



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1022337 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/435 (2006.01) **C07K 14/54** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2000.01.07	(73) Titular(es): BAYER HEALTHCARE AG 51368 LEVERKUSEN	DE
(30) Prioridade(s): 1999.01.20 EP 9910096		
(43) Data de publicação do pedido: 2000.07.26	(72) Inventor(es): HEINER APELER HERMANN WEHLMANN	DE DE
(45) Data e BPI da concessão: 2006.07.26 011/2006	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PLASMÍDEOS, SUA CONSTRUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE INTERLEUCINA-4 E DE PROTEÍNAS MUTANTES DE INTERLEUCINA-4**

(57) Resumo:

RESUMO

**"PLASMÍDEOS, SUA CONSTRUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NA
PREPARAÇÃO DE INTERLEUCINA-4 E DE PROTEÍNAS MUTANTES DE
INTERLEUCINA-4"**

A presente invenção relaciona-se com a construção e utilização de plasmídeos de expressão na preparação de interleucina-4 recombinante (IL-4) e de proteínas mutantes de interleucina-4.

DESCRIÇÃO

"PLASMÍDEOS, SUA CONSTRUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE INTERLEUCINA-4 E DE PROTEÍNAS MUTANTES DE INTERLEUCINA-4"

Área da Invenção

A presente invenção relaciona-se com a construção e utilização de plasmídeos de expressão na preparação de interleucina-4 recombinante (IL-4) e de proteínas mutantes de interleucina-4.

Antecedentes da Invenção

A interleucina-4 (IL-4) humana adulta é constituída por 129 aminoácidos com 50% de homologia em relação à IL-4 do ratinho. A IL-4 é a única citocina conhecida que orienta a diferenciação das células T auxiliares para um fenótipo T_{H2} (Mosmann e Sad, Immunol. Today 17, 138-146, 1996). A IL-4 faz a sinalização em linfócitos e noutras células através de um complexo heterodimérico de dois receptores de citocina, o IL-4R α e a cadeia γ (γ c). Foram descritos mutantes de IL-4 antagonistas (Kruse et al., EMBO J. 11, 3237-3244, 1992). Três aminoácidos próximos da extremidade C (R121, Y124 e S125) são importantes para ligação à cadeia γ c. A introdução de Asp (D) nestas posições bloqueia a dimerização do receptor e a sinalização através da membrana.

A proteína mutante dupla de interleucina-4 (IL-4 DM) é uma variante da IL-4 com 2 alterações de aminoácido nas

posições 121 e 124 designada por IL-4 R121D Y124D. A IL-4 DM consegue bloquear tanto a actividade da IL-4 como a actividade da IL-13. Em contraste com todos os mutantes de posição única nunca foi encontrada qualquer actividade agonista residual para esta proteína mutante. Julga-se que estas propriedades antagonistas da IL-4 DM sejam úteis para o tratamento de doenças que envolvem o desenvolvimento de for T_{H2} e/ou a produção de IgE (Ryan, J. Allergy Clin. Immunol. 99, 1-5, 1997).

Como foi descrito em várias publicações, pode utilizar-se organismos procariotas para produzir IL-4 recombinante e proteínas mutantes de IL-4. Infelizmente, os sistemas descritos têm um certo número de desvantagens (baixo nível de expressão, baixa estabilidade do vector de expressão) que torna impossível ou economicamente impraticável a produção em grande escala da IL-4 e das proteínas mutantes de IL-4. PTITSYN L.R. e AL'TMAN IB.: BULLETIN OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, vol. 119, nº 1, Janeiro de 1995, páginas 77-79, intitulada 'Recombinant *Escherichia coli* strains provide high-level expression of human Interleukin-3 and Interleukin-4.' A matéria objecto da presente invenção difere desta citação pelo facto de envolver um promotor T5 de *E. coli*. no operação reivindicado. A Patente dos Estados Unidos 4 689 409 relaciona-se com o melhoramento da expressão microbiana de polipéptidos e MAKRIDES S.C.; MICROBIOLOGICAL REVIEWS, vol. 60, nº 3, 1 de Setembro de 1996, páginas 512-538, relaciona-se com 'Strategies for achieving high-level expression in *Escherichia coli*'.

Os critérios principais para um sistema de expressão eficiente e seguro são:

- rendimento de produto elevado
- expressão regulável estável
- estabilidade do vector de expressão

Existem várias características de um plasmídeo de expressão que são importantes para os critérios listados acima (Hannig et al., TIBTECH. 16, 54-60, 1998). Estas são:

- Promotor
- Sítio de ligação ribossómico (rbs)
- Utilização do codão do gene correspondente
- Finalizador transcricional
- Gene de resistência
- Regulação de expressão
- Origem de replicação (ori)

Resumo da Invenção

Produziu-se plasmídeos de expressão para a IL-4 e para as proteínas mutantes de IL-4 com modificações em todos os elementos relevantes para um sistema de expressão eficiente e seguro. A qualidade e a aptidão do sistema de expressão correspondente foram classificadas principalmente de acordo com os critérios seguintes:

- Rendimento de IL-4 e das proteínas mutantes de IL-4

- Estabilidade do plasmídeo
- Conservação da capacidade de indução

Por conseguinte, o objecto da presente invenção é tornar acessível um processo para a construção e utilização de plasmídeos de expressão na produção em grande escala de interleucina-4 recombinante (IL-4) e de proteínas mutantes de interleucina-4. Além disso, o sistema hospedeiro/vector recentemente desenvolvido deverá ser muito adequado para a expressão de outras proteínas (citocinas, factores de crescimento, receptores solúveis, anticorpos etc.).

Surpreendentemente, constatou-se que bactérias transformadas com plasmídeos de acordo com a presente invenção originam valores de velocidade de expressão, estabilidade de plasmídeo e estabilidade de expressão muitas vezes superiores aos observados na transformação de hospedeiros idênticos com plasmídeos conhecidos na técnica. Deste modo, os plasmídeos desta invenção são, de longe, mais úteis para a preparação de interleucina-4 recombinante e de proteínas mutantes de interleucina-4 do que todos os plasmídeos anteriormente conhecidos.

O sistema vector recentemente desenvolvido contém os elementos seguintes:

Promotor T5

O promotor T5 do fago de E. coli em conjunto com duas sequências operadoras lac é proveniente do plasmídeo pQE30 (Qiagen) pertencente à família pDS de plasmídeos

(Bujard et al., *Methods Enzymol.* 155, 416-433, 1987 e Stüber et al., *Immunological Methods*, I. Lefkovits e B. Pernis, eds., Academic Press, Inc., Vol. IV, 121-152, 1990).

Sítio de ligação ribossômico T7 g10

O sítio de ligação ribossômico (rbs) é proveniente da região a montante do gene 10 do fago T7 (líder T7 g 10). O gene 10 do fago T7 codifica a proteína de revestimento, a qual é a proteína principal expressada após infecção pelo T7. O T7 g10 rbs foi obtido a partir do vector pET-9a (Studier et al., *Methods Enzymol.* 185, 60-89, 1990). O líder T7 g10 abrange uma região de cerca de 100 pb (Olins et al., *Gene* 227-235, 1988). Na construção de expressão final a região a montante do sítio XbaI foi eliminada. A sequência líder T7 g10 abrange agora 42 pb e inclui uma alteração de base de G para A na posição 3638 do plasmídeo preferido.

Utilização do codão da sequência de IL-4 natural

Como uma medida eficaz do desvio de utilização de codão sinónimo, o índice de adaptação de codão (CAI) pode ser útil para prever o nível de expressão de um dado gene (Sharp et al., *Nucleic Acids Res.* 15, 1281-1295, 1987 e Apeler et al., *Eur. J. Biochem.* 247, 890-895, 1997). O CAI é calculado como a média geométrica dos valores de utilização de codão sinónimo relativo (RSCU) correspondendo a cada um dos codões utilizados num gene, divididos pelo CAI máximo possível para um gene da mesma composição de aminoácidos. Os valores de RSCU para cada codão são calculados a partir de genes

extremamente expressados de um organismo particular, e.g. *E. coli*, e representam a frequência observada de um codão dividida pela frequência esperada assumindo uma utilização igual dos codões sinónimos para um aminoácido. Genes extremamente expressados, e.g. genes que codificam proteínas ribossômicas, têm geralmente valores de CAI elevados $\geq 0,46$. Genes fracamente expressados como os *lad* e *trpR* na *E. coli* têm valores de CAI baixos $\leq 0,3$.

O valor de CAI calculado da *E. coli* para a sequência de IL-4 natural é de 0,733. Isto significa que o gene natural deveria ser muito adequado para expressão extremamente elevada na *E. coli*. Contudo, um gene sintético com utilização de codão de *E. coli* óptimo (valor de CAI = 1) tem potencial para aumentar o nível de expressão. Deste modo, concebeu-se e clonou-se genes sintéticos de IL-4 e de proteínas mutantes de IL-4.

Finalizador de transcrição

Um fragmento de ADN de T7 contendo o finalizador de transcrição $T\phi$ é proveniente do vector pET-9a (Studier et al., *Methods Enzymol.* 185, 60-89, 1990). Os finalizadores de transcrição determinam os pontos em que o complexo de ARNm-ARN polimerase-ADN se dissocia, finalizando desse modo a transcrição. A presença de um finalizador de transcrição no final de um gene extremamente expressado tem várias vantagens: eles minimizam o sequestro de ARN-polimerase que possa estar envolvida em transcrição desnecessária, eles restringem o tamanho do ARNm ao mínimo, limitando desse modo o

dispêndio de energia, uma vez que uma transcrição forte pode interferir com a origem de replicação, um finalizador de transcrição aumenta a estabilidade do plasmídeo devido à conservação do número de cópias (Balbas e Bolivar, *Methods Enzymol.* 185, 14-37, 1990).

Gene de resistência

O gene de resistência kan é proveniente do vector pET-9a (Studier et al., *Methods Enzymol.* 185, 60-89, 1990). Originariamente, este é o gene kan de Tn903 do vector pUC4KISS (Barany, *Gene* 37, 111-123, 1985). No plasmídeo preferido o gene kan e o gene da IL-4 e da proteína mutante de IL-4 têm orientações opostas, pelo que não haverá um aumento no produto do gene kan após indução devido à transcrição de leitura ao longo do promotor T5. Escolheu-se canamicina como marcador selectivo porque é o antibiótico preferido para efeitos de GMP. Além disso, os vectores à base do gene kan são mais estáveis do que os plasmídeos resistentes à ampicilina (bla). A selectividade à ampicilina tem tendência a perder-se à medida que o fármaco é degradado pela enzima β -lactamase excretada. O modo de resistência bacteriana à canamicina assenta numa aminoglicósido-fosfotransferase que inactiva o antibiótico.

Regulação da expressão

A expressão controlada do gene é absolutamente necessária para a construção de um sistema plasmídeo estável, em particular se a proteína de interesse é prejudicial para a célula hospedeira. O plasmídeo preferido utiliza um sistema que pode ser induzido à

base de lac constituído por um gene repressor de lac (lacI) e duas sequências operadoras lac sintéticas fundidas a jusante do promotor T5 do fago de E. coli. O promotor lacI^q e o gene estrutural lacI foram isolados do vector pTrc99A (Amann et al., Gene 69, 301-315, 1988). I^q é uma mutação do promotor que conduz a uma sobreprodução do repressor lacI. O repressor lac de tipo selvagem é uma molécula tetramérica compreendendo quatro subunidades idênticas de 360 aminoácidos cada. O tetrâmero repressor lac é um dímero de dois dímeros funcionais. As quatro subunidades são mantidas em conjunto por um agrupamento de quatro hélices formado pelos resíduos 340-360. Devido ao isolamento do gene lacI do vector pTrc99A por um corte NarI, os resíduos para além do aminoácido 331 são apagados e adicionados 10 aminoácidos que não estão normalmente codificados no gene lacI. Sabe-se que as mutações ou deleções que ocorrem na extremidade C da lacI, para além do aminoácido 329, originam dímeros funcionais que são fenotipicamente semelhantes ao repressor de tipo selvagem (Pace et al., TIBS 22, 334-339, 1997).

Origem de replicação (ori)

A origem de replicação (ori) do plasmídeo preferido é derivada do vector pET-9a, ori essa que provém de pBR322. Consequentemente, o plasmídeo preferido é portador do replicação pMB1 (ColE1). Os plasmídeos com este replicação são plasmídeos de cópias múltiplas que se replicam de um modo 'relaxado'. Em condições normais de crescimento são mantidas, um mínimo, de 15-20 cópias de plasmídeo em cada célula bacteriana. O número efectivo

para o plasmídeo preferido está dentro desta gama. A replicação da *ori* de tipo ColE1 é iniciada por um transcrito de ARN de 555 nucleótidos, ARN II, o qual origina um híbrido persistente com a sua cadeia molde de ADN próxima da *ori*. O híbrido de ARN II-ADN é depois dissociado pela RNase H na *ori* para produzir um oligonucleótido com o 3'-OH livre que actua como um iniciador para a ADN-polimerase I. Esta iniciação da síntese de ADN é regulada negativamente pelo ARN I, uma molécula de ARN com 108 nucleótidos complementar à extremidade 5' do ARN II. A interacção do ARN I antimensageiro com o ARN II provoca uma alteração conformacional no ARN II que inibe a ligação do ARN II à cadeia molde de ADN e impede, consequentemente, a iniciação da síntese do ADN de plasmídeo. A ligação entre os ARNs I e II é intensificada por uma proteína pequena de 63 aminoácidos (a proteína Rop, Repressora do iniciador), que é codificada por um gene localizado 400 nucleótidos a jusante da origem de replicação (Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, 1989). A deleção do gene da *rop* leva a um aumento no número de cópias e, devido a um efeito de dosagem de gene, a um aumento dos níveis de expressão do gene heterólogo codificado pelo plasmídeo. Observou-se também o mesmo para os vectores de expressão da IL-4 avaliados. Mas verificou-se que os plasmídeos de *rop* são instáveis e perdem-se muito rapidamente durante a fermentação em condições não selectivas. Por conseguinte, o replicação do plasmídeo preferido contém o gene da *rop* para garantir uma estabilidade elevada do plasmídeo. O plasmídeo preferido não tem o gene *mob*

necessário para mobilização e é, por esse motivo, incapaz de orientar a sua própria transferência conjugal de uma bactéria para outra.

No plasmídeo preferido eliminou-se todos os elementos que não são necessários para a replicação, resistência e expressão regulável do plasmídeo.

Por exemplo pode utilizar-se um gene de interleucina-4 natural ou de uma proteína mutante de interleucina-4 em vez do sintético com utilização otimizada do codão de *E. coli*. O finalizador de transcrição preferido é o T ϕ mas também podem ser utilizados outros finalizadores como o rmb T2 ou aspA.

Os métodos utilizados no decorrer da definição do sistema de expressão são fornecidos a seguir.

MATERIAIS E MÉTODOS

Enzimas

As endonucleases de restrição, a fosfatase alcalina intestinal de vitelo, a polinucleótido T4-cinase e a ADN T4-ligase foram adquiridas à Boehringer Mannheim e GIBCO-BRL e utilizadas como recomendado pelo fornecedor.

Métodos de ADN recombinante

Os procedimentos de clonagem correntes foram descritos em Sambrook et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989). As transformações foram realizadas

segundo M. Scott (Seed e Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365-3369, 1987). Como hospedeiros para transformações utilizou-se essencialmente as estirpes de *E. coli* DH5 α (GIBCO BRL) e W3110 (ATCC 27325). O genótipo da W3110 é K12, F⁻, [N(rrnD-rrnE)] λ ⁻.

Os isolamentos em grande escala do ADN de plasmídeo foram realizados com Qiagen-tips (Qiagen). A extracção de fragmentos de ADN dos geles de agarose foi realizada utilizando Jetsorb (Genomed) como recomendado pelo fornecedor.

Os oligonucleótidos para mutagénese orientada para o local, reacções de PCR e sequenciação foram obtidos de MWG Biotech, Pharmacia Biotech ou GIBCO BRL.

As experiências de mutagénese foram realizadas pelo método de Deng e Nickoloff (Deng e Nickoloff, Anal. Biochem. 200, 81-88, 1992) utilizando o sistema 'Unique Site Elimination Mutagenesis' da Pharmacia Biotech. O iniciador utilizado para a recreação do T7 g10 rbs tem a sequência seguinte:

5'TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACATCTAGAAATAAGTTTAACTTTAA
GAA3' (Seq. 1).

Todas as construções e sequência de ADN foram confirmadas utilizando a Sequenciação pelo Ciclo Finalizador Corante com ADN AmpliTaq-Polimerase, FS num sequenciador ABI 373A (Applied Biosystems).

A invenção é explicada em mais pormenor pelos exemplos, figuras e informação de sequências que se seguem:

FIG. 1 até FIG. 4: Construção do plasmídeo de expressão preferido. (Abreviaturas: IL-4 TM, proteína mutante tripla de IL-4; IL-4 DM, proteína mutante dupla de IL-4).

FIG. 5: Estabilidade do plasmídeo dos vectores de expressão da proteína mutante de IL-4 pR021.1.0 e pR02.1.0. O vector pR02.1.0 permanece totalmente estável ao longo de 78 gerações sem selecção com antibiótico. Em contrapartida o vector de expressão pR021.1.0, o qual se baseia no plasmídeo pET-30a (Novagen) comercialmente disponível, é perdido muito rapidamente. Apenas 16% das colónias contêm o plasmídeo após 78 gerações sem selecção com canamicina.

FIG. 6: Conservação da capacidade de indução e expressão do vector de expressão preferido da IL-4 e da proteína mutante de IL-4.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Ensaio da estabilidade do plasmídeo

Os ensaios de estabilidade do plasmídeo foram iniciados sempre com uma cultura congelada em azoto líquido. Determinou-se a OD₆₀₀ da cultura descongelada, diluiu-se a cultura até 10⁻⁴ em tampão de PBS e aplicou-se em placas de agar LB sem antibiótico.

Inoculou-se 1 ml da cultura descongelada em 100 ml de meio de peptona (30 g de peptona de soja, 20 g de extracto de levedura, 5 g de KH₂PO₄, 20 g de Glicerol, 1 g de MgSO₄ × 7H₂O por litro, pH 7,0) e incubou-se a 37 °C a 280 rpm durante 24 horas.

Determinou-se a OD₆₀₀ da cultura multiplicada, diluiu-se a cultura até 10⁻⁶ em tampão de PBS e colocou-se em placas de agar LB sem antibiótico para se obter colónias bem isoladas.

Inoculou-se 100 µl da cultura multiplicada em 100 ml de meio de peptona e incubou-se a 37 °C a 280 rpm durante 24 horas. Repetiu-se este procedimento oito vezes.

Aplicou-se 100 colónias bem separadas das placas LB nas quadrículas de placas LB com canamicina (25 µg/ml) e placas LB sem canamicina e incubou-se a 37 °C dum dia para o outro. Determinou-se todos os dias a percentagem de colónias resistentes.

O número de gerações por dia foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $\log[OD_{600} \text{ FINAL}/OD_{600} \text{ INICIAL}]/\log 2$.

Para os estudos de expressão diluiu-se 100 vezes 1 ml de uma cultura multiplicada para meio LB e manuseou-se como se descreve (ver Exemplo 2).

Exemplo 2

Expressão

Para a expressão em pequena escala de interleucina-4 e proteínas mutantes de interleucina-4, multiplicou-se as células em meio LB (10 g de triptona de Bacto, 5 g de extracto de levedura, 10 g de NaCl por litro, pH 7,5) até a OD_{600} atingir 0,8-1,0. A expressão foi induzida pela adição de IPTG até uma concentração final de 0,5 mM e prosseguiu-se a incubação durante 5 horas. As células foram colhidas por centrifugação.

Para análise por SDS-PAGE, ressuspendeu-se sedimentos de células em tampão de carga para SDS-PAGE até uma concentração de 1 unidade de $OD_{600}/100 \mu\text{l}$.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Bayer AG

<120> PLASMÍDEOS, SUA CONSTRUÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NA PREPARAÇÃO DE INTERLEUCINA-4 E DE PROTEÍNAS MUTANTES DE INTERLEUCINA-4

<130> Plasmídeos para proteínas mutantes de IL-4

<140>

<141>

<160> 2

<170> Patentin Ver. 2

<210> 1

<211> 60

<212> ADN

<213> Desconhecida

<220>

<223> Descrição do Organismo Desconhecido: iniciador

<400> 1

tcaattgtga ggggataaca attcacaca tctagaaata atttgitta actttaagaa 60

<210> 2

<211> 4202

<212> ADN

<213> Desconhecida

<220>

<223> Descrição do Organismo Desconhecido: Humano

<400> 2

```

ttagaaaaac tcacgcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagtgag aaatcaccat gagtgcgcac 240
tgaatccggt gagaatggca aaagcctatg catttctttc cagacttggt caacaggcca 300
gccattaagc tcgcatcaa aatcaactgc atcaacccaa ccgttattca ttcgtgattg 360
cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgtt gttaaaaagg caattacaaa caggaatcga 420
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata 480
ttcttctaatacctggaatgctgtttcccggggatcgcatgggtgagtaaccatgcatc540
atcaggagta cggataaaaatgcttgatggctcggaagaggcataaattccgtcagccagtt600
tagtctgacc atctcatctgtaacatcattggcaacgcta cctttgccatgtttcagaaa660
caactctggc gcatcgggct tccatacaa togatagattgtgcacctgattgcccgac720
attatcgca gccatttat accatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcg780
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gtcataaca ccccttgat tactgtttat840
gtaagcagac agttttattg ttcatgacca aaatccctta acgtgagttt tctgtccact900
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg960
taatctgctg cttgcaaaaa aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc1020
aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccataa1080
ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta1140
catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtctgttc1200
ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg1260
ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacctc caccgaactg agatacctac1320
agcgtgagct atgagaaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg1380
taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgc caagggagct tccaggggga aacgcctggt1440

```

```

atctttatag tctctgctggg ttctgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct 1500
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 1560
ccttttgctg gccttttgct cacatggtct ttctgcggtt atcccctgat tctgtggata 1620
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgcgc cagccgaacg accgagcgca 1680
gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcctc 1740
tgtgcggtat ttcacaccgc aatgggtcac tctcagtaca atctgctctg atgcgcgata 1800
gttaagccag tatacactcc gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac 1860
ccgccaaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcctc cgtttacaga 1920
caagctgtga ccgctctccg gagctgcctg tgtcagaggt ttccaccgct atcaccgaaa 1980
cgcgcgagggc agctgcggta aagctcatca gcgtggctgt gaagcgattc acagatgtct 2040
gcctgttoat ccgcgtccag ctctgtgagt ttctccagaa gcgttaatgt ctggcttctg 2100
ataaagcggg ccatgttaag ggcggttttt tctgtttgg tcaactgatgc ctccgtgtaa 2160
gggggatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat gctcacgata 2220
cgggttactg atgatgaaca tgcccgggta ctggaacggt gtgagggtaa acaactggcg 2280
gtatggatgc ggccgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg ctcatgagcc 2340
cgaagtggcg agcccgatct tcccctcgg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg 2400
cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc gagatccatt 2460
tacgttgaca ccatcgaatg gtgcaaaacc ttctcgggta tggcatgata gcgcccgaa 2520
gagagtcaat tcagggtggg gaatgtgaaa ccagtaacgt talacgatgt cgcagagtat 2580
gccggtgtct cttatcagac cgtttcccgc gtgggtaacc aggccagcca cgtttctgcg 2640
aaaaacgccc aaaaagtgga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg 2700

gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc 2760
ctgcacgcgc cgtcgcgcaat tctcgcggcg attaaatctc gcgcgatca actgggtgcc 2820
agcgtgggtg tctcgtatgg agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac 2880
aatcttctcg ccgaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat 2940
gccattgctg tggaaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac 3000
cagacacca tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtaacgcact gggcgtggag 3060
catctggtcg cattygggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggccctt aagtctctgc 3120
tcggcgcgct tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg 3180
atagcggaac gggaaaggca ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaac catgcaaatg 3240
ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcgatg ctgggtgcca acgatcagat ggcgctgggc 3300
gcaatgcgcy ccattaccga gtcgggctg cgcgttggty cggatatctc ggtagtggga 3360
tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat atccgcctgt taaccacct caaacaggat 3420
ttctgcctgc tggggcaaac cagcgtggac cgttctctca aactctctca gggccaggcg 3480
gtgaagggca atcagctggt gccctctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggctcga 3540
gaaatcataa aaaatttatt tgctttgtga gcggataaca attataatag attcaattgt 3600
gagcggataa caatttcaca catctagaaa taattttatt taactttaag aaggagatat 3660
acatatgcac aatgogata tcaccctgca ggaaatcctc aaaaccctga attctctgac 3720
cgaacagaaa accctgtgca ccgaactgac cgttaccgac atcttctgct cttcgaaaaa 3780
caccaccgaa aaagaaacct tetgcccgtg tgetaccgtt ctgcgtcagt tctactctca 3840
ccacgaaaaa gacacccggt gcctgggtgc taccgetcag cagttccacc gtcacaaaca 3900
gctgatccgt ttctgaaac gtctggaccg taacctgtgg ggtctggctg gtctgaacag 3960
ctgcccgggt aaagaagcta accagtctac cctggaaaac ttctggaac gtctgaaaac 4020
catcatggac gaaaaagact ctaaagtctc ttcttaataa ggatccggct gctaacaaag 4080
cccgaagga agctgagttg gctgctgcca ccgctgagca ataactagca taacccttg 4140
gggcctctaa accgggtctt aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccggataat 4200
tc

```

REIVINDICAÇÕES

1. Vector para a preparação de IL-4 e proteínas mutantes de IL-4 numa estirpe de Escherichia coli, compreendendo na ordem de 5' para 3' os seguintes elementos ligados de uma maneira eficaz: um promotor regulável constituído pelo promotor T5 do fago de E. coli e duas sequências operadoras lac, um sítio de ligação de ribossoma do fago de E. coli T7 g10, um codão de início de tradução, um gene estrutural para a IL-4 ou para uma proteína mutante de IL-4 e a jusante desse gene estrutural um finalizador de transcrição.
2. Construção de ADN a qual compreende a sequência de ADN mostrada na Seq. ID. N° 2.
3. Escherichia coli transformada com o vector da reivindicação 1 ou com a construção de ADN da reivindicação 2.
4. Utilização do vector de acordo com a reivindicação 1 ou da construção de ADN de acordo com a reivindicação 2 num método de preparação de IL-4 e de proteínas mutantes de IL-4.

Lisboa, 15 de Setembro de 2006

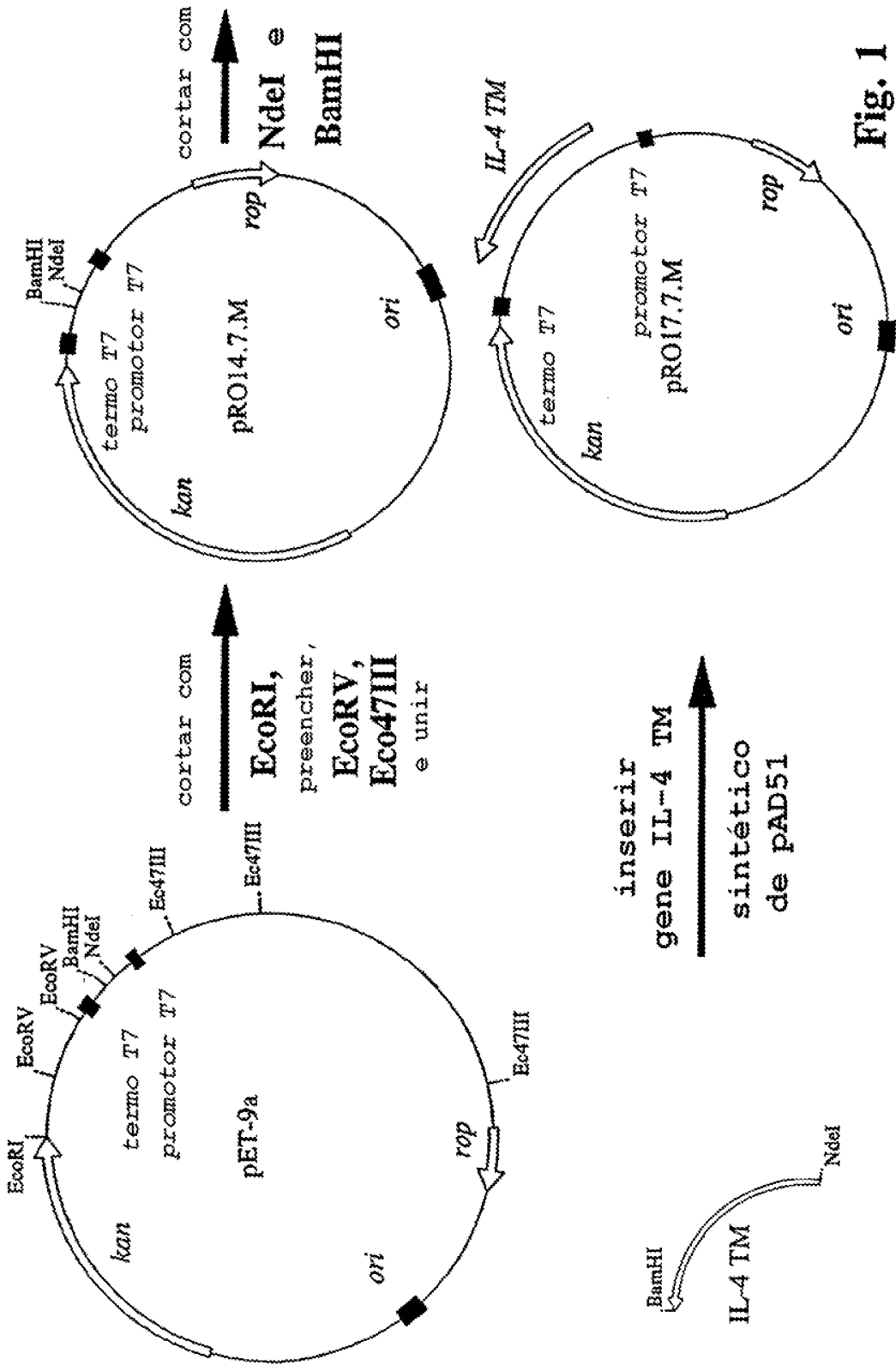


Fig. 1

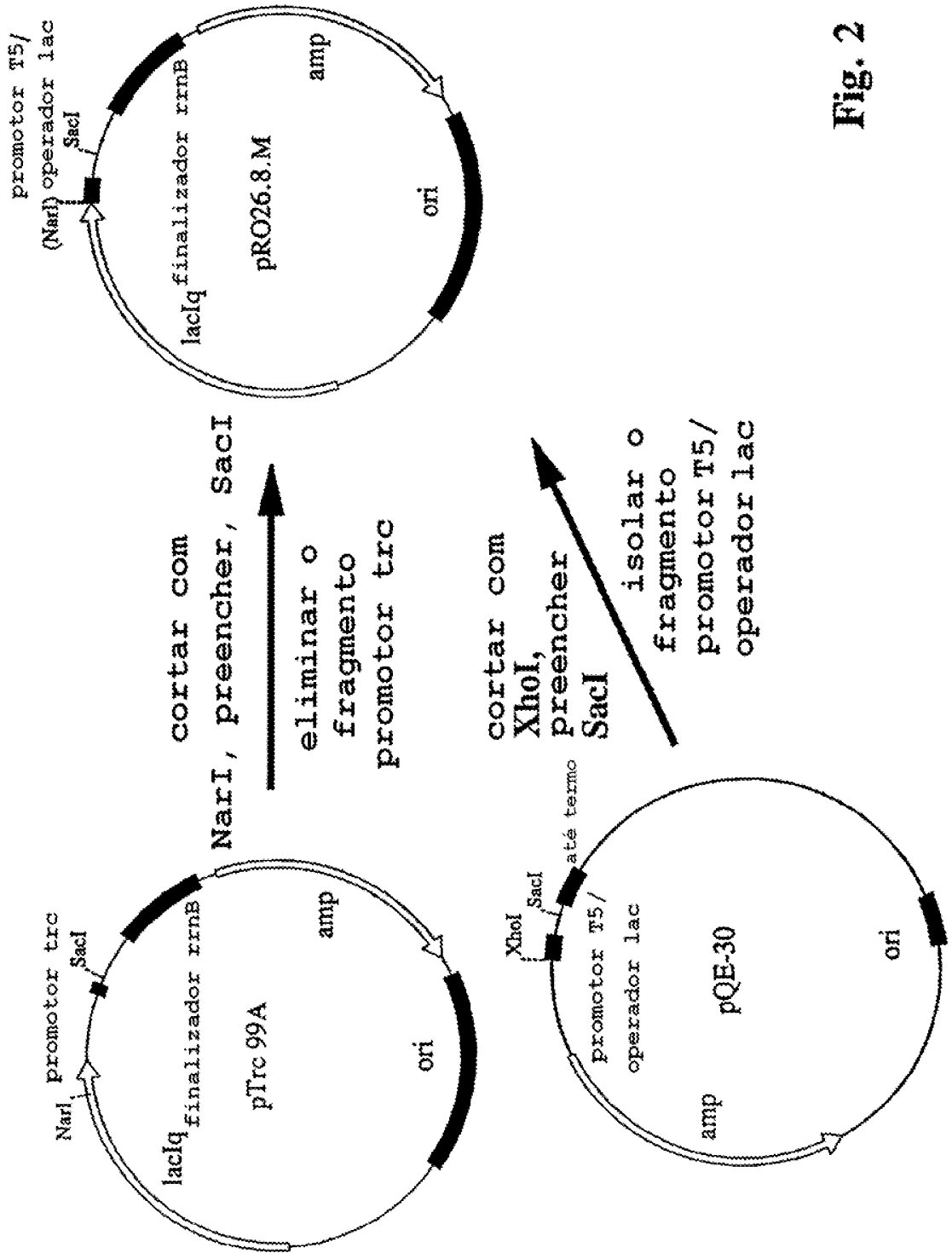


Fig. 2

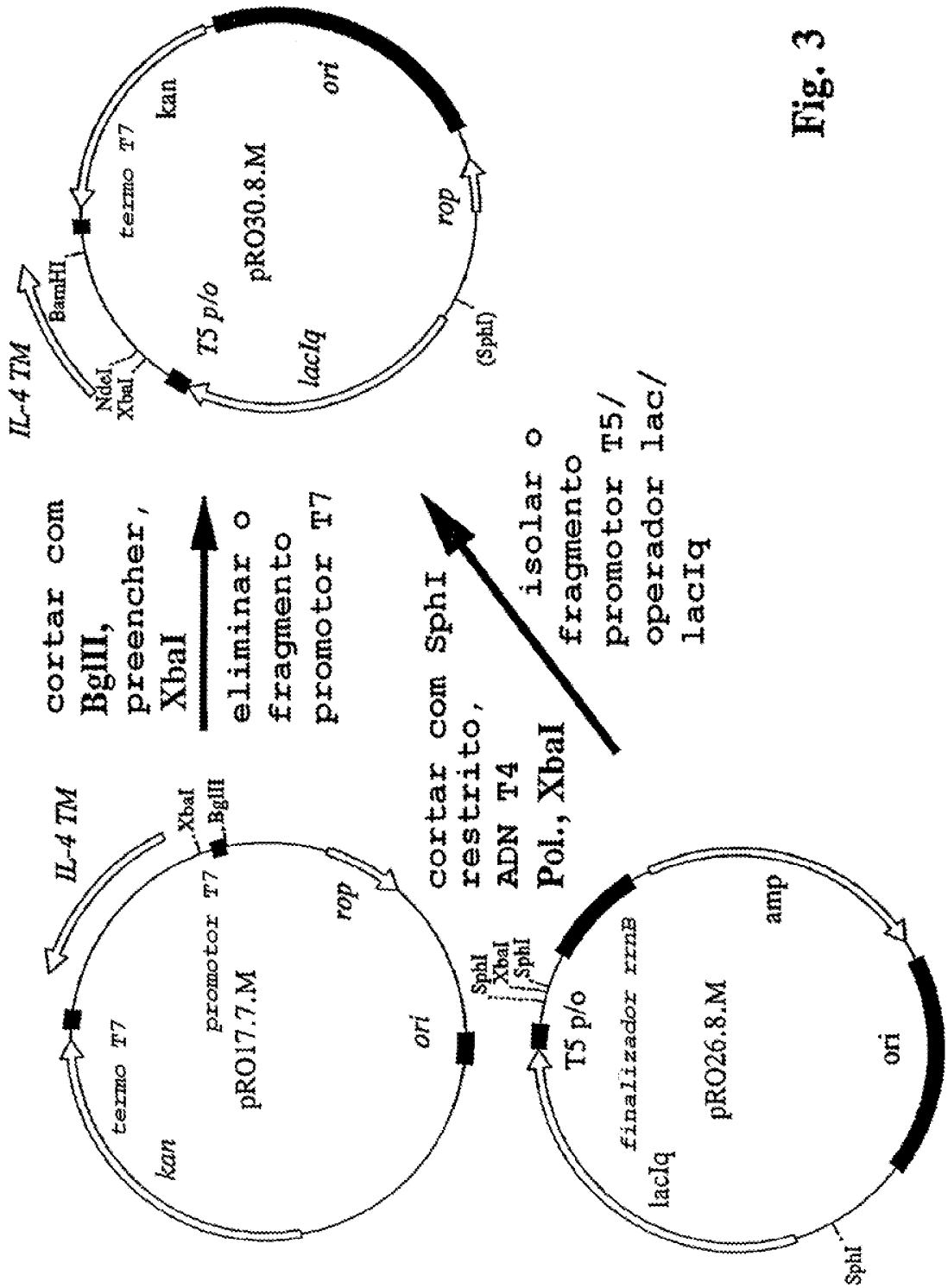


Fig. 3

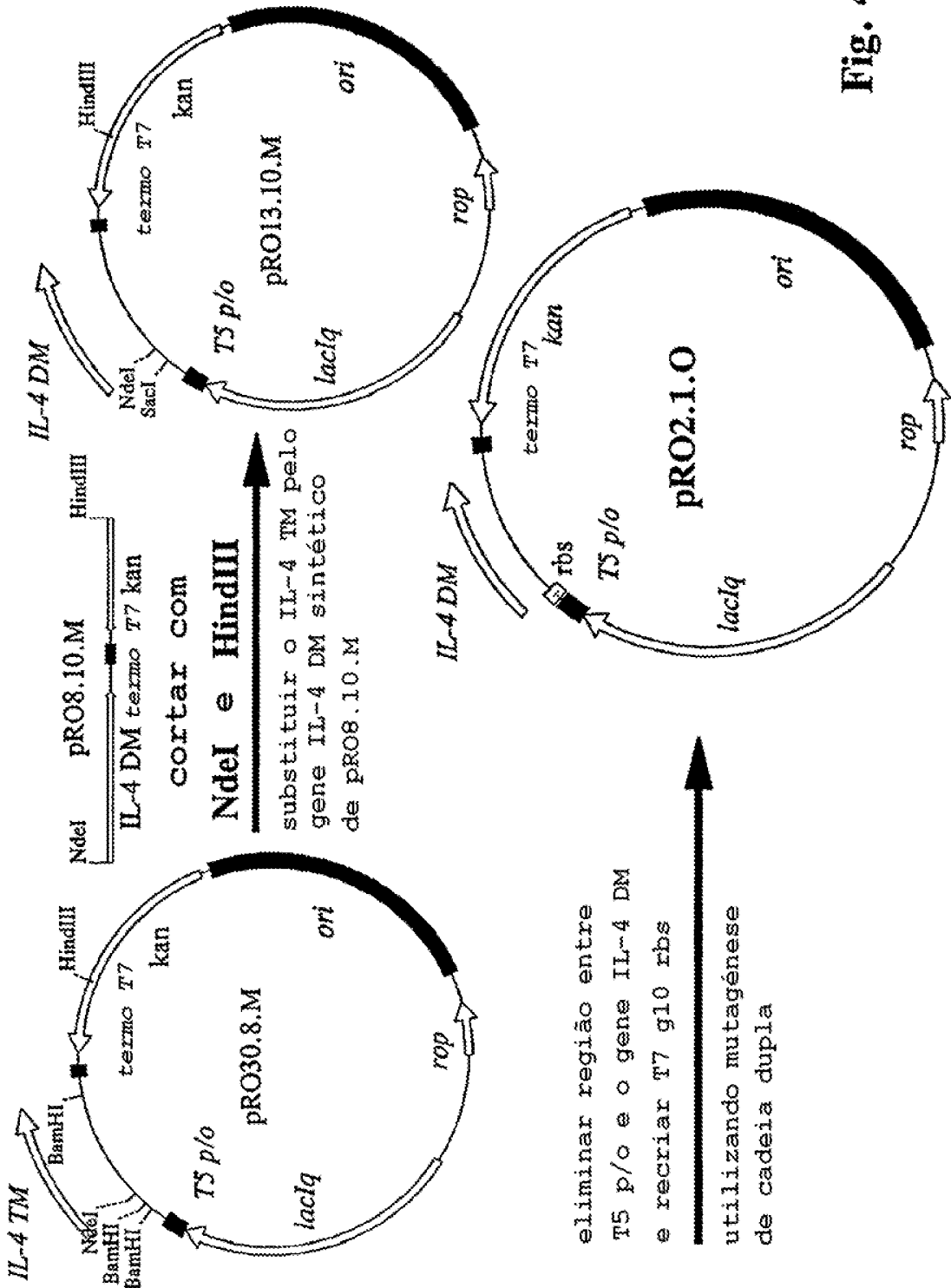
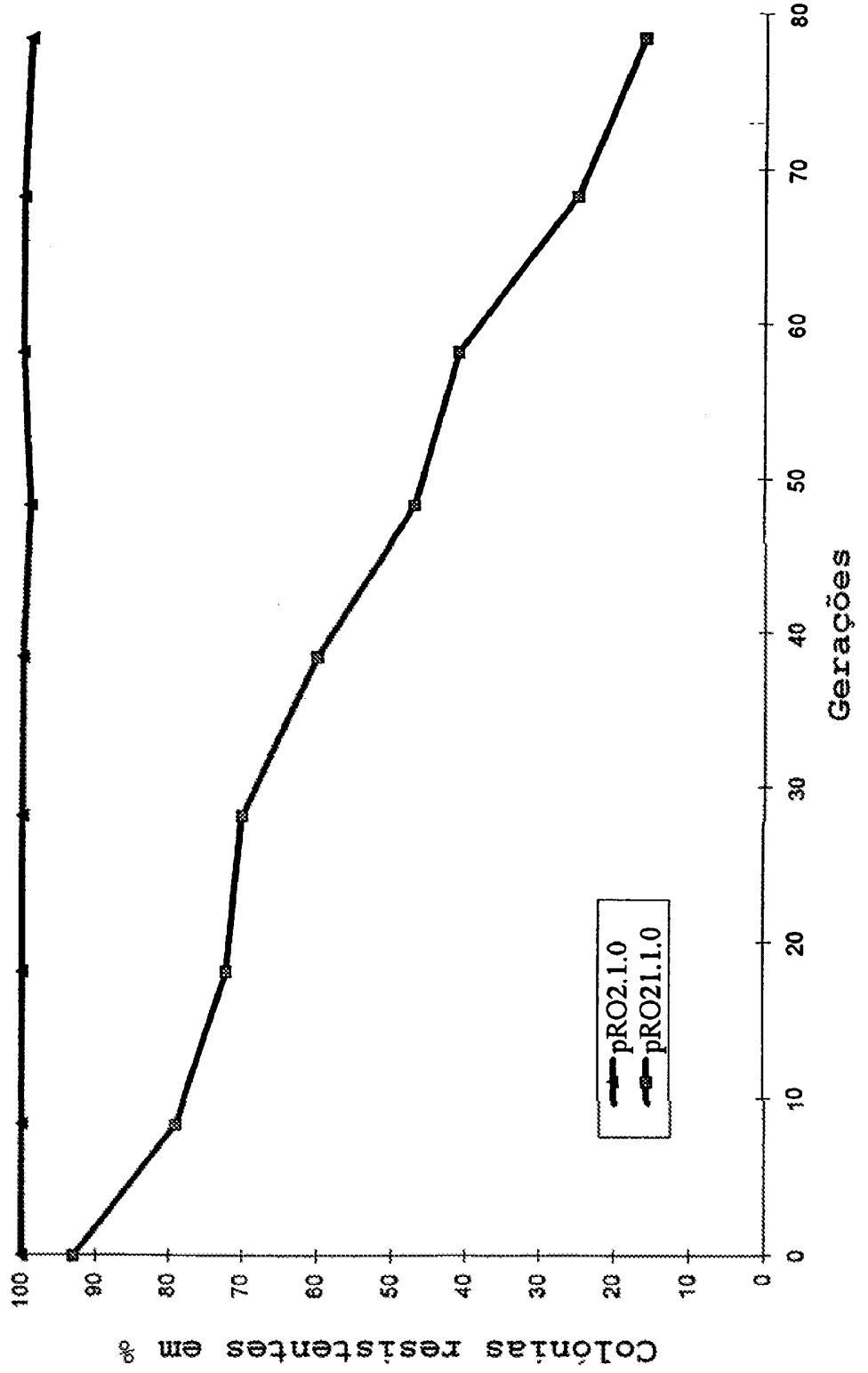


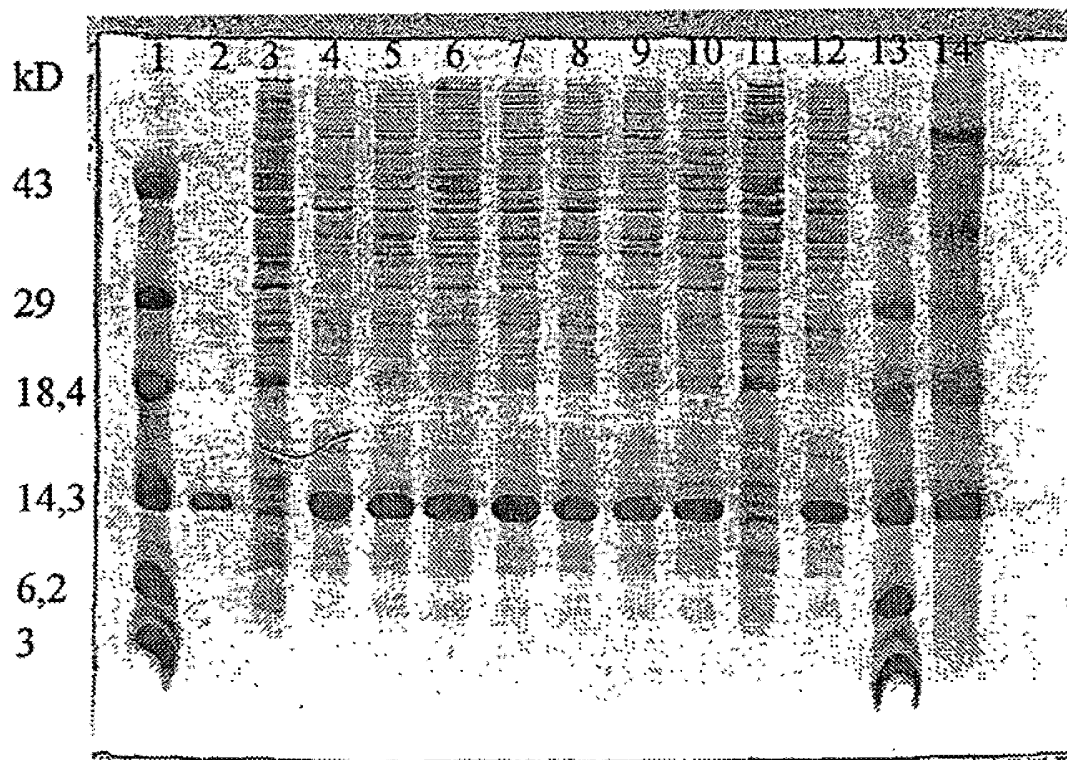
Fig. 4

5/6

Fig. 5



6/6



Análise por SDS-PAGE (15%) de extractos totais de *E. coli*/pR02.1.0 multiplicadas durante números diferentes de gerações sem selecção com antibiótico após 5 horas de indução com IPTG 0,5 mM. Aplicou-se 10 µl de sedimentos celulares ressuspensos em cada coluna. O gel foi efectuado em condições redutoras e revelados com azul brilhante de Coomassie.

- Coluna 1: Marcador de peso molecular (Gama baixa, Life Technologies)
 Coluna 2: Proteína mutante de IL-4 (5 µg)
 Coluna 3: *E. coli*/pR02.1.0 (8 gerações) antes da indução
 Coluna 4: *E. coli*/pR02.1.0 (8 gerações) após indução
 Coluna 5: *E. coli*/pR02.1.0 (18 gerações) após indução
 Coluna 6: *E. coli*/pR02.1.0 (28 gerações) após indução
 Coluna 7: *E. coli*/pR02.1.0 (38 gerações) após indução
 Coluna 8: *E. coli*/pR02.1.0 (48 gerações) após indução
 Coluna 9: *E. coli*/pR02.1.0 (58 gerações) após indução
 Coluna 10: *E. coli*/pR02.1.0 (68 gerações) após indução
 Coluna 11: *E. coli*/pR02.1.0 (78 gerações) antes da indução
 Coluna 12: *E. coli*/pR02.1.0 (78 gerações) após indução
 Coluna 13: Marcador de peso molecular (Gama baixa, Life Technologies)
 Coluna 14: Marcador de peso molecular (Gama alta, Life Technologies)