



## Zastosowanie luliberyny w szczepionkach antykoncepcyjnych

Apolinary Szewczuk, Ewa Kurowska

Laboratorium Białek Sygnalowych, Instytut Immunologii i Terapii  
Doświadczalnej, Polska Akademia Nauk, Wrocław

### Luliberin in contraceptive vaccines

#### Summary

Luliberin (luteinizing hormone releasing-hormone, LHRH) is the key regulatory decapeptide that controls reproduction in mammals. It is secreted by the hypothalamus and after binding to a specific receptor it initiates a series of events leading to the liberation of lutropin (LH) and finally steroid sex hormones. In some case, the infertility in females and males may be explained by mutations of the LH or LHRH receptor genes. Immunisation of animals with LHRH conjugates induces high titres of antibodies, resulting in the cessation of the biological function of the hormone and, in the end, in a temporary infertility.

In this review, the application of LHRH vaccines as birth control for women and men was presented. Being effective and inexpensive, semisynthetic LHRH vaccines are useful in the animal breeding for immunocastration. The best vaccines are totally synthetic LHRH ones, which are much safer than the CG- or LH-vaccines based on antigens isolated from human material, which may be contaminated with pathogens.

#### Key words:

luliberin, LHRH, lutropin, LH, contraceptive vaccines.

#### Adres do korespondencji

Apolinary Szewczuk,  
Laboratorium Białek  
Sygnalowych,  
Instytut Immunologii  
i Terapii Doświadczalnej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. R. Weigla 12,  
53-114 Wrocław.

### 1. Wstęp

Luliberynę – hormon uwalniający hormon luteinizujący (LHRH), zwaną także gonadoliberyną (GnRH), wykryto w wyciągach z mózgow ssaków w 1960 r. (1). Wydzielony z podwzgórzy świń i owiec hormon zidentyfikowano w 1971 r. jako decapeptyd o sekwencji:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (2).

Charakterystyczną cechą budowy LHRH jest obecność reszty N-końcowego kwasu piroglutaminowego (pGlu-) i C-końcowego amidu glicyny (-Gly-NH<sub>2</sub>).

Z podwzgórzy człowieka i szczura izolowano cDNA kodujący 92-aminokwasowy prekursor luliberyny, z którego po enzymatycznym trawieniu i modyfikacji powstaje LHRH (3,4). Hormon ten jest także uwalniany przez niektóre komórki układu immunologicznego (5). W przysadce luliberyna wiąże się ze swoistym receptorem (LHRH-R) inicjując szereg procesów biochemicznych, w wyniku których uwalniana jest lutropina – heterodimeryczny hormon luteinizujący (LH) i folitropina (FSH) (6,7). Ostatnio wykazano, że aktywatorami LHRH-R mogą być także heksa- i pentapeptydy, znane wcześniej jako antagoniści endoteliny (8). W jajnikach i jądrach LH wiąże się z receptorem, mogącym wiązać także choriogonadotropinę (CG), stymulując powstawanie hormonów steroidowych uczestniczących w zapłodnieniu i wczesnym rozwoju płodu (9). Steroidy te, aktywując procesy transkrypcji genów i wydarzenia potranslacyjne, mają wpływ na syntezę białek (10).

W ostatnim dwudziestoleciu wykryto u ptaków i ryb wiele izoform LHRH różniących się od przedstawionej sekwencji deka-peptydu dwoma lub więcej resztami L-aminokwasów, lecz zawierających pGlu- i -Gly-NH<sub>2</sub> (7,11). U człowieka i niektórych ssaków stwierdzono obecność dwóch innych izoform LHRH. Jedna z nich posiada sekwencję identyczną z opisaną wcześniej luliberyną kurczęcia (cLHRH), a druga ma podobne właściwości fizykochemiczne i biologiczne jak luliberyna z łososia (sLHRH) (12,13). Wykazano, że izoformy LHRH są uwalniane przez dwie różne populacje komórek podwzgórza małp Rhexus, co sugeruje, że izohormony te mogą uruchamiać różne szlaki działania luliberyny (14).

Zarówno LHRH, jak i jego izoformy znacznie zwiększają inkorporację [<sup>3</sup>H]tymidyny do DNA w komórkach gonad, co wskazuje na ich istotną rolę w syntezie kwasów nukleinowych i białek (15).

Ostatnio Tsutsui i wsp. (16) wydzielili z mózgów przepiórek 12-aminokwasowy peptyd silnie hamujący uwalnianie LH i FSH przez komórki przedniego płata przysadki. Sekwencja tego antagonisty LHRH jest następująca:

Ser-Ile-Lys-Pro-Ser-Ala-Tyr-Leu-Pro-Leu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

Autorzy przypuszczają, że w podwzgórzach kręgowców syntetyzowana jest cała grupa tego typu peptydowych antagonistów z charakterystyczną dla C-końca dipeptydową sekwencją: -Arg-Phe-NH<sub>2</sub>.

## 2. Przyczyny niepłodności ludzi

Niepłodność występuje u około 10% par małżeńskich (17). Przyczyn niepłodności w części z tych przypadków należy szukać w zmianach o podłożu genetycznym dotyczących budowy receptorów luliberyny i/lub lutropiny, a także podjednostki β lutropiny (18).

U osób cierpiących na hipogonadyzm połączony często z niepłodnością, oprócz LHRH-R typu „dzikiego” stwierdzono trzy następujące warianty: Arg262Gln (zamiana Arg<sup>262</sup>na Gln), Gln106Arg, Tyr284Cys (19,20). Dotychczas opisano także cztery warianty hLH powstałe przez jedno- lub dwupunktową mutację genu kodującego podjednostkę  $\beta$ hLH: Trp8Arg, Ile15Thr, Gln54Arg i Gly102Ser (21-23). Pierwsze dwa z wymienionych wariantów wykryto u chorych obojga płci, u których występowała niepłodność (24,25). Szczególnie często niepłodności kobiet towarzyszy wariant Gly102Ser  $\beta$ hLH związany z zamianą kodonu CGT na AGT w genie podjednostki  $\beta$  hormonu (26). Interesującą i mającą prawdopodobnie znaczny wpływ na niepłodność jest obserwacja, że podawanie heterozygotycznym kobietom luliberyny silniej stymuluje uwalnianie obu genetycznych wariantów LH niż uwalnianie „dzikiego” typu tego hormonu (27).

Występowanie kilku wariantów stwierdzono także w przypadku receptora lutropiny (9). Wariant Ala593Pro tego receptora wykryto u mężczyzn cierpiących na rzekome obojnactwo (28). U osób obojga płci, u których występował niedorozwój gonad i niepłodność zanotowano warianty Asn291Ser i Ser616Tyr oraz dwie nonsensowe mutacje w LH-R (29). W ludzkim receptorze lutropiny odkryto 12 miejsc mogących ulegać mutacjom, głównie w domenie transmembranowej. Część z nich wykryto u chorych obojga płci z zaburzeniami płodności (pseudowczesne dojrzewanie kobiet, mikropenis) (30,31).

Stosując niektóre syntetyczne analogi LHRH, blokujące receptor tego hormonu (np. Buserelin, Nafarelin, NalGlu, Antide, Detirelix), można spowodować okresową niepłodność (7,32-34).

### 3. Szczepionki antykoncepcyjne regulujące płodność ludzi

Niepokojąco szybki przyrost populacji ludzkiej (szczególnie w krajach słabo rozwiniętych) spowodował, że koniecznością stało się prowadzenie, pod egidą organizacji międzynarodowych (WHO), prac nad szczepionkami antykoncepcyjnymi bezpiecznymi dla zdrowia i mogącymi mieć zastosowanie na szeroką skalę. Początkowo w szczepionkach tych stosowano ludzką choriogonadotropinę (hCG) lub fragmenty tego hormonu, odgrywającego znaczącą rolę w początkowych etapach ciąży i jej utrzymaniu (35). Korzystnym rozwiązaniem mogły być szczepionki na bazie LHRH, których skuteczność sprawdzono w badaniach klinicznych (36-38). Znaczną część tych preparatów można zaliczyć do szczepionek półsyntetycznych, tj. pierwszej generacji. Do tej grupy należą koniugaty hormonu z nośnikami białkowymi (albumina bydłęca lub ludzka, toksoid tężca, cholery lub błonicy). Stosowano także syntetyczny hormon z większą liczbą grup aminowych lub karboksylowych ((D-Lys<sup>6</sup>)LHRH, (Glu<sup>1</sup>)LHRH) (38), zamknięty w biodegradowalnych mikrokapsułkach (39).

#### 4. Półsyntetyczne szczepionki

Luliberyna nie jest skutecznym immunogenem, lecz koniugaty tego hormonu z niektórymi nośnikami białkowymi indukują powstawanie przeciwciał skierowanych przeciw LHRH, hamujących działanie hormonu, co w konsekwencji prowadzi do niepłodności. Sposoby wiązania LHRH z nośnikami przedstawiono w tabeli 1. Wykazano, że immunizowanie samic szczura koniugatem LHRH z albuminą surowicy bydłowej indukuje powstawanie przeciwciał anty-LHRH, co powoduje obniżenie stężenia LH we krwi oraz atrofię jajników i niepłodność zwierząt (40). Kilkakrotne immunizowanie samców szczura i królika koniugatem LHRH z toksoidem tężca powodowało wzrost miana przeciwciał anty-LHRH, którego maksimum stwierdzono w 8-9 miesiącu immunizacji. Równocześnie obserwowano zmniejszenie wagi jąder, najądrzy oraz niepłodność zwierząt. Po zakończeniu immunizacji miano przeciwciał spadało wraz z powrotem płodności zwierząt (41). Również immunizacja LHRH sprzęgniętym poprzez dipeptyd Gly-Cys z takimi preparatami jak: tuberkulina, toksoid błonicy, toksoid tężca lub tyroglobulina indukuje odpowiedź immunologiczną oraz morfologiczne zmiany w gonadach i całkowite zahamowanie spermatogenezy. Końcowym efektem immunizacji jest niepłodność zwierząt. Spośród kilku przebadanych adiuwantów najaktywniejszymi okazały się ałun i NISV (niejonowy surfaktant) (42,47). Przegląd białek będących nośnikami peptydowych antygenów oraz bifunkcyjnych odczynników stosowanych do sporządzania koniugatów (m. in. aldehyd glutarowy, karbodiimidy, diisocyaniany) przedstawił w swojej pracy Muller (48).

Tabela 1

##### Półsyntetyczne szczepionki LHRH

Nośnik(i)	Sposób wiązania	Odczynnik wiążący	Literatura
albumina wołowa (BSA)	-CO-NH-	karbodiimid	(40)
toksoid tężca	-CO-NH-	nie podano	(41)
tuberkulina, toksoid tężca lub dyfterii, tyroglobulina	-Gly-Cys-	MBS*	(42)
albumina ludzka (HSA)	-Gly-Cys-	nie podano	(43)
owoalbumina (Ova)	LHRH-COOH	karbodiimid	(44)
hemocyjanina, owoalbumina	(dimer) LHRH-Gln-LHRH	MBS	(45,46)
kopolimer kwasów mlekowego i glikolowego (PLGA)	-NH (D-Lys <sup>6</sup> )LHRH mikrogranulki	MBS	(38,39)
toksoidy bakteryjne, tyroglobulina, poli(aminokwasy)	LHRH-Gly-Cys, syntetyczny epitop T <sub>h</sub>	MBS	(42)
BSA, HSA, toksoid tężca, cholery lub błonicy	(D-Lys <sup>6</sup> )LHRH, (Glu <sup>1</sup> )LHRH	karbodiimid lub MBS	(38)

\*MBS – maleimidobenzoilosuccinimid

#### 4.1. Szczepionki immunokastracyjne

Stosowane w hodowli zwierząt szczepionki antykoncepcyjne z koniugatami LHRH nazwano szczepionkami immunokastracyjnymi. Ich aplikowanie może zastępować chirurgiczną kastrację zwierząt. Meloen i wsp. (45) do immunokastracji samców prosiąt zastosowali 20-aminokwasowy peptyd, będący podwójną cząsteczką LHRH połączoną chemicznie z hemocyjaniną. Stwierdzono zahamowanie wzrostu jąder i spadek poziomu testosteronu w surowicy zwierząt. W późniejszych badaniach uzyskano koniugaty, w których hemocyjaninę zastąpiono owoalbuminą (46). W porównaniu z kastracją chirurgiczną immunokastracja jest zabiegiem bezpieczniejszym, tańszym i prostszym w wykonaniu.

Prendiwille i wsp. (43) immunizując 2-krotnie jałówki luliberyną (1 i 0,1 mg), połączoną poprzez dipeptyd (-Gly-Cys-) z ludzką albuminą, stwierdzili wzrost miana przeciwciał anti-LHRH, spadek stężenia estradiolu w osoczu oraz brak rui i owulacji w tej grupie zwierząt. Prowadziło to do okresowej niepłodności. Stosując LHRH związany poprzez grupę karboksylową z owoalbuminą do immunizacji jagniąt Brown i wsp. (44) uzyskali obniżenie poziomu LH w osoczu w okresie 46-90 tygodni oraz zahamowanie funkcji reprodukcyjnych zwierząt. Podanie samcom myszy koniugatu owoalbuminy z 7 cząsteczkami LHRH (ova-LHRH-7) spowodowało, oprócz pojawienia się przeciwciał, zmniejszenie gruczołu pęcherzykowego i prostaty, co doprowadziło do bezpłodności zwierząt (49). Dwukrotne podanie myszom rekombinowanego ova-LHRH-7 (50 µg) z adiuwantem Freund'a indukowało po 2 tygodniach wysokie miano przeciwciał anti-LHRH i powodowało spadek wagi macicy i jajników (z  $138 \pm 6$  do  $89 \pm 11$  mg), co wiąże się z antykoncepcyjnym działaniem tego koniugatu. Działanie ova-LHRH-4 było znacznie słabsze (50).

Także analog luliberyny, w którym Gly<sup>6</sup> zastąpiono D-Lys - (D-Lys<sup>6</sup>)LHRH w mikrosferach kopolimeru kwasu mlekowego i glikolowego (0,4-1,6 µm), wstrzyknięty samcom szczura, indukuje silną odpowiedź anti-LHRH i atrofię prostaty (39).

Efektywność działania szczepionek z LHRH (antykoncepcyjnych i immunokastracyjnych) można mierzyć nie tylko wzrostem miana przeciwciał anti-LHRH, lecz także spadkiem poziomu LH, FSH lub androsteronu i testosteronu we krwi (40,44,45, 47,51) oraz obserwując atrofię macicy i jąder (40,45,50).

#### 5. Syntetyczne szczepionki

Stosowanie białek w immunogenach stwarza możliwość generowania przeciwciał skierowanych przeciwko tym nośnikom białkowym. W związku z tym zaproponowano użycie w szczepionkach peptydów będących określonymi epitopami pomocniczych limfocytów T (T<sub>H</sub>), które są słabymi immunogenami lub nie wykazują takich właściwości (42,52,53). Peptydy te mogą odgrywać w szczepionkach rolę adiuwantów o właściwościach immunomodulacyjnych (54,55).

Najbardziej efektywnym nośnikiem dla LHRH okazał się 15-aminokwasowy liniowy peptyd będący epitopem T4 o następującej sekwencji:

Ala-Leu-Asn-Asn-Arg-Phe-Gln-Ile-Leu-Gly-Val-Glu-Leu-Lys-Ser

Koniugat luliberyny z tym syntetycznym peptydem, utworzony przez N-końcową grupę karboksylową hormonu, indukuje u myszy BALB/C wysokie miano przeciwciał anti-LHRH i wywołuje, trwającą co najmniej 24 tygodnie, niepłodność samic. Natomiast koniugaty powstałe przez połączenie C-końcowej grupy karboksylowej LHRH z epitopami T3 lub T2 okazały się słabymi immunogenami i wykazywały słabe działanie antykoncepcyjne (42,56) (tab. 2).

**Tabela 2**

**Syntetyczne szczepionki z LHRH**

Druga część hybrydu szczepionki	Metoda otrzymywania	Literatura
23-aminokwasowy epitop pomocniczego limfocyty T (T <sub>h</sub> )	LHRH-Gly-Cys i sulfoMBS	(42)
14 lub 21-aminokwasowy fragment epitopu T <sub>h</sub>	LHRH lub LHRH-COOH i HNBTU*	(56)
dekapeptydowy fragment P-fimbrii <i>E. coli</i>	nukleotyd kodujący LHRH** technika rekombinacji DNA	(58)
dekapeptydowy fragment LH-R (miejsce wiążące)	technika rekombinacji DNA	(57)
18-aminokwasowy fragment owoalbuminy	technika rekombinacji DNA	(51)

\* pochodna benzotriazolouroniowa

\*\* sekwencja oligonukleotydu kodującego LHRH: CAGCACTGGAGCTACGGGCTGAGGCCTGGG

Stosując metody inżynierii genetycznej otrzymano chimerę fragmentu owoalbuminy z 4 lub 7 cząsteczkami LHRH. Immunizowanie jałówek krów ova-LHRH-7 powodowało zahamowanie owulacji przez co najmniej 60 dni i niepłodność zwierząt (51).

Van der Zee i wsp. (58) przygotowali koniugaty LHRH z P-fimbriami *E. coli* stosowane później do immunizacji samic szczura oraz jałówek krów. Inny rodzaj szczepionki antykoncepcyjnej zaproponowali Remy i wsp. (57). Zastosowali nośnik będący eksonem 1 receptora lutropiny, a ściśle biorąc fragment wiążący LH. Hybryd takiego fragmentu mysiego LH-R z fagiem typu 88-4 podawany samcom myszy powodował wzrost miana przeciwciał anti-LH-R z równoczesną okresową niepłodnością zwierząt.

## 6. Podsumowanie

Niewątpliwym osiągnięciem XX w. było opracowanie wielu metod regulowania i kontrolowania płodności ludzi oraz zwierząt hodowlanych. Intensywne prace pro-

wadzone w ramach programu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) doprowadziły do opracowania wielu szczepionek antykoncepcyjnych, które zostały poddane badaniom klinicznym. Początkowo w szczepionkach tych stosowano głównie ludzką choriogonadotropinę lub fragment tego hormonu (35,59). Wadą tego typu szczepionek był jednak wysoki koszt ich otrzymania, a także, że zastosowany w nich hormon został izolowany z materiału biologicznego i mógł być zanieczyszczony patogennymi wirusami (np. HBs, HIV, itd.). Szczepionki zawierające koniugaty LHRH, otrzymane metodami chemicznymi lub za pomocą inżynierii genetycznej, są natomiast znacznie tańsze i, co istotniejsze, pozbawione patogenów. Dlatego też można je stosować na masową skalę w krajach zagrożonych niekontrolowanym wyżem demograficznym. Szczepionki LHRH znalazły zastosowanie także w hodowli zwierząt. Mogą one zastąpić kosztowniejszą i bardziej niebezpieczną kastrację, a ich działanie nie jest długotrwałe.

## Literatura

1. McCann S. M., Taleisnik S., Friedman H. M., (1960), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104, 432-434.
2. Bailey P. D., (1990), *An introduction to peptide chemistry*, Ed. Wiley J. and Sons, Chichester, New York, 152-166.
3. Adelman J. P., Mason A. J., Haylick J. S., Seeburg P. H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 179-183.
4. Gore A. C., Roberts J. L., (1997), *Front Neuroendocrinol.*, 18, 209-245.
5. Kurowska E., Gorczyca W. A., Szewczuk A., (2000), *Post. Hig. Med. Dośw.*, 54, 749-758.
6. Evans J. J., (1999), *Endocr. Rev.*, 20, 46-67.
7. Szewczuk A., Kurowska E., Szewczuk Z., (1999), *Post. Biol. Kom.*, 26, 827-840.
8. Yahalom D., Koch Y., BenAroya N., Fridkin M., (2000), *Mol. Pharmacol.*, 57, 718-724.
9. Sobkowiak A., Wierzbicki A., Trzeciak W. H., (1997), *Post. Biol. Kom.*, 24, 67-82.
10. Witek A., (2000), *Gin. Pol.*, 71, 92-97.
11. Craig A. G., Fischer W. H., Park M., Rivier J. E., Musselman B. D., Powell J. F. F., Reska-Skinner S. M., Prakash M. O., Mackie G. O., Sherwood N. M., (1997), *FEBS Lett.*, 413, 215-225.
12. White R. B., Eisen J. A., Kasten T. L., Fernald R. D., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 305-309.
13. Yahalom D., Chen A., Ben-Aroya N., Rohimipour S., Kaganovsky E., Okon E., Fridkin M., Koch Y., (1999), *FEBS Lett.*, 463, 289-294.
14. Latimer V. S., Rodrigues S. M., Garyfallou V. T., Kohama S. G., White R. B., Fernald R. D., Urbanski H. F., (2000), *Mol. Brain Res.*, 75, 287-292.
15. Pazos A. J., Mathieu M., (1999), *Gen. Comp. Endocr.*, 113, 112-120.
16. Tsutsui K., Saigoh E., Ukena K., Teranishi H., Fujisawa Y., Kikuchi M., Ishii S., Sharp J. P., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275, 661-667.
17. Achermann J. C., Jameson J. L., (1999), *Mol. Endocrinol.*, 13, 812-818.
18. Kurowska E., Szewczuk A., (1999), *Post. Hig. Med. Dośw.*, 53, 631-647.
19. de Roux N., Young J., Brailly-Tabard S., Misrahi M., Milgrom E., Schaison G., (1999), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 567-572.
20. Kottler M. L., Chauvin S., Lahlou N., Harris C. E., Johnston C. J., Lagarde J. P., Bouchard P., Farid N. R., Counis R., (2000), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 3002-3008.
21. Huhtaniemi I., Pettersson K., (1998), *Clin. Endocrinol.*, 48, 675-682.
22. Elter K., Erel C. T., Cine N., Ozbek U., Hachanefioglu B., Ertungealp E., (1999), *Fertil. Steril.*, 71, 425-430.
23. van den Beld A. W., Huhtaniemi I. T., Pettersson K. S. L., Pols H. P., Grobbee D. E., de Jong F. H., Lamberts S. W. J., (1999), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 1334-1339.
24. Takahashi K., Kurioka H., Ozaki T., Kanasaki H., Kohsaka M., Miyazaki K., Karino K., (1998), *Hum. Reprod.*, 13, 3338-3344.

25. Ramanujam L. N., Liao W. X., Roy A. C., Ng S. C., (2000), *Hum. Reprod.*, 15, 925-928.
26. Liao W. X., Ashim C. R., Clement Ch., Sabaratnam A., Shan S. R., (1998), *Fertil. Steril.*, 69, 102-106.
27. Takahashi K., Kurioka H., Ozaki T., Kanasaki H., Miyazaki K., Karino K., (2000), *Eur. J. Endocrinol.*, 143, 375-381.
28. Kremer H., Kraaij R., Toledo S. P. A., Post M., Fridman J. B., Hayashida C. Y., van Reen M., Milgrom E., Ropers H. H., Mariman A. P. N., Themmen A. P. N., Brunner H. G., (1995), *Nat. Genet.*, 9, 160-164.
29. Arnhold I. J. P., Latronico A. C., Batista M. C., Mendonca B. B., (1999), *Fertil. Steril.*, 71, 597-601.
30. Latronico A. C., Abell A. N., Arnhold I. J. P., Liu X., Lins T. S. S., Brito V. N., Billerbeck A. E., Segalof D. L., Mendonca B. B., (1998), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 2435-2440.
31. Wu S. M., Leschek E. W., Brain C., Chan W. Y., (1999), *Mol. Genet. Metab.*, 66, 68-73.
32. Fraser H. M., (1993), *Br. Med. Bull.*, 49, 62-72.
33. Szewczuk A., Kurowska E., (1999), *Wiad. Chem.*, 53, 219-234.
34. Szewczuk A., Kurowska E., Szewczuk Z., (2000), *Biotechnologia*, 49, 161-173.
35. Kochanowska I. E., Szewczuk A., (1995), *Post. Hig. Med. Dośw.*, 49, 451-468.
36. Thau R., (1992), *Scand. J. Immunol.*, 36, 127-130.
37. Talwar G. P., (1997), *Immunol. Cell Biol.*, 75, 184-189.
38. Talwar G. P., (1998), *Encyclopedia of immunology 2<sup>nd</sup> ed.*, Eds. Delves P. J., Roitt I., San Diego-London Acad. Press Inc., 640-648.
39. Diwan M., Dawar H., Talwar G. P., (1998), *Prostate*, 35, 279-284.
40. Fraser H. M., Baker T. G., (1978), *J. Endocrinol.*, 77, 85-93.
41. Kumar N., Savage T., de Jesus W., Tsong Y. Y., Didolkar A., Sundaram K., (2000), *Toxicol. Sci.*, 53, 92-99.
42. Ferro V. A., Stimson W. H., (1998), *Vaccine*, 16, 1095-1102.
43. Prendiville D. J., Enright W. J., Crowe M. A., Finnerty M., Hynes N., Roche J. F., (1995), *J. Anim. Sci.*, 73, 2382-2389.
44. Brown B. W., Mattner P. E., Caroll P. A., Hoskinson R. M., Rigby R. D. G., (1995), *J. Reprod. Fertil.*, 103, 131-135.
45. Meloen R. H., Turkstra J. A., Lankhof H., Puijk W. C., Schaaper W. M. M., Dijkstra G., Wensing C. J. G., Oonk R. B., (1994), *Vaccine*, 12, 741-746.
46. Oonk H. B., Turkstra J. A., Schaaper W. M. M., Erkens J. H. F., Schuitemaker-de Weerd M. H., van Nes A., Verheijden J. H. M., Meloen R. H., (1998), *Vaccine*, 16, 1074-1082.
47. Ferro V. A., O`Grady J. E., Notman J., Stimson W. H., (1996), *Vaccine*, 14, 451-457.
48. Muller S., (1999), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Vol. 28, *Synthetic peptides and proteins*, Elsevier Eds. Pillai S. and van der Vliet P.C., Elsevier Amsterdam, New York, Oxford, Singapore, Tokyo, 79-131.
49. Quesnell M. M., Zhang Y. H., de Avila D. M., Bertrand K. P., Reeves J. J., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 347-353.
50. Zhang Y., Rozell T. G., de Avila D. M., Bertrand K. P., Reeves J. J., (1999), *Vaccine*, 17, 2185-2191.
51. Sosa J. M., Zhang Y., de Avila D. M., Bertrand K. P., Reeves J. J., (1998), *J. Anim. Sci.*, 76, 214, abstract 832.
52. Kumar A., Arora R., Kaur P., Chauhan V. S., Sharma P., (1992), *J. Immunol.*, 148, 1499-1505.
53. Valmori D., Pessi A., Bianchi E., Corradin G., (1992), *J. Immunol.*, 149, 717-721.
54. Schijns V. E. J. C., (2000), *Curr. Opin. Immunol.*, 12, 456-463.
55. Fitzmaurice C. J., Brown L. E., McInerney T. L., Jackson D. C., (1996), *Vaccine*, 14, 553-560.
56. Ghosh S., Jackson D. C., (1999), *Int. Immunol.*, 11, 1103-1110.
57. Remy J. J., Couture L., Rabesona H., Haertle T., Salesse R., (1996), *J. Reprod. Immunol.*, 32, 37-54.
58. van der Zee A., Noordegraaf C. V., van den Bosch H., Gielen J., Bergmans W., Hoekstra W., van Die I., (1995), *Vaccine*, 13, 753-758.
59. Talwar G. P., Singh O., Pal R., Chatterjee N., Sahai P., Dhall K., Kaur J., Das S. K., Suri S., Buckshee K., Saraya L., Saxena B. N., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 8532-8536.