



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014005376-0 A2

(22) Data do Depósito: 07/03/2014

(43) Data da Publicação: 10/02/2016
(RPI 2353)



(54) Título: ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE PROTEÍNA DE FUSÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA, USO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA E USO DA COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA

(51) Int. Cl.: C07K 14/575; C07K 11/00; A61K 38/22

(73) Titular(es): OURO FINO SAÚDE ANIMAL LTDA

(72) Inventor(es): CELSO RAUL ROMERO RAMOS, MIRYAN MARROQUIN QUELOPANA

(74) Procurador(es): FRANCISCO CARLOS RODRIGUES SILVA

(57) Resumo: ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE PROTEÍNA DE FUSÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA, USO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA E USO DA COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA. A presente invenção se refere a uma proteína inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma e proteína de fusão compreendendo a mesma, assim como a uma composição antigênica compreendendo inibina alfa modificada e/ou um fragmento antigênico da mesma e/ou uma proteína de fusão compreendendo inibina alfa modificada, ao processo de produção da proteína inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma e proteína de fusão compreendendo a mesma, e ao uso da inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma ou proteína de fusão compreendendo inibina alfa, e ao uso da composição antigênica no aumento da ovulação de animais, especialmente mamíferos e aves. A presente invenção é baseada na modificação da sequência madura da subunidade alfa da inibina de *Bos taurus*, especificamente no segmento da extremidade C-terminal que, além da modificação de alguns aminoácidos, passa a ter as duas r(...)

“ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE PROTEÍNA DE FUSÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA, USO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA E USO DA COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA”

Campo Técnico

[01] A presente invenção se refere a uma proteína inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma e proteína de fusão compreendendo a mesma, assim como a uma composição antigênica compreendendo inibina alfa modificada e/ou um fragmento antigênico da mesma e/ou uma proteína de fusão compreendendo inibina alfa modificada, ao processo de produção da proteína inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma e proteína de fusão compreendendo a mesma, e ao uso da inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma ou proteína de fusão compreendendo inibina alfa modificada no aumento da ovulação em animais, especialmente mamíferos e aves.

[02] A presente invenção é baseada na modificação da sequência madura da subunidade alfa da inibina de *Bos taurus*, especificamente no segmento da extremidade C-terminal que, além da modificação de alguns aminoácidos, passa a ter duas regiões imunogênicas nesse segmento, sendo a região mais imunogênica aquela que está localizada no extremo C-terminal.

Referência à Listagem de Sequencia

[03] A Listagem de Sequência submetida juntamente com este documento é ora incorporada para referência complementar. A cópia eletrônica da Listagem Sequencial está gravada em disco compacto não regravável (CD) nos termos da Resolução Nº 228/2009 do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, em uma forma legível por computador no formato de texto (.txt).

Histórico da Invenção

[04] A inibina é uma proteína (glicoproteína) secretada pelas células granulosa (feminina) e Sertoli (masculina) em resposta ao FSH (hormônio estimulante de folículo) e sua principal ação é o controle da realimentação

negativa na secreção de FSH da glândula pituitária. Ela é encontrada em grandes quantidades no plasma seminal e fluido folicular. É uma proteína dimérica de grande complexidade, sendo que a forma “madura” da inibina tem um peso molecular de 32 kDa e consiste de uma cadeia alfa (aproximadamente 18 kDa) e uma cadeia beta (14 kDa), essas duas cadeias sendo ligadas por pontes dissulfeto. As subunidades sozinhas não possuem atividade biológica conhecida. Cada subunidade é originada a partir de um gene separado e é produzida como uma grande proteína precursora. Também é conhecido o fato de que cada subunidade tem múltiplos sítios de clivagem, de modo que subunidades de diferentes tamanhos são rotineiramente encontradas no fluido folicular. Estima-se que são possíveis várias combinações que dão origem a inúmeras formas diméricas diferentes de inibina. As que são encontradas frequentemente no fluido folicular bovino são as de aproximadamente 29, 34, 48, 58, 68, 77, 122 e >160 kDa. A família da inibina é adicionalmente complicada pela existência de dois genes separados da subunidade beta. Eles são denominados subunidade beta-A e subunidade beta-B. Enquanto as inibinas são dímeros formados pelas subunidades alfa e beta, os dímeros compostos pelas subunidades beta-beta formam outro hormônio, a activina.

[05] Como a inibina atua sistematicamente para inibir a liberação de FSH, é apropriado dizer que uma redução na secreção de inibina pode aumentar as concentrações de FSH e, conseqüentemente, ter um potencial uso no aumento da fertilidade.

[06] Portanto, inibinas e activinas são moléculas multifuncionais que inibem e ativam, respectivamente, a secreção do FSH produzido pela glândula pituitária.

[07] Já foi verificado que as inibinas e activinas estão envolvidas na regulação de inúmeras funções, tais como secreção de hormônio do hipotálamo e glândula pituitária, secreção de hormônio gonadais, desenvolvimento e maturação de células germinativas, diferenciação do eritróide, secreção de insulina, sobrevivência de células nervosas, desenvolvimento embriogênico axial ou crescimento de ossos, dependendo de

sua composição de subunidade. Acredita-se que as inibinas se opõem às funções da activina (ver informação disponível em www.uniprot.org).

[08] Além de seu papel essencial no controle seletivo de secreção de FSH, as inibinas são atualmente reconhecidas como reguladores parácrinos ovariano e testicular e têm múltiplos efeitos parácrinos na unidade útero-placenta, representando um marcador promissor para infertilidade masculina e feminina e doenças ginecológicas e de gestação.

[09] Em virtude de sua importância no desenvolvimento de compostos e composições para a profilaxia, tratamento e diagnóstico de doenças e condições médicas em seres humanos, assim como no aumento da fertilidade de animais mamíferos, incluindo o homem, e aves, muitas pesquisas vêm sendo realizadas sobre as inibinas e sua obtenção, não só por purificação a partir de extratos naturais, como através de métodos empregando técnicas de DNA recombinante.

[010] O documento WO8600078 descreve um método de purificação e caracterização da inibina e o uso da mesma como antígeno para a produção de anticorpos. Também é proposto um método de construção de sondas de oligonucleotídeo para subsequente clonagem e expressão dos genes de inibina, usando a técnica de DNA recombinante, a partir das sequências de aminoácidos das subunidades da proteína. Este desenvolvimento foi realizado em uma época em que o conhecimento da inibina e das técnicas de sequenciamento, caracterização e modificação de material genético não contava com os recursos que hoje estão disponíveis. Por essa razão, nesse documento não há nenhuma informação sobre as sequências de aminoácidos da proteína e nem das sequências de nucleotídeos codificantes da proteína integral ou de suas subunidades.

[011] O documento US4864019 descreve um método para tratar um mamífero visando o controle da fertilidade. De acordo com esse método, um anticorpo é gerado em resposta ao uso de um peptídeo sintético, o qual inclui os seis resíduos da extremidade N-terminal de uma inibina alfa de mamífero, sendo que o anticorpo reage com a inibina e atua na atividade de supressão da

liberação de gonadotropina. O anticorpo resultante pode ser administrado a um mamífero em dosagem suficiente para neutralizar uma porção significativa do teor de inibina no soro sanguíneo periférico, bloqueando, assim, a atividade hormonal da inibina endógena. Nesse documento é descrito que a proteína de 32 kDa, isolada de fluido folicular suíno, é composta por duas cadeias, de 18 kDa e de 14 kDa, ligadas por pontes dissulfeto, cadeias essas que são ricas em resíduos Cys.

[012] O documento CA2158116 descreve um método para induzir a superovulação em gado por meio de vacinação contra inibina, seguida de injeção de FSH exogenamente. A vacinação contra inibina é feita pelo uso de um antígeno obtido pela ligação de albumina a um polipeptídeo sintetizado a partir da sequência de aminoácidos das posições 1-26 (a partir da extremidade N-terminal) da subunidade alfa de inibina suína ou bovina, dita mistura de antígeno e adjuvante sendo injetada subcutaneamente no gado diversas vezes.

[013] O documento WO9522980 (PI9507426) descreve um método para acelerar o início da puberdade em aves, mais particularmente em ratitas e psitacíformes, pela administração de uma proteína heteróloga compreendendo inibina, ou um fragmento da mesma, e uma proteína portadora, sendo que a inibina ou fragmento da mesma compreende as sequências identificadas nesse documento como SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 4 e a proteína portadora pode ser selecionada de proteína de ligação a maltose, albumina de soro bovino, ovoalbumina, flagelina, albumina de soro, etc. No documento WO9640219 (PI9609067) são descritas as composições empregadas no método descrito e reivindicado no WO9522980.

[014] O documento PI0316084 descreve composições de peptídeo antigênico múltiplo compreendendo peptídeos imunogênicos (subunidade alfa de inibina madura, ou substituições conservativas das mesmas) ligados a uma cadeia principal de aminoácidos em conjunto com um veículo aceitável, tal como albumina de soro, proteína de ligação a maltose, hemocianina de *keyhole limpet* etc. Essas composições são empregadas na melhoria do desempenho de produção de animais, especialmente de aves.

[015] O documento PI0506043 descreve um processo para avaliação genética do desempenho produtivo de animais a partir de marcadores moleculares associados a genes da inibina, leptina, LH, FSH, entre outros, e seus receptores.

[016] SCHANBACHER (SCHANBACHER B. Radioimmunoassay of inhibin: serum responses to unilateral and bilateral orchidectomy. **Endocrinology** 1988;123(5):2323–30) desenvolveu um radioimunoensaio para a determinação da concentração da inibina no soro e em outros fluidos biológicos, utilizando o antisoro do coelho para a cadeia alfa da inibina porcina. Este teste mostrou-se preciso, sensível e específico para a inibina.

[017] O'SHEA T, e colaboradores (O'SHEA T, BINDON BM, HILLARD MA, PIPER LR, FINDLAY JK, MIYAMOTO K. Increase in ovulation rate in Merino ewes after active immunization with inhibin preparations obtained by immunoaffinity chromatography. **Reprod Fertil Dev** 1989;1(4):347–55) verificaram um aumento de duas a quatro vezes na taxa de ovulação de ovelhas após a imunização com peptídeo sintético contendo a porção N-terminal da subunidade alfa da inibina porcina ovina ou bovina conjugada a uma proteína carreadora.

[018] Adicionalmente, TANNETTA D.S. e colaboradores (TANNETTA DS, FEIST SA, BLEACH EC, GROOME NP, EVANS LW, KNIGHT PG. Effects of active immunization of sheep against an amino terminal peptide of the inhibin alpha C subunit on intrafollicular levels of activin A, inhibin A and follistatin. **J Endocrinol** 1998;157(1):157–68) verificaram que a imunização de ovelhas com um peptídeo sintético correspondente à porção amino terminal (aminoácidos 1-29) da subunidade alfa madura da inibina bovina conjugada a tuberculina foi responsável pelo aumento de três vezes no número total de folículos maduros por ovelha comparada a um grupo controle.

[019] Recentemente, LI HAN, D.G. e colaboradores (LI HAN, D.G. MAO, D.K. ZHANG, A.X. LIANG, M. FANG, MUHAMMAD MOAEEN-UD-DIN, L.G. YANG, Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin α (1–32) fragment for improving the fertility in rats and sheep, **Animal Reproduction**

Science, 2008, 109, 1–4, 251-265) avaliaram a possibilidade de utilização de uma vacina de DNA contendo os aminoácidos 1-32 da cadeia alfa da inibina como ferramenta para o aumento do desenvolvimento de folículo ovariano e tamanho da prole.

[020] Mais recentemente ainda, PRASAD, S. e colaboradores (PRASAD, S. RASTOGI, S.K. GANGULY, B. Computational designing of a poly-epitope fecundity vaccine for multiple species of livestock. **Vaccine**. 2013: Article in Press) descreveram um método computacional para a predição de epítomos em um peptídeo candidato a antígeno vacinal. A vacina proposta contém um novo poli-epítopo que foi desenhado utilizando diferentes ferramentas computacionais e tem como alvo a inibina e a folistatina de diferentes animais de interesse veterinário.

[021] O estado da técnica citado acima mostra a importância do aumento da imunogenicidade da inibina, particularmente da subunidade alfa da inibina, e de fragmentos ou proteínas de fusão contendo sequências imunogênicas da inibina alfa. Esse aumento de imunogenicidade tem aplicação importante tanto no aumento de produção de animais, incluindo mamíferos e aves, como no tratamento, profilaxia e diagnóstico de doenças e condições médicas em seres humanos.

Sumário da Invenção

[022] A presente invenção revela novas sequências de inibina alfa contendo regiões mais imunogênicas por modificação da sequência madura da subunidade alfa da inibina de *Bos taurus* (obtida a partir da coleção do GenBank sob o No. de acesso AAI09838.1, Inhibin alpha *Bos taurus*).

[023] De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é provido um antígeno compreendendo uma sequência de aminoácidos de inibina alfa modificada, aqui denominada INIBINA OF, compreendendo a SEQ ID NO: 1, antígeno esse que tem maior imunogenicidade quando comparada à da inibina de *Bos taurus*, No. de acesso AAI09838.1 no GenBank:

SEQ ID NO: 1:

Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Met	Arg	Pro	Leu	His	Val	Arg	Thr	Thr
1				5					10					15
Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr	Glu	Met	Asp	Pro	Asn	Arg
				20					25					30
Leu	Thr	Gln	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Pro	Glu	Glu
				35					40					45
Pro	Ala	Ala	His											
				49										

[024] De acordo com um segundo aspecto da invenção, são providas sequências de aminoácidos tendo substituições conservativas na sequência da INIBINA OF, assim como fragmentos imunogênicos da mesma compreendendo substituições conservativas.

[025] De acordo com um terceiro aspecto da invenção, são providas proteínas heterólogas de fusão compreendendo a INIBINA OF, análogos, derivados ou fragmentos imunogênicos da mesma, incluindo substituições conservativas na SEQ ID NO:1, e uma proteína portadora/carregadora farmacologicamente aceitável, preferencialmente a proteína portadora Rrp42.

[026] De acordo com um quarto aspecto da invenção, é provida uma sequência de nucleotídeos - SEQ ID NO:2 - compreendendo o gene codificante da sequência de aminoácidos da INIBINA OF da presente invenção que compreende a SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:2:

GGATCCCTCG	AGGGTTCTGC	TCCGGGCACC	ATGCGTCCGC	TGCACGTGCG	50
TACCACCTCC	GATGGTGGCT	ACTCTTTCAA	ATACGAAATG	GACCCGAACC	100
GCCTGACTCA	GCATTCTGCT	GGCCTGCTGC	AGCGCCCGCC	GGAAGAACCG	150
GCTGCGCACT	AAGCTT				166

[027] Em um quinto aspecto, a presente invenção diz respeito a um antígeno compreendendo uma sequência de aminoácidos de inibina alfa modificada, aqui denominada INIBINA OF, e codificada pelo gene sintético, dito antígeno compreendendo a SEQ ID NO:3 tendo a mesma antigenicidade do antígeno que compreende a SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:3:

Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Met	Arg	Pro	Leu	His
1				5					10					15
Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr	Glu	Met
				20					25					30
Asp	Pro	Asn	Arg	Leu	Thr	Gln	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg
				35					40					45
Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	His							
				50										

[028] Em um sexto aspecto, a presente invenção diz respeito a uma composição antigênica compreendendo (i) o antígeno INIBINA OF, que compreende a SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, seus análogos, derivados ou fragmentos imunogênicos da mesma, incluindo substituições conservativas na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, (ii) opcionalmente, aditivos ou substâncias potencializadoras da atividade imunogênica da INIBINA OF e (iii) um veículo farmacologicamente aceitável.

[029] Em um sétimo aspecto, a presente invenção diz respeito a uma composição antigênica compreendendo (i) uma proteína heteróloga de fusão que compreende o antígeno INIBINA OF, análogos, derivados ou fragmentos imunogênicos da mesma, incluindo substituições conservativas na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, e uma proteína portadora/carregadora farmacologicamente aceitável, preferencialmente a proteína portadora Rrp42; (ii) opcionalmente, aditivos ou substâncias potencializadoras da atividade antigênica da INIBINA OF e (iii) um veículo farmacologicamente aceitável.

[030] Também, de acordo com um oitavo aspecto, a invenção se refere ao uso (a) do antígeno INIBINA OF, análogos, derivados ou fragmentos antigênicos do mesmo, incluindo substituições conservativas na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, (b) de uma proteína heteróloga de fusão que compreende a sequência de aminoácidos da INIBINA OF, análogos, derivados ou fragmentos imunogênicos da mesma, incluindo substituições conservativas na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, e uma proteína portadora/carregadora farmacologicamente aceitável, preferencialmente a proteína portadora Rrp42

de *Pyrococcus abyssi* e (c) de uma composição antigênica compreendendo dita INIBINA OF, análogos, derivados ou fragmentos imunogênicos da mesma, incluindo substituições conservativas na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, ou dita proteína heteróloga de fusão de INIBINA OF, no tratamento ou profilaxia de condições médicas relacionadas com a infertilidade de animais mamíferos e aves e no aumento da produção de animais mamíferos ou aves.

Breve Descrição das Figuras

[031] A Figura 1 mostra a sequência de aminoácidos da subunidade alfa da inibina madura de *Bos taurus* (No. de acesso no Gen Bank AAI09838.1, Inhibin alpha *Bos taurus*).

[032] A Figura 2 ilustra a análise de antigenicidade da inibina alfa de *Bos taurus* empregando o programa PROTEAN (Lasergene).

[033] A Figura 3 apresenta a sequência de aminoácidos como analisada na Figura 2, destacando as duas sequências com bom índice antigênico (segundo algoritmos presentes no programa PROTEAN).

[034] A Figura 4 representa o modelo estrutural da inibina alfa mostrando as regiões antigênicas 1 (verde) e 2 (laranja), sendo que a modelagem estrutural da inibina de *Bos taurus* foi realizada com o programa SwissModel PDB Viewer e o servidor SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org>) usando como molde a estrutura do TGF-beta (PDB 2QCQ).

[035] A Figura 5 apresenta a estrutura formada na extremidade C-terminal da inibina alfa de *Bos taurus*.

[036] A Figura 6 apresenta a sequência de aminoácidos original contendo a região da extremidade N-terminal (sublinhada) a ser mudada, a região antigênica em laranja mostrada na Figura 4 e os aminoácidos (sublinhados), após a região antigênica, a serem mudados.

[037] A Figura 7 mostra a sequência de aminoácidos resultante de uma primeira modificação na extremidade N-terminal

[038] A Figura 8 apresenta a conformação do modelo estrutural da sequência de aminoácidos modificada na extremidade C-terminal da inibina alfa de *Bos*

taurus, de acordo com uma primeira modificação de acordo com a invenção, como mostrada na Figura 7.

[039] A Figura 9 mostra a sequência de aminoácidos da INIBINA OF da invenção resultante das modificações representadas na Figura 8 e incluindo, na extremidade C-terminal, a região antigênica representada em verde na Figura 3.

[040] A Figura 10 mostra a sequência de nucleotídeos do gene sintético da presente invenção, codificante da INIBINA OF da presente invenção.

[041] A Figura 11 mostra a sequência de aminoácidos, codificada pelo gene sintético da invenção, que compreende a sequência da INIBINA OF da invenção.

[042] A Figura 12 apresenta o alinhamento da sequência da INIBINA OF com inibinas de organismos selecionados.

[043] A Figura 13 apresenta o Esquema da clonagem do gene do antígeno "INIBINA OF" no vetor de expressão.

[044] A Figura 14 apresenta a análise da proteína purificada por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. M.- Marcador de massa molecular.

Descrição Detalhada da Invenção

[045] A presente invenção baseia-se na obtenção de uma nova proteína, aqui denominada de INIBINA OF, produzida a partir da sequência de aminoácidos da proteína madura correspondente à subunidade alfa da inibina de *Bos taurus* (obtida do Gen Bank sob No. de acesso AAI09838.1), proteína essa contendo duas importantes regiões antigênicas que tornam a INIBINA OF útil no aumento da produção de animais mamíferos e aves e no tratamento de infertilidade em seres humanos, dentre outros empregos.

[046] A dita sequência madura da subunidade alfa da inibina de *Bos taurus* (No. de acesso AAI09838.1 no Gen Bank) (ver Figura 1) é a seguinte:

Ser	Thr	Pro	Pro	Leu	Pro	Trp	Pro	Trp	Ser	Pro	Ala	Ala	Leu	Arg	
1				5					10					15	
Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Cys	
				20					25					30	
His	Arg	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Ser	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Trp	Asp	
				35					40					45	
Arg	Trp	Ile	Val	His	Pro	Pro	Ser	Phe	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Cys	His	
				50					55					60	
Gly	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	
				65					70					75	
Pro	Gly	Val	Pro	Pro	Thr	Pro	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Val	Pro	
				80					85					90	
Gly	Ala	Gln	Pro	Cys	Cys	Ala	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Met	Arg	Pro	
				95					100					105	
Leu	His	Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr	
				110					115					120	
Glu	Met	Val	Pro	Asn	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Cys	Ala	Cys	Ile		
				125					130				134		

[047] A nova proteína foi desenhada para conter as regiões mais imunogênicas da subunidade alfa da Inibina. Para alcançar essa meta, a antigenicidade da sequência da Inibina foi analisada usando o programa PROTEAN da Lasergene. O resultado dessa análise está mostrado na Figura 2. As duas sequências com bom índice antigênico (segundo algoritmos presentes no programa PROTEAB), que estão ressaltados nos quadros 1 e 2 da Figura 2, correspondem aos fragmentos mostrados nas cores verde e laranja da Figura 3.

[048] A primeira sequência com bom índice de antigenicidade (**Leu Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His**) se localiza nos primeiros 29 aminoácidos da extremidade N-terminal da subunidade alfa da Inibina, sendo já conhecido seu emprego como antígeno, conjugado ou fusionado a proteínas portadoras/carregadoras. A segunda sequência com boa antigenicidade (**Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Met**) está mais perto da extremidade C-terminal

da subunidade alfa da Inibina e não é conhecido o seu emprego, isoladamente, como antígeno.

[049] Como mostrado na Figura 4, o modelo estrutural da Inibina alfa de *Bos taurus*, obtida usando o servidor SwissModel, apresenta a primeira sequência antigênica localizada numa região com estrutura flexível na extremidade N-terminal. Já a segunda sequência fica localizada numa folha-beta presente em uma estrutura formada na extremidade C-terminal da Inibina alfa.

[050] De acordo com a estratégia empregada na presente invenção, a estrutura formada na extremidade C-terminal da inibina alfa (ver Figuras 5 e 6), os aminoácidos 115-122 contendo a sequência 2 (**Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Met**), foi utilizada como o novo antígeno para reproduzir epítomos estruturais que possam estar presentes na sequência final escolhida.

[051] Como evidenciado na Figura 5, na base da estrutura escolhida, há quatro cisteínas (Cys) e uma “dobra” na estrutura que é mantida pela interação hidrofóbica dos aminoácidos valina (Val) e Leucina (Leu). Estes aminoácidos estão localizados no meio de uma região hidrofóbica da molécula da Inibina alfa, mais precisamente na fase que interage com o receptor.

[052] Na Figura 6 estão indicadas (aminoácidos sublinhados) as posições que foram modificadas para a obtenção da nova proteína da presente invenção, INIBINA OF. As modificações efetuadas na sequência representada na Figura 6 tiveram como objetivo:

- a. Facilitar a purificação da proteína recombinante: As duas cisteínas da extremidade C-terminal da sequência original (Figura 6) foram substituídas por Serina (**S**, homólogo estrutural da cisteína) e Glicina (**G**, para dar flexibilidade à sequência, no caso de se adicionar outra sequência nessa extremidade). As cisteínas podem formar pontes dissulfeto inespecíficos com outras moléculas e dificultar a purificação da proteína recombinante, por isso é conveniente evitar sua presença.
- b. Evitar a interferência da proteína portadora/carregadora na estrutura da INIBINA OF: Na extremidade N-terminal da sequência original (Figura 6), foi removida a sequência “Pro Cys Cys Ala Ala Leu”

(aminoácidos 94-99) que contém duas cisteínas consecutivas. Assim esses aminoácidos foram substituídos pela sequência "Gly Ser Ala" para dar flexibilidade à ligação, na concretização da invenção em que é empregada uma proteína/molécula carregadora. Os aminoácidos "Gly Ser Ala", na nova proteína fusionada, evitam a interferência da proteína carregadora na formação da estrutura tridimensional desejada, como representada na Figura 5.

- c. Aumento da solubilidade da nova proteína INIBINA OF: Os aminoácidos valina (Val) e Leucina (Leu), mostrados na estrutura da Figura 5, foram substituídos pelo ácido Aspártico (**D**, Asp) e Arginina (**R**, Arg), respectivamente, que têm cargas opostas, podendo interagir para estabilizar a "dobra" na estrutura mostrada da Figura 5. Estas substituições possibilitam o aumento da solubilidade da proteína INIBINA OF da presente invenção e impedem uma possível interação com o receptor. Adicionalmente e vantajosamente obtém-se uma "quebra" da região hidrofóbica presente no segmento escolhido, melhorando, assim a solubilidade da proteína da invenção.

[053] A sequência de aminoácidos resultante dessas substituições e modificações está representada na Figura 7.

[054] A Figura 8 mostra o resultado da análise dessa nova sequência por dinâmica molecular, usando o programa NOC (<http://noch.sourceforge.net>) que mostrou a estabilidade e manutenção da estrutura desejada durante a dinâmica, apesar de todas as modificações/substituições operadas.

[055] Finalmente, a sequência antigênica 1 (**Leu Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His**, aminoácidos 16-27 da sequência da subunidade alfa da inibina de *Bos taurus*, No. de acesso AAI09838.1 no GenBank), que é naturalmente flexível, foi acrescentada na extremidade C-terminal da molécula representada na Figura 8, que já contém a sequência antigênica 2 (**Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Met**). A Figura 9 mostra a sequência de aminoácidos do antígeno da presente invenção, aqui denominado de INIBINA OF. A alfa-inibina pertence à família das proteínas "TGF-beta", e em *Bos taurus* há outras

proteínas homólogas à inibina como, por exemplo, TGF-beta 1, TGF-beta 2, Morfogen, entre outras. Por esse motivo, a estratégia seguida na presente invenção foi a de usar apenas uma subsequência compreendida nos primeiros 29 aminoácidos da alfa-inibina, região essa que não está presente em nenhum outro membro da família das “TGF-beta”. Assim a resposta imunológica gerada é específica contra a inibina.

[056] Em resumo, o antígeno “INIBINA OF” da presente invenção reúne as duas regiões mais imunogênicas da inibina alfa, regiões essas que agora se encontram dispostas numa molécula que conserva apenas uma região estrutural da proteína original. Efetivamente, o antígeno da presente invenção é diferente de todos os antígenos relacionados à inibina testados até o momento.

[057] A presente invenção também inclui as variantes da INIBINA OF da invenção conservativamente modificadas e tendo pelo menos 85% de identidade com qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, e tendo substancialmente a mesma atividade imunogênica das mesmas.

[058] É amplamente conhecido da técnica de bioquímica que certas substituições de aminoácidos podem ser feitas em sequências de proteínas sem afetar a função ou atividade da mesma. Em geral, substituições conservativas de aminoácidos ou substituições de aminoácidos similares podem ocorrer naturalmente ou intencionalmente sem que haja modificação da atividade biológica, por exemplo, imunogenicidade da proteína. Os aminoácidos similares podem ser aqueles com tamanho e/ou propriedades de carga similares. Por exemplo, aspartato e glutamato e isoleucina e valina são pares de aminoácidos similares. A similaridade entre pares de aminoácidos pode ser avaliada por inúmeras maneiras conhecidas do técnico no assunto. Por exemplo, Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Volume 5, Suplemento 3, Capítulo 22, pp. 345-352, que é aqui incorporado a título de referência, fornece tabelas de frequência para substituições de aminoácidos que podem ser empregadas como uma medida de similaridade. As tabelas de frequência de Dayhoff et al. são baseadas em comparações de

sequências de aminoácidos para proteínas tendo a mesma função, a partir de uma variedade de diferentes fontes de evolução.

[059] A “percentagem de identidade de sequência” para polinucleotídeos e polipeptídios é determinada por comparação de duas sequências alinhadas de modo ótimo ao longo de uma janela de comparação, sendo que a porção da sequência de polinucleotídeos ou polipeptídios, na janela de comparação, pode compreender adições ou deleções quando comparadas a uma sequência de referência (que não compreende deleções ou adições) para o alinhamento ótimo das duas sequências. A percentagem é calculada pela determinação do número de posições da base de ácido nucléico ou resíduo aminoácido idêntico que ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições igualadas/coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando o resultado por 100 para dar a percentagem. O alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser conduzido por implementação computadorizada de algoritmos conhecidos (por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA presentes no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., ou BlastN e BlastX disponíveis a partir do National Center for Biotechnology Information), ou por inspeção. Sequências são tipicamente comparadas usando BlastN ou BlastX com parâmetros default.

[060] Identidade substancial de sequências de polinucleotídeos significa que um polinucleotídeo ou gene compreende uma sequência que possui pelo menos 75% de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 80% e mais preferivelmente pelo menos 90% de identidade de sequência quando comparada a uma sequência de referência. Tipicamente, dois polipeptídios ou proteínas são considerados substancialmente idênticos se pelo menos 40%, preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente 90% e mais preferivelmente 95% são sequências idênticas ou têm substituições conservativas. As sequências são preferivelmente comparadas usando GAP com parâmetros default.

[061] A proteína INIBINA OF da invenção pode ser obtida por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por reação em cadeia da polimerase (PCR). Mais particularmente, foi construído um primer com base na sequência de aminoácidos da proteína INIBINA OF da invenção, SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3.

[062] É importante observar que o antígeno INIBINA OF da presente invenção pode conter substituições conservativas, as quais permitem a obtenção de análogos da proteína INIBINA OF em sítios diferentes das sequências antigênicas mostradas na Figura 9, para preservar a sua antigenicidade e, portanto, sendo apropriados para os mesmos usos. A Tabela 1 mostra os exemplos de ditas substituições:

Tabela 1: Exemplos de substituições conservativas

Resíduo	Substituição conservativa
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Gln	Asn
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Leu	Ile, Val
Met	Leu, Ile
Ser	Thr, Gly
Thr	Ser, Val
Val	Ile, Leu

[063] Também estão incluídos na presente invenção os fragmentos da proteína INIBINA OF da presente invenção que mantêm a antigenicidade da proteína integral como representada na SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3.

[064] Após ser obtida a sequência de aminoácidos desejada (SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3) foi realizado o desenho do gene sintético codificante de dita sequência. O desenho desse gene sintético preferencialmente é realizado empregando códons otimizados para expressão em um hospedeiro apropriado,

por exemplo, um sistema de expressão procarioto, preferencialmente *Escherichia coli*. Essa técnica é bem conhecida dos técnicos no assunto e não requer descrição mais detalhada. Também há vários programas/software disponíveis no mercado para realizar o desenho de um gene sintético. Por exemplo, podem ser empregados softwares tais como o GeneDesign 2.0, Vector sendo preferencialmente empregado o software GeneDesign (DNA2.0), que permite a tradução inversa a partir de uma sequência de polipeptídios, todos conhecidos no estado da técnica.

[065] Para alcançar a otimização em *Escherichia coli*, na sequência de nucleotídeos projetada foram adicionados os sítios de corte para as enzimas de restrição BamHI (GGATCC), XhoI (CTCGAG) e HindIII (AAGCTT) para realizar a clonagem do gene sintético em vetores de expressão. Também foi adicionando o códon “stop” (TAA) para terminar a tradução após o último aminoácido (H, His) da sequência “INIBINA OF”. A sequência de nucleotídeos resultante corresponde à SEQ ID NO:2 e está representada na Figura 10. Deve ser observado que, em razão da degenerescência do código genético é possível haver modificação de nucleotídeos que codifiquem os mesmos aminoácidos da SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, desde que seja preservada a otimização de expressão no sistema de expressão utilizado.

[066] A presente invenção também inclui uma proteína heteróloga de fusão compreendendo a proteína INIBINA OF da invenção e uma proteína portadora/carregadora apropriada. O termo “proteína heteróloga fusionada” como aqui empregado tem a intenção de definir o conjunto de duas proteínas diferentes constituindo uma só molécula. Por exemplo, uma proteína compreendendo a proteína INIBINA OF da invenção, ou um fragmento da mesma, ou uma variante conservativamente modificada da mesma, fundida com uma proteína carregadora. A proteína heteróloga fusionada é expressada a partir de um sistema de expressão compreendendo um gene fusionado que contém um gene codificante para a expressão da proteína INIBINA OF da invenção e um gene codificante para expressão da proteína carregadora.

[067] A proteína portadora/carregadora não é um aspecto crítico da invenção. Por exemplo, o gene codificante da proteína carregadora pode ser selecionado de, mas não limitado a, genes codificantes para expressão das seguintes proteínas: Glutathione S-Transferase (GST), proteínas da família de pequeno modificador relacionado à ubiquitina (SUMO), proteína Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*, proteína de ligação a maltose, albumina de soro bovino, hemocianina de keyhole limpet, ovoalbumina, flagelina, albumina de soro de qualquer espécie, gama globulina de qualquer espécie, polímeros de aminoácidos D- e/ou L-. O gene de proteína carregadora preferido é o gene de Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*.

[068] Como mencionado acima, a proteína carregadora mais preferida para a obtenção da proteína fusionada com a sequência do antígeno INIBINA OF da invenção é a Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi* (No. de acesso no GenBank: NP_126302.1), proteína esta que faz parte do complexo exossômico que participa no processamento e maturação dos RNAs celulares. A sequência de aminoácidos da Rrp2 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi* é a seguinte (ver Cohen et al., 2003, "An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*". Mol Microbiol. 47(6):1495-512):

```
MSDNEIVAGIMRDHIINLLKEGKRIDDRGFEDYRPIEIEVGVIEKAEGSALVKLGSTQVLVGIKTSLGEP
FPDTPNMGVMTTNVELVPLASPTFEPGPPDERAIELARVIDRGIRESKALNLEKMVIVPGKIVRVVFIDV
HVLDDHGDGNLMDAIGIAAIAALLNARVPKVRNEETGEVETLDETEPLPVEKIPVPVTFKIGNILVVDPS
LDEELVMDGKITITTTDETGHISAVQKSEGGAFKLEEVMYAVETAFFKKAEEIRKLILEAVEKAKQ
```

[069] Com base nesta sequência, foi desenhado um gene sintético codificante dessa proteína, mas empregando códons otimizados para expressão melhorada em *Escherichia coli*, utilizando o software GeneDesign/DNA2.0. Nesta nova sequência de nucleotídeos foram adicionados os sítios de corte para as enzimas de restrição XhoI (CTCGAG) visando realizar a clonagem para fusionar outras proteínas no extremo C-terminal da Rrp42. O novo gene sintético codificante da proteína Rrp2 tem a seguinte sequência de nucleotídeos:

SEQ ID NO:4:

```

ATGTCCGACA ACGAAATCGT TGCTGGTATC ATGCGTGACC ATATCATCAA 50
CCTGCTGAAA GAAGGTAAAC GTATTGACGA CCGCGGCTTT GAAGACTACC 120
GTCCGATTGA AATTGAAGTG GGTGTTATTG AAAAAGCTGA AGGCTCTGCG 100
CTGGTGA AAC TGGGTTCCTAC TCAGGTTCTG GTTGGCATCA AACTTCTCT 150
GGGCGAACCG TTCCCGGACA CCCC GAACAT GGGTGTATG ACCACCAACG 250
TTGAACTGGT TCCGCTGGCT TCTCCGACCT TCGAACC GGG TCCGCCGGAT 300
GAACGCGCTA TCGAACTGGC GCGTGTGATC GATCGTGGTA TTCGCGAATC 350
TAAAGCGCTG AACCTGGAAA AAATGGTTAT CGTTCCGGGT AAAATCGTTC 400
GTGTTGTTTT CATCGACGTT CATGTTCTGG ACCACGACGG CAACCTGATG 450
GACGCTATCG GCATCGCTGC TATTGCGGCT CTGCTGAACG CTCGTGTTCC 500
GAAAGTTCGT TACAACGAAG AAACCGGCGA AGTTGAAACC CTGGACGAAA 550
CTGAACCGCT GCCGGTTGAA AAAATTCCGG TTCCGGTTAC CTTGCGGAAA 600
ATTGGCAACA TTCTGGTTGT GGACCCGTCC CTGGACGAAG AACTGGTTAT 650
GGACGGCAAA ATTACTATTA CTACCGACGA AACCGGTCAC ATTTCCGCTG 700
TTCAGAAATC CGAAGGCGGT GCTTTCAAAC TGGAAGAAGT TATGTACGCG 750
GTTGAAACCG CTTTTAAAAA AGCGGAAGAA ATCCGTAAAC TGATTCTGGA 800
AGCGGTGAA AAAGCGAAAC AGCTCGAG 828

```

[070] Muitos métodos de isolamento de genes e de produção de produtos de genes de fusão são conhecidos do estado da técnica. Pode ser citado, por exemplo, o método descrito em Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vols I, II e III. Também muitos kits de vetor comercialmente disponíveis, tal como o kit pMAL™-c podem ser usados para preparar o produto de gene de fusão da presente invenção.

[071] Resumidamente, o método para produzir uma proteína heteróloga fusionada da presente invenção compreende as etapas de inserir um gene de fusão em uma região codificante de um plasmídeo, transformação da célula hospedeira com o plasmídeo e expressão da proteína heteróloga fusionada a

partir da célula hospedeira por métodos bem conhecidos no estado da técnica. Mais particularmente, o método de produção da proteína heteróloga fusionada da presente invenção compreende a inserção do cDNA que é codificado para expressão da INIBINA OF da invenção, ou um fragmento da mesma, ou uma variante conservativamente modificada da mesma, em um vetor que contém a informação codificante para a produção de uma proteína carregadora, preferencialmente a proteína Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*. Após a inserção do vetor no sistema de expressão, a proteína heteróloga fusionada é expressada pelo sistema.

[072] A obtenção tanto da sequência de nucleotídeos do gene codificante da proteína INIBINA OF da invenção como da proteína carregadora permite construir o vetor de expressão para produção do antígeno e da proteína heteróloga antigênica de fusão da invenção. Inúmeros vetores de expressão estão comercialmente disponíveis para a construção do gene codificante das proteínas antigênicas da invenção, tal como o vetor comercial pRSETA da Invitrogen (Life Technologies). O especialista no assunto será capaz de, a partir dos ensinamentos da presente invenção e dos sistemas de expressão comercialmente disponíveis, selecionar o vetor apropriado para emprego na produção da INIBINA OF e da proteína de fusão contendo a mesma. Em particular, foi empregado o vetor não comercial pET-SUMO. O vetor pET-SUMO é um derivado de vetor comercial pET e contém sítios múltiplos de clonagem logo após o sítio de clivagem da SUMO-protease (Figura 13B).

[073] O sistema de expressão para a produção das proteínas antigênicas da invenção pode ser qualquer sistema disponível comercialmente. Um exemplo é o sistema de expressão *Escherichia coli*, cepas BL21 (DE3) e Rosetta (DE3), disponível a partir da empresa Novagen (ver Novagen Catalog 2009/2010, páginas 121 e 123, disponível na Web em www.merckmillipharma.com/promart/library/Novagen-pET-E-coli-expression-system.pdf). Com o emprego deste sistema de expressão preferido e do vetor de expressão pET-SUMO e com a proteína carregadora Rrp42 obtida a partir do gene modificado de SEQ ID NO:4 é possível obter a proteína heteróloga de

fusão da invenção de modo simples, com elevado nível de pureza e sem a necessidade de métodos de purificação adicional, tal como os métodos cromatográficos.

[074] A composição da presente invenção pode compreender, além do antígeno da invenção, adjuvantes, preservativos, diluentes, emulsificantes, estabilizantes e outros ingredientes farmacologicamente aceitáveis e que são empregados em preparações imunogênicas para uso humano e animal. Exemplos não limitantes de adjuvantes incluem o adjuvante incompleto de Freund, o adjuvante completo de Freund, manana acetilada polidispersa β -(1,4) ligada, adjuvantes de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, adjuvantes lipídicos modificados, adjuvantes derivados de saponina, sulfato de dextrana, hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.

[075] A composição da presente invenção pode ser administrada a um animal, incluindo o homem, por meios conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, a composição pode ser administrada por via parenteral, por exemplo, subcutânea, intraperitoneal, ou intramuscular, ou por via oral, ou intranasal e pode ser administrada em uma ou mais doses diárias.

[076] A quantidade da composição da invenção administrada a um animal varia de acordo com a espécie do animal. Para bovinos, a quantidade de antígeno por dose relatada na literatura varia de 50 a 125 microgramas, para a inibina inteira (Medan MS et al (2004) Effects of re-immunization of heifers against inhibin on hormonal profiles and ovulation rate. Reproduction. 128(4):475-82), e de 1mg até 5 mg para peptídeos baseados nos primeiros 29 aminoácidos da inibina fusionados a carregadores (Takedomi T et al. (2005) Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. J Reprod Dev. 51(3):341-6). Dado que a invenção contém duas regiões antigênicas é esperado que seja mais imunogênica que os peptídeos baseados nos primeiros 29 aminoácidos. A dose da composição da invenção a ser administrada ao indivíduo contém o antígeno INIBINA OF da invenção, ou uma variante conservativamente modificada ou fragmentos imunogênicos do mesmo ou proteína heteróloga de fusão compreendendo o

mesmo, em uma quantidade menor que 1,0 mg, preferivelmente no máximo 0,5 mg, mais preferivelmente ainda na faixa de 0,2 até 0,4 mg. O especialista na técnica, com base nos ensinamentos da presente invenção pode ser capaz de determinar, por meio de testes rotineiros, a quantidade de proteína INIBINA OF, ou uma variante conservativamente modificada ou fragmentos imunogênicos da mesma ou uma proteína heteróloga de fusão compreendendo a mesma, que será necessária para desenvolver uma resposta imunológica adequada à dita proteína pelo animal.

[077] A sequência de aminoácidos expressada pelo gene sintético da SEQ ID NO:2 tem a sequência de aminoácidos representada na Figura 11 e corresponde à SEQ ID NO:3.

[078] É importante reafirmar que a molécula da INIBINA OF da presente invenção contém os dois segmentos mais imunogênicos da inibina alfa: um segmento que corresponde à sequência mais imunogênica do peptídeo de 29 aminoácidos da extremidade N-terminal, e outro segmento imunogênico localizado mais próximo da extremidade C-terminal, extremidade esta que foi modificada por substituições de aminoácidos para facilitar a purificação da proteína/antígeno resultante, torná-lo mais solúvel e evitar a interferência da proteína carregadora na concretização da invenção correspondente à proteína de fusão. A sequência do antígeno da invenção é relativamente curta, se comparada à sequência completa da inibina e as substituições de aminoácidos reduzem ao máximo ou até mesmo eliminam a possibilidade de reação cruzada com outras proteínas da família das TGF-beta. A Figura 12 mostra a baixa identidade da sequência da INIBINA OF da invenção com os outros membros da família TFG-beta presentes em *Bos taurus*.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Desenho do antígeno Inibina OF

[079] A sequência de 134 aminoácidos, correspondente à subunidade alfa madura da inibina de *Bos taurus*, foi deduzida a partir da sequência do Gen Bank No AAI09838.1:

Ser	Thr	Pro	Pro	Leu	Pro	Trp	Pro	Trp	Ser	Pro	Ala	Ala	Leu	Arg	
1				5					10					15	
Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Cys	
				20					25					30	
His	Arg	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Ser	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Trp	Asp	
				35					40					45	
Arg	Trp	Ile	Val	His	Pro	Pro	Ser	Phe	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Cys	His	
				50					55					60	
Gly	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Val	
				65					70					75	
Pro	Gly	Val	Pro	Pro	Thr	Pro	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Val	Pro	
				80					85					90	
Gly	Ala	Gln	Pro	Cys	Cys	Ala	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Met	Arg	Pro	
				95					100					105	
Leu	His	Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr	
				110					115					120	
Glu	Met	Val	Pro	Asn	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Cys	Ala	Cys	Ile		
				125					130				134		

[080] Esta sequência foi analisada usando o software Lasergene Protean (DNASTar) para identificar peptídeos com alto índice de antigenicidade pelo algoritmo de Jameson & Wolf [ver Jameson B.A., Wolf H. 1988. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. Comput Appl Biosci. 4(1):181-6]. A Figura 2 mostra o resultado gráfico desta análise, indicando com os números 1 e 2 os picos com maior antigenicidade

[081] A sequência antigênica 1 (Leu Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His) corresponde aos aminoácidos 16-27 da alfa-inibina madura. Peptídeos contendo os primeiros 29 aminoácidos já foram usados como antígeno, conjugado ou fusionado a proteínas carregadoras/portadoras.

[082] A sequência antigênica 2 (Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Met) corresponde aos aminoácidos 115-122 da inibina alfa. Esta sequência ainda não foi usada, isoladamente, como antígeno.

[083] Como não se tem estruturas de inibinas obtidas experimentalmente, foi realizada uma modelagem da estrutura da alfa-inibina de *Bos taurus*

automaticamente através do servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>), usando como molde a estrutura da proteína morfogênica óssea (BMP-3) humana, um membro da superfamília de proteínas TGF- β (PDB 2QCQ chain B). A Figura 4 mostra o modelo obtido. Neste modelo, a sequência antigênica 1, no extremo N-terminal mostra uma estrutura em hélice “coil” livre, enquanto que a sequência antigênica 2 se localiza numa folha-beta formada no extremo C-terminal da inibina.

[084] Com intuito de usar a sequência antigênica 2 como novo antígeno, foi selecionada toda a estrutura de folha beta que a contém, de modo a possibilitar a reprodução estrutural deste epítopo. A Figura 5 mostra a folha beta escolhida.

[085] Na base da estrutura escolhida há quatro Cisteínas (duas delas mostradas na Figura 6) e uma estrutura “dobra” que é mantida pela interação hidrofóbica dos aminoácidos Valina e Leucina (Val e Leu na Figura 6). Estes aminoácidos se encontram no meio de uma região hidrofóbica da molécula da inibina, na fase que interage com o receptor.

[086] Sobre esta sequência foram realizadas as seguintes mudanças:

1.- As duas Cisteínas do extremo C-terminal, da sequência original, foram substituídas por Serina (S, homólogo estrutural da Cisteína) e Glicina (G, para dar flexibilidade no caso de se adicionar outra sequência neste extremo).

2.- No extremo N-terminal, da sequência original, foi removida a sequência “Pro Cys Cys Ala Ala Leu L” que contém duas Cisteínas consecutivas. No seu lugar, foi adicionada a sequência “Gly Ser Ala” para dar flexibilidade à ligação com a molécula carregadora, de modo que a fusão não interfira com a formação da estrutura tridimensional desejada que é mostrada na Figura 5.

3.- Para incrementar a solubilidade da molécula final e impedir uma possível interação do antígeno com o receptor, os aminoácidos Valina (Val) e Leucina (Leu), mostrados na Figura 6, foram substituídos por ácido Aspártico (Asp, D) e Arginina (Arg, R), respectivamente, que possuem cargas opostas e,

portanto, podem interagir para estabilizar a “dobra” na estrutura mostrada na Figura 5 e simultaneamente diminuir a hidrofobicidade do segmento escolhido.

[087] Como resultado dessas modificações, foi obtida a sequência representada na Figura 7.

[088] O efeito dessas modificações na estrutura da folha beta selecionada foi avaliado por simulação de dinâmica molecular usando o programa NOC 3.0 (<http://noch.sourceforge.net>). A Figura 8 mostra a representação da estrutura após a simulação, indicando a manutenção da estrutura desejada após as modificações realizadas.

[089] Como mencionado anteriormente, os primeiros 29 aminoácidos da inibina alfa que contém a sequência antigênica 1 não estão presentes em outros membros da superfamília de proteínas TGF- β . As sequências de aminoácidos destas proteínas alinham com a inibina a partir do aminoácido 30.

[090] Para a sequência antigênica 2, foi realizada uma comparação da sequência, como ilustrada na Figura 7, com proteínas não-redundantes depositadas em diversos bancos de genes, usando a ferramenta “protein BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) no servidor <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Essa sequência antigênica 2 alinhou apenas com inibinas, com um “e-value” (um índice que indica a probabilidade do alinhamento ser ao acaso) menor que 1e-06 (7e-12 para a inibina de *Bos taurus*). Os alinhamentos com outras proteínas não relacionadas à inibida mostraram um “e-value” maior que 5. Portanto, é pouco provável a ocorrência de reação cruzada com outras proteínas que não sejam inibina.

[091] A Figura 12 mostra o alinhamento da sequência modificada com o extremo C-terminal de algumas inibinas selecionadas. Pela identidade na região correspondente à sequência antigênica 2 (**Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Met**) é possível afirmar que ela pode gerar anticorpos contra as inibinas listadas nesta Figura 12, a saber: Bovino, Ovino, Porco, Cabra, Cavalo, Gato, Cachorro, Camundongo e Humano. A sequência antigênica 1 (**Leu Leu Gln Arg Pro Pro Glu Glu Pro Ala Ala His**), também está presente em todas as inibinas relatadas na base de dados do GenBank.

[092] Finalmente, a sequência antigênica 1, que é naturalmente flexível, foi adicionada no extremo C-terminal da sequência modificada contendo a sequência antigênica 2, obtendo-se assim a sequência correspondente ao antígeno “inibina OF” [SEQ ID No: 1]:

Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Met	Arg	Pro	Leu	His	Val	Arg	Thr	Thr
1				5					10					15
Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr	Glu	Met	Asp	Pro	Asn	Arg
				20					25					30
Leu	Thr	Gln	His	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Pro	Glu	Glu
				35					40					45
Pro	Ala	Ala	His											
				49										

Exemplo 2: Desenho do gene sintético para o antígeno Inibina OF

[093] Estabelecida a sequência de aminoácidos do antígeno OF, procedeu-se ao desenho de um gene sintético que codifique esta sequência, usando códons otimizados e harmonizados para sua melhor expressão em *Escherichia coli*.

[094] Para a harmonização de códons [ver Angov et al. (2011) Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. *Methods Mol Biol.* 705:1-13], foram localizados, no gene original (de *Bos taurus*), os códons raros ou usados com menor frequência, empregando o programa ANACONDA (<http://bioinformatics.ua.pt/software/anaconda>) alimentado com as tabelas de uso de códons de *Bos taurus* depositado no “Codon usage database” (<http://www.kazusa.or.jp/codon>). Na harmonização foram considerados os códons raros, presentes entre as duas estruturas secundárias e loops, visualizados no modelo estrutural usando o programa DeepView-Swiss-PdbViewer (<http://spdbv.vital-it.ch>). Os códons raros ou menos frequentes de *E. coli* foram introduzidos manualmente no gene sintético, empregando a interface do programa Gene Design v2.0 (firma DNA2.0). Também foram introduzidos manualmente: o sítio de corte para a enzima XhoI (CTCGAG) no extremo 5', o códon stop junto com o sítio de corte para Hinde III (TAAGCTT, em negrito o

códon stop e sublinhado o sítio de Hind III, na Figura 10). Além disso, foi adicionado, na base de dados de sequências a serem evitadas do programa Gene Design v2.0, o sítio “chi” de *E. coli* 5' GCTGGTGG 3'. Este sítio favorece a recombinação por homologia e pode causar instabilidade do plasmídeo de expressão.

[095] Finalmente, foi realizada a síntese do gene desenhado, correspondente à SEQ ID NO:2, codificante da SEQ ID NO: 3. O gene sintético foi clonado num vetor sem o sítio de clonagem múltipla derivado do pBlueScript II SK cortado com SmaI denominado pBSK-IniOF. A sequência do gene sintético (SEQ ID NO:2) foi confirmada por sequenciamento.

Exemplo 3: Clonagem do gene sintético da Inibina OF em fusão com a proteína SUMO

[096] Em uma das concretizações da presente invenção, a expressão da proteína recombinante foi realizada por fusão com a proteína SUMO (de “small ubiquitin-like modifier”), que pertence à família daquelas usadas para aumentar a expressão da proteína INIBINA OF da invenção e melhorar sua solubilidade. Além disso, a estrutura terciária da proteína SUMO é reconhecida pela SUMO protease que cliva exatamente entre a SUMO e a proteína alvo, dando como resultado a proteína nativa sem fusão.

[097] A Figura 13 mostra a estratégia de clonagem. O gene sintético foi cortado do plasmídeo pBSK-IniOF (Figura 13A) usando as enzimas BamHI e Hind III e clonado nos sítios correspondentes do vetor pET-SUMO (Figura 13B). O plasmídeo resultante foi denominado pET-SUMO-IniOF (Figura 13C). O sucesso da clonagem foi verificado por sequenciamento usando o primer universal T7 reverse primer (5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3').

Exemplo 4: Produção da Inibina OF em fusão com a proteína SUMO

[098] A cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pET-SUMO-IniOF foi crescida em 200 ml de meio LB Kanamicina (25 ug/ml) e incubada com o material de um crio tubo do bando de sementes. A cultura foi incubada a 37°C, a 200 rpm, por 16 horas.

[099] Os 200 ml de cultura foram inoculados em 5 Litros do meio MCHD (Meio Complexo de Alta Densidade) em fermentador de 15 litros. A fermentação em regime constante de batelada alimentada, a 37°C, 30% de oxigênio dissolvido, tendo glicerol como fonte de carbono. Na $DO_{600nm} = 15$, a alimentação por glicerol foi trocada por lactose (indução) e a fermentação continuou por mais 12 horas a 28°C.

[0100] As células foram coletadas por centrifugação a 6000 rpm por 30 minutos e ressuspendidas no tampão de lise (5 mM imidazol, 0,5M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0,1% Triton X-100; 5mM 2-mercaptoetanol) e lisadas no homogeneizador de alta pressão.

[0101] As células lisadas e homogeneizadas foram submetidas a filtração através de membrana de 0,2 μm (sistema “end-filtration” millipore) à temperatura ambiente. O lisado foi clarificado em coluna contendo a resina Chelating-Sepharose (GE health care) ativada com Ni^{2+} . Após a absorção, a resina foi lavada com o tampão 0,5M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 contendo 5 mM de imidazol; e em seguida com o mesmo tampão contendo 40 mM de imidazol. A proteína recombinante foi eluída com o tampão de eluição (0,5 M imidazol, 0,1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) coletando-se frações correspondentes ao pico de eluição.

[0102] A proteína eluída da coluna cromatográfica de afinidade foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular na coluna carregada com a resina Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare) usando o tampão 0,1M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. O SDS-PAGE da Figura 14 mostra apenas uma banda de aproximadamente 20 kDa, esperada para a fusão da proteína 6xHis-SUMO (13,5 kDa) e a Inibina OF (6,5 kDa). A expressão de proteína solúvel, assim como a estabilidade da proteína purificada durante seu armazenamento a 4°C na concentração de 1mg/ml, indicam o sucesso no desenho do antígeno com referência à solubilidade e à estabilidade.

Reivindicações

1. Antígeno de inibina alfa caracterizado por compreender uma sequência de aminoácidos selecionada de:
 - (a) SEQ ID NO:1;
 - (b) SEQ ID NO:3;
 - (c) variantes conservativamente modificadas tendo pelo menos 85% de identidade com qualquer uma das sequências de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, e tendo substancialmente a mesma atividade imunogênica das mesmas;
 - (d) fragmentos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, ditos fragmentos contendo as duas regiões imunogênicas da SEQ ID NO:1 ou da SEQ ID NO:3; e
 - (e) uma proteína heteróloga de fusão compreendendo a SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:3, ou um fragmento ou variante conservativamente modificada das mesmas, e uma proteína carregadora farmacologicamente aceitável.
2. Antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência selecionada do grupo consistindo de:
 - (i) SEQ ID NO:1;
 - (ii) uma variante da SEQ ID NO:1 compreendendo aminoácidos conservativamente modificados e tendo pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:1; e
 - (iii) um fragmento da SEQ ID NO:1 compreendendo as regiões imunogênicas que se ligam especificamente a anticorpos produzidos em resposta à inibina.
3. Antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender uma sequência selecionada do grupo consistindo de:
 - (i) SEQ ID NO:3;
 - (ii) uma variante da SEQ ID NO:3 compreendendo aminoácidos conservativamente modificados e tendo pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:3; e

- (iii) um fragmento da SEQ ID NO:3 compreendendo as regiões imunogênicas que se ligam especificamente a anticorpos produzidos em resposta à inibina.
4. Antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender a fusão de proteínas que compreendem:
- (a) uma sequência de aminoácidos tendo antigenicidade com relação à inibina, dita sequência sendo selecionada do grupo consistindo de:
 - (i) SEQ ID NO:1;
 - (ii) uma variante da SEQ ID NO:1, compreendendo aminoácidos conservativamente modificados e tendo pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:1;
 - (iii) um fragmento da SEQ ID NO:1 compreendendo as regiões imunogênicas que se ligam especificamente a anticorpos produzidos em resposta à inibina;
 - (iv) SEQ ID NO:3;
 - (v) uma variante da SEQ ID NO:3 compreendendo aminoácidos conservativamente modificados e tendo pelo menos 90% de identidade de sequência com a SEQ ID NO:3; e
 - (vi) um fragmento da SEQ ID NO:3 compreendendo as regiões imunogênicas que se ligam especificamente a anticorpos produzidos em resposta à inibina, e
 - (b) uma sequência de aminoácidos de proteína carregadora da proteína antigênica (a), farmacologicamente aceitável.
5. Antígeno de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita proteína carregadora farmacologicamente aceitável é selecionada do grupo consistindo de proteínas da família de pequeno modificador relacionado à ubiquitina (SUMO), proteína Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*, proteína de ligação a maltose, albumina de soro bovino, hemocianina de keyhole limpet, ovoalbumina, flagelina, albumina de soro de qualquer espécie, gama globulina de qualquer espécie, polímeros de aminoácidos D- e/ou L-.

6. Antígeno de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de dita proteína carregadora farmacologicamente aceitável ser a proteína Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi* codificada pela SEQ ID NO:4.
7. Antígeno de inibina alfa caracterizado por compreender a SEQ ID NO:1.
8. Antígeno de inibina alfa caracterizado por compreender a SEQ ID NO:3.
9. Antígeno de inibina alfa caracterizado por compreender a fusão da proteína antigênica SEQ ID NO:1 com a proteína carregadora Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi* codificada pela SEQ ID NO:4.
10. Antígeno de inibina alfa caracterizado por compreender a fusão da proteína antigênica SEQ ID NO:3 com a proteína carregadora Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi* codificada pela SEQ ID NO:4.
11. Gene codificante de um antígeno de inibina alfa caracterizado pelo fato de compreender uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de:
 - (a) SEQ ID NO:2; e
 - (b) uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 75% de identidade com relação à SEQ ID NO:2.
12. Gene codificante de uma proteína de fusão compreendendo o antígeno como definido na reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender:
 - (a) uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de:
 - (i) SEQ ID NO:2;
 - (ii) uma sequência codificante do antígeno compreendendo a SEQ ID NO:1 ;
 - (iii) uma sequência codificante de variantes conservativamente modificadas tendo pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:1 e tendo substancialmente a mesma atividade imunogênica da SEQ ID NO:1; e
 - (iv) uma sequência codificante de fragmentos da SEQ ID NO:1 ditos fragmentos contendo as regiões imunogênicas da SEQ ID NO:1, e

- (b) uma sequência codificante de uma proteína carregadora selecionada do grupo consistindo de proteínas da família de pequeno modificador relacionado à ubiquitina (SUMO), proteína Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*, proteína de ligação a maltose, albumina de soro bovino, hemocianina de keyhole limpet, ovoalbumina, flagelina, albumina de soro de qualquer espécie gama globulina de qualquer espécie, polímeros de aminoácidos D- e/ou L-.

13. Gene codificante de uma proteína de fusão compreendendo o antígeno como definido na reivindicação 4, caracterizado pelo fato de compreender:

- (a) uma sequência de nucleotídeos selecionada do grupo consistindo de:
 - (i) SEQ ID NO:2;
 - (ii) uma sequência codificante do antígeno compreendendo a SEQ ID NO:3;
 - (iii) uma sequência codificante de variantes conservativamente modificadas tendo pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:3 e tendo substancialmente a mesma atividade imunogênica da SEQ ID NO:3; e
 - (iv) uma sequência codificante de fragmentos da SEQ ID NO:3 ditos fragmentos contendo as regiões imunogênicas da SEQ ID NO:3, e
- (b) uma sequência codificante de uma proteína carregadora selecionada do grupo consistindo de proteínas da família de pequeno modificador relacionado à ubiquitina (SUMO), proteína Rrp42 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*, proteína de ligação a maltose, albumina de soro bovino, hemocianina de keyhole limpet, ovoalbumina, flagelina, albumina de soro de qualquer espécie gama globulina de qualquer espécie, polímeros de aminoácidos D- e/ou L-.

14. Gene codificante de acordo com a reivindicação 12 ou reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a dita sequência codificante de uma proteína

carregadora é a SEQ ID NO:4 que codifica a proteína Rrp2 da arqueobactéria *Pyrococcus abyssi*.

15. Processo de obtenção do antígeno de inibina alfa definido nas reivindicações 1-3 e 7-8, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- (i) preparação de um sistema de expressão compreendendo:
 - (a) o gene codificante de um antígeno de inibina alfa definido na reivindicação 11;
 - (b) um sistema de expressão apropriado, preferencialmente uma cepa de *Escherichia coli* selecionada das cepas BL21 (DE3) e Rosetta (DE3), e
 - (c) um promotor de expressão apropriado, selecionado de pRSETA e pET, preferencialmente o promotor pET-SUMO;
- (ii) inoculação das células hospedeiras com o sistema de expressão preparado na etapa (i);
- (iii) lise das células para obtenção do antígeno de inibina alfa; e
- (iv) purificação do dito antígeno de inibina alfa obtido.

16. Processo de obtenção do antígeno como definido nas reivindicações 4-5 e 9-10, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

- (i) preparação de um sistema de expressão compreendendo:
 - (a) o gene codificante de um antígeno de inibina alfa como definido na reivindicação 12, ou reivindicação 13 ou reivindicação 14;
 - (b) um sistema de expressão apropriado, preferencialmente uma cepa de *Escherichia coli* selecionada das cepas BL21 (DE3) e Rosetta (DE3), e
 - (c) um promotor de expressão apropriado, selecionado de pRSETA e pET, preferencialmente o promotor pET-SUMO;
- (ii) inoculação das células hospedeiras com o sistema de expressão preparado na etapa (i);
- (iii) lise das células para obtenção do antígeno de inibina alfa; e
- (iv) purificação do antígeno como definido nas reivindicações 4, 9 ou 10.

17. Composição antigênica, caracterizada por compreender:
 - (a) o antígeno de inibina alfa como definido em qualquer uma das reivindicações 1-3 e 7-8;
 - (b) opcionalmente, um adjuvante; e
 - (c) um veículo farmacologicamente aceitável.
18. Composição antigênica, caracterizada por compreender:
 - (a) o antígeno de inibina alfa como definido em qualquer uma das reivindicações 4-6 e 9-10;
 - (b) opcionalmente, um adjuvante; e
 - (c) um veículo farmacologicamente aceitável.
19. Composição antigênica de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que dito adjuvante é selecionado do grupo consistindo de: adjuvante incompleto de Freund, o adjuvante completo de Freund, manana acetilada polidispersa β -(1,4) ligada, adjuvantes de copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, adjuvantes lipídicos modificados, adjuvantes derivados de saponina, sulfato de dextrana, hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio.
20. Composição antigênica de acordo com a reivindicação 17 ou reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que dito veículo farmacologicamente aceitável inclui preservativos, diluentes, emulsificantes, estabilizantes e outros ingredientes farmacologicamente aceitáveis.
21. Uso do antígeno de inibina alfa como definido nas reivindicações 1-3 e 7-8, caracterizado por ser no aumento da produção de animais mamíferos ou aves.
22. Uso do antígeno de inibina alfa como definido nas reivindicações 4-6 e 9-10, caracterizado por ser no tratamento de infertilidade de animais mamíferos, incluindo o homem
23. Uso da composição antigênica como definida em qualquer uma das reivindicações 17-20, caracterizado por ser no aumento da produção de animais mamíferos ou aves.

24. Uso da composição antigênica como definida em qualquer uma das reivindicações 17-20, caracterizado por ser no tratamento de infertilidade de animais mamíferos, incluindo o homem.

FIGURA 1

Ser	Thr	Pro	Pro	Leu	Pro	Trp	Pro	Trp	Ser	Pro	Ala	Ala	Leu	Arg
1				5					10					15
Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Pro	Glu	Glu	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Cys
				20					25					30
His	Arg	Ala	Ala	Leu	Asn	Ile	Ser	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Trp	Asp
				35					40					45
Arg	Trp	Ile	Val	His	Pro	Pro	Ser	Phe	Ile	Phe	Tyr	Tyr	Cys	His
				50					55					60
Gly	Gly	Cys	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Asp	Leu	Pro	Leu	Pro	Val
				65					70					75
Pro	Gly	Val	Pro	Pro	Thr	Pro	Val	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Val	Pro
				80					85					90
Gly	Ala	Gln	Pro	Cys	Cys	Ala	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Met	Arg	Pro
				95					100					105
Leu	His	Val	Arg	Thr	Thr	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Phe	Lys	Tyr
				110					115					120
Glu	Met	Val	Pro	Asn	Leu	Leu	Thr	Gln	His	Cys	Ala	Cys	Ile	
				125					130				134	

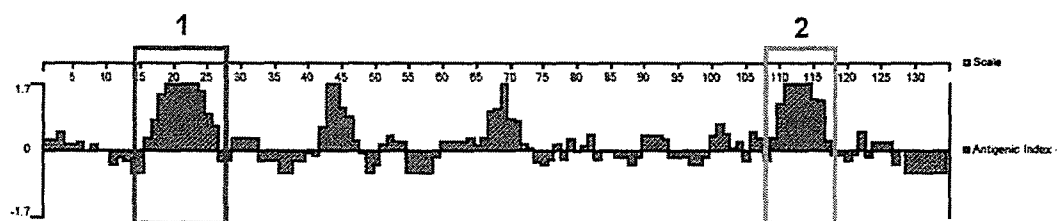
FIGURA 2

FIGURA 3

STPPLPWPWSPAALRLLQRPPEEPAAHADCHRAALNISFQELGWRWIVHPPSFIFYYCHGGCGLSPP
 região antigênica 1

QDLPLPVPGVPPTPVQPLSLVPGAQPCCAALPGTMRPLHVRTTSDGYSFKYEMVPNLLTQHCACI
 região antigênica 2

FIGURA 4

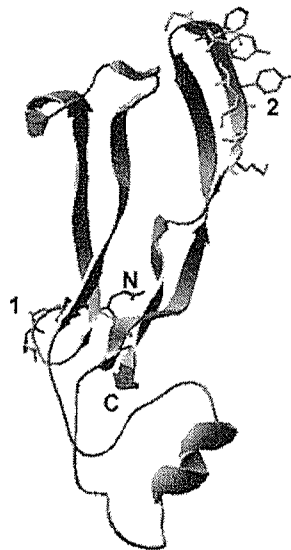


FIGURA 5

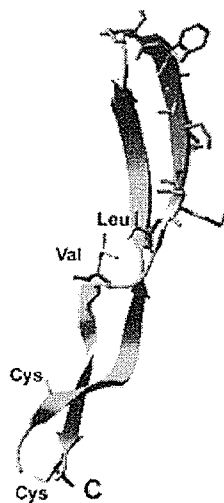


FIGURA 6

PCCAALPGTMRPLHVRTTSDG**GYSEFKYEM**VPNLLTQH**CAC**I

FIGURA 7

GSAPGTMRPLHVRTTSDGGYSEKYEMDPNRLTQHSAG

FIGURA 8

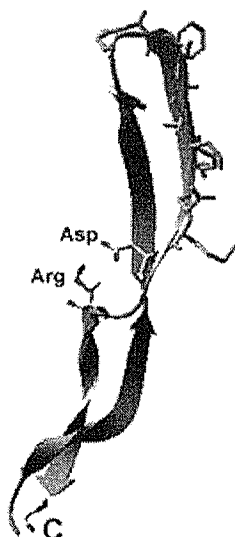


FIGURA 9

GSAPGTMRLHVRTTSDG **2** **1** GYSFKYEMDPNRLTQHSAGLLQRPPEEPAAH

FIGURA 10

GGATCCCTCGAGGGTTCTGCTCCGGGCACCATGCGTCCGCTGCACGTGCGTACCACCTCCGATGGTGGCT
ACTCTTTCAAATACGAAATGGACCCGAACCGCCTGACTCAGCATTCTGCTGGCCTGCTGCAGCGCCCGCC
GGAAGAACCGGCTGCGCACTAAGCTT

FIGURA 11

GSLEGSAPGTMRLHVRTTSDGGYSEFKYEMDPNRLTQHSAGLLQRPPEEPAAH

FIGURA 12

	100	110	120	130
Porcine	AALPGTMRSL	RVRTTSDGGYSEFKYET	VPNLLTQHCACI	
chicken	AALPGTMRSL	RVRTTSDGGYSEFKYET	VPNLLAODCTCV	
Mouse	AALPGSMRSL	RVRTTSDGGYSEFKYEM	VPNLLTQHCACI	
Cat	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYET	VPNLLTQHCACI	
Dog	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYET	VPNLLTQHCACI	
Horse	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYEI	VPNLLTQHCACI	
Goat	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYEM	VPNLLTQHCACI	
Ovine	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYEM	VPNLLTQHCACI	
Human	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYET	VPNLLTQHCACI	
Bovine	AALPGTMRPL	RVRTTSDGGYSEFKYEM	VPNLLTQHCACI	
Antigen2	GSAPGTMRLPL	RVRTTSDGGYSEFKYEM	DPNRLTQHSAG.	

2

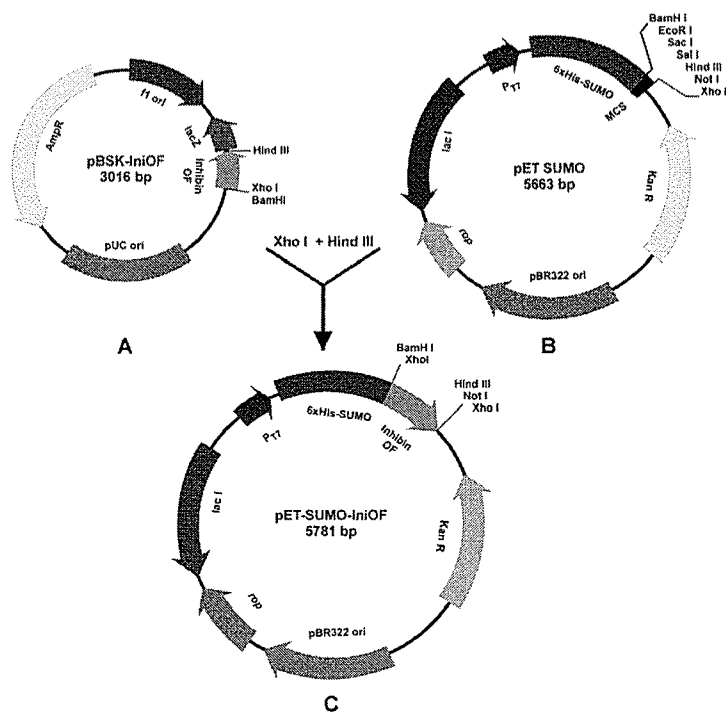
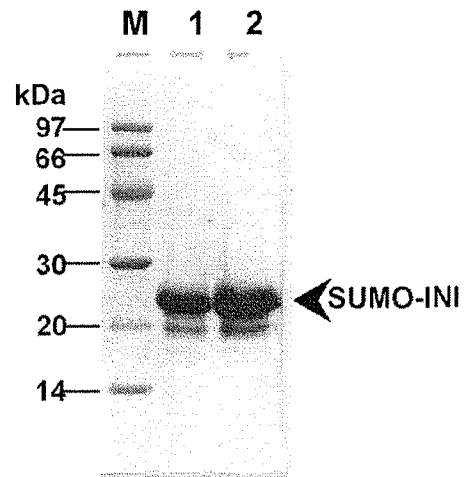
FIGURA 13

FIGURA 14

Resumo

“ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE INIBINA ALFA, GENE CODIFICANTE DE PROTEÍNA DE FUSÃO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA, COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA, USO DO ANTÍGENO DE INIBINA ALFA E USO DA COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA”

A presente invenção se refere a uma proteína inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma e proteína de fusão compreendendo a mesma, assim como a uma composição antigênica compreendendo inibina alfa modificada e/ou um fragmento antigênico da mesma e/ou uma proteína de fusão compreendendo inibina alfa modificada, ao processo de produção da proteína inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma e proteína de fusão compreendendo a mesma, e ao uso da inibina alfa modificada, fragmentos antigênicos da mesma ou proteína de fusão compreendendo inibina alfa, e ao uso da composição antigênica no aumento da ovulação de animais, especialmente mamíferos e aves. A presente invenção é baseada na modificação da sequência madura da subunidade alfa da inibina de *Bos taurus*, especificamente no segmento da extremidade C-terminal que, além da modificação de alguns aminoácidos, passa a ter as duas regiões mais imunogênicas nesse segmento.