

(11) *Número de Publicação:* **PT 101697 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 7)
C07K014/47 A C12N015/85 B

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

(22) <i>Data de depósito:</i> 1995.05.04	(73) <i>Titular(es):</i> TADATSUGU TANIGUCHI NIHOGAOKA 19 A-207 IBARAKI-SHI, OSAKA 567 JP
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.08.24 EP 88113793 1988.11.24 EP 88119602	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.12.29	(72) <i>Inventor(es):</i> TAKASHI FUJIWARA JP
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 04/99 1999.04.21	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM FACTOR DE REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO GENÉTICA

(57) *Resumo:*

FACTOR DE; REGULAÇÃO; EXPRESSÃO; GENÉTICA; ADN





INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI
TELEFAX: 87 53 08

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11)	T.D.	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
PT 101 697		4 de Maio de 1995	

Requerente (71):

Dr. Tadatsugu Taniguchi, Japonês, biólogo molecular, residente em Nihogaoka 19 A-207, Ibaraki-shi, Osaka 567, Japão

Inventores (72):

Dr. Tadatsugu Taniguchi e Dr. Takashi Fujita, residentes na Japão

Reivindicação de prioridade(s) (30)

Data do pedido	Pais de Origem	N.º de pedido
24.08.1988	EP	88113793.9
24.11.1988	EP	88119602.6

Figura (para interpretação do resumo)

Epigrafe: (54)

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM
FACTOR DE REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO
GENÉTICA"

Resumo: (máx. 150 palavras) (57)

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma molécula de ADN recombinante que contém a seguinte sequência nucleotídica

Fórmula IIIa

```
      10      20      30      40
ATGCCGGTGGAAACGGATGCGAATGCGCCCGTGGCTGGAGGAGCAG
      50      60      70      80      90
ATAAATTCCAATACGATACCAGGGCTAAAGTGGCTGAACAAGGAG
      100     110     120     130
AAGAAGATTTTCCAGATCCCCTGGATGCATGCGGCTCGGCACGGA
      140     150     160     170     180
TGGGACGTGGAAAAGGATGCTCCGCTCTTCAGAAACTGGGCGATC
      190     200     210     220
CATACAGGAAAGCATCAACCAGGAATAGATAAACCAGATCCAAAA
      230     240     250     260     270
ACATGGAAAGCAAATTTTCGATGTGCCATGAATTCCCTGCCCGAC
      280     290     300     310
ATTGAGGAAGTGAAGGACAGAAGCATAAAGAAAGGAAACAACGCC
```

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PATENTES

CAMPO DAS CEBOLAS, 1100 LISBOA
TEL.: 888 51 51 / 2 / 3 TELEX: 18356 INPI
TELEFAX: 87 53 08

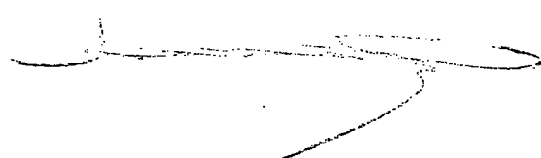
FOLHA DO RESUMO (Continuação)

Modalidade e n.º (11)	T. D.	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
PT 101 697			

Resumo (continuação) (57)

320 330 340 350 360
TTCAGAGTCTACCGGATGCTGCCCTTATCCGAACGACCTTCCAAG
370 380 390 400
AAAGGAAAGAAACCAAGACAGAAAAAGAAGAGAGAGTTAAGCAC
410 420 430 440 450
ATCAAGCAAGAACCAGTTGAGTCATCTTTGGGGCTTAGTAATGGA
460 470 480 490
GTAAGTGGCTTTTCTCCTGAGTATGCGGTCCTGACTTCAGCTATA
500 510 520 530 540
AAAAATGAAGTGGATAGTACGGTGAACATCATAGTTGTAGGACAG
550 560 570 580
TCCCATCTGGACAGCAACATTGAAGATCAAGAGATCGTCACTAAC
590 600 610 620 630
CCGCCAGACATCTGCCAGGTTGTAGAAGTGACCACTGAGAGTGAT
640 650 660 670
GACCAGCCAGTCAGCATGAGTGAGCTCTACCCTCTACAGATTTCT
680 690 700 710 720
CCTGTGTCTTCTACGCAGAAAGCGAAACTACCGACAGTGTGGCC
730 740 750 760
AGTGATGAAGAGAACGCAGAGGGGAGACCACACTGGAGGAAGAGG
770 780 790 800 810
AGCATCGAAGGCAAGCAGTACCTCAGCAACATGGGGACACGGAAC
820 830 840 850
ACCTATCTGCTGCCCAGCATGGCGACCTTTGTACCTCCAACAAG
860 870 880 890 900
CCAGATCTGCAGGTCACCATCAAAGAGGATAGCTGTCCGATGCCT
910 920 930 940
TACAACAGCTCCTGGCCCCCATTACAGACCTTCCCCTTCCTGCC
950 960 970 980 990
CCAGTGACCCCCACGCCCAGCAGCAGTCGGCCAGACCGGGAGACC
1000 1010 1020 1030
CGGGCCAGTGTATCAAGAAGACATCTGATATCACCCAGGCCCGT
1040
GTCAAGAGCTGT

ou um fragmento, ou uma variante degenerada da molécula ou do fragmento, que codifica para uma proteína que se liga à sequência oligomérica repetida AAGTGA e aos elementos de regulação a montante do gene de IRF- β humano, que compreende isolar-se sequências de ADN que codificam para uma proteína com as propriedades referidas a partir de uma origem eucariótica, como por exemplo de origem humana ou com origem em ratos, galinhas, rãs ou em leveduras, e se seleccionar por hibridação cruzada um clone positivo.

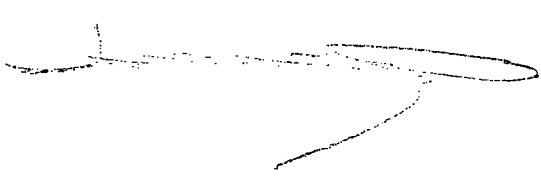


DESCRIÇÃO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM FACTOR DE REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO GENÉTICA"

A transcrição de genes em células de mamíferos é regulada por mecanismos complexos nos quais as interacções das sequências de ADN de regulação com proteínas de ligação de ADN de acção trans desempenham um papel principal. No contexto da regulação de transcrição, os genes que codificam para os interferões (IFNs) apresentam um aspecto comum a muitos genes de citoquinas; a transcrição destes genes é induzida transitoriamente seguindo diversos sinais extracelulares. Encontra-se bem documentado o facto de que a transcrição dos genes para IFN- α e IFN- β é induzida de forma eficiente por vírus em várias células, enquanto que a do gene que codifica para IFN- γ é induzido em linfócitos T (células T) a seguir a estimulação mitogénica (para uma revisão ver Weissmann e Weber, 1986; Taniguchi, 1988).

O IFN- β , uma citoquina que foi originalmente identificada pela sua potente actividade antiviral, parece também desempenhar um papel crucial na regulação do crescimento das células e na diferenciação. Neste aspecto, para além de vírus e de poli(rT):poli(rC) que são indutores bem conhecidos do gene do IFN- β , muitas citoquinas, tais como o factor 1 de estimulação de colónias (CSF-1) (Moore et al., 1984; Warren e Ralf, 1986; Resnitzky et al., 1986), o factor de necrose de tumores (TNF) (Onozaki et al., 1988), o factor de crescimento



derivado de plaquetas (PDGF) (Zullo et al., 1985) e IFNs (Kohase et al., 1987) parecem também induzir o IFN- β em certas células, sugerindo que podem transduzir sinais semelhantes ou idênticos nas células visadas.

Demonstrou-se que a indução do gene do IFN- β por vírus e por poli(rI):poli(rC) ocorre ao nível da transcrição (Raji e Pitha, 1983; Ohno e Taniguchi, 1983; Dinter et al., 1983; Zinn et al., 1983). Deste modo as sequências de ADN que actuam em cis funcionando como intensificadores indutíveis foram identificadas dentro da região 5' de flanco do gene de IFN- β humano (Fujita et al., 1985, 1987; Goobourn et al., 1985; Dinter e Hauser, 1987). A região intensificadora indutível (isto é, -65 a -105 com respeito ao local de remate "CAP") contém unidades hexanucleotídicas repetitivas; (AAGTGA)₄. Os requerentes descobriram que o IRF-1 desempenha um papel essencial na activação induzida por vírus da transcrição do gene de IFN- β por interacção com os elementos cis identificados.

No pedido de Patente Europeia original N°. 8911518.1, publicado sob o n°. 0359998, os requerentes descreveram determinadas moléculas de ADN recombinante que codificam para proteína que possuem a actividade de um factor I de regulação de interferão (IRF-I).

A presente invenção proporciona uma molécula de ADN recombinante descrita pela fórmula IIIa abaixo indicada:

Fórmula IIIa

```

          10          20          30          40
ATGCCGGTGGAACGGATGCGAATGCGCCCGTGGCTGGAGGAGCAG
          50          60          70          80          90
ATAAATTCCAATACGATACCAGGGCTAAAGTGGCTGAACAAGGAG
```

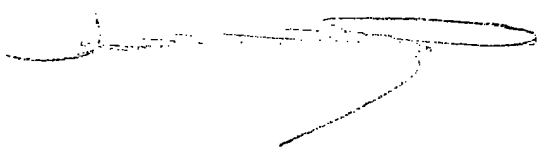


100 110 120 130
 AAGAAGATTTTCCAGATCCCCTGGATGCATGCGGCTCGGCACGGA
 140 150 160 170 180
 TGGGACGTGGAAAAGGATGCTCCGCTCTTCAGAACTGGGCGATC
 190 200 210 220
 CATACAGGAAAGCATCAACCAGGAATAGATAAACCAGATCCAAAA
 230 240 250 260 270
 ACATGGAAAGCAAATTTTCGATGTGCCATGAATTCCTGCCCGAC
 280 290 300 310
 ATTGAGGAAGTGAAGGACAGAAGCATAAAGAAAGGAAACAACGCC
 320 330 340 350 360
 TTCAGAGTCTACCGGATGCTGCCCTTATCCGAACGACCTTCCAAG
 370 380 390 400
 AAAGGAAAGAAACCAAAGACAGAAAAAGAAGAGAGAGTTAAGCAC
 410 420 430 440 450
 ATCAAGCAAGAACCAGTTGAGTCATCTTTGGGGCTTAGTAATGGA
 460 470 480 490
 GTAAGTGGCTTTTCTCCTGAGTATGCGGTCCTGACTTCAGCTATA
 500 510 520 530 540
 AAAAATGAAGTGGATAGTACGGTGAACATCATAGTTGTAGGACAG
 550 560 570 580
 TCCCATCTGGACAGCAACATTGAAGATCAAGAGATCGTCACTAAC
 590 600 610 620 630
 CCGCCAGACATCTGCCAGGTTGTAGAAGTGACCACTGAGAGTGAT
 640 650 660 670
 GACCAGCCAGTCAGCATGAGTGAGCTCTACCCTCTACAGATTTCT
 680 690 700 710 720
 CCTGTGTCTTCCTACGCAGAAAGCGAAACTACCGACAGTGTGGCC
 730 740 750 760
 AGTGATGAAGAGAACGCAGAGGGGAGACCACACTGGAGGAAGAGG
 770 780 790 800 810
 AGCATCGAAGGCAAGCAGTACCTCAGCAACATGGGGACACGGAAC
 820 830 840 850
 ACCTATCTGCTGCCAGCATGGCGACCTTTGTCACCTCCAACAAG

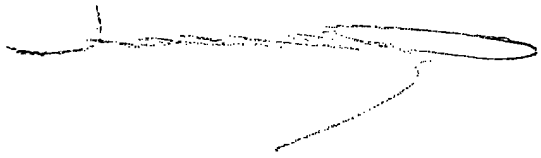


()

10 20 30 40
 ATGCCGGTGGAAACGGATGCGAATGCGCCCGTGGCTGGAGGAGCAG
 50 60 70 80 90
 ATAAATTCCAATACGATACCAGGGCTAAAGTGGCTGAACAAGGAG
 100 110 120 130
 AAGAAGATTTTCCAGATCCCCTGGATGCATGCGGCTCGGCACGGA
 140 150 160 170 180
 TGGGACGTGGAAAAGGATGCTCCGCTCTTCAGAAACTGGGCGATC



190 200 210 220
 CATACAGGAAAGCATCAACCAGGAATAGATAAACCAGATCCAAA
 230 240 250 260 270
 ACATGGAAAGCAAATTTTCGATGTGCCATGAATTCCCTGCCCCGAC
 280 290 300 310
 ATTGAGGAAGTGAAGGACAGAAGCATAAAGAAAGGAAACAACGCC
 320 330 340 350 360
 TTCAGAGTCTACCGGATGCTGCCCTTATCCGAACGACCTTCCAAG
 370 380 390 400
 AAAGGAAAGAAACCAAAGACAGAAAAAGAAGAGAGAGTTAAGCAC
 410 420 430 440 450
 ATCAAGCAAGAACCAGTTGAGTCATCTTTGGGGCTTAGTAATGGA
 460 470 480 490
 GTAAGTGGCTTTTCTCCTGAGTATGCGGTCCTGACTTCAGCTATA
 500 510 520 530 540
 AAAAATGAAGTGGATAGTACGGTGAACATCATAGTTGTAGGACAG
 550 560 570 580
 TCCCATCTGGACAGCAACATTGAAGATCAAGAGATCGTCACTAAC
 590 600 610 620 630
 CCGCCAGACATCTGCCAGGTTGTAGAAGTGACCACTGAGAGTGAT
 640 650 660 670
 GACCAGCCAGTCAGCATGAGTGAGCTCTACCCTCTACAGATTTCT
 680 690 700 710 720
 CCTGTGTCTTCTACGCAGAAAGCGAAACTACCGACAGTGTGGCC
 730 740 750 760
 AGTGATGAAGAGAACGCAGAGGGGAGACCACACTGGAGGAAGAGG
 770 780 790 800 810
 AGCATCGAAGGCAAGCAGTACCTCAGCAACATGGGGACACGGAAC
 820 830 840 850
 ACCTATCTGCTGCCCAGCATGGCGACCTTTGTACCTCCAACAAG
 860 870 880 890 900
 CCAGATCTGCAGGTCACCATCAAAGACCATAGCTGTCCGATGCCT
 910 920 930 940
 TACAACAGCTCCTGGCCCCCATTTACAGACCTTCCCCTTCTGCC



950 960 970 980 990
CCAGTGACCCCCACGCCAGCAGCAGTCGGCCAGACCGGGAGACC

1000 1010 1020 1030
CGGGCCAGTGTTCATCAAGAAGACATCTGATATCACCCAGGCCCGT

1040
GTCAAGAGCTGTTAAGCCTTTGACTCTCCCTGGTGGTTGTTGGGA
TTTCTTAGCTTTGTGTTGTTCTTTGTTTGTATTATATTATTTTTT
TTCTCTATGATACCTATCTTAGACACATCTAAGGGAGAAAGCCTT
GACGATAGATTATTGATTGCTGTGTCCAACCTCCAGAGCTGGAGCT
TCTTCTTAACTCAGGACTCCAGCCCCCCCCCCCCCTCGGTAGATG
CGTATCTCTAGAACCTGCTGGATCTGCCAGGGCTACTCCCTCAAG
TTCAAGGACCAACAGCCACACGGGCAGTGGACCTGCTGCGTTGCC
TACGGTCAAGGCCAGCATGGTGGAGTGGATGCCTCAGAACGGAGG
AGAAAATGTGAACTAGCTGGAATTTTTTTATTCTTGTGAATATGT
ACATAGGGCAGTACGAGCAATGTCGCGGGCTGCTTCTGCACCTTA
TCTTGAAGCACTTACAATAGGCCTTCTTGTAATCTTGCTCTCCTT
CACAGCACACTCGGCGACCCCTTCTGTGTCCACTACCCCACTACC
CACCCCTCCCTCCTCAACCCCTCCATCCCGGTCTCTATGCGCCC
CTTCCCCCAACCAATCCCATCACAACTCTTACCTATCCTTTCC
CTCCCAACCCCTTCTATCCCAGCCCACCACCTACCCCACTCCTCC
CCAACCTCCTCCATTCTAGCCCATTACCCACGCCTCTCTCCTCAGC
CCAGCCTACCCCATCCCACCCTGTTCCCTTTCCTCCAGTTTCCTCT
CCTCAAAGGCAAGGCTCTACATCTTGGAGGAGGAGGAGGAGAAGA
AAATGAGTTTCTTCACCGCTGTCCCATTTTAAGACTGCTTGAATA
ATAAAAAAAAAATCTTTCTAATCTGCTATGCTTGAATGGCACGCGG
TACAAAGGAAAACCTGTCATGGAAATATTATGCAAATCCCAGATC
TGAAGACGGAAAATACTCTAATTCTAACCAGAGCAAGCTTTTTTA
TTTTTTTATACAAGGGGAATATTTTATTCAAGGTAAAAAATTCT

AAATAAAATATAATTGTTTTTATCTTTTCTACAGCAAATTTATA
 ATTTTAAGATTCCTTTTCTGTTTCATCAGCAGTTGTTATTACATC
 CCTTGTTGGCACATTTTTTTTTTTAATTTTGTAAGGTGAAAAAAAAA
 ACTTTTATGAGCTCATGTAGCAATCAAATTATCCTGTGGATTGAT
 AATAAATGAATATGGTATATAGTTAAAGATTTTAAAAAAAAAAAAA

ou um fragmento, ou uma variante degenerada da molécula ou do fragmento.

A molécula de ADN da presente invenção é de preferência uma molécula que codifica para uma proteína que se liga à sequência oligomérica repetida AAGTGA e aos elementos de regulação a jusante do gene do IFN- β humano.

A molécula de ADN pode incluir uma região promotora a qual é constituída ou indutível, por exemplo indutível por vírus, por exemplo por vírus da doença de Newcastle, ou é indutível por estimulação mitogénica, por exemplo utilizando Concanavalina A.

A molécula de ADN recombinante da presente invenção pode também conter uma sequência promotora e de regulação contida na fórmula V que se apresenta seguidamente:

Fórmula V

PstI
 CTGCAGAAAGAGGGGGACGGTCTCGGCTTTCCAAGACAGGCAAGGGGG
 -299

GC Box 1 GC Box 2
 CAGGGGAGTGGAGTGGAGCAAGGGGCGGCCCCGCGGTAGCCCCGGGGCGGTGGCGCGG
 -251

GCCCCAGGGGGTGGGGAGCACAGCTGCCTTGTACTTCCCCTTCGCCGCTTAGCTCTAC
 -193

CAAT Box

AACAGCCTGATTTCCTCCGAAATGATGAGGCCGAGTGGCCAATGGGCGCGCAGGAGCG
-135

Minor Cap site

GCGCGGCGGGGGCGTGGCCGAGTCCGGGCCGGGAATCCCGCTAAGTGTTCAGATTTC
-77 -21

Major Cap site

TTCGCGGCGCCGCGGACTCGCCAGTGCGCACCACTCCTTCGTGAGGTAGGACGTGCT
-19 +1

TTCACAGTCTAAGCCGAACCGAACCGAACCGAACCGAACCGAACCGGGCCGAGTTGCS
+39

CCGAGGTCAGCCGAGGTGGCCAGAGGACCCAGCATCTCGGGCATCTTCGCTTCGTG
+97

CGCGCATCGCGTACCTACACCGCAACTCCGTGCCTCGCTCTCCGGCACCTCTGCGAA
+155

PstI
TCGCTCCTGCAG
+213 +225

ou uma sua variante degenerada.

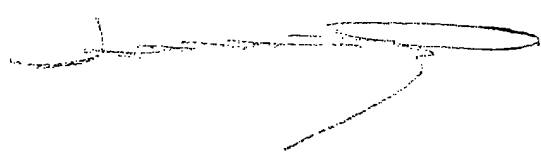
A presente invenção compreende também uma célula hospedeira, por exemplo uma célula bacteriana, por exemplo E. coli, ou uma célula de levedura ou uma célula de mamífero, por exemplo uma célula CHO, ou uma célula de rato, por exemplo L929, transformada por uma molécula de ADN recombinante tal como definida acima.

A proteína que é codificada pela sequência de ADN da fórmula IIIa apresenta a fórmula VIII.

Fórmula VIII

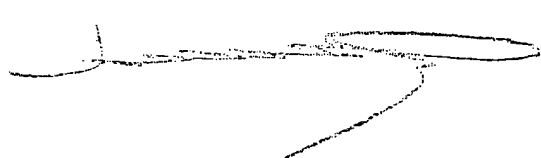
MetProValGluArgMetArgMetArgProTrpLeuGluGluGln

IleAsnSerAsnThrIleProGlyLeuLysTrpLeuAsnLysGlu



LysLysIlePheGlnIleProTrpMetHisAlaAlaArgHisGly
TrpAspValGluLysAspAlaProLeuPheArgAsnTrpAlaIle
HisThrGlyLysHisGlnProGlyIleAspLysProAspProLys
ThrTrpLysAlaAsnPheArgCysAlaMetAsnSerLeuProAsp
IleGluGluValLysAspArgSerIleLysLysGlyAsnAsnAla
PheArgValTyrArgMetLeuProLeuSerGluArgProSerLys
LysGlyLysLysProLysThrGluLysGluGluArgValLysHis
IleLysGlnGluProValGluSerSerLeuGlyLeuSerAsnGly
ValSerGlyPheSerProGluTyrAlaValLeuThrSerAlaIle
LysAsnGluValAspSerThrValAsnIleIleValValGlyGln
SerHisLeuAspSerAsnIleGluAspGlnGluIleValThrAsn
ProProAspIleCysGlnValValGluValThrThrGluSerAsp
AspGlnProValSerMetSerGluLeuTyrProLeuGlnIleSer
ProValSerSerTyrAlaGluSerGluThrThrAspSerValAla
SerAspGluGluAsnAlaGluGlyArgProHisTrpArgLysArg
SerIleGluGlyLysGlnTyrLeuSerAsnMetGlyThrArgAsn
ThrTyrLeuLeuProSerMetAlaThrPheValThrSerAsnLys
ProAspLeuGlnValThrIleLysGluAspSerCysProMetPro
TyrAsnSerSerTrpProProPheThrAspLeuProLeuProAla
ProValThrProThrProSerSerSerArgProAspArgGluThr
ArgAlaSerValIleLysLysThrSerAspIleThrGlnAlaArg
ValLysSerCys

A proteína acima pode ser obtida por cultura de uma célula transformada e isolamento da proteína produzida de um modo convencional.



O pedido de Patente Europeia original N°. 8911518.1 descreve a clonagem e a expressão de determinadas proteínas IRF-I da forma seguinte:

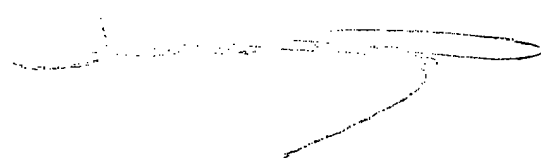
1. Clonagem e expressão de ADN de IRF-1 em E. coli

- A. Isolou-se ARN poli(A)⁺ de células L929 de rato não induzidas e utilizou-se para sintetizar ADNc (segundo o procedimento de Aruffo e Seed, 1987). O ADNc foi em seguida clonado num vector λ gt11 cindido com EcoRI e construiu-se um banco de ADNc de acordo com o processo conhecido de Huynh et al., 1985, utilizando E. coli Y1090 como estirpe hospedeira.

Efectuou-se em seguida uma busca no banco de λ gt11 com a sequência AAGTGA multimerizada (4 vezes) (seguidamente referida como oligómero C1; Fujita et al., 1987) como sonda.

Neste processo de busca, inoculou-se E. coli Y1090 infectado pelos fagos λ gt11 recombinantes em placas rectangulares de 10x13 cm. As placas foram em seguida incubadas a 12°C durante 4 a 5 horas, após o que eram visíveis cerca de 20 000 colónias/placa.

Os filtros de membrana para a busca eram membranas de nylon (Nytran; Schleicher & Schnell) ou de nitrocelulose (Schleicher & Schnell). Os filtros foram mergulhados em IPTG 10 mM (para a indução do gene de expressão lacZ nas colónias de fagos apropriados) e secos ao ar, em seguida foram cobertos sobrepostos nas placas e incubados a 37°C durante 2,5 horas. As colónias apenas produzirão uma proteína codificada por ADNc se o ADNc estiver em concordância de quadro com o gene lacZ.



Os filtros foram em seguida removidos e arrefecidos a 4°C durante 20 minutos e, sem secar, foram submetidos a selecção.

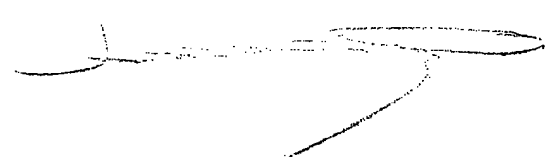
Os filtros de membrana foram em seguida preparados para análise tal como se segue:

Preparou-se um extracto nuclear de células L929 de rato e depositou-se (numa quantidade correspondente a cerca de 10 µg de proteína) sobre as membranas.

Antes de se efectuar a ligação de ADN utilizou-se um tampão de ligação constituído por Hepes 10 mM a pH 7,5, NaCl 5,0 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e 5% de glicerol. Adicionou-se 5% de leite em pó magro (Yukijurishi Inc.) ao tampão e incubaram-se os filtros na mistura durante 1 hora a 4°C e em seguida enxaguaram-se durante 1 minuto no mesmo tampão mas neste caso sem leite em pó.

Incubaram-se em seguida os filtros em tampão de ligação (1 ml) contendo 350 µg/ml de ADN de esperma de salmão com um comprimento médio de aproximadamente 300 pb e ADN oligomérico C1 sonda marcado com ³²P (10⁶ cpm/ml; actividade específica 2 000 cpm/fmol) (ver Fujita et al., 1987). A sonda de ADN foi marcada nas extremidades 5' com [γ-³²P]ATP utilizando quinase T4.

Após a ligação, os filtros foram lavados à temperatura ambiente com o tampão de ligação durante 1 a 2 horas (filtro de 10 ml), mudando o tampão de ligação várias vezes durante esta operação. Os filtros foram em seguida secos ao ar e submetidos a auto-radiografia. Nesta análise, as membranas de nylon, ao contrário das membranas de nitrocelulose, deram um sinal positivo que era inibido de

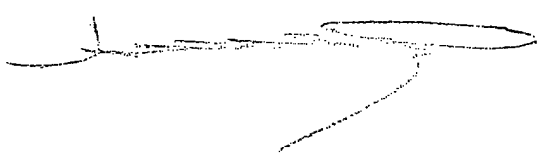


forma específica com a inclusão do oligómero C1 não marcado em excesso.

Seleccionaram-se desta forma cerca de $1,4 \times 10^6$ recombinantes. Entre os 32 clones fágicos positivos identificados na primeira selecção, verificou-se que um clone (designado por λ L28-8) se ligava repetidamente com a sonda de ADN em selecções subsequentes.

2. Produção e purificação de proteína em E. coli transfectado

Prepararam-se clones bacterianos lisogénicos por transfecção de E. coli Y1089 com λ L28-8. Em seguida inocularam-se os clones lisogénicos contendo λ L28-8 obtidos de um dia para o outro em 400 ml de meio L a 1%. Cultivaram-se as bactérias a 31°C até que a DO_{600} alcançou o valor de 1. A temperatura foi então ajustada a 42°C durante 20 min. Em seguida adicionou-se IPTG 10 mM e, após incubação a 38°C durante mais 20 min, as culturas foram rapidamente centrifugadas e o agregado foi suspenso em 10 ml de tampão de lise constituído por Hepes 20 mM a pH 7,9, EDTA 0,2 mM, espermidina 0,5 mM, espermina 0,15 mM, DTT 0,1 mM, 10% de glicerol, fluoreto de fenilmetionilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM, 1 μ g/ml de pepstatina A, 1 μ g/ml de leupeptina, L-1-tosilamida-2-feniletilclorometilbenzamida 500 μ M, molibdato de sódio 10 mM, pirofosfato de sódio 2 mM e ortovanadato de sódio 2 mM. Submeteram-se as suspensões das células a três ciclos rápidos de congelamento - descongelamento e em seguida centrifugaram-se a 30 000 rpm durante uma hora a 4°C utilizando um rotor Beckman 50 Ti. O sobrenadante foi utilizado directamente para uma análise de retardamento em gel (ver em seguida) ou em alternativa foi ainda purificado.



A purificação adicional foi levada a efeito como se segue:

Aplicaram-se aproximadamente 4 ml do sobrenadante numa coluna de poli(di-C): poli(di-C) com um volume de leito de 2 ml e equilibrada com um tampão de lise. Aplicou-se em seguida o material eluído (4 ml) a uma coluna DE 52 (Whatman) contendo um volume de leito de 2 ml equilibrada com tampão Z (Hepes 25 mM a pH 7,8, $MgCl_2$ 12,5 mM, DTT 1 mM, 20% de glicerol, 0,1% de Np-40 e PMSF 0,5 mM). Eluiu-se a actividade de ligação de ADN com tampão Z contendo KCl 0,1 mM. O eluído foi novamente concentrado utilizando centricon-10 (Amicon). A concentração final da proteína era de 28 mg/ml.

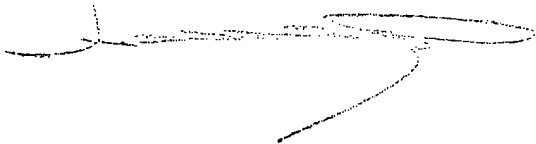
3. Caracterização do produto proteico do clone 1L28-8:

(i) Análise de retardamento em gel

Prepararam-se clones bacterianos lisogénicos contendo λ L28-8 por transfecção de E. coli Y1089 e induziram-se para expressar o ADNc clonado a altos níveis utilizando o procedimento de Huynh et al., 1985. Utilizaram-se para comparação clones lisogénicos preparados e tratados do mesmo modo com o fago não contendo inserido o ADNc (designado por λ 6).

Prepararam-se extractos contendo cada um 3 μ g de proteína das culturas induzidas do lisogénio (quatro preparados designados por λ L28-8a, λ L28-8b, λ 6a e λ 6b).

Foi também preparado extracto nuclear (3 μ g de proteína) a partir de células L929 de rato.



Os extractos foram incubados com um fmol de sonda oligomérica C1 marcada tal como descrito acima com uma actividade específica de 8 000 cpm/fmol.

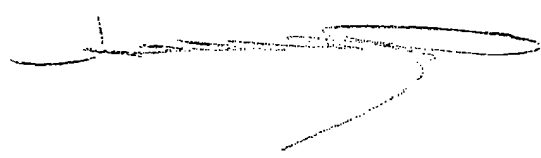
Cada extracto foi também submetido a análises por competição, nas quais se adicionou um ADN competidor em várias concentrações à incubação.

Os resultados da análise são apresentados na Fig. 1, em que as diversas pistas possuem a seguinte correspondência:

Pista	Extracto
1	nenhum
2	λ 6a
3	λ 6b
4	λ 6b com um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C1 não marcado
5	λ 6b com um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C5A não marcado*
6	λ L28-8a
7	λ L28-8b
8	λ L28-8b com um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C1 não marcado
9	λ L28-8b com um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C5A não marcado*
10	células L929
11	células L929 com um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C1 não marcado
12	células L929 com um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C5A não marcado*

* O oligómero C5A encontra-se descrito em Fujita et al., 1985 e é uma sequência 6 vezes repetida de GAAA.

A partir da Fig. 1 é possível verificar que as sondas de ligação são detectáveis nas pistas 6, 7, 9, 10 e 12.



Tal como se mostra na Fig. 1, os extractos proteicos dos lisogénios de λ L28-8 deram origem a bandas desviadas (pistas 6 e 7), cujo aparecimento foi inibido por excesso de ADN do oligómero C1 não marcado mas não pela mesma quantidade do oligómero C5A (pistas 8 e 9).

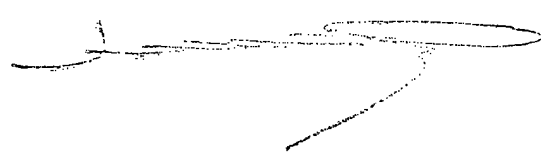
Em contraste com as proteínas derivadas de λ L28-8, as que foram preparadas a partir do lisogénio derivado de λ 6 induzido não deram origem a essas bandas desviadas (pistas 2 a 5). Pode-se verificar que as bandas modificadas são muito semelhantes às do IRF-1 natural de células de rato (pistas 10 e 12). Estas diferenças que existem nos dois conjuntos de bandas desviadas é considerado como uma consequência das diferentes quantidades de proteína ligada à sonda de ADN.

Além disso, verificou-se que as bandas desviadas foram detectadas apenas com as proteínas induzidas por IPTG das células Y1089 transfectadas com λ L28-8.

(ii) Análise do rasto de ADNase

Efectuou-se uma análise de rasto a fim de verificar as propriedades de ligação da proteína codificada por ADN de λ L28-8 a um ADN que codifica para a região a montante do gene do IFN- β .

A proteína codificada pelo ADN de λ L28-8 foi extraída do lisogénio induzido e parcialmente purificada por cromatografia em coluna tal como descrito acima e ensaiada para verificação das suas propriedades em relação a um ADN contendo a região a montante do gene do IFN- β .



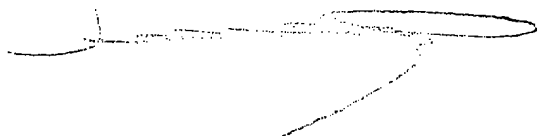
Prepararam-se sondas de ADN sob a forma de fragmentos SalI-HindIII isolados a partir de p-125cat (contendo o tipo selvagem do gene de IFN- β) e de p-125DPcat (contendo um gene de IFN- β mutante). O plasmídeo p-125cat foi construído como o p-105cat (Fujita et al., 1987), excepto em que se utilizou o fragmento BamHI (-125)-TagI (+19) de pSE-125 (Fujita et al., Cell, Vol. 41, págs. 489-496, 1985). O plasmídeo p-125DPcat, contendo mutações pontuais no interior dos elementos reguladores do IFN- β , foi obtido por mutagénesis dirigida de oligonucleótidos sintéticos em P-125cat, tal como descrito em Hatakeyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, págs. 9640-9654, 1986). Ambos os ADNs foram marcados no local HindIII por meio de (γ - 32 P[ATP utilizando quinase T4.

Incubaram-se 4 fmol da sonda de ADN (actividade específica 3 000 cpm/fmol) na mistura reaccional de 20 μ l contendo Tris-HCl 25 mM a pH 7,9, MgCl₂ 6,25 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM, 10% de glicerol e 2% de álcool polivinílico na presença ou na ausência de 280 μ g de proteína purificada.

Na análise adicionaram-se 5×10^{-4} unidades de ADNase I (Worthington) e incubou-se durante 1 min a 25°C.

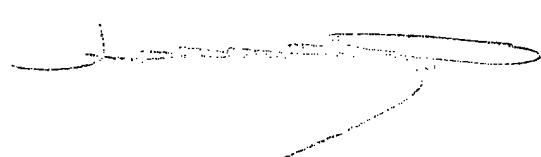
A Fig.2 mostra auto-radiogramas dos fragmentos de ADN obtidos a partir de amostras obtidas realizando os procedimentos seguintes. No lado esquerdo da Fig. 2 encontra-se parte da sequência de ADN da sonda de IFN- β de tipo selvagem e do lado direito da Fig. 2 encontra-se parte da sequência de ADN da sonda de IFN- β mutante.

1. A sonda de IFN- β de tipo selvagem foi cindida por reacções de A+G (ver Methods in Enzymology, Vol. 65, págs. 499-560) - o resultado é apresentado na pista 1.

- 
2. A sonda de IFN- β de tipo selvagem foi digerida parcialmente por ADNase I sem protecção - o resultado é apresentado na pista 2.
 3. A sonda de IFN- β de tipo selvagem foi feita reagir com a proteína e em seguida digerida com ADNase I - o resultado é apresentado na pista 3.
 4. A sonda de IFN- β de tipo selvagem foi feita reagir com a proteína na presença de um excesso molar de 1000 vezes de oligómero C1 não marcado e em seguida digerida com ADNase I - o resultado é apresentado na pista 4.
 5. A sonda de IFN- β mutante foi feita reagir com a proteína e em seguida digerida com ADNase I - o resultado é apresentado na pista 5.
 6. A sonda de IFN- β mutante foi cindida por reacções A+G - o resultado é apresentado na pista 6.

Na Fig. 2 as regiões protegidas tal como são reveladas nas pistas 3 e 5 são indicadas respectivamente nas sequências apresentadas nos lados esquerdo e direito do auto-radiograma. Os motivos hexaméricos estão inscritos num rectângulo.

A partir dos resultados na Fig. 2 poder-se-á ver que as regiões protegidas correspondem aos nucleótidos -100 a -64, sendo esta a região que se descobriu ser protegida pelo IRF-1 obtido a partir das células L929. A protecção foi anulada pelo uso do oligómero C1 não marcado em excesso (pista 4). Verificou-se também, utilizando concentrações baixas de proteína, que ocorre protecção preferencial na região que contém o motivo AAGTGA (-80 a -70).



Estes resultados indicam que a proteína possui uma alta afinidade para a região que contém o motivo AAGTGA e uma baixa afinidade para a região circundante.

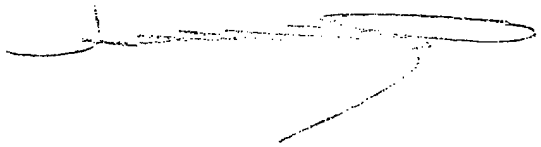
O segmento de gene de IFN- β mutante transporta mutações T-G nas posições -106, -100, -73 e -67. Na comparação das pistas 5 e 2 sob as mesmas condições de análise, a protecção ganha pelas proteínas recombinantes parece restrita à região não mutada (pista 2). Esta observação está em conformidade com a observação de que a introdução destas mutações tem como resultado uma drástica redução (20 vezes) da indutibilidade da transcrição por NDV em células L929 e que a ligação in vitro do IRF-1 ao gene IFN- β mutante era notável apenas na região não mutada.

Para além disso, a utilização do oligómero C1 revela que a proteína protege especificamente a região que contém as sequências oligoméricas. Esta protecção corresponde de forma idêntica à obtida por IRF-1 nativo derivado de células L929.

3. Análise de competição de ADN

Esta análise foi levada a efeito para se examinar a afinidade da proteína recombinante em relação a várias sequências de ADN incluindo algumas das sequências de ADN de regulação de transcrição conhecidas. Procedeu-se do seguinte modo:

Isolou-se o fragmento HindIII-SalI da sonda de IFN- β a partir de p-125 cat (ver Fujita et al., 1987); este fragmento contém a sequência do gene de IFN- β humano de +19 a -125. O ADN foi marcado nas extremidades 3' terminais por



preenchimento em ambas as extremidades com [α - 32 P]dCTP utilizando o fragmento de Klenow.

A actividade específica da sonda de ADN era de 8 000 cpm/fmol.

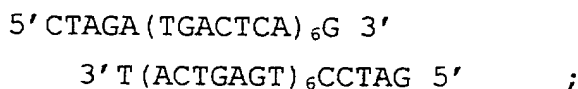
As análises de retardação em gel foram levadas a efeito sob as condições acima descritas.

Na realização das análises de competição, o ADN foi feito reagir com a proteína na presença de diversas concentrações de ADNs em competição nas misturas de ligação tal como indicado na Fig. 3.

O nível de formação do complexo foi quantificado por análise densitométrica do auto-radiograma. A formação do complexo na ausência de ADN competidor foi tomada como 100%.

A estrutura dos ADNs competidores era a seguinte:

a) AP-1: um ADN sintético com a seguinte sequência:



b) TNF: 37 pb de ADN sintético que abrange desde +1162 a +2116 (ver Nadwin et al., 1985) do primeiro intrão de TNF- α ;

c) H2-D^d de murino: 37 pb de ADN sintético que abrange o elemento IRS (-159 a -123) tal como descrito por Korber et al., 1988;

d) IFN- α humano: 46 pb de ADN sintético que correspondem ao Elemento de Resposta de vírus, ver Ryals et al., 1985.



e) Sequências hexaméricas C1, C2, C3, C4 e C5a.

As sequências C1 e C5a encontram-se descritas acima. As sequências C2, C3 e C4 são tal como publicado em Cell, 49, 352-367 (1987); representam as sequências

AAATGA	C2
AAGGGA	C3 e
AAAGGA	C4 respectivamente

f) A sequência do gene de IFN- β de +19 a -66.

Na Fig. 3 o painel do lado esquerdo mostra os resultados obtidos quando as repetições do hexâmero foram utilizadas como competidores. O painel do meio mostra os resultados quando os segmentos do gene de IFN humano foram utilizados como competidores e o painel do lado direito mostra os resultados correspondentes utilizando diversos segmentos de ADN tal como indicado dentro do painel.

A partir dos resultados apresentados na Fig. 3 ver-se-á que o aparecimento da banda desviada foi eliminado por competição pelas sequências hexaméricas pela ordem de eficiência C1- C2- C3- C4, mas não foi eliminado de forma significativa por competição por C5a.

Também se pode observar que os segmentos de ADN sintético que abrangem os elementos regulatórios de ambos os genes de IFN- α I humano e de H-2D^d de murino deram origem a uma actividade competitiva. Este facto é particularmente interessante uma vez que o segmento de ADN do gene de H-2D^d contém a chamada sequência de resposta IFN (IRS) que funciona como um intensificador quando as células respondem ao IFN (Sujita et al., 1987; Israel et al., 1986; Korber et al., 1988).



De facto, encontram-se em muitas das sequências promotoras dos genes indutíveis por IFN motivos sequenciais idênticos ou semelhantes a estes encontrados no gene de IFN- β em que os factores nucleares parecem ligar-se de modo específico (Korber et al., 1988; Lery et al., 1988).

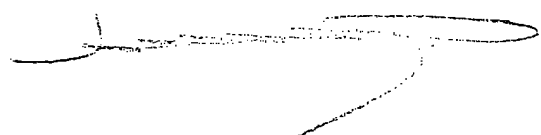
Os resultados apresentados na Fig. 3 são aproximadamente semelhantes aos obtidos quando a análise é repetida sob condições idênticas utilizando proteína natural produzida a partir de células L929.

Estrutura do ADNc que codifica para IRF-I de murino

A sequência de ADN dos ADNs clonados foi determinada por um método didesoxi (SEQUENASE; United States Biochemical, Inc.) ou pelo método normal Maxam-Gilbert (Maxam e Gilbert, 1980).

Isolou-se a inserção de λ L28-8 em E. coli Y1089 como se segue: preparou-se o ADN fágico por procedimentos normais e digeriu-se o ADN por EcoRI, em seguida isolou-se o ADNc cindido do ADN fágico e sequenciou-se pelo método didesoxi (Sequenase; United States Biochemical, Inc.). Verificou-se que o ADNc inserido em λ L28-8 tinha 1,8 kb de comprimento. A análise de sequência nucleotídica revelou um grande quadro de leitura livre ligado em fase com o gene do β -galactósido.

Para seleccionar os clones que continham as inserções de ADNc maiores, sintetizou-se ADNc de cadeia dupla com ARN poli (A)⁺ derivado de células L929 e clonado no vector CDMB de acordo com o processo publicado de Aruffo e Seed (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, pág. 8573, 1987) e Seed (Nature, Vol. 329, págs. 840-842, 1987).



Os plasmídeos recombinantes foram introduzidos na estirpe de *E. coli* MC1061/p3 (de acordo com o processo de Aruffo e Seed; tal como descrito acima), submeteram-se os clones de ADNc a selecção utilizando a sonda de ADNc derivada de λ L28-8 (marcado com ^{32}P) sob condições pouco rígidas para hibridação de ADN-ADN (Kashima et al., *Nature*, Vol. 313, págs. 402-404, 1985) e seleccionou-se um clone pIRF-L para estudo posterior.

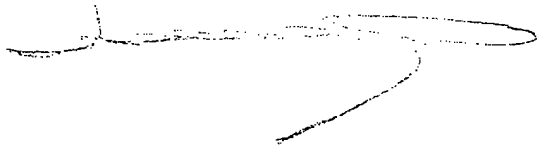
A inserção de ADNc de pIRF-L pretendida foi obtida por digestão com HindIII e XbaI e foi sequenciada pelos métodos descritos acima. A sequência é apresentada na fórmula IV e na Fig. 4.

Verificou-se que a sequência de ADNc de λ L28-8 contém uma sequência idêntica na região de sobreposição com a excepção de que faltava um resíduo de A entre os nucleótidos 1773 e 1781.

As extremidades terminais 5' e 3' do ADNc derivado de λ L28-8 estão marcadas por flechas na Fig. 4. As sequências ATTTATTTA e ATTTA que possivelmente conferem instabilidade ao ARNm estão inscritas em rectângulos.

Tal como se verifica a partir da Fig. 4A, o ADNc de murino derivado do pIRF-L era mais longo em 198 pb e 20 pb do que o ADNc de λ L28-8 nas regiões 5' e 3' respectivamente.

Por análise da sequência de ADN genómico que contém a região promotora deste gene verifica-se que no ADNc de pIRF-L faltam cerca de 30 pb do local de remate principal, ver abaixo, fórmula V e Fig. 7.



A sequência imediatamente a montante do primeiro codão ATG, GGACCATGC, concorda bem como a sequência de consenso de Kozak GCC^A GCATGG para o local de início de tradução.

Não se encontrou qualquer sequência ATG em concordância de quadro na sequência a montante da sequência ATG acima mencionada confirmando que esta é de facto o codão de início para o ARNm de IRF-I.

Tal como foi referido acima, não se detectou qualquer diferença na sequência de nucleótidos entre os ADNc's de λ L28-8 e pIRF-L dentro das regiões sobrepostas, excepto um nucleótido na região não codificadora 3'.

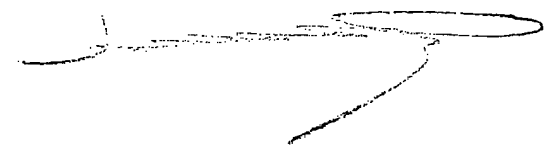
Verificou-se deste modo que o IRF-I de murino era constituído por 329 ácidos aminados com um P.M. calculado de 37,3 kD. Não se encontraram locais de N-glicosilação canónicos no interior da sequência.

Não se detectou qualquer homologia significativa com outras proteínas conhecidas por meio de busca na base de dados Protein Sequence Database (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) e em sequências mais recentemente publicadas.

Uma análise da hidropatia registada em gráfico de acordo com Kyte e Doolittle, 1982, indica que a proteína no seu conjunto é altamente hidrofílica (Fig. 4B).

Por inspecção da sequência primária deduzida do IRF-I de murino detectaram-se as seguintes características:

A metade terminal amina que se prolonga até ao ácido aminado (a.a.) 140 é rica em lisina (Lys) e arginina (Arg). De facto, 31 do total de 39 resíduos Lys e Arg estão localizados



nesta região. No painel inferior da Fig. 4B representa-se um sumário diagramático da localização dos ácidos aminados básicos (Arg e Lys) (colunas ascendentes) e ácidos aminados acídicos (Asp e Glu) (colunas descendentes).

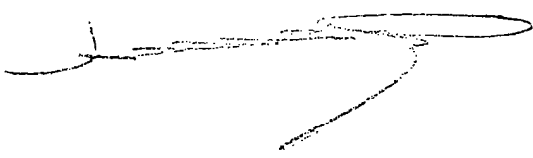
Como se apresenta na Fig. 4B, esta região mostra uma forte hidrofiliçidade e é considerada como a região responsável em primeiro lugar pela ligação de IRF-I às sequências de ADN específicas.

Nestas circunstâncias, os motivos característicos para muitas proteínas que se ligam a ADN, tais como dedos de zinco e motivos de hélice-volta-hélice (Pabo e Sauer, 1984, Evans e Hollenberg, 1988) não foram detectáveis na proteína IRF-I.

Pelo contrário, o resto da molécula (isto é, a metade terminal carboxilo) apresenta uma abundância relativa de ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), serina (Ser) e treonina (Thr). De 89 ácidos aminados (do a.a. 140 ao 329), 33 (17%) representam ácidos aminados acídicos e 36 (19%) representam Ser e Thr. É notável que se encontre um grupo de 5 ácidos aminados acídicos consecutivos nos a.a. 227 a 231. Com respeito a Ser e Thr, muitos aparentam formar aglomerados (região nos a.a. 153 a 156, 190 a 192, 206 a 208 e 220 a 222; aqui referidas como as regiões S-T). As regiões S-T são representadas por pequenos rectângulos abertos no painel inferior da Fig. 4B.

Estrutura do ADNc que codifica para o IRF-I humano

Seguindo um procedimento semelhante ao descrito acima para o IRF-I de murino, clonou-se e sequenciou-se o ADNc de IRF-I humano.



Preparou-se um banco de ADNc humano por síntese de ADNc utilizando poli(A)⁺ARN de uma linha de células T humana Jurkat. A síntese de ADN de cadeia dupla e a subsequente clonagem para o vector plasmídico CDM8 foram levadas a cabo de acordo com o processo de Aruffo e Seed (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, págs. 8573-8577, 1987) e Seed (Nature, Vol. 329, págs. 840-842, 1987).

Introduziram-se os plasmídeos recombinantes numa estirpe de E. coli MC1061/p3 utilizando o procedimento de Aruffo e Seed tal como mencionado acima.

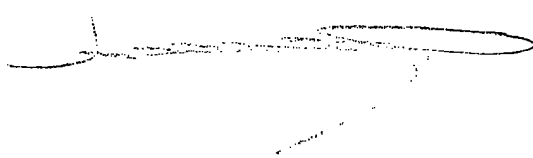
Procedeu-se a uma busca dos clones de ADNc que hibridam por reacção cruzada com ADNc de IRF-I de rato utilizando ADNc (marcado com ³²P) de λL28-8 como sonda sob condições pouco críticas para hibridação de ADN-ADN. As condições empregues foram exactamente como descritas por Kashima et al. (Nature, Vol. 313, págs. 402-404, 1985).

Dos clones positivos, seleccionou-se o clone pHIRF31 contendo a inserção de ADNc mais longa.

A sequência de ADNc pretendida do clone pHIRF31 foi isolada por digestão do ADN plasmídico por XhoI e após isolamento foi submetida a sequenciação pelos métodos descritos acima. A estrutura do gene de IRF-I humano é apresentada na fórmula II e na Fig. 8.

As sequências deduzidas para o IRF-I de murino e humano são apresentadas justapostas para comparação na Fig. 5.

Por análise do ADN humano verificou-se que este IRF-I é mais curto que o IRF-I de murino em quatro ácidos aminados.



Pode verificar-se a ocorrência de forte conservação das sequências de ácidos aminados entre as duas moléculas de IRF-I. Em particular pode ver-se que 133 de entre 145 ácidos aminados (95%) das metades terminais de amina são idênticos.

Tomada no seu conjunto, a observação anterior indica que o IRF-I é uma nova classe de proteína de ligação de ADN.

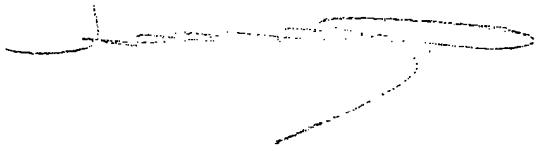
Também se deve notar que as sequências ATTTATTTA e ATTTA, encontradas em muitas citoquinas e ARNm's de proto-oncogenes, estão presentes no interior da região não traduzida 3' do ADNc de IRF-I de murino e, de forma idêntica, a sequência ATTTA encontra-se no interior da região correspondente ao ADNc de IRF-I humano. Crê-se que estas sequências desempenham um papel na regulação de pós-transcrição da expressão genética conferindo instabilidade ao ARNm (Shaw e Kamen, 1986; Caput et al., 1986).

O plasmídeo pIRF-L foi transfectado para E. coli MC1061/p3, que foi depositado como E. coli MC1061/p3 (pIRF-L) na Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology (FRI), 1-3, Higashi 1-chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken 305, Japão, sob os termos do Tratado de Budapeste em 19 de Agosto de 1988 sob o nº. FERM BP-2005.

O plasmídeo pIRF31 foi transfectado de forma semelhante para E. coli MC1061/p3 que foi depositado como E. coli MC1061/p3 (pIRF-31) na FRI sob os termos do Tratado de Budapeste em 19 de Agosto de 1988 sob o nº. FERM BP-2006.

Regulação do gene do IRF

1. Expressão do ARNm de IRF-I



Tendo em vista o facto de que o IRF-I manifesta afinidades com sequências de regulação de genes diferentes do gene do IFN- β e que se encontra deste modo envolvido na regulação de um conjunto de genes em diversos tipos de células, efectuou-se um exame da expressão do ARNm de IRF-I em células de rato derivadas de diversos tecidos e órgãos utilizando ADNc de murino como sonda. Para preparar esta sonda, utilizou-se ADN do fago M13 mp10 (ver abaixo) contendo a cadeia de sentido directo do fragmento PstI do gene do IRF-I como matriz para sintetizar o ADN de sentido inverso marcado com ^{32}P , digeriu-se o produto por EcoRI e isolou-se a sonda de ADN tal como descrito por Fujita et al., (1985).

O ARN total foi isolado pelo processo estabelecido de Aruffo e Seed, 1987.

Em seguida efectuou-se uma análise de mancha essencialmente como descrito por Thomas (1980), sendo a película de raios X exposta durante 3 dias, e os resultados são apresentados na Fig. 6A. As várias pistas representam os resultados de ensaios efectuados utilizando ARN integral de células dos seguintes tecidos:

Pista 1	cérebro
Pista 2	coração
Pista 3	fígado
Pista 4	pulmão
Pista 5	baço (não estimulado)
Pista 6	timo
Pista 7	rim
Pista 8	músculo
Pista 9	intestino
Pista 10	baço (estimulado)
Pista 11	Con A - baço estimulado



Para o ensaio em cada pista utilizaram-se 5 µg de ARN integral das células, excepto na pista 8, para a qual se utilizaram apenas 1,2 µg de ARN.

Pode verificar-se a partir da Fig. 6A que se detectou uma banda correspondente a cerca de 2.0 kb na maioria das amostras de ARN através desta análise de mancha apesar do nível de expressão do ARNm parecer baixo. É de notar que o nível de expressão de ARNm nos linfócitos derivados de baço foi aumentado drasticamente a seguir a estimulação por Con A (Pista 11).

Numa análise adicional induziram-se células L929 de rato por NDV tal como descrito anteriormente (Fujita et al., 1985) e extraiu-se o ARN citoplasmático, pelo processo de Aruffo e Seed, 1987, de três em três horas após a infecção.

Prepararam-se ADNs sonda a partir de várias sequências que se seguem e marcaram-se pela reacção de marcação de iniciador múltiplo (Amersham), nomeadamente

- (i) um fragmento EcoRI de 1,8 kb de λL28-8 (actividade específica 2×10^8 cpm/µg);
- (ii) um fragmento BamHI-BglIII de 0,5 kb de um clone genómico de IFN-β (actividade específica 5×10^8 cpm/µg) e
- (iii) um fragmento BamHI-PvuII de 2,0 kb de um clone contendo pseudogene de β-actina humana (actividade específica 5×10^8 cpm/µg).

Os resultados são apresentados na Fig. 6B. Realizaram-se análises de mancha tal como descrito acima, utilizando o procedimento de Thomas (1980).



Em cada pista depositaram-se 10 μ g do ARN citoplasmático. A película de raios X foi exposta durante 3 horas. Verificou-se por meio de análises densitométricas que o ARNm de IRF-I aumentou cerca de 25 vezes 9 a 12 horas após a infecção por NDV.

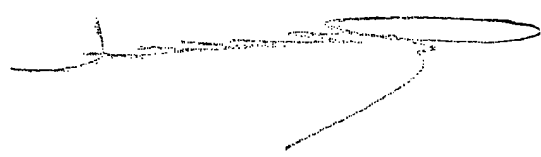
Se bem que o aumento de ARNm seja muito elevado, é também transitório, com um pico entre as 9 e as 12 horas e baixando cerca de 15 horas após a indução. A acumulação de ARNm precede a acumulação de ARNm de IFN-B; como se pode ver na Fig. 6B, a indução de ARNm de IRF-I pode ser observada 3 horas após a infecção de NDV enquanto que o ARNm de IFN- β só é detectável após 6 horas sob condições de análise de mancha idênticas para ambos os ARNs.

O promotor de IRF-I

Tal como demonstrado acima, a transcrição do gene de IRF-I é regulada por vários agentes tais como vírus e mitógenos.

Por análise de mancha de Southern do ADN cromossomal verificou-se que o gene de IRF-I pode ser emendado e não transformado em membros múltiplos no rato.

Submeteu-se um banco do fago λ contendo ADN de rato recém-nascido a uma busca para seleccionar os clones que contêm a sequência promotora de IRF-I utilizando a mesma sonda de ADNc derivada de λ L28-8 utilizada anteriormente. Identificaram-se quatro clones positivos, tendo-se verificado que todos eles contêm o mesmo ADN genómico e utilizou-se um deles, λ g14-2, para análises adicionais. Sub-clonou-se um fragmento PstI no



interior do local PstI de pUC19 para construir o vector p19IRFP.

Clonou-se em seguida o mesmo ADN no interior do local PstI de M13mp10 e M13mp11, que foram utilizados para gerar ADN para análises de sequência.

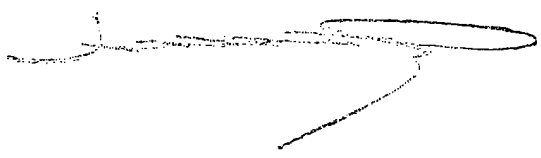
A análise de sequência de nucleótidos do fragmento PstI dos clones referidos foi efectuada tal como descrito anteriormente. Identificaram-se locais de remate principal e secundário por análises de mapeação SI.

Na Fig. 7A apresenta-se a sequência determinada. Como se pode verificar, a sequência a jusante do ADN emparelha perfeitamente com a do ADNc derivado de pIRF-L.

A análise de nuclease S1 indica a presença de dois locais de remate para o ARNm de IRF-I, estando o local principal cerca de 20 nucleótidos a montante do local secundário. Não se encontram sequências caixa TATA típicas presentes no interior da região a montante do gene. Em vista da abundância inusitada de sequência CpG, esta região constitui provavelmente uma "ilha HTF" (Bird, 1986).

A região promotora contém duas caixas GC e uma caixa CAAT (ver Fig. 7A); as caixas referidas em primeiro lugar devem ligar SpI (Kadogan et al., 1986) e a última CP-1 ou CP-2 (Chodosh et al., 1988).

O fragmento PstI que contém as sequências promotoras foi em seguida ensaiado para determinação da sua reactividade em resposta a sinais extracelulares, por exemplo indutibilidade por vírus, do seguinte modo:



Construiu-se um gene quimérico no qual se justapôs um gene relator, nomeadamente um gene de acetiltransferase de cloranfenicol bacteriano (CAT), a jusante do segmento PstI. Esta construção foi feita através da amputação de um fragmento PstI de p19IRPF (ver acima) por BamHI e HindIII e da clonagem do fragmento resultante no interior do fragmento da estrutura BglIII-HindIII de pA₁₀cat₂ (Rosenthal et al., 1983) a fim de construir o vector pIRFcat.

Prepararam-se várias outras construções do seguinte modo:

Preparou-se o vector pIRFΔcat por digestão do fragmento BamHI-HindIII derivado de p19IRFP com HaeIII cujo único local de reconhecimento se localiza a desde -30 até -35 do local de remate principal (Fig. 5A). Ligou-se o fragmento HaeIII-HindIII com o fragmento de estrutura BglIII-HindIII de pA₁₀cat₂ e o ADN sintético seguinte

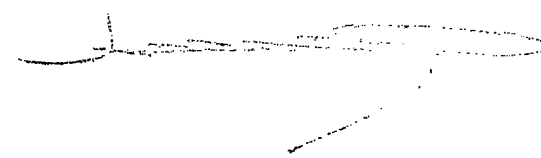
5'GATCCTAGATTTCTTCGCGGCGC 3'
3'GATCTAAAGAAGCGC 5'

Deste modo tanto o vector pIRFcat como o pIRFΔcat continham sequências até -320 e -48 respectivamente do local de remate principal.

O vector p-125cat contém a sequência promotora do gene IFN-β humano tal como descrito por Fujita et al., 1987.

O vector pSV2cat encontra-se descrito em Gorman et al., Science, Vol. 221, págs. 551-553.

Como gene de referência utilizou-se pRSVgtp (ver Gorman et al., acima).



Os vários genes foram transfectados para células L929 de rato utilizando o método de fosfato de cálcio (Fujita et al., 1985). Transfectaram-se 5×10^6 células com 7,5 μ g do plasmídeo de ensaio contendo o gene relator CAT e 2,5 μ g de pRSVgtp. As células foram induzidas por NDV ou por indução falsa e em seguida foram submetidas à análise enzimática conforme descrito por Fujita et al., 1985.

Ao calcular a actividade relativa de CAT, a actividade de CAT das células induzidas falsamente transfectadas com pSV2cat foi tomada como 100%. Cada actividade de CAT foi normalizada pelo Ecogtp (Mulligan e Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 78, págs. 2072-2076) das amostras respectivas. As amostras em que o CAT se encontrava abaixo do nível de fundo foram marcadas b.b. ("below background").

Os resultados são apresentados na Fig. 7B.

Verifica-se que a transfecção do vector pIRFcat em L929 de rato deu origem à expressão de baixo nível de actividade de CAT. O nível de expressão de CAT foi intensificado quando as células transfectadas foram estimuladas por NDV. A supressão da sequência de 300 pb a jusante do gene IRF-I (pIRF Δ cat) virtualmente aboliu as expressões tanto constitutiva como induzida do gene CAT. Este facto demonstra que a sequência promotora se encontra no interior da região de 300 pb a jusante e é indutível por vírus.

Construção de plasmídeos de expressão

1. Digeriu-se ADN fágico do clone λ L28-8 por EcoRI e recolheu-se o ADNc da inserção. Os locais EcoRI do ADNc

foram alinhados por meio de polimerase de ADN T4 e em seguida foram ligados com ADNs adaptadores sintéticos possuindo as sequências pGATCCATTGTGCTGG e pCCAGCACAATG de acordo com Aruffo e Seed, 1987.

Após remoção dos ADNs sintéticos por centrifugação com um gradiente de 5 a 20% de acetato de potássio (Aruffo e Seed, 1987), ligou-se o ADNc de IRF-I com os ADNs adaptadores fixados a ambas as extremidades com ADN do vector CDMB cindido por BstXI (Seed, B, Nature, Vol. 329, págs. 840-842, 1987). Isolaram-se os plasmídeos pIRF-S e pIRF-A contendo o ADNc de IRF-I na orientação de sentido directo e de sentido inverso com respeito ao promotor CMV respectivamente.

Cada ADN plasmídico foi transfectado quer com p-55cat quer com p55C1B (Fujita et al., 1987) em célula L929 e determinou-se o nível de expressão de CAT.

Os resultados são apresentados no Quadro 1 abaixo:

QUADRO 1

	Plasmídeos transfectados	Indução por NDV	Actividade de CAT (% de conversão)
Exp. 1	pIRF-S p-55cat	-	< 1 %
	pIRF-S p-55CIB	-	50 %
	pIRF-A p-55cat	-	< 1 %
	pIRF-A	-	< 1 %
Exp. 2	pIRF-S p-55CIB	-	1,7 %
	p-IRF-S p-55CIB	+	3,6 %
	pIRF-A p-55CIB	-	< 0,1 %
	p-IRF-A p-55CIB	+	< 0,1 %

A eficiência da transfecção do ADN varia em função do estado das células receptoras (neste caso células L929 de rat). A eficiência foi muito mais baixa na Exp. 2 em comparação com a Exp. 1. Deste modo, o nível de expressão de CAT é relativamente mais baixo na Exp. 2.

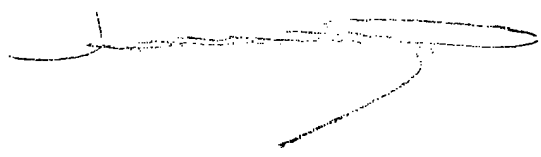
Como se pode verificar no quadro anterior, apenas foi detectada actividade de CAT significativa em células transfectadas por p-55CIB e pIRF-S. Estes dados demonstram que o IRF-I se liga com as sequências AAGTGA repetidas (8 vezes) presentes a montante do gene CAT em p-55CIB e por isso promove a transcrição do gene CAT distal.

Os resultados mostram ainda que o nível de expressão de CAT é aumentado (mais de duas vezes) por infecção das células transfectadas com NDV (Quadro 1), demonstrando que é possível controlar a expressão dos genes por diversos estímulos tais como vírus.

2. Construiu-se do modo exposto seguidamente um plasmídeo de expressão para a produção de uma proteína constituído pelo domínio de ligação de ADN de IRF-I e pelo domínio de activação de transcrição da levedura GAL4:

Digeriu-se o plasmídeo pIRF-S por HindIII e PstI e isolou-se a inserção do ADNc. Digeriu-se o ADNc por DraIII e recuperou-se o fragmento HindIII-DraIII (cerca de 500 pb), tendo sido designado como fragmento A.

Digeriu-se o vector de expressão CDM8 por HindIII e XbaI e isolou-se o ADN estrutural, tendo sido designado como fragmento B.



Isolou-se o ADN que codifica para o domínio de activação de transcrição da levedura GAL4 a partir do plasmídeo pRB968 (Ma e Ptashne, 1987) como se segue:

Em primeiro lugar digeriu-se o ADN de pRB968 por HindIII e alinharam-se as extremidades por polimerase de ADN T4. Adicionou-se ADN ligante de XbaI sintético ao ADN e subsequentemente digeriu-se o ADN por PvuII e XbaI.

Recuperou-se o fragmento resultante de ADN PvuII-XbaI de cerca de 600 pb e designou-se como fragmento C.

Além disso, preparou-se um ADN sintético com a seguinte sequência:

(5')GTGTCGTCCAG(3')
(3')GCACACAGCAGGTC(5')

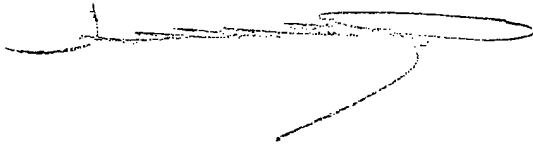
designado como fragmento D.

Construiu-se um vector de expressão pIRFGAL4 por ligação dos fragmentos A, B, C e D. Como plasmídeo de regulação construiu-se o plasmídeo pIRFAGAL4 por ligação dos fragmentos A, B e C e de um ADN sintético com a seguinte sequência:

(5')GTGTCTGACAG(3')
(3')GCACACAGACTGTC(5')

Uma vez que está presente um triplete terminador, TGA, em concordância de quadro entre as sequências de IRF-I e GAL4 no plasmídeo pIRFA GAL4, na proteína expressa deve faltar o domínio de activação GAL4.

A fim de verificar as propriedades funcionais dos factores de transcrição quiméricos codificados pelo



plasmídeo, co-transfectou-se cada um dos plasmídeos pIRFGAL4 e pIRFΔGAL4 com p-55CIB em células e verificou-se se ocorria a expressão de CAT. Os resultados são apresentados no Quadro 2 que se segue:

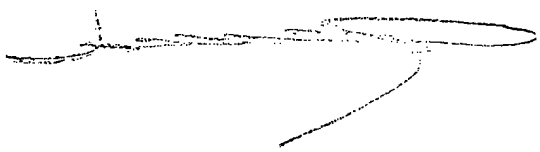
QUADRO 2

Plasmídeo transfectado	Actividade de CAT (% de conversão)
pIRF-S p-55CIB	2,0 %
pIRF-A p-55CIB	< 0,2 %
pIRFGAL4 p-55CIB	1,4 %
pIRFΔGAL4 p-55CIB	< 0,2 %

Célula hospedeira, células L929 de rato. As células não foram induzidas por NDV.

Os resultados mostram que a expressão de um gene visado (tais como os genes que codificam para uma interleuquina, um interferão (α , β e γ), um activador de plasminogénio, a eritropoietina, o factor de estimulação de colónias de granulócitos, a insulina, a hormona de crescimento humana ou a dismutase de superóxido (ou mutantes dos genes humanos)) pode ser aumentada por IRF-I.

Os genes visados como mencionado acima, tais como genes de interferão, por exemplo IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN-ómega, e de activadores de plasminogénio, por exemplo t-PA, pro-uroquinase ou uroquinase, etc., podem ser expressos mais eficientemente também por inclusão para esse fim de promotores fundidos com diversos comprimentos de sequências de reconhecimento para IRF-I, por exemplo AAGTGA.



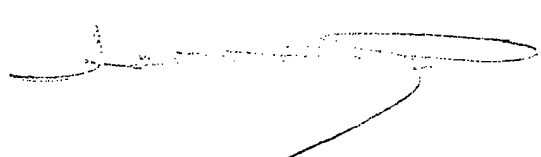
Por exemplo os genes visados podem ser introduzidos em várias células hospedeiras, juntamente com IRF-I intacto ou com genes de IRF-I quiméricos. Aumentando o comprimento do ADN de local de reconhecimento do IRF-I, por exemplo por aumento do número de repetições AAGTGA e o nível de expressão do factor de transcrição, pode-se alcançar um alto nível de expressão dos genes visados.

Por exemplo as sequências de repetição AAGTGA podem ser postas em contacto com um promotor apropriado tal como o promotor de IFN- β ou o promotor precoce de vírus SV40. Um gene visado, por exemplo um gene de t-PA ou um gene de IFN- β , pode ser ligado a jusante de um promotor como os referidos; a estrutura de um gene construído deste modo seria (AAGTGA)_x (Promotor) (gene visado, p. ex. gene do t-PA).

Este gene poderia então ser introduzido e amplificado em células CHO, por exemplo célula CHO DXBII (estirpe dhfr) (Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, págs. 4216-4220, 1980).

Idealmente, tal como discutido acima, uma célula hospedeira será escolhida a partir de uma célula que não possui qualquer actividade de IRF-I endógena ou que não possui esta actividade a um nível substancial. O gene de IRF-I, de preferência com um promotor forte tal como um promotor CMV ou um promotor indutível tal como um promotor de um gene de metalotioneno, pode ser introduzido no interior das diversas células hospedeiras de um modo convencional.

O gene de IRF-I pode ser co-introduzido e amplificado juntamente com o gene visado. Em alternativa, o gene de



IRF-I e o gene visado podem ser introduzidos separadamente no interior da célula hospedeira.

Em células transfectadas conforme descrito, o IRF-I pode ser produzido quer constitutivamente (no caso por exemplo do promotor de CMV) quer de modo induzido (no caso por exemplo do promotor de metalotioneno é induzido por metais divalentes tais como zinco). O IRF-I expresso liga-se às repetições AAGTGA e aumenta o gene visado distal, por exemplo o gene de t-PA ou o gene de IFN.

Esta expressão pode ser ainda aumentada por indução viral, por exemplo por NDV, tal como se pode ver no Quadro 1, Experiência 2. Esta indução aumenta a actividade do IRF-I.

Sequência de ADNc de rato que apresenta hibridação cruzada com ADNc de IRF-I de murino da fórmula III

Preparou-se um banco de ADNc de rato pelo processo descrito acima. O ADNc foi sintetizado pelo processo normal utilizando o ARNm derivado de células de rato L929 e inseriu-se o ADNc no vector λ gtII pelo processo normal. O banco de λ gtII resultante foi em seguida submetido a uma busca para isolar os clones de ADNc cujas inserções apresentam hibridação cruzada com o ADNc de IRF-I de murino descrito acima, tal como se segue:

Incubaram-se filtros de nitrocelulose contendo ADNs de placas fágicas de acordo com as seguintes fases

- (1) em 3xSCC a 65°C durante 30 minutos, seguidos por

(2) 60 minutos de incubação em 3xSSC contendo solução de Denhart (0,2% de albumina de soro de bovino, 0,2% de Ficoll, 0,2% de polivinilpirrolidona 25), seguidos de

(3) uma fase de pré-hibridação constituída por uma incubação durante 12 horas a 65°C numa solução contendo NaCl 1 M, Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM, 0,1% de SDS, 50 µg/ml de ADN suporte de cadeia simples (por exemplo ADN de esperma de salmão) e solução de Denhart e

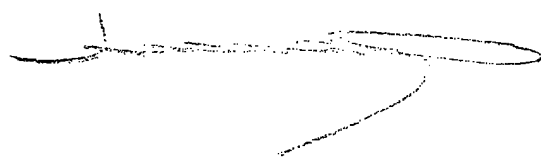
(4) repetiu-se a incubação da fase 3 mas incluindo ADNc de IRF-I de murino marcado com ³²P como sonda. Esta sonda de ADNc foi preparada sob a forma da inserção cindidapor EcoRI de λL28-8 e foi traduzida pelo sistema de marcação Multiprime (ver acima). A incubação foi efectuada a 65°C durante 1\2 horas.

Os filtros foram em seguida lavados, enxaguados brevemente em solução de 2xSSC e em seguida lavados em solução de 3xSSC contendo 0,1% de SDS durante 30 minutos a 65°C. Este procedimento foi repetido por duas vezes.

Seleccionou-se um dos clones positivos designado por PHH-45 e verificou-se que continha ADNc que cobria apenas uma parte da sequência de codificação para um IRF.

A inserção de ADNc em PHH-45 foi por conseguinte isolada e utilizada para seleccionar clones contendo inserções maiores tal como descrito acima para a preparação de pIRF-L sob o título "Estrutura do ADNc que codifica para o IRF-I de murino".

Dos clones positivos identificados, seleccionou-se o que é designado por pIRF2-5 e caracterizou-se utilizando o processo anteriormente descrito para IRF-I de murino. A sequência



completa de ADNc que hibrida é apresentada na fórmula Iva e a sequência de ácidos aminados da proteína de IRF correspondente é apresentada na fórmula VIII.

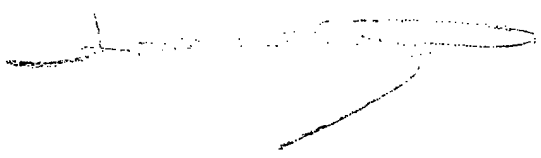
Transfectou-se o plasmídeo pIRF 2-5 em E. coli MC 1061/p3, o qual foi depositado como E. coli no FRI nos termos do Tratado de Budapeste em 22 de Novembro de 1988 sob o n°. FERM BP-2157.

ADNc do genoma de levedura que hibrida com uma sequência de ADNc de IRF-I humano

Preparou-se ADN de levedura pelo processo normal e digeriu-se com EcoRI. Depositaram-se 5 µg do ADN digerido em gel de agarose a 0,8% e submeteram-se a electroforese e a análise de mancha de ADN por processos normais.

Tratou-se o filtro com as manchas exactamente como descrito no exemplo precedente para isolamento do ADN de rato que hibrida com IRF-I de murino excepto no que se segue:

Na fase (3), a temperatura de incubação foi de 55°C e na fase (4) a incubação foi também efectuada a 55°C e a sonda radioactiva foi o ADNc de IRF-I humano isolado a partir de pHIRF31 por digestão do plasmídeo com XhoI, sendo esta sonda marcada conforme descrito no exemplo anterior para o IRF-I de murino. O filtro foi lavado a 55°C em 2xSSC. Os clones positivos foram identificados por auto-radiografia (ver Fig.9).



Referências

Abreu S.L., Bancroft F.C., and Stewart II E.W. (1979). Interferon priming.

J. Biol. Chem. 254, 414-418.

Aruffo A., and Seed B. (1987). Molecular cloning of a cDNA by a high-efficiency COS cell expression system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8573-8577.

Bird A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation.

Nature 321, 209-213.

Caput D., Beutler B., Hartog K., Thayer R., Brown-Schimer S., and Cerami A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 83, 1670-1674.

Cavalieri R.L., Havell E.Z., Vilcek J., and Pestka S. (1977). Induction and decay of human fibroblast interferon mRNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4415-4419.

Chodosh L.A., Baldwin A.S., Carthew R.W., and Sharp P.A. (1988). Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits.

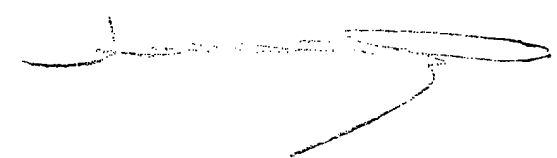
Cell 53, 11-24.

Dinter H., Hauser H., Mayr U., Lammers R., Bruns W., Gross G., and Collins J. (1983). Human interferon-beta and co-induced genes: molecular studies. In the biology of the Interferon System 1983, E.

De Maeyer and H. Schellekens, eds. (Amsterdam: Elsevier Science Publishers), 33-34.

Dinter H., and Hauser H. (1987). Cooperative interaction of multiple DNA elements in the human interferon- β promoter.

Eur. J. Biochem. 166, 103-109.



Evans R.M., and Hollenberg S.M. (1988). Zinc Fingers: Gilt by association.
Cell 52, 1-3.

Fujita T., Saito S., and Kohno S. (1979). Priming increases the amount of interferon mRNA in poly(rI):poly(rC)-treated L cells.
J.Gen. Viol. 45, 301-308.

Fujita T., Ohno S., Yasumitsu H., and Taniguchi T. (1985). Delimitation and properties of DNA sequences required for the regulated expression of human interferon- β gene
Cell 41, 489-496.

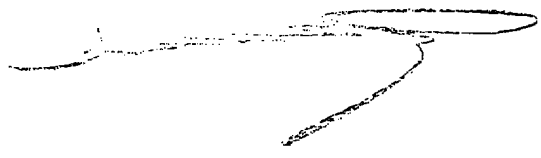
Fujita T., Shibuya H., Hotta H., Yamanishi K., and Taniguchi T. (1987). Interferon- β gene regulation: Tandemly repeated sequences of a synthetic 6 bp oligomer function as a virus-inducible enhancer.
Cell 49, 357-367.

Galabru J., and Hovanessian A.G. (1985). Two interferon- β induced proteins are involved in the protein kinase complex dependent on double-stranded RNA.
Cell 43, 685-694.

Goodbourn S., Zinn K., and Maniatis T. (1985). Human β -interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element.
Cell 41, 509-520

Huynh T.V., Young R.A., and Davis R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ 11. In DNA cloning-A Practical Approach, Volume 1, D.M. Glover, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 49-78.

Israel A., Kimura A., Fournier A., Fellous M., and Kourilsky P. (1986). Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of a mouse H-2 gene.
Nature 322, 743-746.



Kadonaga J.T., Jones K.A., and Tjian R. (1986). Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp 1. Trends Biochem. Sci. 11, 20-23.

Kakidani H., and Ptashne M. (1986). GAL4 activates gene expression in mammalian cells. Cell 52, 161-167.

Keller A.D., and Maniatis T. (1988). Identification of an inducible factor that binds to a positive regulatory element of the human β -interferon gene. Proc. Natl. Acad. Sci USA 85, 3309-3313.

Kohase M., May L.T., Tamm I., Vilcek J., and Sehgal P.B. (1987). A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin-1. Mol. Cell. Biol. 7, 272-280.

Korber B., Mermoud N., Hood L., and Stroynowski I. (1988). Regulation of gene expression by interferons: Control of H-2 Promoter responses. Science 239, 1302-1306.

Kozak M. (1987). An Analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. Nucl. Acids Res. 15, 8125-8143.

Krebs E., Eisenman R., Kuenzel E., Litchfield D., Lozeman F., Liischer B., and Sommercorn J. (1988). Casein Kinase II as a potentially important enzyme concerned with signal transduction. In the Molecular Biology of Signal Transduction (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory) Abstract p.35.

Kuhl D., de la Fuente J., Chaturvedi M., Parimoo S., Ryals J., Mayer F., and Weissmann C. (1987). Reversible silencing of enhancers by sequences derived from the human IFN- α promoter. Cell 50, 1057-1069.

Kyte J., and Doolittle R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157, 105-132.

Levy D.E., Kessler D.S., Pine R., Reich N., and Darnell J.E. (1988). Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. Genes and Development 2, 383-393.

Ma J., and Ptashne M. (1987). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognised by GAL80. Cell 50, 137-142.

Maxam A., and Gilbert W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. Meth. Enzym. 65, 499-560.

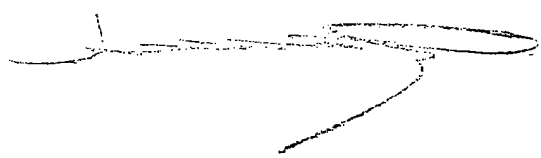
Moore R.N., Larsen H.S., Horohov D.W., and Rouse B.T. (1984). Endogenous regulation of macrophase proliferative expansion by colony-stimulation-factor-induced interferon. Science 223, 178-180.

Nedwin G., Naylor S., Sakaguchi A., Smith D., Jarrett-Nedsin J., Pennica D., Goeddel D., and Gray P. (1985). Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localisation. Nucl. Acids. Res. 13, 6361-6373.

Nir U., Cohen B., Chen L., and Revel M. (1984). A human IFN- β I gene deleted of promoter sequences upstream from the TATA box is controlled post-transcriptionally by dsRNA. Nucl. Acids Res. 12, 6979-6993.

Ohno S., and Taniguchi T. (1983). The 5'-flanking sequence of human interferon- β gene is responsible for viral induction of transcription. Nucl. Acids Res. 11, 5403-5412.

Onozaki K., Urawa H., Tamatani T., Iwamura Y., Hashimoto T., Baba T., Suzuki H., Yamada M., Yamamoto S., Oppenheim J.J., and Matsushima K. (1988). Synergistic interactions of



interleukin 1, interferon- β and tumor necrosis factor in terminally differentiating a mouse myeloid leukemic cell line (MI).

J. Immunol. 140, 112-119.

Pabo C.O., and Sauer R.T. (1984). Protein-DNA recognition. Ann. Rev. Biochem. 53, 293-321.

Raji N.B.K., and Pitha P.M. (1981). An analysis of interferon mRNA in human fibroblast cells induced to produce interferon.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 7426-7430.

Raji N.B.K., and Pitha P.M. (1983). Two levels of regulation of β -interferon gene expression in human cells.

Proc. Natl. Acad. Sci USA 80, 3923-3927.

Resnitzky D., Yarden A., Zipori D., and Kimchi A. (1986). Autocrine β -related interferon controls c-myc suppression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation.

Cell 46, 31-40.

Rosenthal N., Kress M., Gruss P., and Khoury G. (1983). BK viral enhancer element and a human cellular homolog.

Science 222, 749-755.

Ryals J., Dieks P., Ragg H., and Weissmann C. (1985). A 46-nucleotide promoter segment from an INF- α gene renders an unrelated promoter inducible by virus.

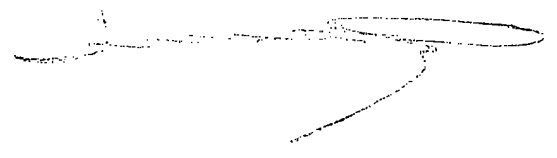
Cell 41, 497-507.

Shaw G., and Kamen R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation.

Cell 46, 659-667.

Singh H., LeBowitz J.H., Baldwin Jr. A.S., and Sharp P.A. (1988). Molecular cloning of an enhancer binding protein: Isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA.

Cell 52, 415-423.



Sugita K., Miyazaki J.I., Appella E., and Ozato K. (1987). Interferons increase transcription of a major histocompatibility class I gene via a 5' interferon consensus sequence.

Mol. Cell Biol 7, 2625-2630.

Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka C., Kashima N., Yoshimoto R., and Hamuro J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2.

Nature 302, 305-310.

Taniguchi T. (1988). regulation of cytokine gene expression.

Ann. Rev. Immunol. 6, 439-464.

Thomas P.S. (1980). Hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205.

Tiwari R.J., Kusari J., and Sen G.C. (1987). Functional equivalents of interferon-mediated signals needed for induction of a mRNA can be generated by double-stranded RNA and growth factors.

EMBO J. 6, 3373-3378.

Warren M.K., and Ralf P. (1986). Macrophage growth factor CSF-I stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor and colony stimulating activity.

J. Immunol. 137, 2281-2285.

Webster N., Jin J.R., Green S., Hollis L., and Chambon P. (1988). The yeast UAGs is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator.

Cell 52, 169-178.

Weissmann C., and Weber H. (1986). The interferon genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 251-300.

Young R.A., and Davis R.W. (1983). Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes.

Science 222, 778-782.

Zinn K., Dimaio D., and Maniatis T. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene.

Cell 34, 865-879.

Zullo J.N., Cochran B.H., Huang A.S., and Stiles C.D. (1985). Platelet-derived growth factor and doublestranded ribonucleic acids and stimulate expression of the same genes in 3T3 cells.

Cell 43, 793-800.

Lisboa, 4 de Maio de 1995.

Assinado e rubricado por: _____

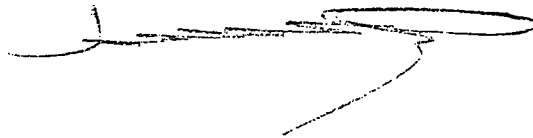
A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.



FIG .1

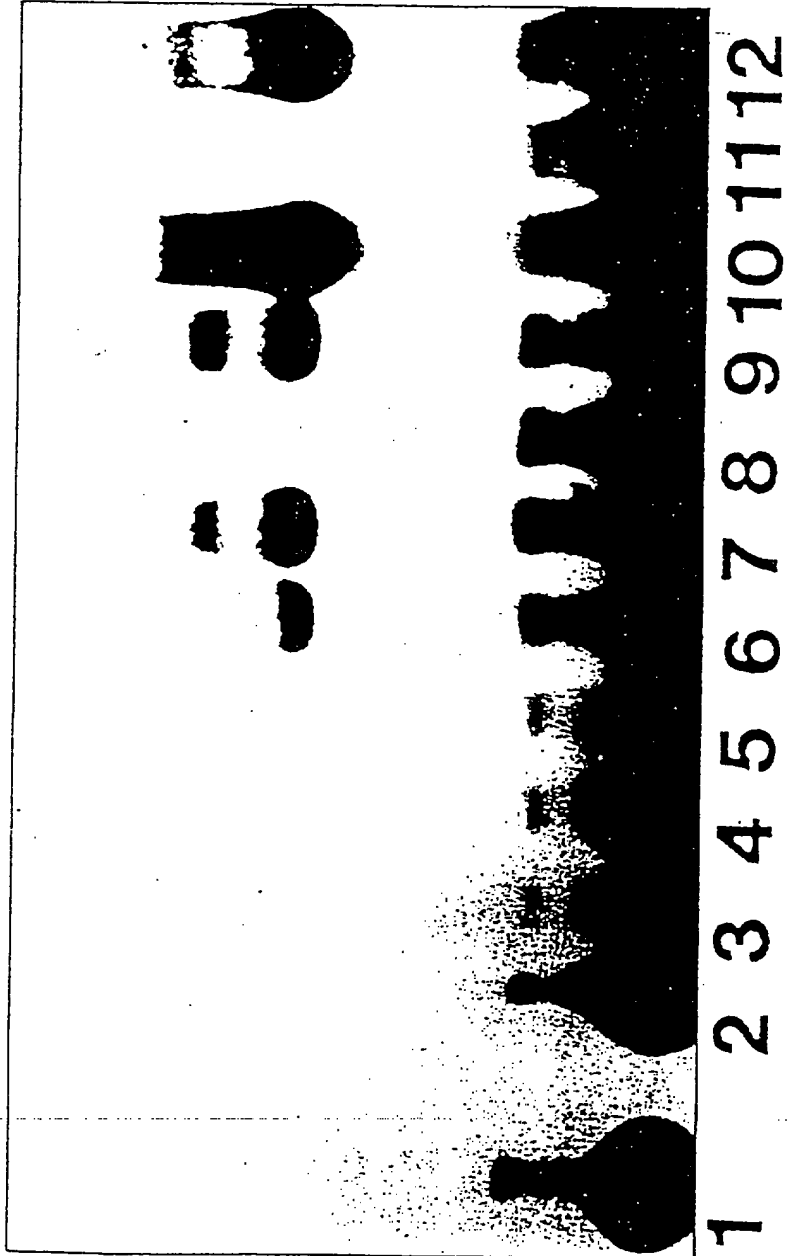


FIG. 2

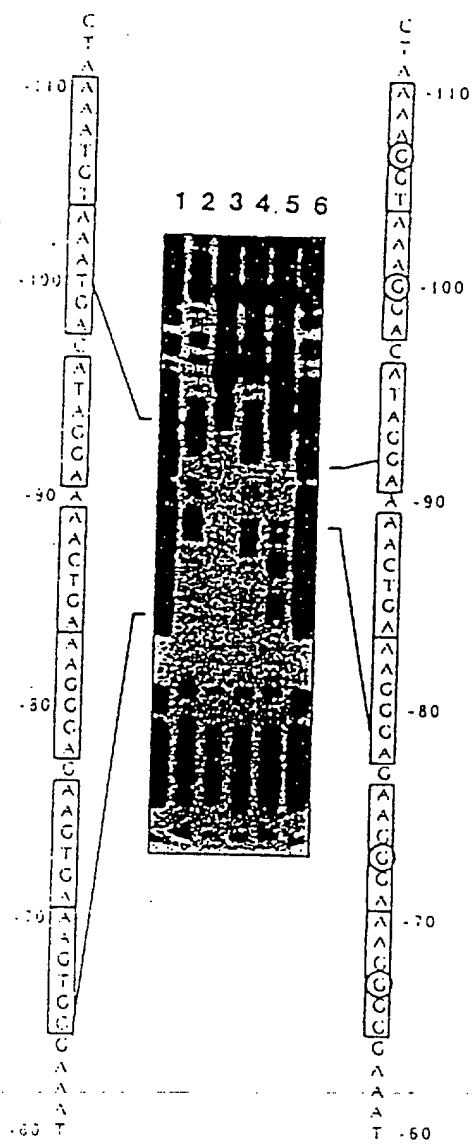


FIG. 3

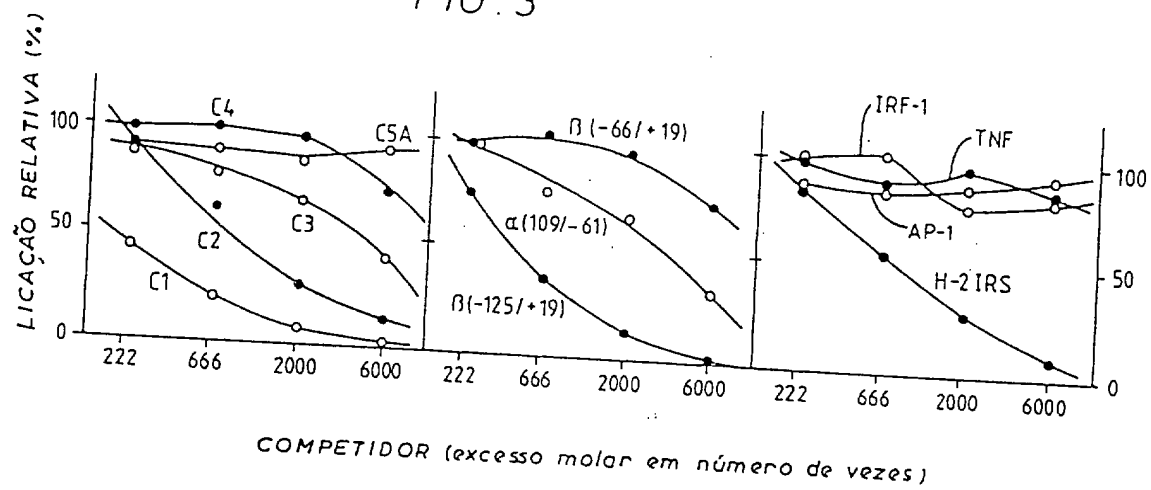


FIG. 4A

Página a

1 GGACGTGCTTTTCACAGTCTAAGCCGAACCGAACCGAACCGAACCGAACCGAACCGGGCC
60 GAGTTGCGCCGAGGTCAGCCGAGGTGGCCAGAGGACCCAGCATCTCGGGCATCTTTCCG
119 CTTCGTGCGCGCATCGCGTACCTACACCGCAACTCCGTGCCTCGCTCTCCGGCACCCCTC
178 TGCGAATCGCTCCTGCAGCAA λ L28-8 1
AGCCACC ATG CCA ATC ACT CGA ATG CGG
Met Arg Pro Trp Leu Glu Met Gln Ile Asn Ser Asn Gln Ile Pro
227 ATG AGA CCC TGG CTA GAG ATG CAG ATT AAT TCC AAC CAA ATC CCA
Gly Leu Ile Trp Ile Asn Lys Glu Glu Met Ile Phe Gln Ile Pro
272 GGG CTG ATC TGG ATC AAT AAA GAA GAG ATG ATC TTC CAG ATT CCA
Trp Lys His Ala Ala Lys His Gly Trp Asp Ile Asn Lys Asp Ala
317 TGG AAG CAC GCT GCT AAG CAC GGC TGG GAC ATC AAC AAG GAT GCC
Cys Leu Phe Arg Ser Trp Ala Ile His Thr Gly Arg Tyr Lys Ala
362 TGT CTG TTC CGG AGC TGG GCC ATT CAC ACA GGC CGA TAC AAA GCA
Gly Glu Lys Glu Pro Asp Pro Lys Thr Trp Lys Ala Asn Phe Arg
407 GGA GAA AAA GAG CCA GAT CCC AAG ACA TGG AAG GCA AAC TTC CGT
Cys Ala Met Asn Ser Leu Pro Asp Ile Glu Glu Val Lys Asp Gln
452 TGT GCC ATG AAC TCC CTG CCA GAC ATC GAG GAA GTG AAG GAT CAG
Ser Arg Asn Lys Gly Ser Ser Ala Val Arg Val Tyr Arg Met Leu
497 AGT AGG AAC AAG GGC AGC TCT GCT GTG CCG GTG TAC CGG ATG CTG
Pro Pro Leu Thr Arg Asn Gln Arg Lys Glu Arg Lys Ser Lys Ser
542 CCA CCC CTC ACC AAG AAC CAG AGG AAA GAG AGA AAG TCC AAG TCC
Ser Arg Asp Thr Lys Ser Lys Thr Lys Arg Lys Leu Cys Gly Asp
587 AGC CGA GAC ACT AAG AGC AAA ACC AAG AGG AAG CTG TGT GGA GAT
Val Ser Pro Asp Thr Phe Ser Asp Gly Leu Ser Ser Ser Thr Leu
632 GTT AGC CCC GAC ACT TTC TCT GAT GGA CTC AGC AGC TCT ACC CTA

FIG. 4A

Página b

160
 677 Pro Asp Asp His Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Gly Tyr Leu Gly Gln
 CCT GAT GAC CAC AGC AGT TAC ACC ACT CAG GGC TAC CTG GGT CAG

180
 722 Asp Leu Asp Met Glu Arg Asp Ile Thr Pro Ala Leu Ser Pro Cys
 GAC TTG GAT ATG GAA AGG GAC ATA ACT CCA GCA CTG TCA CCG TGT

200
 767 Val Val Ser Ser Ser Leu Ser Glu Trp His Met Gln Met Asp Ile
 GTC GTC AGC AGC AGT CTC TCT GAG TGG CAT ATG CAG ATG GAC ATT

Ile Pro Asp Ser Thr Thr Asp Leu Tyr Asn Leu Gln Val Ser Pro
 812 ATA CCA GAT AGC ACC ACT GAT CTG TAT AAC CTA CAG GTG TCA CCC

220
 857 Met Pro Ser Thr Ser Glu Ala Ala Thr Asp Glu Asp Glu Glu Gly
 ATG CCT TCC ACC TCC GAA GCC GCA ACA GAC GAG GAT GAG GAA GGG

240
 902 Lys Ile Ala Glu Asp Leu Met Lys Leu Phe Glu Gln Ser Glu Trp
 AAG ATA GCC GAA GAC CTT ATG AAG CTC TTT GAA CAG TCT GAG TGG

260
 947 Gln Pro Thr His Ile Asp Gly Lys Gly Tyr Leu Leu Asn Glu Pro
 CAG CCG ACA CAC ATC GAT GCC AAG GGA TAC TTG CTC AAT GAG CCA

Gly Thr Gln Leu Ser Ser Val Tyr Gly Asp Phe Ser Cys Lys Glu
 992 GGG ACC CAG CTC TCT TCT GTC TAT GGA GAC TTC AGC TGC AAA GAG

280
 1037 Glu Pro Glu Ile Asp Ser Pro Arg Gly Asp Ile Gly Ile Gly Ile
 GAA CCA GAG ATT GAC AGC CCT CGA GGG GAC ATT GGG ATA GGC ATA

300
 1082 Gln His Val Phe Thr Glu Met Lys Asn Met Asp Ser Ile Met Trp
 CAA CAT GTC TTC ACG GAG ATG AAG AAT ATG GAC TCC ATC ATG TGG

320
 1127 Met Asp Ser Leu Leu Gly Asn Ser Val Arg Leu Pro Pro Ser Ile
 ATG GAC AGC CTG CTG GGC AAC TCT GTG AGG CTG CCG CCC TCT ATT

329
 1172 Gln Ala Ile Pro Cys Ala Pro
 CAG GCC ATT CCT TGT GCA CCA TAG TTTGGGTCTCTGACCCGTTCTTGCCC

1222 TCCTGAGTGAGTTAGGCCTTGGCATCATGGTGGCTGTGATACAAAAAAGCTAGACTCC

1281 TGTGGGCCCCCTTGACACATGGCAAAGCATAGTCCCACTGCAAACAGGGGACCATCCTCC

FIG. 4A

Página c

1340 TTGGGTCAGTGGGCTCTCAGGGCTTAGGAGGCAGAGTCTGAGTTTTCTGTGAGGTGAA
1399 GCTGGCCCTGACTCCTAGGAAGATGGATTGGGGGTCTGAGGTGTAAGGCAGAGGCCAT
1458 GGACAGGAGTCATCTTCTAGCTTTTTAAAAGCCTTGTTCATAGAGAGGGTCTTATCGC
1517 TGGGCTGGCCCTGAGGGGAATAGACCAGCGCCACAGAAGAGCATAGCACTGCCCTAG
1576 AGCTGGCTCTGTACTAGGAGACAATTGCACTAAATGAGTCCTATTCCCAAAGAACTGCT
1635 GCCCTTCCCAACCGAGCCCTGGGATGGTTCCCAAGCCAGTGAAATGTGAAGGGAAAAAA
1694 AATGGGGTCCTGTGAAGGTTGGCTCCCTTAGCCTCAGAGGGAATCTGCCTCACTACCTG
1753 CTCCAGCTGTGGGGCTCAGGAAAAAAAAAATGGCACTTTCTCTGTGGACTTTGCCACATT
1812 TCTGATCAGAGGTGTACACTAACATTTCTCCCCAGTCTAGGCCTTTGCATTATTATTA
1871 TAGTGCCTTGCTGGTGCCTGCTGTCTCCTCAGGCCTTGGCAGTCCTCAGCAGGCCCAG
1930 GGAAAAGGGGGTTGTGAGCGCCTTGGCGTGACTCTTGACTATCTATTAGAAACGCCAC
1989 CTAAGTCTAAATGGTGTGTTGGTCAATGTGGTGGACCTGTGTAATATGTATATTTGTCT
2048 TTTTATAAAATTTTATTTAGTTGTTTACAAAAA 2082

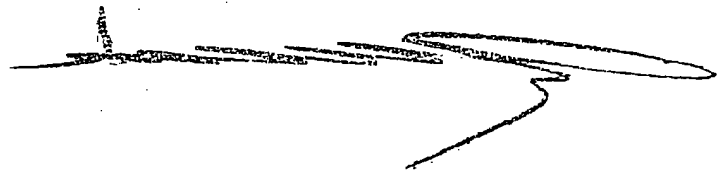


FIG. 4B

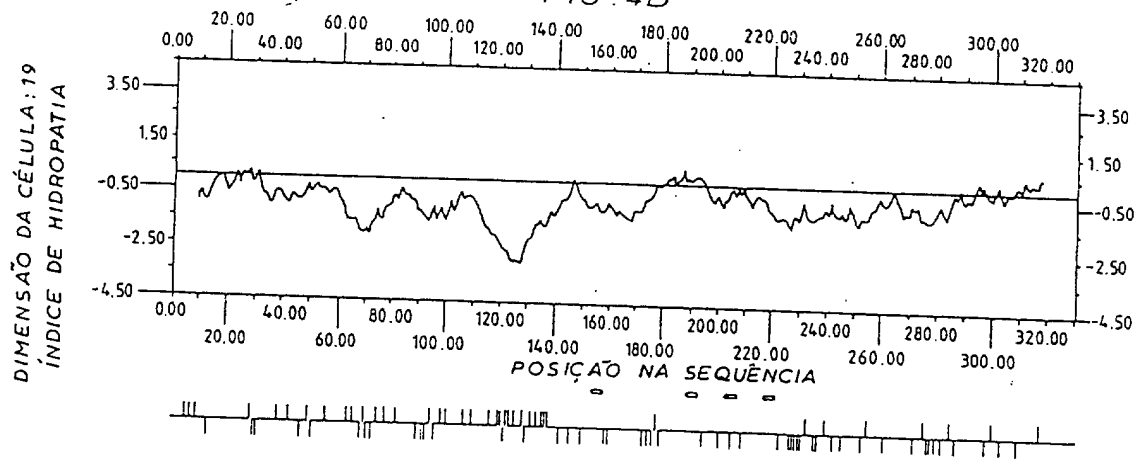




FIG. 5

RATO 1 25 50
MPITRMRMRPWLEMQINSNQIPGLIWINKEEMIFQIPWKHAAKHGWDINK
HOMEM *****
MPITWMRMRPWLEMQINSNQIPGLIWINKEEMILEIPWKHAAKHGWDINK

75 100
DACLFERSWAIHTGRYKAGEKEPDPKTWKANFRCAMNSLPDIEEVKDQSRN

DACLFERSWAIHTGRYKAGEKEPDPKTWKANFRCAMNSLPDIEEVKDQSRN

125 150
KGSSAVRVYRMLPPLTRNQRKERKSKSSRDTSKTKRKLCDVSPDTFSD

KGSSAVRVYRMLPPLTKNQRKERKSKSSRDAKSKAKRLSCGDSSPDTFSD

175 200
GLSSSTLPDDHSSYTTQGYLGQDLDMERDITPALSPCVVSSSLSEWHMQM

GLSSSTLPDDHSSYTVPGYM-QDLEVEQALTPALSPCAVSSTLPDWHIPV

225 250
DIIPDSTTDLYNLQVSPMPSTSEAATDEDEEGKIAEDLMKLFEQSEWPQT

EVVPDSTSDLYNFQVSPMPSISEATDEDEEGKLPEDIMKLLEQSEWQPT

275 300
HIDGKGYLLNEPGTQLSSVYGDFSCKEEPEIDSPRGDIGIGIQHVFTMK

NVDGKGYLLNEPGVQPTSVYGDFSCKEEPEIDSPGGDIGLSLQRVFTDLK

329
NMDSIMWMDSLLGNSVRLPPSIQAIPCAP

NMDAT-WLDSLLTP-VRLP-SIQAIPCAP

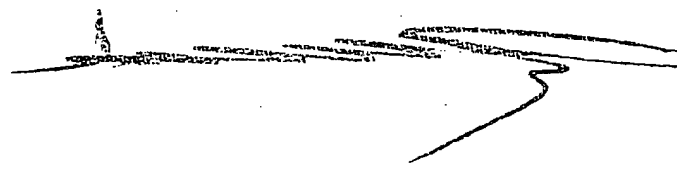
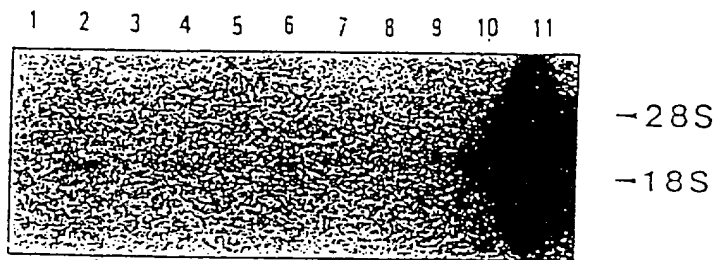
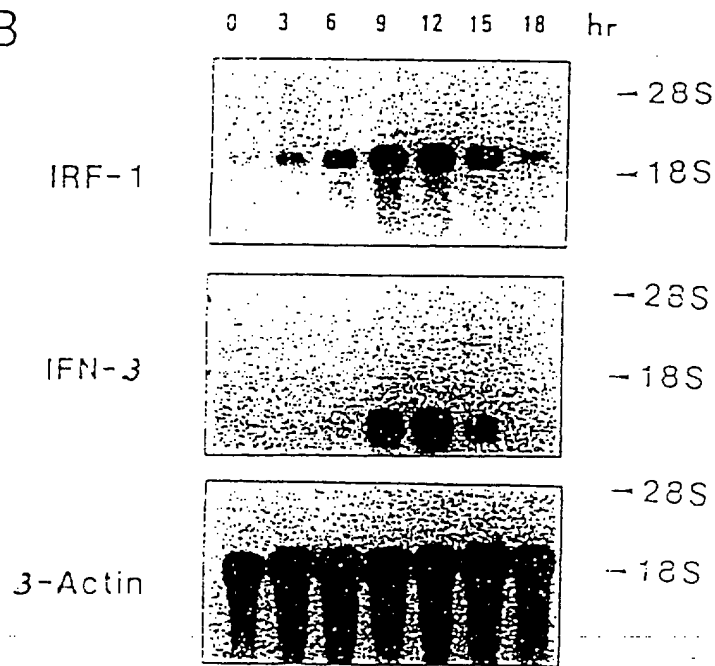


FIG. 6

A



B



PstI
 TCGCTCCTGCAG
 +213 .. +225

FIG. 7B

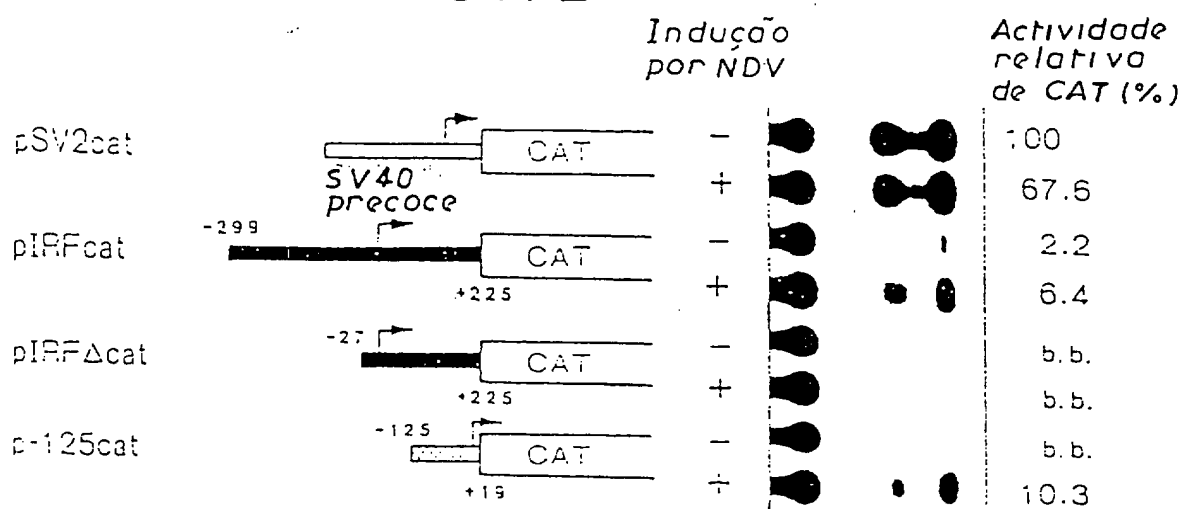


FIG. 8

Página b

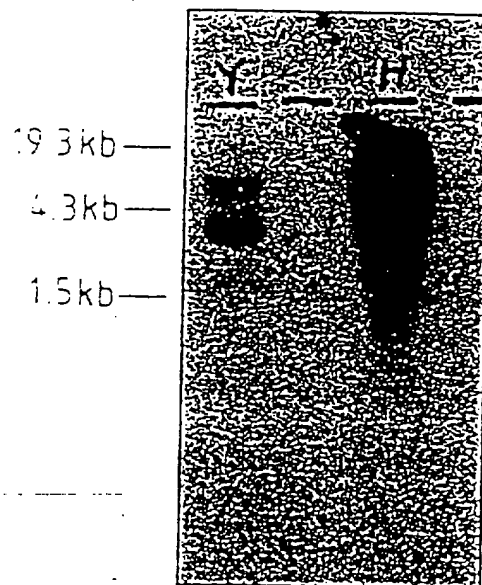
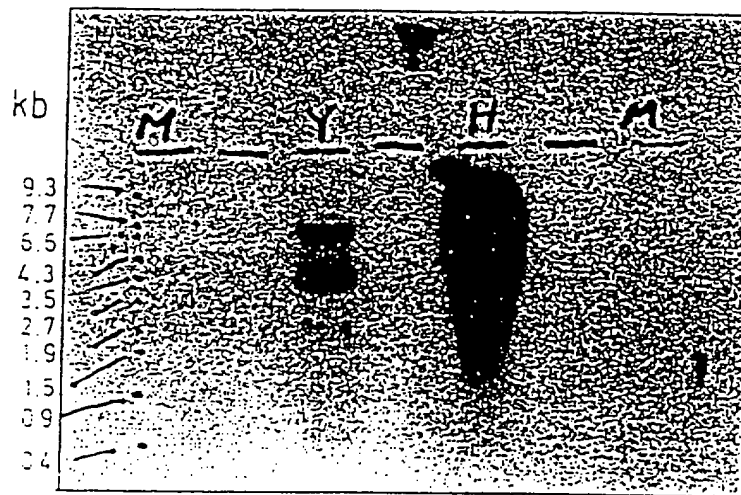
510 520 530 540 550
 AGGCTACATGCAGGACTTGGAGGTGGAGCAGGCCCTGACTCCAGCACTGT
 GlyTyrMetGlnAspLeuGluValGluGlnAlaLeuThrProAlaLeuSer
 560 570 580 590 600
 CGCCATGTGCTGTCAGCAGCACTCTCCCCGACTGGCACATCCCAGTGGAA
 ProCysAlaValSerSerThrLeuProAspTrpHisIleProValGlu
 610 620 630 640 650
 GTTGTGCCGGACAGCACCAGTGATCTGTACAACCTCCAGGTGTCACCCAT
 ValValProAspSerThrSerAspLeuTyrAsnPheGlnValSerProMet
 660 670 680 690 700
 GCCCTCCATCTCTGAAGCTACAACAGATGAGGATGAGGAAGGGAAATTAC
 ProSerIleSerGluAlaThrThrAspGluAspGluGluGlyLysLeuPro
 710 720 730 740 750
 CTGAGGACATCATGAAGCTCTTGGAGCAGTCGGAGTGGCAGCCAACAAAC
 GluAspIleMetLysLeuLeuGluGlnSerGluTrpGlnProThrAsn
 760 770 780 790 800
 GTGGATGGGAAGGGGTACCTACTCAATGAACCTGGAGTCCAGCCCACCTC
 ValAspGlyLysGlyTyrLeuLeuAsnGluProGlyValGlnProThrSer
 810 820 830 840 850
 TGTCTATGGAGACTTTAGCTGTAAAGGAGGAGCCAGAAATTGACAGCCCAG
 ValTyrGlyAspPheSerCysLysGluGluProGluIleAspSerProGly
 860 870 880 890 900
 GGGGGATATTGGGCTGAGTCTACAGCGTGTCTTCACAGATCTGAAGAAC
 GlyAspIleGlyLeuSerLeuGlnArgValPheThrAspLeuLysAsn
 910 920 930 940 950
 ATGGATGCCACCTGGCTGGACAGCCTGCTGACCCCAGTCCGGTTGCCCTC
 MetAspAlaThrTrpLeuAspSerLeuLeuThrProValArgLeuProSer
 960 970
 CATCCAGGCCATTCCCTGTGCACCGTAGCAGGGCCCCTGGGCCCCCTCTTA
 IleGlnAlaIleProCysAlaPro***
 TTCCTCTAGGCAAGCAGGACCTGGCATCATGGTGGATATGGTGCAGAGAA
 GCTGGACTTCTGTGGGCCCCCTCAACAGCCAAGTGTGACCCCACTGCCAAG
 TGGGGATGGGCCTCCCTCCTTGGGTCATTGACCTCTCAGGGCCTGGCAGG
 CCAGTGTCTGGGTTTTTCTTGTGGTGTAAGCTGGCCCTGCCTCCTGGGA
 AGATGAGGTTCTGAGACCAGTGTATCAGGTCAGGGACTTGGACAGGAGTC

FIG. 8

Página a

CGAGCCCCGCCGAACCGAGGCCACCCGGAGCCGTGCCCAGTCCACGC
CGGCCGTGCCCGGGCGCCTTAAGAACCAGGCAACCACTGCCTTCTTCCCT
CTTCCACTCGGAGTCGCGCTTCGCGCGCCCTCACTGCAGCCCCCTGCGTCG
CCGGGACCCTCGCGCGCGACCAGCCGAATCGCTCCTGCAGCAGAGCCAAC
10 20 30 40 50
ATGCCCATCACTTGGATGCGCATGAGACCCTGGCTAGAGATGCAGATTAA
MetProIleThrTrpMetArgMetArgProTrpLeuGluMetGlnIleAsn
60 70 80 90 100
TTCCAACCAAATCCCGGGGCTCATCTGGATTAATAAAGAGGAGATGATCT
SerAsnGlnIleProGlyLeuIleTrpIleAsnLysGluGluMetIleLeu
110 120 130 140 150
TGGAGATCCCATGGAAGCATGCTGCCAAGCATGGCTGGGACATCAACAAG
GluIleProTrpLysHisAlaAlaLysHisGlyTrpAspIleAsnLys
160 170 180 190 200
GATGCCTGTTTGTTCGGAGCTGGGCCATTACACAGGCCGATACAAAGC
AspAlaCysLeuPheArgSerTrpAlaIleHisThrGlyArgTyrLysAla
210 220 230 240 250
AGGGGAAAAGGAGCCAGATCCCAAGACGTGGAAGGCCAACTTTCGCTGTG
GlyGluLysGluProAspProLysThrTrpLysAlaAsnPheArgCysAla
260 270 280 290 300
CCATGAACTCCCTGCCAGATATCGAGGAGGTGAAAGACCAGAGCAGGAAC
MetAsnSerLeuProAspIleGluGluValLysAspGlnSerArgAsn
310 320 340 340 350
AAGGGCAGCTCAGCTGTGCGAGTGTACCGGATGCTTCCACCTCTCACCAA
LysGlySerSerAlaValArgValTyrArgMetLeuProProLeuThrLys
360 370 380 390 400
GAACCAGAGAAAAGAAAGTCAAGTCCAGCCGAGATGCTAAGAGCA
AsnGlnArgLysGluArgLysSerLysSerSerArgAspAlaLysSerLys
410 420 430 440 450
AGGCCAAGAGGAAGTCATGTGGGGATTCCAGCCCTGATACCTTCTCTGAT
AlaLysArgLysSerCysGlyAspSerSerProAspThrPheSerAsp
460 470 480 490 500
GGACTCAGCAGCTCCACTCTGCCTGATGACCACAGCAGCTACACAGTTCC
GlyLeuSerSerSerThrLeuProAspAspHisSerSerTyrThrValPro

FIG. 9.



REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de uma molécula de ADN recombinante que contém a seguinte sequência nucleotídica

Fórmula IIIa

```

      10      20      30      40
ATGCCGGTGGAAACGGATGCGAATGCGCCCGTGGCTGGAGGAGCAG

      50      60      70      80      90
ATAAATTCCAATACGATACCAGGGCTAAAGTGGCTGAACAAGGAG

      100     110     120     130
AAGAAGATTTTCCAGATCCCCTGGATGCATGCGGCTCGGCACGGA

      140     150     160     170     180
TGGGACGTGGAAAAGGATGCTCCGCTCTTCAGAAACTGGGCGATC

      190     200     210     220
CATACAGGAAAGCATCAACCAGGAATAGATAAACCAGATCCAAAA

      230     240     250     260     270
ACATGGAAAGCAAATTTTCGATGTGCCATGAATTCCCTGCCCGAC

      280     290     300     310
ATTGAGGAAGTGAAGGACAGAAGCATAAAGAAAGGAAACAACGCC

      320     330     340     350     360
TTCAGAGTCTACCGGATGCTGCCCTTATCCGAACGACCTTCCAAG

      370     380     390     400
AAAGGAAAGAAACCAAAGACAGAAAAAGAAGAGAGAGTTAAGCAC

      410     420     430     440     450
ATCAAGCAAGAACCAGTTGAGTCATCTTTGGGGCTTAGTAATGGA

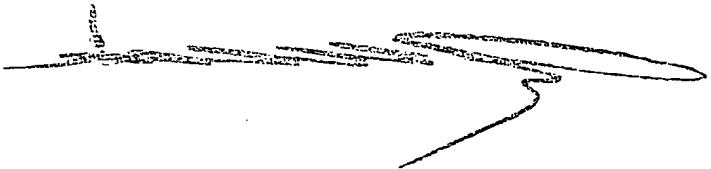
      460     470     480     490
GTAAGTGGCTTTTCTCCTGAGTATGCGGTCCTGACTTCAGCTATA

      500     510     520     530     540
AAAAATGAAGTGGATAGTACGGTGAACATCATAGTTGTAGGACAG

      550     560     570     580
TCCCATCTGGACAGCAACATTGAAGATCAAGAGATCGTCACTAAC

      590     600     610     620     630
CCGCCAGACATCTGCCAGGTTGTAGAAGTGACCACTGAGAGTGAT

```



```

      640      650      660      670
GACCAGCCAGTCAGCATGAGTGAGCTCTACCCTCTACAGATTTCT

      680      690      700      710      720
CCTGTGTCTTCCTACGCAGAAAGCGAAACTACCGACAGTGTGGCC

      730      740      750      760
AGTGATGAAGAGAACGCAGAGGGGAGACCACACTGGAGGAAGAGG

      770      780      790      800      810
AGCATCGAAGGCAAGCAGTACCTCAGCAACATGGGGACACGGAAC

      820      830      840      850
ACCTATCTGCTGCCCAGCATGGCGACCTTTGTACCTCCAACAAG

      860      870      880      890      900
CCAGATCTGCAGGTCACCATCAAAGAGGATAGCTGTCCGATGCCT

      910      920      930      940
TACAACAGCTCCTGGCCCCCATTTACAGACCTTCCCCTTCCTGCC

      950      960      970      980      990
CCAGTGACCCCCACGCCCAGCAGCAGTCGGCCAGACCGGGAGACC

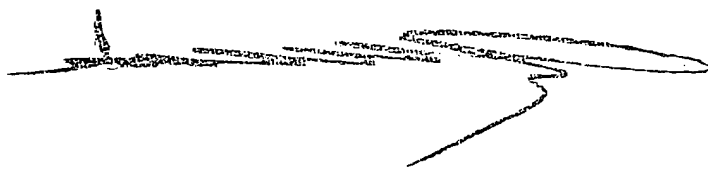
      1000      1010      1020      1030
CGGGCCAGTGTGTCATCAAGAAGACATCTGATATCACCCAGGCCCGT

      1040
GTCAAGAGCTGT

```

ou um fragmento, ou uma variante degenerada da molécula ou do fragmento, que codifica para uma proteína que se liga à sequência oligomérica repetida AAGTGA e aos elementos de regulação a montante do gene de IRF- β humano, caracterizado por se isolarem sequências de ADN que codificam para uma proteína com as propriedades referidas a partir de uma origem eucariótica, como por exemplo de origem humana ou com origem em ratos, galinhas, rãs ou em leveduras, e se seleccionar por hibridação cruzada um clone positivo.

2. Processo para a preparação de uma molécula de ADN recombinante que hibrida com a versão de sentido inverso da molécula definida de acordo com a reivindicação 1 e que



codifica para uma proteína que se liga à sequência oligomérica repetida AAGTGA e aos elementos de regulação a montante do gene de IRF- β humano, caracterizado por se utilizar como matriz uma cadeia de sentido directo obtida pelo processo da reivindicação 1.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a molécula de ADN recombinante preparada conter sequências de flanco a montante e a jusante conforme a seguinte fórmula:

Fórmula IVa

TCTCAGGCAAGCCGGGGA

CTAACTTTTAGTTTTGCTCCTGCGATTATTCAACTGACGGGCTTT

CATTTCCATTTTACACACCCTAACAACTCACACCTTGCGGGAT

TGTATTGGTAGCGTGGAATAAAAAAAAAAGCACATTGAGAGGGTACC

10 20 30 40
ATGCCGGTGGAACGGATGCGAATGCGCCCGTGGCTGGAGGAGCAG

50 60 70 80 90
ATAAATTCCAATACGATACCAGGGCTAAAGTGGCTGAACAAGGAG

100 110 120 130
AAGAAGATTTTCCAGATCCCCTGGATGCATGCGGCTCGGCACGGA

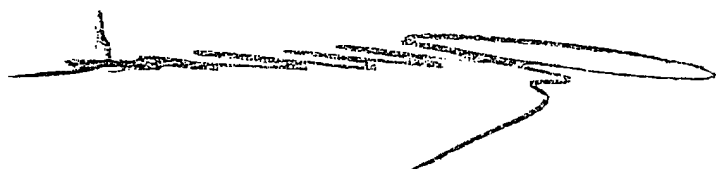
140 150 160 170 180
TGGGACGTGGAAAAGGATGCTCCGCTCTTCAGAACTGGGCGATC

190 200 210 220
CATACAGGAAAGCATCAACCAGGAATAGATAAACCAGATCCAAAA

230 240 250 260 270
ACATGGAAAGCAAATTTTCGATGTGCCATGAATTCCCTGCCCGAC

280 290 300 310
ATTGAGGAAGTGAAGGACAGAAGCATAAAGAAAGGAAACAACGCC

320 330 340 350 360
 TTCAGAGTCTACCGGATGCTGCCCTTATCCGAACGACCTTCCAAG
 370 380 390 400
 AAAGGAAAGAAACCAAGACAGAAAAAGAAGAGAGAGTTAAGCAC
 410 420 430 440 450
 ATCAAGCAAGAACCAGTTGAGTCATCTTTGGGGCTTAGTAATGGA
 460 470 480 490
 GTAAGTGGCTTTTCTCCTGAGTATGCGGTCCTGACTTCAGCTATA
 500 510 520 530 540
 AAAAATGAAGTGGATAGTACGGTGAACATCATAGTTGTAGGACAG
 550 560 570 580
 TCCCATCTGGACAGCAACATTGAAGATCAAGAGATCGTCACTAAC
 590 600 610 620 630
 CCGCCAGACATCTGCCAGGTTGTAGAAGTGACCACTGAGAGTGAT
 640 650 660 670
 GACCAGCCAGTCAGCATGAGTGAGCTCTACCCTCTACAGATTTCT
 680 690 700 710 720
 CCTGTGTCTTCCTACGCAGAAAGCGAAACTACCGACAGTGTGGCC
 730 740 750 760
 AGTGATGAAGAGAACGCAGAGGGGAGACCACACTGGAGGAAGAGG
 770 780 790 800 810
 AGCATCGAAGGCAAGCAGTACCTCAGCAACATGGGGACACGGAAC
 820 830 840 850
 ACCTATCTGCTGCCCAGCATGGCGACCTTTGTACCTCCAACAAG
 860 870 880 890 900
 CCAGATCTGCAGGTCACCATCAAAGACCATAGCTGTCCGATGCCT
 910 920 930 940
 TACAACAGCTCCTGGCCCCATTTACAGACCTTCCCCTTCCTGCC
 950 960 970 980 990
 CCAGTGACCCCCACGCCAGCAGCAGTCGGCCAGACCGGGAGACC
 1000 1010 1020 1030
 CGGGCCAGTGTCAATCAAGAAGACATCTGATATCACCCAGGCCCGT
 1040
 GTCAAGAGCTGTAAAGCCTTTGACTCTCCCTGGTGGTTGTTGGGA



TTTCTTAGCTTTGTGTTGTTCTTTGTTTGTATTATATTATTTTT
TTCTCTATGATACCTATCTTAGACACATCTAAGGGAGAAAGCCTT
GACGATAGATTATTGATTGCTGTGTCCAACCTCCAGAGCTGGAGCT
TCTTCTTAACTCAGGACTCCAGCCCCCCCCCCCCCTCGGTAGATG
CGTATCTCTAGAACCTGCTGGATCTGCCAGGGCTACTCCCTCAAG
TTCAAGGACCAACAGCCACACGGGCAGTGGACCTGCTGCGTTGCC
TACGGTCAAGGCCAGCATGGTGGAGTGGATGCCTCAGAACGGAGG
AGAAAATGTGAACTAGCTGGAATTTTTTTATTCTTGTGAATATGT
ACATAGGGCAGTACGAGCAATGTCGCGGGCTGCTTCTGCACCTTA
TCTTGAAGCACTTACAATAGGCCTTCTTGTAATCTTGCTCTCCTT
CACAGCACACTCGGCGACCCCTTCTGTGTCCACTACCCCACTACC
CACCCCTCCCTCCTCAACCCCTCCATCCCGGTCTCTATGCGCCC
CTTCCCCCAACCAATCCCATCACAACTCTTACCTATCCTTTCC
CTCCCAACCCCTTCTATCCCAGCCCACCACCTACCCCACTCCTCC
CCAACTCCTCCATTCTAGCCCATTACCCACGCCTCTCTCCTCAGC
CCAGCCTACCCCATCCCACCCTGTTCCCTTTCCTCCAGTTTCCTCT
CCTCAAAGGCAAGGCTCTACATCTTGGAGGAGGAGGAGGAGAAGA
AAATGAGTTTCTTCACCGCTGTCCCATTTTAAGACTGCTTGAATA
ATAAAAAAAATCTTTCTAATCTGCTATGCTTGAATGGCACGCGG
TACAAAGGAAAACCTGTCATGGAAATATTATGCAAATTCCCAGATC
TGAAGACGGAAAATACTCTAATTCTAACCAGAGCAAGCTTTTTTA
TTTTTTTATACAAGGGGAATATTTTATTCAAGGTAAAAAATTCT
AAATAAAATATAATTGTTTTTTATCTTTTCTACAGCAAATTTATA
ATTTTAAGATTCTTTTTCTGTTTCATCAGCAGTTGTTATTACATC
CCTTGTGGCACATTTTTTTTTTAATTTTGTAAGGTGAAAAAAA
ACTTTTATGAGCTCATGTAGCAATCAAATTATCCTGTGGATTGAT

AATAAATGAATATGGTATATAGTTAAAGATTTTAAAAAAAAAAAAA

4. Processo para a preparação de uma célula hospedeira transformada, caracterizado por se utilizar para a transformação uma molécula de ADN recombinante preparada de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3.
5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o gene ou o fragmento ou a sua variante degenerada definido na reivindicação 1 estar sob a regulação de um promotor constitutivo ou de um promotor indutível.
6. Processo de acordo com a reivindicação 4 ou a reivindicação 5, caracterizado por a célula hospedeira ser uma célula bacteriana ou uma célula de uma levedura ou uma célula de mamífero.
7. Processo para a preparação de uma proteína com a estrutura definida pela sequência de ADN definida na reivindicação 1 ou na reivindicação 3, caracterizado por compreender uma fase de efectuar uma cultura de uma célula hospedeira preparada de acordo com qualquer das reivindicações 4 a 6 e se isolar a proteína expressa pela cultura.

Lisboa, 7 de Agosto de 1995.
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned below the official text.