales castrados quirúrgicamente tienen un impacto negativo en el rendimiento zootécnico, la calidad de la carcasa y el bienestar animal. Estos factores fueron decisivos en la búsqueda de una
50 alternativa más sostenible a la castración porcina y motivaron el desarrollo de la presente invención.

El principio de inmunocastración se basa en la aplicación de vacunas que contienen una forma modificada de GnRH conjugada a una proteína, que induce la formación de anticuerpos dirigidos contra la GnRH (ZAMARATSKAIA *et al.*, 2008). El uso del propio sistema inmunitario del cerdo para suprimir la GnRH interrumpe el eje hipotálamo-hipófisis-
55 gonadal al establecer una barrera inmunitaria que interrumpe el paso de la GnRH desde el

sitio de liberación en el hipotálamo hasta el sitio de acción en la glándula pituitaria. La supresión de GnRH evita que estimule la secreción de LH y FSH por la glándula pituitaria, lo que reduce el desarrollo de los testículos y la síntesis de hormonas esteroideas (THUN *et al.*, 2006), incluida la androstenona ZAMARATSKAIA *et al.*, 2008), la principal hormona responsable del olor en la carcasa. Los animales inmunocastrados muestran mejoras en la calidad de la carcasa, en el uso de alimentos (conversión alimentaria), producen menos residuos y utilizan menos agua, contribuyendo a una producción efectivamente sostenible (ESG).

Las principales ventajas de la inmunocastración son:

- (1) Mejora de la calidad de la carne: la inmunocastración puede mejorar la calidad de la carne, haciéndola más suave y jugosa, ya que los cerdos inmunizados tienen menos grasa intramuscular y un mayor contenido de ácidos grasos insaturados;
- (2) Reducción de costos: La inmunocastración elimina la necesidad de realizar la castración quirúrgica de cerdos, lo que reduce los costos de manipulación y transporte, además de evitar problemas de comportamiento asociados con la castración;
- (3) Menor impacto ambiental: La inmunocastración puede reducir el impacto ambiental de la producción porcina, ya que evita la producción de desechos asociados con la castración quirúrgica, como la eliminación del tejido testicular y el uso de anestésicos;
- (4) Mayor eficiencia del alimento: Los cerdos inmunizados tienen un mejor uso de los nutrientes del alimento, lo que puede resultar en un mejor rendimiento de la producción y una mayor rentabilidad para los productores. Según estudios de Santos *et al.* (2012), los animales inmunocastrados presentan un aumento de peso diario aproximadamente un 8,3 % mayor que los animales castrados); y
- (5) Mejora del bienestar animal: La inmunocastración puede contribuir a mejorar el bienestar de los animales, ya que evita el dolor y el estrés asociados con la castración quirúrgica. Los cerdos no registrados tienen altos niveles de testosterona, androstenona y escatol, presentan un comportamiento más agresivo y menos sensibilidad en la carne.

En resumen, los cerdos no registrados tienen altos niveles de testosterona, androstenona y escatol, presentan un comportamiento más agresivo y menos sensibilidad en la carne. Los cerdos castrados quirúrgicamente, es decir, los cerdos a los que se les han extirpado los testículos, son menos agresivos en comparación con los cerdos no castrados, pero están más debilitados. A su vez, los cerdos inmunocastrados son menos agresivos (CRONIN *et al.*, 2003) tienen una mejor conversión alimenticia, GPD (ganancia de peso diaria), peso final de la canal y, en consecuencia, un mayor rendimiento de carne que los cerdos castrados quirúrgicamente (PAULY *et al.*, 2009).

En este escenario, los principales objetivos de la presente invención fueron el desarrollo de un péptido de GnRH modificado y su conjugado para la preparación de composiciones con alta inmunogenicidad para la inmunocastración de mamíferos, en particular la de cerdos, el desarrollo de un método de fabricación de un antígeno de GnRH modificado conjugado, el desarrollo de una composición de vacuna que comprende dicho conjugado y de un kit que comprende dicha composición de vacuna y sus instrucciones de uso.

En particular, el péptido de GnRH modificado de la presente invención está unido/conjugado al portador mediante un enlace covalente y puede representarse mediante una de las siguientes estructuras:

Fórmula 1

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

o

CLOROACETIL-HWSYGLRPG-NH₂

ESTADO DE LA TÉCNICA

A menos que se especifique lo contrario, los términos utilizados a lo largo de esta memoria descriptiva tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la descripción y en el contexto específico en el que se utiliza cada término. Ciertos términos que se utilizan para describir la divulgación se analizan a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional con respecto a la descripción de la divulgación.

Se apreciará que lo mismo se puede decir de diferentes maneras. Por consiguiente, se puede utilizar un lenguaje y sinónimos alternativos para cualquiera de los términos

discutidos en este documento. No se debe asignar un significado especial a si un término se elabora o se discute en este documento. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos, pero la ejemplificación de algunos sinónimos no excluye el uso potencial de otros no enumerados en este documento.

5 Considerando lo anterior, los términos "GnRH modificado" y "péptido de GnRH modificado" en el contexto de la presente solicitud se refieren a una secuencia polipeptídica de 9 aminoácidos de la hormona GnRH y las modificaciones descritas en la presente para sus extremos, y se refieren además al principio activo de la composición de vacuna reivindicada. Por lo tanto, "GnRH modificado" y "péptido de GnRH modificado" son expresiones que pueden entenderse como referencia al antígeno de vacuna que se conjuga con una proteína portadora, capaz de reconocerse y desencadenar una respuesta del sistema inmunitario.

15 Algunos estudios en la literatura proponen vacunas para la inmunocastración de cerdos. Una de estas vacunas es el nombre comercial Vivax®, desarrollado por la empresa Zoetis, que inhibe la actividad de GnRH y la producción de testosterona, reduciendo así tanto la producción como la acumulación de sustancias indeseables. La solicitud de patente correspondiente a dicha composición de vacuna es BR 1020190027932, que comprende los siguientes objetos: una vacuna, un método para preparar dicha vacuna y su uso. Aunque se describe que la composición de vacuna comprende a) un antígeno que comprende GnRH, 20 b) un adyuvante que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG, un esterol, un fosfolípido y un aceite, en donde dicha vacuna es una formulación oleosa o una emulsión de A/A, no se hace referencia al tipo de GnRH utilizado. Sin embargo, en la memoria descriptiva de dicha solicitud, se prevé que la GnRH abarca la GnRH de mamífero de origen natural (SEQ ID NO: 11 (piro-EHWSYGLRPG-NH₂)) e incluye análogos de GnRH que son capaces de inhibir la liberación de gonadotropinas por la glándula pituitaria y, por lo tanto, inhibe la liberación de hormonas esteroideas, estradiol, progesterona y testosterona.

25 Aún así, en BR 1020190027932, se proporcionan ejemplos adicionales de análogos de GnRH que incluyen, de modo no taxativo, leuprolida (pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-DLeu-Leu-Arg-Pro-NH₂; SEQ ID NO: 12), buserelina (pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Tbu) -Leu-Arg-Pro-NH₂; SEQ ID NO: 13), deslorelina (pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NH₂; SEQ ID NO: 14) y fertirelina (pyrGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-NH₂; SEQ ID NO: 15). Además, el documento describe el uso de portadores inmunoestimuladores, a saber: toxina diftérica, toxina de ricina, exotoxina de pseudomonas, alfa-amanitina, proteína antiviral de uva de rata (PAP, pokeweed), proteínas que inhiben el ribosoma, especialmente 35 las proteínas que inhiben el ribosoma de cebada, trigo, maíz, centeno, gelonina y abrina, así como ciertos productos químicos citotóxicos, tales como, por ejemplo, melfalán y daunomicina. Sin embargo, el documento BR 1020190027932 no se refiere a análogos de GnRH, específicamente a una GnRH de 9 aminoácidos, que comprende modificaciones similares a cloroacetilo en el extremo amino-terminal, ni describe un péptido de 9 aminoácidos modificado conjugado con albúmina (BSA) o toxoide diftérico (DT), como se describe en la presente invención.

40 Linder I W y Robey F A, F.El documento en nombre de Linder I, W. y Robey, F. A., titulado *Automated synthesis and use of N-chloroacetyl-modified peptides for the preparation of synthetic peptide polymers and peptide-protein immunogens*, se refiere a un método para incorporar grupos N-cloroacetilo en los extremos amino de péptidos sintéticos usando un programa estándar con un sintetizador de péptidos automatizado. Los péptidos modificados con N-cloroacetilo reaccionan con proteínas que contienen sulfhidrilo tales como albúmina de suero bovino modificada con 4-mercaptobutirimida para formar conjugados proteína-péptido estables.

50 Además, el documento en nombre de Linder I, W. y Robey, F. A. describe que, al incorporar la cisteína en el péptido sintético, la autopolimerización o ciclación del péptido sintético se produce mediante la reacción del sulfhidrilo libre con el grupo cloroacetilo. Sin embargo, contrariamente a lo que propone la presente invención, el documento no describe la modificación en el extremo C-terminal del péptido carboxil GnRH a carbamida, 55 modificación que da como resultado la eficacia de la vacuna descrita en la presente (como se demuestra en los resultados del estudio de eficacia de las tablas 6, 7 y 8 a continuación).

El documento en nombre de Chua, B. Y., Al Kobaisi, M., Zeng, W., Mainwaring, D., & Jackson, D. C., titulado *Chitosan Microparticles and Nanoparticles as Biocompatible*

Delivery Vehicles for Peptide and Protein-Based Immunocontraceptive Vaccines, describe la producción de vacunas immunocontraceptivas basadas en nanopartículas o micropartículas de quitosano como vehículos basados en LHRH. Dichas partículas se han modificado para contener grupos cloroacetilo, que sirven como sitios de enlace covalente para péptidos que contienen residuos de cisteína. Sin embargo, además de que dicho documento no describe un péptido de GnRH que comprende el extremo C-terminal modificado con carbamida, el documento no describe la conjugación a través de SATA, sino más bien, a través de residuos de cisteína.

De manera similar al documento descrito anteriormente, el documento propiedad de Mezö, Gábor, et ál., et ál., titulado Synthesis and Structural Characterization of Bioactive Peptide Conjugates using Thioether Linkage Approaches, describe péptidos de GnRH alargados con residuos de cisteína y conjugados a un portador derivado de tetratuftsina cloroacetilada. Sin embargo, en el documento propiedad de Mezö, Gábor, et ál., la conjugación del péptido con el portador no se realiza a través de SATA, sino más bien a través de residuos de cisteína. Además, aunque el péptido a conjugar tiene el extremo C-terminal modificado a carbamida, dicha modificación se determinó en base a una estrategia de conjugación, pero no para la estabilización del péptido y su eficacia, factor que implica la inmunocastración de los animales. Además, dicho documento se refiere a GnRH – III, que es un péptido diferente al abordado en la presente invención.

El documento propiedad de Oonk, H. B., et ál., titulado *New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH*, describe el desarrollo de una GnRH dimerizada y modificada en una posición de aminoácido para permitir la conjugación de la GnRH modificada con ovoalbúmina. Dicho conjugado se aplicó en la producción de vacunas para la inmunocastración de cerdos. Sin embargo, este documento describe una modificación en un residuo de aminoácido de la GnRH, pero no la modificación en el extremo C-terminal como se propone en la presente invención.

El documento propiedad de Miller, Brian T., et ál., titulado The Occurrence of O-Acylation during Biotinylation of Gonadotropin-releasing Hormone and Analogs, trata sobre la reacción química entre la GnRH y sus análogos con ésteres sulfonados de biotina N-hidroxisuccinimida a través de un enlace tioéter directamente, o mediante la inserción de un espaciador. Sin embargo, en dicho documento se discute un tipo diferente de conjugación, en donde el péptido conjugado carece de la modificación C-terminal como se describe en la presente invención.

En este sentido, a diferencia de las soluciones encontradas en el estado de la técnica, la presente invención propone un antígeno de vacuna de GnRH modificado de alta inmunogenicidad con eficacia para la inmunocastración de mamíferos, en particular cerdos, siendo el extremo C-terminal de dicho péptido siendo carbamida en lugar de carboxilo. Los resultados presentados en la presente muestran que el péptido de extremo C-terminal carbamida tuvo una eficacia superior al péptido de extremo C-terminal carboxilo.

Además, el Solicitante señala que la modificación del péptido de GnRH ligado al uso de un agente solubilizante (urea), también produce un efecto sorprendente en la composición reivindicada en comparación con los documentos de la técnica anterior, ya que los resultados presentados en la presente muestran, sorprendentemente, que el péptido de GnRH modificado estaba más expuesto al sistema inmunitario, lo que resulta en una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes, es decir, induce una respuesta inmunitaria aún más efectiva en el individuo. Por lo tanto, la presente solicitud demuestra inequívocamente que un péptido de GnRH modificado con un extremo C-terminal carbamida tiene efectos superiores en relación con su eficacia, por ejemplo, en comparación con el péptido del extremo carboxilo C-terminal no modificado de la técnica anterior.

Por lo tanto, la técnica anterior mencionada anteriormente, incluso si se combinan entre sí, no daría como resultado las enseñanzas descritas de una manera sin precedentes en la presente invención. En particular, las técnicas anteriores mencionadas anteriormente no describen ni pueden sugerir un péptido de GnRH modificado en el extremo C-terminal carbamida conjugado con un portador a través de SATA y con el extremo N de la GnRH funcionalizada con cloroacetilo. Además, debe mencionarse que la técnica anterior mencionada anteriormente, de manera similar, no describe ni sugiere el uso de urea como agente solubilizante y la exposición a GnRH en la inmunocastración de mamíferos,

especialmente en cerdos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En una primera modalidad, la presente invención tiene como objetivo proponer un péptido de GnRH modificado como se define en la SEQ ID NO.: 1.

5 En una segunda modalidad, la presente invención tiene como objetivo proponer un conjugado que comprende un péptido de GnRH modificado y una proteína portadora.

En una tercera modalidad, la presente invención tiene como objetivo proponer una composición de vacuna, con alta inmunogenicidad, que comprende dicho conjugado de GnRH modificado en una formulación farmacéuticamente aceptable.

10 Además, en una cuarta modalidad, la presente invención tiene como objetivo proponer un kit que comprende la composición de vacuna de la invención, así como sus instrucciones de uso.

Aún así, en una quinta modalidad, la presente invención tiene como objetivo proponer el uso del péptido de GnRH modificado conjugado en la fabricación de una composición de vacuna para inmunocastración de mamíferos, en particular en
15 inmunocastración porcina, en donde el péptido de GnRH modificado consiste en la siguiente estructura: **CIAC**-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ o **cloroacetil**-HWSYGLRPG-NH₂.

20 En una sexta modalidad, la presente invención tiene como objetivo proponer un método para fabricar antígeno peptídico de GnRH modificado conjugado, que se refiere al principio activo de la composición reivindicada en la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Con el fin de obtener una visualización completa y completa del objeto de la presente invención, se presentan las siguientes Figuras, que se describen a continuación.

25 La Figura 1 presenta un esquema de las reacciones del proceso de producción de antígeno sintético, en donde 1A representa la etapa 1 de la funcionalización de la proteína portadora y 1B representa la etapa 2 de la reacción de desprotección del grupo SATA.

La Figura 2 presenta el esquema de la reacción de conjugación de la proteína portadora-SATA con el péptido de GnRH funcionalizado con cloroacetilo de la etapa d del método de fabricación del antígeno sintético de GnRH modificado conjugado.
30

La Figura 3 muestra el cronograma del protocolo de vacunación utilizado para los estudios preclínicos in vivo.

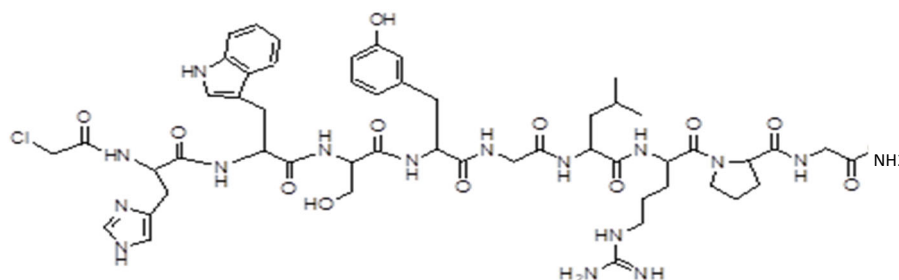
La Figura 4 presenta la SDS-Page y la Western Blotting, respectivamente, marcadas contra el anticuerpo anti-GnRH de las diferentes proteínas portadoras conjugadas con el péptido GnRH. 4A) Columnas: 1 - Marcador de peso molecular (4 µL); 2 - Portador de toxoide diftérico silvestre (proveedor 1) conjugado con el péptido GnRH sin modificación del extremo C-terminal a carbamida y sin urea (10 µL); 3 - Portador de toxoide diftérico silvestre (proveedor 1) conjugado con el péptido GnRH con modificación del extremo C-terminal a carbamida y con urea (10 µL); 4 - Portador de toxoide diftérico recombinante (producto CRM 197 - comprado a la empresa FinaBio Biosolutions LLC) conjugado con el péptido GnRH sin modificación del extremo C-terminal a carbamida y sin urea (Lote 001) (10 µL); 5 - Portador de toxoide diftérico recombinante conjugado con péptido GnRH sin modificación del extremo C-terminal a carbamida y sin urea (Lote 002) (10 µL); 6 - Portador de toxoide diftérico de tipo salvaje (proveedor 1) antes de la conjugación con péptido GnRH (control antes de la conjugación) (10 µL); 7 - Portador de toxoide diftérico recombinante antes de la conjugación con péptido GnRH (Control antes de la conjugación) (10 µL); 4B) Columnas: 1 - Marcador de peso molecular (4 µL); 2 - Portador albúmina bovina (BSA) conjugado con péptido GnRH sin modificación del extremo C-terminal a carbamida y sin urea (10 µL); 3 - Portador de toxoide diftérico salvaje (proveedor 2) conjugado con péptido GnRH sin modificación del extremo C-terminal a carbamida y sin urea (10 µL); 4 - Portador albúmina bovina (BSA) conjugado con péptido GnRH con modificación del extremo C-terminal a carbamida y con urea (10 µL); 5 - Portador de toxoide diftérico salvaje (proveedor 2) conjugado con péptido GnRH con modificación del extremo C-terminal a carbamida y con urea (10 µL); 6 - Portador BSA antes de la conjugación con péptido GnRH (control antes de la conjugación) (10 µL); 7 - Portador de toxoide diftérico salvaje (proveedor 2) antes de la conjugación con péptido GnRH (control antes de la conjugación) (10 µL). Los anticuerpos utilizados fueron: Anticuerpo primario: IgG monoclonal de ratón GnRH I (HU11B) - Santa Cruz Biotechnology (sc32292 Lote: # B0619), dilución: 1/125; Anticuerpo secundario: IgG-Peroxidasa anti-ratón
55

- SIGMA ALDRICH (Cod. A8924 Lote: SLBZ3812), dilución: 1/10.000.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objetivo proponer un péptido de GnRH modificado con extremos cloroacetilo y carbamilo, que consiste en la siguiente secuencia: **ClAc-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂** y con la estructura química que se presenta a continuación.

Fórmula 2



Además, el objeto de la presente invención es proponer un conjugado que comprende el péptido de GnRH modificado y una proteína portadora, en donde la proteína portadora es albúmina bovina (BSA) o toxoide diftérico de tipo salvaje o recombinante u otro portador que tiene características de aminas primarias de residuos de lisina expuestos en la superficie.

Aún así, el objeto de la presente invención es una composición de vacuna de alta inmunogenicidad que comprende el conjugado de dicha GnRH modificada con albúmina o toxoide diftérico (de tipo salvaje o recombinante) u otros portadores que tienen características de aminas primarias de residuos de lisina expuestos en la superficie en una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende DEAE-Dextrano o sus sales conjugadas o polímeros catiónicos que comprenden PEI, quitosano, polipropilenimina, polilisina, poliamidaamina, polialilamina, cloruro de polidialildimetilamonio, poli (isopropil acrilamida - co-acrilamida), ácido co-acrílico, bromuro de poli N-etilvinilperidina, poli dimetilamino, etilmetacrilato, polietilenglicol, clorhidrato de politrimetilaminoetilmetacrilato.

Aún así, es un objeto de la presente invención proponer un kit que comprenda la composición de vacuna para la inmunocastración de mamíferos, en particular cerdos, así como sus instrucciones de uso.

Además, es un objeto adicional de la presente invención describir el uso del conjugado que comprende el péptido de GnRH modificado y un portador en la preparación de una composición de vacuna para inmunocastración de mamíferos, en particular en inmunocastración porcina.

Adicionalmente, el presente invento tiene como objetivo proponer un método para la fabricación de un antígeno de péptido de GnRH modificado conjugado a una proteína portadora, según se describe en los pasos siguientes.

Modificaciones de GnRH

En primer lugar, se realizaron modificaciones en la estructura del péptido GnRH. Originalmente, la molécula de GnRH consistía en un decapeptido que contenía extremos C-terminal (carboxi-terminal) y N-terminal (amino-terminal), de la siguiente manera: pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. En la presente invención, el decapeptido se transformó en un péptido que contenía 9 aminoácidos con los extremos modificados, con cloroacetilo en el extremo N y carbamilo en lugar de carboxamida en el extremo C-terminal, conjugado con albúmina (BSA) o con el toxoide diftérico en una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende DEAE-Dextrano o sus sales conjugadas o polímeros catiónicos que comprenden PEI, quitosano, polipropilenimina, polilisina, poliamidaamina, polialilamina, cloruro de polidialildimetilamonio, poli (isopropil acrilamida - co-acrilamida), ácido co-acrílico, bromuro de poli N-etilvinilperidina, poli dimetilamino, etilmetacrilato, polietilenglicol, clorhidrato de politrimetilaminoetilmetacrilato. Por lo tanto, la GnRH modificada se produce mediante un proceso químico (acetilación química), es decir, sin la necesidad de una planta industrial para producir la vacuna recombinante, lo que requiere un menor nivel de bioseguridad.

Dicho método de fabricación del antígeno de GnRH modificado sintético conjugado por acetilación química comprende las siguientes etapas (Figura 1 y 2):

- funcionalización de la proteína portadora, que puede elegirse de albúmina bovina, toxoide diftérico de tipo salvaje o recombinante u otros portadores que tienen características de aminas primarias de residuos de lisina expuestos en la superficie, con el reactivo SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo) en solución de reacción y EDTA (Figura 1A);
 - incubar la reacción durante al menos 2 horas con agitación a temperatura ambiente (20-30 °C), en donde el reactivo SATA se une a las aminas primarias de la proteína portadora. SATA añade grupos sulfhidrilo a las aminas primarias de las proteínas por ataque nucleófilo y se abandona el grupo succinimida (Figura 1A y 1B);
 - realizar el proceso de diafiltración para eliminar el reactivo SATA libre que no funcionalizó el portador;
 - conjugación del péptido de GnRH modificado con el portador funcionalizado con SATA en presencia de la solución de desacetilación, donde se produce la reacción de conjugación del cloroacetilo del SATA con la lisina de la proteína portadora. La conjugación se produce debido al ataque nucleófilo del péptido al grupo tiol liberado por la hidroxilamina presente en la solución de desacetilación. En dicha reacción química se produce una modificación en el péptido, en donde el antígeno final resultante se compone de varios péptidos unidos a la proteína portadora;
 - incubar la reacción durante al menos 12 horas con agitación a una temperatura de 20 a 30 °C;
 - añadir la solución de detención de la reacción después de la conjugación;
 - diafiltración para la eliminación del péptido GnRH no conjugado con la proteína portadora;
 - esterilización del antígeno conjugado mediante filtración terminal con un filtro de 0.22 µm, para recolectar la solución de antígeno estéril en bolsas desechables estériles; y extracción de muestras para análisis de calidad.
- Después de la aprobación de la calidad final del antígeno mediante métodos bioanalíticos, fisicoquímicos y microbiológicos (esterilidad) (la Figura 4 presenta los resultados de los métodos SDS-Page y *Western Blotting*). A partir de esta figura 4a y 4b es posible observar que el marcaje del anticuerpo contra GnRH se produce en los antígenos (péptido GnRH y su conjugado) que estaban con la modificación de carbamida en el C-terminal y la presencia de urea (Figura 4 A – columna 3) y Figura 4 B – columnas 4 y 5). Estos resultados muestran que tanto la modificación del péptido con carbamida como el uso de urea contribuyen al proceso de conjugación, al reconocimiento antígeno – anticuerpo y a la estabilidad del antígeno. Es sorprendente que el uso de urea desempeñe un papel clave en la reacción de conjugación del péptido con el portador, la estabilidad del conjugado y la exposición del péptido conjugado al reconocimiento de anticuerpos. La capacidad de la urea para formar enlaces débiles y desplegar proteínas ayudó a aumentar la exposición de las aminas primarias de las lisinas portadoras que se funcionalizaron con SATA a la conjugación peptídica y actuó sobre la exposición de los péptidos conjugados por molécula portadora. El antígeno final se prepara con una formulación farmacéuticamente aceptable que comprende DEAE-Dextrano o sus sales conjugadas o polímeros catiónicos que comprenden PEI, quitosano, polipropilenimina, polilisina, poliamidaamina, polialilamina, cloruro de polidialildimetilamonio, poli (isopropilacrilamida – co-acrilamida), ácido co-acrílico, bromuro de poli N-etilvinilperidina, poli dimetilamino, metacrilato de etilo, polietilenglicol, clorhidrato de metacrilato de politrimetilaminoetilo. Por lo tanto, se obtiene una GnRH modificada con un peso molecular de aproximadamente 1145,9-1147,9 Da, denominada comercial y químicamente N-cloroacetil-GnRF (2-10) conjugada con la proteína portadora.
- Con respecto a las etapas del método de fabricación del antígeno de GnRH modificado sintético descrito anteriormente, se presentan más detalles técnicos:
- Etapas 1 – Funcionalización del portador con SATA (portador de SATA) (Figura 1A)
- añadir la proteína portadora (albúmina bovina o toxoide diftérico de tipo salvaje o recombinante) solubilizada a una concentración de 5-10 mg/ml en la solución de reacción;
 - añadir solución de EDTA 10-100 mM y agitar durante al menos 50 rpm;
 - esperar al menos 10 minutos y comprobar el pH. Si es necesario, ajuste el pH entre 8,0 y 9,0 con solución de NaOH (1M);
 - añadir el reactivo SATA solubilizado con DMSO (0,1 – 2% p/v);

esperar al menos 10 minutos y comprobar el pH. Si es necesario, ajuste el pH entre 8,0 y 9,0 con solución de NaOH (1M);

al final de la adición de los componentes y el ajuste del pH, completar hasta el volumen final con la solución de reacción de la siguiente manera:

5 Fórmula 3

$$\text{Cantidad de solución de reacción} = \text{Volumen final (L)} - \{ (\text{Cantidad de solución de NaOH (1M) (L)} + \text{proteína portadora (L)} + \text{volumen de solución de EDTA} + \text{volumen de SATA solubilizado en DMSO}) \}$$

incubar la reacción con agitación, al menos 50 rpm, y durante un periodo mínimo de 2 horas a temperatura ambiente (20-30 °C);

10 clarificar la solución del portador de SATA de la etapa 1 en un filtro PVDF de porosidad máxima de 1.0 µm;

diafiltrar la solución portadora de SATA concentrada de la etapa 1 usando 5-10 volúmenes de solución de diafiltración de la etapa 1, a través de un sistema de retroalimentación continua, es decir, manteniendo constante el volumen de diafiltración 1 en el que se lava la muestra;

15 completar la solución portadora de SATA desde la etapa 1 hasta el volumen final con la solución de diafiltración de la etapa 1;

medir la concentración del portador SATA en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm;

20 proceder con el cálculo para evaluar la concentración de portador SATA en milimolar (mM) y en mg/mL y registrar los resultados;

antes de comenzar la segunda etapa de la reacción, calcular la tasa de grupos protegidos, es decir, el número promedio de SATA incorporado en el portador. Esta medición se realiza mediante la reacción de Ellmans, que es una reacción colorimétrica en la que el reactivo de Ellmans cambia de color en presencia de grupos sulfhidrilo libres y se absorbe a una longitud de onda de 412 nm;

25 medir la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm; calcular la tasa de tioles por molécula portadora y en la fórmula a continuación:

Fórmula 4

Etapa 2 – Conjugación del portador de SATA con el péptido cloroacetilo-GnRH

$$\text{Tioles por molécula portadora} = (1.625 \times \text{Absorbancia del portador SATA}) / \text{Concentración del portador SATA (mM)}$$

30 (reacción de desprotección del grupo SATA – Figura 1B)

añadir a un vial que contiene el péptido solubilizado en solución de urea, 35-40% de solución de diafiltración 1;

accionar el sistema de agitación durante al menos 50 rpm;

35 rpm de agitación durante al menos 12 horas a temperatura ambiente (20-30°C);

añadir al vial 5-20% de la solución de desacetilación;

cerrar el vial y mantener la solución de reacción de la etapa 2 durante al menos 50 rpm de agitación durante al menos 12 horas a temperatura ambiente (20-30°C);

40 después de completar el tiempo de incubación, agregar 0,1-1% de solución de parada de reacción (ácido yodoacético - 30 mg/mL) al reactor e incubar durante al menos 2 horas y bajo agitación durante al menos 50 rpm;

clarificar la solución en un filtro de porosidad de 0,5-1,0 µm;

diafiltrar la solución portadora de GnRH de la etapa 2 usando un volumen total de 5-10 volúmenes de solución de diafiltración de la etapa 2, a través de un sistema de retroalimentación continua, es decir, manteniendo el volumen inicial de la solución portadora de GnRH de la etapa 2;

al final del proceso, completar la solución portadora de GnRH de la etapa 2 para el volumen final con la solución de diafiltración - Etapa 2;

en una cabina de seguridad biológica, filtrar la solución portadora de GnRH de la etapa 2 en un filtro de 0,22 µm.

La composición de vacuna de la presente invención, cuyo ingrediente activo es un péptido de GnRH modificado, comprende además un portador o portador farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en albúmina o toxoide de difteria de tipo salvaje o recombinante u otros portadores que tienen características de amina primaria de residuos de lisina expuestos en la superficie.

Estudio preclínico

Pruebas *in vivo*

A partir de la construcción del péptido de GnRH modificado, se desarrolló una vacuna para la inmunocastración de cerdos cuyas pruebas de seguridad y eficacia, que abarca evaluaciones tales como el comportamiento de montaje previo a la faena, ensayos analíticos (cuantificación de testosterona, androstenona, escatol y anti-GnRH), evaluación sensorial (prueba de cocción de carne con grasa). Dichas evaluaciones se realizaron de manera comparativa para demostrar el rendimiento entre formulaciones de tipo salvaje, recombinantes y basadas en toxoide diftérico (DT) y BSA como portadores.

La Tabla 1 a continuación establece los grupos de animales probados con la administración de la composición de vacuna de la presente invención, que comprende un conjugado de GnRH modificado y un transportador o portador farmacéuticamente aceptable, y la composición de nombre comercial Vivax® disponible en el mercado nacional.

GRUPOS	Tratamientos	n
1	Vivax®	24 (3/corral)
2	Composición de la vacuna GnRH modificada – 15% DEAE, BSA 750 ug/dosis	24 (3/corral)

Tabla 1: Grupos de estudio preclínico, en donde el grupo 1 se refiere al grupo vacunado con Vivax® y el grupo 2 se refiere al grupo vacunado con la composición de vacuna de la presente invención.

Protocolo de vacunación

Para los estudios preclínicos *in vivo*, se utilizaron cerdos sanos de aproximadamente 128 días de edad, que fueron vacunados los días D0 (día cero - primera vacunación) y D28 (segunda vacunación). El estudio se realizó en 8 réplicas con 3 animales/corral, totalizando 9 grupos (n = 24). El día D51 los animales fueron sacrificados siguiendo los procedimientos éticos recomendados (Figura 3).

Por lo tanto, con base en el protocolo de vacunación llevado a cabo con ambos grupos 1 y 2, se obtuvieron resultados sobre el rendimiento zootécnico, la tipificación de la carcasa y la seguridad, que se presentan y describen a continuación.

Rendimiento	Tratamientos	
	GnRH – portador BSA	Vivax®
Ganancia de peso diaria - GPD (kg)	1,212	1,250
Ingesta diaria de pienso - IDP (kg)	3,140	3,165
Conversión alimentaria - CA	2,613	2,510

Tabla 2: La tabla presenta la cuantificación de 3 parámetros de rendimiento:

Ganancia de peso diaria - GPD (kg), Ingesta diaria de pienso - IDP (kg) y Conversión alimentaria - CA, comparando los grupos tratados con la vacuna Vivax® y la composición de la vacuna de la presente invención.

Rendimiento	Tratamientos	
	GnRH – BSA	Vivax®
Peso vivo a la faena (kg) [179 días edad]	151,409	150,021
Peso muerto/carcasa (kg)	107,283	106,650
Rendimiento carcasa (%)	70,874	71,060
Espesor tocino (mm)	17,963	17,656
Profundidad lomo (mm)	69,454	67,217
Carne magra (%)	58,100	57,933
Carne magra (kg)	62,341	61,684

- 5 **Tabla 3:** La tabla presenta la cuantificación de 7 parámetros de rendimiento: Peso vivo a la faena (kg) [179 días de edad], Peso muerto/carcasa (kg), Rendimiento de carcasa (%), Espesor de tocino (mm), Profundidad de lomo (mm), Carne magra (%) y Carne magra (kg), comparando los grupos tratados con la vacuna Vivax® y la composición de la vacuna de la presente invención.

Rendimiento	Tratamientos	
	GnRH-BSA	Vivax®
Androstenona (µg/g)	0,081	0,194
Escatol (µg/g)	<0,05	<0,05
Testosterona (ng/mL)	0,944	1,379

- 10 **Tabla 4:** La tabla presenta los resultados serológicos de la cuantificación hormonal de androstenona (µg/g), escatol (µg/g) en grasa y testosterona (ng/mL) en suero sanguíneo, comparando los grupos tratados con la vacuna Vivax® y la composición de vacuna de la presente invención.

Escatol (µg/g) Grasa	Androstenona (µg/g) Grasa		
	Bajo <0,5	Mediano 0,5-1,0	Alto >1,0
Bajo <0,1	Riesgo bajo	Riesgo bajo	Riesgo mediano
Mediano 0,1-0,22	Riesgo bajo	Riesgo mediano	Riesgo alto
Alto >0,22	Riesgo mediano	Riesgo alto	Riesgo alto

- 15 **Tabla 5:** Tabla de referencia de riesgo en relación con los contenidos de androstenona/grasa (µg/g) y escatol (µg/g) en grasa para la interpretación de los datos de la Tabla 4.

Resultados

Las pruebas de eficacia y seguridad en las especies objetivo se realizaron en los grupos descritos a continuación:

- 20 - **G1:** Negativo (placebo)
 - **G2:** Portador de BSA con péptido GnRH con carboxilo en el extremo C-terminal
 - **G3:** Portador 2 de DT salvaje con péptido GnRH con carboxilo en el extremo C-terminal
 - **G4:** Portador de DT recombinante (producto CRM 197 - comprado a la empresa FinaBio Biosolutions LLC) con péptido GnRH con carboxilo en el extremo C-terminal
 25 - **G5:** Portador de BSA con péptido GnRH modificado con carbamida en el extremo C-terminal
 - **G6:** portador de DT salvaje 1 con péptido de GnRH modificado con carbamida en

el extremo C-terminal

- **G7:** Portador DT recombinante (producto CRM 197 - comprado a la empresa FinaBio Biosolutions LLC) con péptido GnRH modificado con carbamida en el extremo C-terminal

5 - **G8:** portador de DT salvaje 2 con péptido de GnRH modificado con carbamida en el extremo C-terminal

- **G9:** Vivax®

10 La Tabla 6 muestra la comparación de acuerdo con los tratamientos en relación con la ingesta diaria de pienso (IDP), la conversión alimentaria (CA) y la ganancia de peso diaria (GPD).

Grupos	IDP (kg)	C.A.	GPD (kg)
G1 Negativo	2,736	3,09 ^b	0,896 ^b
G2	2,853	2,7 ^{91a}	1,025 ^a
G3	2,831	2,99 ^{1ab}	0,95 ^{ab}
G4	2,762	2,92 ^{2ab}	0,95 ^{ab}
G5	2,856	2,90 ^{6ab}	0,99 ^{ab}
G6	2,973	3,038 ^{ab}	0,985 ^{ab}
G7	2,937	3,048 ^{ab}	0,97 ^{ab}
G8	2,855	2,956 ^{ab}	0,97 ^{ab}
G9 Vivax®	3,001	2,949^{ab}	1,02^a

Tabla 6: Media de ganancia de peso diaria (GPD), ingesta diaria de pienso (IDP) y conversión alimentaria (CA) según tratamientos. Las letras ^{a,b,c} distintas en las columnas indican la diferencia por la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

15 La Tabla 7 presenta los parámetros de tipificación de carcasas en relación con el porcentaje de carne magra, espesor del tocino (mm) y profundidad del lomo (mm) en comparación con los tratamientos realizados.

Grupos	% carne magra p=0,845	Espesor tocino (mm) p=0,845	Profundidad lomo (mm) p=0,165
G1 Control Negativo (no castrado quirúrgicamente)	53,76	19,35	58,62
G2	54,08	19,41	60,53
G3	53,37	19,49	56,92
G4	53,86	19,30	59,03
G5	54,47	19,16	61,96
G6	53,99	20,48	63,74
G7	53,77	20,04	61,00
G8	54,04	19,45	60,61

G9 Vivax®	53,27	20,73	60,578
-----------	-------	-------	--------

Tabla 7: Medios de parámetros de tipificación de carcasas según tratamientos.

La siguiente Tabla 8 presenta la recopilación de datos sobre el peso testicular (PT), el peso corporal en la faena, la ganancia de peso diaria (GPD), la conversión alimentar (CA), el % de carne magra, la medición del espesor del tocino, la medición del espesor del lomo, la dosis de androstenona, la dosis de escatol, el número de animales con comportamiento de montaje previo a la faena, la dosis de testosterona y el título anti-GnRH (GMT) en la faena previa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Grupos	PT (kg) p=0,000	Peso faena (kg) p=0,818	GPD (kg) p=0,096	C.A. p=0,05	% carne magra p=0,845	Tocino (mm) p=0,845	Lomo (mm) p=0,165	Andros t (µg/g)	Escatol (µg/g)	Montaje	Test (ng/mL)	Título (faena)
G1 Negativo	0,7 ^a	137,3	0,896 ^b	3,09 ^b	53,76	19,35	58,62	0,15*	0,15*	15	5,08	1
2	0,69 ^a	144,19	1,025 ^a	2,7 ^{9a}	54,08	19,41	60,53	1,23	0,1	5	4,64	1
3	0,63 ^{ab}	140,25	0,95 ^{ab}	2,99 ^{ab}	53,37	19,49	56,92	0,14*	0,1	7	3,13	1.823
4	0,64 ^{ab}	141,71	0,95 ^{ab}	2,92 ^{ab}	53,86	19,30	59,03	0,15*	0,1	5	3,6	34,84
5	0,55 ^{bc}	143,1	0,99 ^{ab}	2,91 ^{ab}	54,47	19,16	61,96	0,32	0,15	1	1,39	958,6
6	0,45 ^d	143,05	0,985 ^{ab}	3,03 ^{8ab}	53,99	20,48	63,74	0,12	0,1	0	0,1	1.149
7	0,44 ^d	141,12	0,97 ^{ab}	3,05 ^{ab}	53,77	20,04	61,00	0,1	0,1	2	0,1	1.751
8	0,42 ^d	141,64	0,97 ^{ab}	2,96 ^{ab}	54,04	19,45	60,61	0,1	0,1	0	0,21	847,6
9 Vivax	0,5 ^{cd}	144,68	1,02 ^a	2,95 ^{ab}	53,27	20,73	60,578	0,1	0,1	1	0,15	610

Tabla 8: La Tabla presenta los valores medios. Las letras ^{a,b,c} distintas en las líneas indican la diferencia por la prueba de Tukey ($p < 0,05$). PT: peso testicular (Kg); Peso faena: peso corporal promedio en el momento de la faena (Kg); GPD: ganancia de peso diaria (Kg), CA: conversión alimentaria; % de carne magra; Tocino: espesor del tocino (mm); Lomo: espesor del lomo (mm); Androst: dosis de androstenona ($\mu\text{g/g}$) en grasa, Escatol: dosis de escatol ($\mu\text{g/g}$) en grasa, Montaje: número de animales con comportamiento de montaje previo a la faena; Test: dosis de testosterona en suero (ng/mL), Título: dosis anti-GnRH (GMT) previa a la faena.

Los resultados muestran que los grupos con el péptido GnRH modificado con carbamida en la porción C-terminal presentaron resultados similares (Tabla 6 - Rendimiento zootécnico y Tabla 7 - Tipificación de carcasas) o numéricamente superiores (Tabla 8 - Comportamiento de ensamble, testosterona y título) al grupo G9 de la vacuna Vivax®.

En resumen, los resultados presentados demuestran que las formulaciones de vacuna de la presente invención son seguras para su uso en animales, son eficaces y tienen un rendimiento similar, utilizando BSA o DT recombinante o DT de tipo salvaje como portador, en comparación con la vacuna Vivax® disponible en el mercado nacional.