

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication:

0 293 357 B1

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN(45) Date de publication de fascicule du brevet: **05.05.93** (51) Int. Cl.⁵: **C07K 15/00**(21) Numéro de dépôt: **88870095.2**(22) Date de dépôt: **24.05.88**(54) **Expression de la proapolipoprotéine A-I humaine.**(30) Priorité: **28.05.87 GB 8712540**(43) Date de publication de la demande:
30.11.88 Bulletin 88/48(45) Mention de la délivrance du brevet:
05.05.93 Bulletin 93/18(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE(56) Documents cités:
EP-A- 0 267 703
WO-A- 86/05810

FEBS LETTERS, vol. 194, no. 2, janvier 1986,
pages 343-346, Federation of European
Biochemical Societies; R. LORENZETTI et al.:
"Expression of the human apolipoprotein AI
gene fused to the E. coli gene for beta-
galactosidase"

NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 13, no. 6,
mars 1985, pages 1923-1938, IRL Press Ltd,
GB; G. BUELL et al.: "Optimizing the expres-
sion in E. coli of a synthetic gene encoding
somatomedin-C (IGF-I)"

(73) Titulaire: **U C B, S.A.**
326, Avenue Louise, Bte 7
B-1050 Bruxelles(BE)(72) Inventeur: **Bollen, Alex**
65, Gaasbeekstraat
B-1711 Itterbeek(BE)
Inventeur: **Gobert, Jean**
120, rue du Cornet
B-1040 Bruxelles(BE)
Inventeur: **Wulfert, Ernst**
52, Avenue des Aubépines
B-1180 Bruxelles(BE)(74) Mandataire: **Dusseldorp, Raymond et al**
U.C.B. S.A. Département D.T.B. 326, avenue
Louise, Bte 7
B-1050 Bruxelles (BE)

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

La présente invention se rapporte à de nouvelles séquences d'ADN recombinantes comprenant une séquence codant pour la proapolipoprotéine A-I humaine, à des vecteurs de clonage et d'expression contenant ces séquences d'ADN, aux cellules hôtes transformées avec ces vecteurs d'expression, ainsi qu'aux procédés de production de la proapolipoprotéine A-I humaine en utilisant les nouvelles séquences d'ADN recombinantes, les vecteurs et transformants.

L'apolipoprotéine A-I (apo A-I) humaine est le constituant protéinique principal des lipoprotéines de haute densité (LHD) et des chylomicrons de la lymphe. Le foie et l'intestin grêle sont les centres primaires de la synthèse de l'apo A-I. L'apo A-I est synthétisée dans ces organes sous la forme d'un précurseur protéinique (preproapo A-I). Un clivage cotraductionnel du prépeptide intervient à l'intérieur de la cellule et le proapo A-I est sécrétée dans le plasma et dans la lymphe.

Le proapo A-I contient six acides aminés supplémentaires (Arg - His - Phe - Trp - Gln - Gln) qui sont fixés au groupe amino terminal de l'apo A-I. En atteignant la région vasculaire, la proapo A-I est clivée in vivo par une enzyme protéolytique spécifique (apo A-I propeptidase) pour donner l'apo A-I mature.

L'apo A-I mature est un polypeptide unique non glycosylé de séquence connue, composé de 243 acides aminés (H.B. BREWER et coll., Biochem.Biophys.Res.Comm.,80,(1978),623-630); il sert de cofacteur pour l'enzyme plasmatique de la lécithine: cholestérol acyltransférase, qui est responsable de la formation dans le plasma de la plupart des esters du cholestérol. Des défauts dans les structures ou dans la biosynthèse de l'apolipoprotéine peuvent conduire à des désordres dans le système de transport des lipides plasmatiques et au développement d'une maladie des artères coronaires. On a montré que de faibles taux plasmatiques en apo A-I et en LHD constituent un facteur de risque important pour des crises cardiaques (infarctus du myocarde) et pour d'autres maladies athérosclérotiques vasculaires. Des mutations dans le gène codant pour l'apo A-I en particulier, ont été associées à des réductions du taux de LHD ainsi qu'à des maladies prématurées des artères coronaires.

L'apo A-I et les LHD sont les constituants majeurs du plasma qui participent au transfert du cholestérol des tissus périphériques (artères) vers le foie (appelé aussi transport inverse du cholestérol) pour être excrété par l'organisme. Etant donné que l'accumulation du cholestérol dans les artères est la caractéristique et le mécanisme le plus important de l'athérosclérose, la stimulation du transport inverse du cholestérol au moyen de l'apo A-I pourrait retarder et inverser le processus athérosclérotique et par là diminuer l'incidence des crises cardiaques.

La maturation de la proapo A-I en apo A-I peut se produire quantitativement à l'extérieur de la cellule avec un temps de séjour dans le sang inférieur à 12 heures. Etant donné que la proapo A-I est le précurseur majeur, si pas le seul, de l'apo A-I mature, il pourrait être utilisé dans une thérapeutique de substitution chaque fois que les taux de LHD diminuent, par exemple dans des déficiences héréditaires ou acquises. A cause de l'utilité thérapeutique de l'apo A-I en général, les chercheurs ont recherché des techniques qui permettent de produire l'apo A-I en grandes quantités. Traditionnellement, de telles techniques comportent la purification de l'apo A-I à partir du plasma sanguin.

Plusieurs publications (P. CHEUNG et L. CHAN, Nucleic Acids Res.11,(1983),3703-3715; J.J. SEIL - HAMER et coll., DNA,3,(1984),309-317 et la demande de brevet japonaise n° 96998/86) ont montré que l'ADN complémentaire codant pour la préproapo A-I peut être préparé par des techniques de génie génétique bien connues.

R. LORENZETTI et coll., (FEBS Lett.194,(1986),343-346) ont montré que l'apo A-I peut être exprimée dans E. coli sous la forme d'une protéine fusionnée à la beta-galactosidase, non clivable. Cependant, des tentatives pour exprimer l'apo A-I mature sous la forme d'une protéine non fusionnée sont restées sans succès.

Dans la demande de brevet japonaise n° 96998/86 citée ci-dessus, on décrit l'expression d'une protéine semblable à l'apolipoprotéine A-I humaine, dans E. coli qui a été transformé par un plasmide PHAIE-I contenant le gène de structure de l'apo A-I sous le contrôle du promoteur tac. Cependant, le gène de structure est incomplet et se compose des codons pour les acides aminés +4 à +243, précédés par un codon ATG d'initiation de la traduction. Il en résulte que le produit d'expression obtenu contient la méthionine N-terminale (correspondant au codon ATG) qui peut provoquer des effets secondaires lors de son emploi en thérapeutique.

J.B. MALLORY et coll. (J.Biol.Chem.262,(1987),4241-4247; demandes de brevet internationales PCT WO 86/04920 et WO 87/02062) décrivent l'expression de l'apolipoprotéine A-I humaine dans des cellules ovariennes d'hamsters chinois (culture de cellules animales). La construction utilisée contient le gène complet de la préproapolipoprotéine A-I humaine. Les cellules ovariennes d'hamsters chinois semblent transformer la forme proapo en la forme apo mature, puisque seulement 5 à 10% de la protéine apo A-I

sécritée est de la proapo A-I, le restant étant la protéine apo A-I mature. La productivité du système est relativement faible, puisque $0,5 \times 10^5$ cellules sécrètent seulement 25-30 µg/ml d'apo A-I en 24 heures. Dans la demande de brevet internationale PCT WO 87/02062, quelques exemples de réalisation se rapportent à l'expression de l'apolipoprotéine A-I humaine dans d'autres hôtes, tels que *E. coli* (hôte bactérien) et *S. cerevisiae* (levure). Cependant, aucune des constructions employées ne contient l'information génétique pour la forme proapo et la protéine exprimée n'est pas la proapolipoprotéine A-I humaine.

La présente invention concerne les moyens et les méthodes pour préparer la proapolipoprotéine A-I humaine par la technologie de l'ADN recombinant, c'est-à-dire la protéine proapo A-I mature qui est susceptible d'être clivée par l'enzyme protéolytique spécifique apo A-I propeptidase. Par l'expression "mature" telle qu'elle est utilisée ici, on entend non seulement la proapo A-I humaine telle quelle, mais aussi la protéine correspondante dont le premier acide aminé est la méthionine et dont la présence est due au codon ATG d'initiation de la traduction dans la construction du vecteur d'expression.

La présente invention se rapporte à la construction de vecteurs de clonage et d'expression contenant une séquence d'ADN codant pour la proapo A-I humaine, de manière à permettre l'amplification et par conséquent l'expression de la protéine proapo A-I humaine mature aussi bien que la met-proapo A-I, ses conjugués de fusion ou ses conjugués avec le signal N-terminal. De même, la présente invention concerne des cultures de cellules viables ou des microorganismes génétiquement modifiés parce qu'ils hébergent de tels vecteurs, et capables de produire le polypeptide proapo A-I humaine. En outre, la présente invention procure la proapo A-I humaine dans un état physique distinct de celui que l'on trouve ou que l'on isole à partir d'une source ou d'un environnement naturels; en raison de sa méthode de préparation, la proapo A-I humaine est essentiellement débarrassée des protéines endogènes habituelles et d'autres matériaux ou substances d'origine.

La présente invention concerne la production de la proapo A-I humaine au moyen de la technique de l'ADN recombinant dans tous ses aspects et ne doit pas être interprétée comme étant limitée à des détails spécifiques décrits et englobés dans le cadre de l'invention.

Un aspect fondamental de la présente invention concerne la production d'une protéine qui consiste en ou contient la proapo A-I humaine mature et qui, dès lors, peut être convertie, *in vitro* et *in vivo*, en apo A-I humaine mature par l'action protéolytique de l'apo A-I propeptidase. Le produit proapo A-I humain peut être utilisé tel quel pour des usages thérapeutiques; on peut utiliser également la met-proapo A-I, si la présence du radical méthionyle est pharmaceutiquement acceptable, parce que ce produit peut être converti naturellement et efficacement dans la circulation sanguine par la propeptidase naturelle pour fournir de l'apo A-I humaine mature authentique. Si on le désire, la proapo A-I humaine peut être produite dans des microorganismes ou dans des cultures de cellules sélectionnées qui sont capables de traiter la méthionine N-terminale et qui, par conséquent, sont capables de produire la proapo A-I humaine sous une forme qui ne contient pas la méthionine N-terminale. Alternativement, qu'elle contienne ou non un radical méthionyl N-terminal, la proapo A-I humaine peut être clivée *in vitro* pour obtenir l'apo A-I humaine mature, qui peut être utilisée pour des applications thérapeutiques. Il en est de même pour les conjugués de fusion et les conjugués incluant le signal N-terminal de la proapo A-I; le clivage produit l'apo A-I humaine authentique dépourvue de la méthionine N-terminale.

Un second aspect important de la présente invention réside dans l'emploi d'une séquence modifiée codant pour au moins une partie de la molécule de la proapo A-I humaine; cette séquence codante modifiée améliore l'efficacité de la traduction en raison de la réduction ou même de la prévention de la formation de structures en épingle. Il est possible que R. LORENZETTI et coll. (FBS Lett. 194, (1986), 343-346) n'aient pas pu observer l'expression d'une protéine apo A-I mature non fusionnée parce que leurs constructions d'ADN étaient susceptibles de former de manière appréciable des structures en épingle, conduisant à une expression très inefficace. On a constaté avec surprise qu'une expression efficace peut être assurée par une modification appropriée de quelques codons dans la séquence codant pour les acides aminés -6 à +14 de la proapo A-I humaine. L'expression "modification appropriée" telle qu'elle est utilisée ici implique que quelques-uns des codons naturels sont remplacés par d'autres codons qui, selon le code génétique, représentent les mêmes acides aminés, et elle implique, en outre, que toutes les modifications prises ensemble conduisent à la réduction ou même à la prévention de la formation de structures en épingle. Il est important de signaler que les modifications de la séquence d'ADN n'ont aucun effet sur la nature du site de clivage de la propeptidase, vu que la séquence d'acides aminés reconnue par la propeptidase est préservée dans la construction.

Au niveau des protéines, la présente invention se rapporte à la proapo A-I humaine en tant que produit d'une culture de cellules ou d'un microorganisme génétiquement modifié. Cette proapo A-I humaine peut se présenter sous la forme d'une proapo A-I mature, sous la forme d'une proapo A-I mature précédée par un résidu de méthionine, sous la forme d'une protéine fusionnée telle que par

exemple beta - galactosidase - proapo A-I et sous la forme du composé préproapo A-I. Le produit obtenu est essentiellement débarrassé des protéines endogènes habituelles et d'autres matériaux ou substances d'origine commune à la source naturelle (plasma de sang) de la protéine concernée. La culture de cellules ou le microorganisme utilisé pour la production n'est pas limité à des lignées cellulaires et à des organismes spécifiques: tant les cellules procaryotes que les cellules eucaryotes peuvent être employées, y compris les lignées cellulaires animales et humaines. Seulement à titre illustratif, nous donnons ici l'exemple de l'expression dans la bactérie *E. coli* (comme représentant des cellules procaryotes) et dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que dans des cellules d'insectes infectées par baculovirus (comme représentants des cellules eucaryotes).

Au niveau des protéines, la présente invention se rapporte également à l'apo A-I humaine obtenue par le traitement par l'apo A-I propeptidase de la proapo A-I humaine préparée ci-dessus. Cette apo A-I humaine sera identique à la forme authentique de l'apo A-I mature humaine et sera dépourvue de tout résidu de méthionine N-terminal.

Au niveau de l'application, la présente invention se rapporte aux compositions pharmaceutiques renfermant la proapo A-I humaine et/ou l'apo A-I humaine ci-dessus, et contenant en outre, au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable, un solvant, un diluant ou un excipient convenablement choisi selon la voie d'administration et les exigences habituelles dans la formulation des compositions pharmaceutiques.

Au niveau de l'ADN, la présente invention se rapporte à une séquence d'ADN recombinante comprenant une séquence qui code pour la proapolipoprotéine A-I humaine dans laquelle une partie de la séquence codante naturelle a été remplacée par un fragment d'ADN codant pour les mêmes acides aminés mais consistant en une séquence de nucléotides différente, de manière à réduire ou à prévenir la formation de structures en épingle. Selon une forme de réalisation spécifique préférée, la séquence naturelle codant pour les acides aminés -6 à +14 de la proapo A-I a été remplacée par la séquence (un seul brin indiqué):

5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3'

ladite séquence comprenant un codon supplémentaire ATG d'initiation de la traduction et des codons modifiés pour les résidus des acides aminés -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 et +14.

Sur le plan de l'ADN, la présente invention se rapporte également à des vecteurs de clonage répliquables et à des vecteurs d'expression comprenant la séquence d'ADN recombinante précitée qui code pour la proapo A-I humaine. La présente invention se rapporte plus particulièrement aux plasmides recombinants pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612 et pNIV1613 dont la construction est décrite ci-après. Les premiers plasmides cités, pULB9291 et pULB9292 contiennent le gène de structure modifié de la proapo A-I, précédé par un codon ATG et sous le contrôle du promoteur P_L du phage lambda. Ces plasmides sont des vecteurs d'expression qui conviennent pour *E. coli* et commandent la synthèse de la proapo A-I humaine, qui peut être clivée par la propeptidase pour engendrer une apo A-I humaine mature authentique. Lorsqu'il est introduit dans *E. coli*, le plasmide pULB9296 commande l'expression d'une protéine fusionnée contenant la betagalactosidase et le proapo A-I humaine sous le contrôle de la région du promoteur *lac* de *E. coli*. Etant donné que le produit de fusion contient encore la séquence de clivage de la propeptidase, il peut être clivé pour fournir de l'apo A-I mature humaine authentique.

Le plasmide pULB9299 est un vecteur d'expression qui convient pour des espèces de levures et contient les régions du promoteur et du terminateur de la transcription de l'ARG3 pour assurer une expression efficace dans une levure. A nouveau, la proapo A-I humaine obtenue peut être scindée par la propeptidase pour fournir de l'apo A-I humaine mature authentique.

Le plasmide pNIV1612 contient le gène de structure de la proapo A-I fusionné à la séquence d'ADN du peptide signal de la protéine *OmpA* de *E. coli* et sous le contrôle du promoteur *lpp* (lipoprotéine) et du promoteur-opérateur *lac*. Dans la construction, la séquence codante pour le peptide signal de *ompA* précède la séquence de la proapo A-I sans le codon ATG d'initiation de la traduction. Le plasmide est un vecteur de sécrétion approprié pour *E. coli* et commande la synthèse de la proapo A-I humaine qui peut être sécrétée dans le périplasme sans la méthionine N-terminale. Le plasmide pNIV1613 est un vecteur de transfert pour l'introduction de la séquence de l'ADNc de la proapo A-I humaine dans le baculovirus. Il comprend le promoteur polyhédrine du baculovirus et le gène de structure de la proapo A-I, y compris le codon ATG d'initiation de la traduction. Conjointement avec la souche sauvage de baculovirus (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV), le plasmide pNIV1613 commande la synthèse de la proapo A-I dans des cellules d'insectes et peut se retrouver débarrassée de la méthionine après des modifications post-traductionnelles dans les cellules d'insectes.

Finalement, la présente invention se rapporte également à des cultures de cellules et à des microorganismes qui ont été transformés par un vecteur de clonage ou par un vecteur d'expression tel que décrit ci-dessus, et en particulier, à des cultures de cellules et à des microorganismes transformés qui sont capables de produire de la proapo A-I humaine. L'expression "transformés" telle qu'elle est utilisée ici, prend le sens large de "génétiquement modifiés" et n'est certainement pas limitée au concept étroit de "transformation bactérienne". Dépendant de la nature du vecteur employé et de l'hôte sélectionné, toute technique de génie génétique compatible pour obtenir la modification génétique désirée, peut être utilisée, y compris la transfection, la traduction, etc.

Les cultures de cellules et les microorganismes préparés selon l'invention peuvent être utilisés pour une production par fermentation à l'échelle industrielle de la proapolipoprotéine A-I humaine.

L'invention décrite ici a été réalisée en employant entre autres la souche MM 294 du microorganisme *E. coli* K12 (endoA⁻ thi⁻, hsdR⁻, supE⁻); cette souche a été déposée à l'American Type Culture Collection (ATCC No. 33625) sans restriction en ce qui concerne son accessibilité. Toutefois, différentes autres souches microbiennes sont utilisables, comprenant des souches connues de *E. coli* telles que *E. coli* B, *E. coli* B, *E. coli* x 1776 (ATCC No. 31537, déposée le 3 juillet 1979, sans restriction), *E. coli* AR58, dérivée de N99 (ATCC No. 33956) avec cIII⁻, ci 857, bio⁻, fonctions delta H dépourvues de lambda, vendue par PL-PHARMACIA (J.E. MOTT et coll., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82,(1985),88-92; G. DEVARE et coll., Cell,36,(1984),43-49), *E. coli* JM101 (ATCC No 33876) (J. MESSING et coll., Nucleic Acids Res.9,(1981),309-321), ou *E. coli* JA221 (lpp⁻, hdsM⁺, trpE5, leuB6, lacY, recA1/F', lacI^q, lac⁺, pro⁺) (J. GHAYEB et coll., EMBO J.3,(1984),2437-2442), ou d'autres souches microbiennes dont beaucoup sont déposées et accessibles auprès d'institutions de dépôts de microorganismes reconnues, telles que l'American Type Culture Collection (ATCC) -- cf. les listes du catalogue ATCC. Ces autres microorganismes comprennent par exemple, *Bacilli* tels que *Bacillus subtilis* et d'autres Enterobactériacées parmi lesquelles on peut citer, par exemple, *Salmonella Typhimurium* et *Serratia marcesans*, utilisant des plasmides qui peuvent se répliquer et exprimer des séquences de gènes hétérologues.

Les plasmides d'expression pour usage chez les bactéries, par exemple *E. coli*, sont habituellement obtenus à partir du plasmide pBR322 utilisé comme vecteur (déposé à l'ATCC sous le numéro d'accès 37017) et en insérant de manière appropriée, la séquence du gène hétérologue en même temps que les signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, dans la phase de lecture correcte avec un promoteur fonctionnel, en tirant avantage de sites de restriction naturels ou créés synthétiquement. Le vecteur portera un ou plusieurs gènes caractéristiques de sélection phénotypique et une origine de réplication pour assurer l'amplification dans l'hôte. A nouveau, l'insert hétérologue peut être aligné de manière à être exprimé en même temps qu'une pré-séquence fusionnée, provenant par exemple des gènes du système lac.

Les vecteurs d'expression pour baculovirus, par exemple pACRP8 et pACYM1 (Y. MATSUURA et coll., J.Gen.Virol.68,(1987),1233-1250) et le baculovirus type sauvage (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) sont largement utilisés à l'heure actuelle. Ils sont décrits en détail dans la littérature et peuvent être obtenus principalement auprès de TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION.

Selon la présente invention, on peut aussi utiliser différentes cellules d'insectes comme hôte pour des vecteurs d'expression compatibles, telles que par exemple des cellules de *Spodoptera frugiperda* Sf9 (M.D. SUMMER et G.E. SMITH. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect cell culture Procedures, Texas University, College Station, (1987); ATCC CRL 1711).

Selon la présente invention, on peut aussi utiliser différentes souches de levures hébergeant des vecteurs d'expression compatibles tels que le plasmide YRp7 (D.T. STINCHCOMB et coll., Nature,282,(1979),39-43) qui est capable de sélection et de réplication à la fois dans *E. coli* et dans la levure, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*.

Des souches de levures qui peuvent être utilisées sont la souche RH218 (G. MIOZZARI et coll., J.Bacteriol.134,(1978),48-59) déposée à l'American Type Culture Collection sans restriction (ATCC No. 44076), la souche 10S44c (T. CABEZON et coll., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,(1984),8594-8598) qui a le génotype leu2-3, leu2-112, pep 4-3 (M. HOYLAERTS et coll., FEBS Lett.204,(1986),83-87) et la souche lc 1697d (argJ, leu2-1) bradytrophe pour l'arginine (ATCC No. 20631).

Pour exprimer un gène hétérologue tel que l'ADNc pour la proapo A-I humaine dans une levure, il est nécessaire de construire un vecteur plasmidique contenant quatre composants.

Le premier composant est le fragment qui permet la transformation à la fois de *E. coli* et de la levure et qui doit par conséquent contenir un gène de sélection provenant de chaque organisme. Ce peut être le gène responsable de la résistance à l'ampicilline provenant de *E. coli* (cf. "AmpA") et le gène leu2 provenant de la levure. Ce composant requiert également une origine de réplication provenant de chaque organisme pour être retenu comme ADN plasmidique dans les deux organismes. Ce peut être l'origine de *E. coli* provenant de pBR322 et l'origine *arsI* du chromosome III de la levure ou l'origine de réplication de

l'ADN circulaire 2μ.

Le second composant du plasmide est une séquence située en 5' d'un gène de levure fortement exprimé pour promouvoir la transcription d'un gène de structure placé en aval. La séquence située en 5' peut être celle provenant des gènes TDH3 ou ARG3 de la levure. Le fragment est construit de manière à éliminer les séquences de structure de TDH3 ou ARG3 qui sont remplacées par une séquence contenant des sites de restriction alternatifs tels que les sites de restriction NcoI ou BamHI, pour le rattachement commode de cette séquence située en 5' au gène de structure.

Le troisième composant du système est un gène de structure construit de telle manière qu'il contient à la fois un signal ATG d'initiation de la traduction et un signal de terminaison de la traduction.

Le quatrième composant est une séquence d'ADN de levure contenant la séquence située en 3' d'un gène de levure qui renferme les signaux appropriés de terminaison de la transcription et de polyadénylation. Par exemple, des plasmides commandant la production de la proapo A-I humaine dans la levure peuvent être construits en insérant des fragments de gène pour le polypeptide proapo A-I humain dans le site BamHI du plasmide d'expression pRIT 10774 décrit dans la demande de brevet européen No. 151102.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit de constructions préférées de vecteurs contenant une séquence d'ADN recombinante selon l'invention et des conditions dans lesquelles ces vecteurs sont utilisables. Il sera fait référence à cette occasion aux dessins dans lesquels:

- les figures 1A et B montrent la séquence des nucléotides et des acides aminés de la préproapo A-I humaine. La séquence des nucléotides de l'ARN messager de la préproapo A-I humaine a été déterminée à partir de l'analyse de la séquence d'ADN de l'ADNc du clone pULB1609. Les acides aminés prévus dans le peptide signal, dans le propeptide et dans le polypeptide apo A-I mature sont indiqués et sont numérotés à partir du premier résidu d'acide aminé de la protéine apo A-I. On a souligné la région correspondant à la sonde d'ADN synthétique utilisée pour isoler le clone.
- Les abréviations par une lettre unique utilisées pour désigner les acides aminés sont les suivantes: A, alanine; C, cystéine; D, acide aspartique; E, acide glutamique; F, phénylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, méthionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, sérine; T, thréonine; V, valine; W, tryptophane et Y, tyrosine.
- la figure 2 représente le schéma de synthèse d'un adaptateur oligonucléotidique pour la construction d'un fragment d'ADN codant pour les 6 acides aminés du propeptide et pour les 14 premiers acides aminés du polypeptide apo A-I mature, avec le codon ATG d'initiation. Les flèches indiquent les oligonucléotides utilisés pour synthétiser le fragment NcoI - BamI de 65/61 paires de bases (pb).
- la figure 3 montre la construction du plasmide pULB9291 qui porte les régions régulatrices de P_L lambda et la séquence des nucléotides de la proapo A-I.
- la figure 4 montre la construction du plasmide pULB9296 qui porte le promoteur lac de E. coli et une séquence de nucléotides de betagalactosidase fusionnée avec celle de la proapo A-I.
- la figure 5 montre la construction du plasmide pULB9299 qui porte les régions régulatrices de l'ARG3 de la levure et la séquence des nucléotides de la proapo A-I.
- les figures 6A, B et C montrent la construction du plasmide pNIV1612 qui porte les régions régulatrices lac et lpp, la séquence codante pour le peptide signal de ompA et la séquence des nucléotides de la proapo A-I.
- la figure 7 montre la construction du plasmide pNIV1613 qui renferme la région régulatrice du gène de la polyhédrine et la séquence des nucléotides de la proapo A-I.

45 Description détaillée de l'invention.

Préparation de l'ARN: l'ARN total de foie humain est préparé par la méthode au chlorure de guanidinium (R.A. COX, Methods Enzymol.XII, part B,(1968),120-129). Cette préparation d'ARN total est ensuite passée sur une colonne d'oligo(dT) - cellulose pour obtenir les polyA⁺ARNs totaux (T. MANIATIS et coll., dans Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982). A partir de 10 g de foie humain on obtient 200 μg de polyA⁺ARNs.

Synthèse in vitro de l'ADN complémentaire (ADNc).

Les réactions de transcription reverse, au départ de 0,1 à 5 μg de polyA⁺ARNs, sont amorcées avec de l'oligo(dT)₁₂₋₁₈ (environ 1 μg; origine: BOEHRINGER). L'ADNc monobrin est ensuite transformé en molécule à double brin (ADNcdb) avec le même enzyme transcriptase reverse. Les préparations d'ADNcdb, généralement 1 μg, sont traitées avec la SI nucléase pour créer des extrémités franches. Les procédés sont

bien connus de l'homme de métier et sont décrits en détail par T. MANIATIS et coll., loc.cit. L'ADNc_{db} est ensuite allongé par des extensions d'oligo(dC) selon le procédé décrit par L. VILLA-KOMAROFF et coll., (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,75,(1978),3727-3731). Habituellement, on traite 100 ng d'ADNc_{db} par l'enzyme déoxynucéotidyl transférase terminale. En général, des extensions d'une longueur de 15 bases sont ajoutées aux extrémités 3' des molécules d'ADNc_{db}.

Clonage de l'ADNc_{db} allongé dans le vecteur plasmidique pBR322.

L'ADN du plasmide pBR322 est linéarisé par l'enzyme PstI et allongé par des extensions d'oligo(dG) selon la méthode décrite par R.M. LAWN et coll., (Nucleic Acids Res.9,(1981),6103-6114). L'ADNc_{db} allongé par les extensions d'oligo(dC) sont mélangés en proportions équimoléculaires avec l'ADN du pBR322 allongé par des extensions d'oligo(dG). D'habitude, 50 µg du mélange sont hybridés pour recirculariser le plasmide. Les conditions sont bien connues de l'homme du métier et sont décrites en détail par R.M. LAWN et coll., loc.cit. Le mélange d'hybridation est ensuite utilisé pour transformer des cellules compétentes de la souche MM294 de *E. coli*, par exemple, selon la méthode décrite par R.M. LAWN et coll., loc.cit. Plusieurs centaines de transformants sont obtenus par sélection par croissance sur milieu de tétracycline, la résistance à cet antibiotique ayant été apportée par le plasmide pBR322. Des transformants ont aussi été testés pour leur sensibilité à l'ampicilline. Ceux qui sont sensibles contiennent un plasmide chimérique puisque l'insertion de l'ADN étranger dans le vecteur inactive le gène de l'ampicilline.

Criblage de la banque d'ADNc.

Les transformants *E. coli* sont criblés au moyen d'oligonucléotides synthétiques, marqués à leur extrémité 5' au ³²P et correspondant à un fragment du gène de l'apo A-I. La séquence des nucléotides de l'apo A-I humaine est connue (voir P. CHEUNG et L. CHAN, loc.cit. et J.J. SEILHAMER et coll., loc.cit.); il est par conséquent pratique de synthétiser chimiquement par la méthode de N.D. SINHA et coll. (Nucleic Acids Res.12,(1984),4539-4557), une sonde d'oligonucléotides d'une longueur de 22 bases correspondant à l'extrémité 5' du gène. La séquence sélectionnée est la suivante: 5'-GCTGCGGTGCTGACCTTGCCG-3'. Avant d'être utilisé dans des expériences d'hybridation, l'oligonucléotide synthétique est phosphorylé à son extrémité 5' au moyen de la polynucléotide kinase de T4 (P-L Biochemicals) et de (gamma-³²P)ATP. Les conditions de marquage et d'hybridation sont bien connues de l'homme du métier et sont décrites en détail par T. MANIATIS et coll., loc.cit. et par A. BOLLEN et coll., (DNA,2,(1983),255-264).

Construction des plasmides d'expression.

Les méthodes pour la préparation de l'ADN, pour l'isolation de fragments d'ADN, de même que les conditions d'analyse par des enzymes de restriction et les conditions de ligation des fragments sont bien connues de l'homme du métier et sont décrites en détail par R.M. LAWN et coll., loc.cit. et par T. CABEZON et coll., loc.cit. et sont applicables ici.

La synthèse des fragments reliant le promoteur des vecteurs d'expression à l'extrémité 5' du gène sont décrites ci-dessous.

Synthèse du fragment NcoI - Ball.

A la figure 2, on montre en détail les principes qui sont à la base de la conception des oligonucléotides 35-mère, 30-mère, 18-mère et 43-mère utilisés dans la synthèse du fragment NcoI - Ball de 65/61 pb. Les fragments synthétiques 30-mère et 18-mère sont phosphorylés à leurs extrémités 5' au moyen de la polynucléotide kinase de T4 (P-L Biochemicals). 1 µg de chaque oligonucléotide, y compris les 35-mère et 43-mère non phosphorylés sont hybridés pendant 3 minutes à 95 °C dans 300 mM d'acétate de sodium (pH 7.0), puis laissés refroidir lentement à 4 °C. Le mélange d'hybridation est utilisé tel quel dans le procédé de clonage pour la construction des plasmides d'expression.

Séquençage de l'ADN

L'analyse de la séquence de l'ADN a été effectuée selon la méthode décrite par A.M. MAXAM et W. GILBERT (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,(1977),560-564) et par F. SANGER et coll., (Proc.Natl.Acad.Sci.USA,74,(1977),5463-5467).

Analyse des protéines.

Des culots de cellules ayant une densité optique de 1 unité à 630 nm (1 OD₆₃₀) sont obtenus à différentes étapes pendant la fermentation de souches portant les plasmides d'expression de la proapo A-I humaine, pULB9291, pULB9292, pULB9296 et pULB9299 (transformés respectivement dans les souches AR58 et JM101 de *E. coli* et dans la souche 10S44c de levure). Chaque échantillon est remis en suspension dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 6,8, contenant 2% de dodécylsulfate de sodium (DSS), 6 M d'urée, 10% de glycérol et 5% de 2-mercaptoéthanol, et est chauffé à l'ébullition pendant 3 minutes. Des échantillons sont soumis à une électrophorèse en gels de polyacrylamide (U.K. LAEMMLI, 10 (Nature, 227, (1970), 680-685). Les protéines totales sont révélées par coloration au Bleu de Coomassie et la proapo A-I humaine synthétisée est identifiée par reconnaissance immunologique après transfert électrophorétique (voir A. BOLLEN et coll., loc.cit.).

Construction de vecteurs recombinants pour l'expression de la proapo A-I humaine dans la bactérie, dans la levure et dans des cellules d'insectes infectées par baculovirus.

1. Clone d'ADNc pour la préproapo A-I humaine: pULB1609 (figure 1).

Plusieurs centaines de transformants, provenant du clonage de l'ADNc db, correspondant au polyA⁺ARN de foie humain, dans le site *Pst*I de pBR322, sont criblés au moyen de la sonde synthétique apo A-I 22-mère décrits ci-dessus. Un des clones donne un intense signal d'hybridation au cours de l'expérience. Ce clone, désigné par pULB1609, est isolé, et l'insert d'ADN présent dans le plasmide recombinant est caractérisé par analyse de la séquence de l'ADN. Sa longueur correspond à 878 paires de bases (pb); il code pour le polypeptide préproapo A-I complet. Comme le montre la figure 1, le fragment ADNc cloné porte des régions non codantes en 5' et en 3' (19 pb et 55 pb respectivement), la séquence de 54 pb codant pour le peptide précurseur (aa-24 jusque aa-7), la séquence de 18 pb codant pour le propeptide (aa-6 jusque aa-1) et la séquence de 732 pb codant pour l'apo A-I mature (aa1 jusque aa243) et comprennent le codon de terminaison de la traduction. La séquence de la protéine, déduite de la séquence d'ADN, correspond parfaitement bien à la séquence des acides aminés trouvée pour la préproapo A-I à partir de la protéine et à partir de clones d'ADNc isolés indépendamment (W.C. BARKER et coll., 30 Comp.Biochem.Physiol.57B, (1977), 309-315; demande de brevet japonaise No. 96998/86; P. CHEUNG et L. CHAN, loc.cit. et J.J. SEILHAMER et coll., loc.cit.).

2. Construction d'un vecteur d'expression bactérien contenant la séquence de l'ADNc de la proapo A-I humaine: pULB9291 (figures 2 et 3).

pULB9291, un plasmide produisant la proapo A-I humaine, est construit en plaçant un segment provenant du clone pULB1609 derrière le promoteur régulier P_L lambda (figure 3). La construction de ce plasmide d'expression requiert la synthèse de fragments d'ADN comprenant un site de restriction *Nco*I, un codon d'initiation de la traduction et la séquence des nucléotides codant pour les acides aminés à l'extrémité aminée du gène de structure de la proapo A-I humaine, jusqu'au premier site unique de restriction, *Bal*I (figure 2).

Cet adaptateur est synthétisé par des procédés chimiques (N.D. SINHA et coll., loc.cit.). On prépare quatre oligonucléotides synthétiques; après avoir été hybridés, ils codent pour la méthionine correspondant au codon ATG d'initiation de la traduction, pour les 6 acides aminés correspondant au propeptide et pour les 14 premiers acides aminés de l'apo A-I humaine mature (figure 2). L'adaptateur synthétique a été conçu pour minimiser la formation de structures secondaires à l'extrémité 5' du gène. Pour réaliser cela, les codons sélectionnés pour coder les résidus d'acides aminés -6, -1, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 et 14 ne correspondent pas aux codons naturels que l'on observe dans l'ADNc du clone pULB1609.

L'adaptateur synthétique décrit ci-dessus est utilisé pour réunir un fragment d'ADN de 744 pb, provenant de pULB1609, au promoteur P_L lambda dans le plasmide d'expression pULB1221.

La construction du vecteur d'expression pULB1221 est décrite dans la demande de brevet européen 186.643. Elle comporte trois étapes principales au départ du plasmide pCQV2. Le plasmide pCQV2 est décrit par C. QUEEN dans J.Mol.Appl.Genet.2, (1983) 1-10 et est librement accessible.

Le choix de ce vecteur particulier n'est pas obligatoire: on peut utiliser tout autre vecteur possédant un promoteur et, en aval de celui-ci, un site *Nco*I approprié. Environ 0,1 µg des fragments synthétiques, tels que décrits ci-dessus, sont ligués, au moyen de l'ADN ligase de T4, à environ 1 µg du fragment *Bal*I-*Pst*I de 744 pb, provenant de pULB1609, et à environ 1 µg du vecteur plasmidique pULB1221 coupé avec

Ncol et Ball.

Avant de réaliser la ligation, le fragment Ball-PstI de 744 pb a été traité par l'ADN polymérase de T4 de façon à transformer les extrémités protrudantes en 3' en extrémités franches. Le procédé est bien connu de l'homme du métier et est décrit en détail par T. MANIATIS et coll., loc.cit.

Après avoir été amplifiés dans les cellules compétentes de la souche AR58 de *E. coli*, les plasmides reconstruits sont caractérisés par analyse des sites de restriction et par la séquence de l'ADN des fragments synthétiques et des sites de jonction. Un plasmide recombinant, pULB9291, satisfait à tous les critères parce qu'il possède les fragments dans l'orientation et l'ordre corrects; il a été utilisé pour des études d'expression.

3. Construction d'un vecteur d'expression bactérien contenant les séquences fusionnées correspondant à la beta-galactosidase et à la proapo A-I humaine: pULB9296 (figure 4).

Dans cette construction, la séquence d'ADN codant pour la proapo A-I humaine, est fusionnée dans la phase de lecture correcte, en aval de la séquence d'ADN de la beta-galactosidase. Le gène de la beta-galactosidase est présent dans le plasmide d'expression *E. coli* pUR288, librement accessible (U. RUTHER et B. MULLER-HILL, EMBO J.2,(1983),1791-1794), qui porte un promoteur lac efficacement inductible et des sites de restriction appropriés dans la séquence de la beta-galactosidase. Le plasmide recombinant approprié est construit comme montré à la figure 4. En premier lieu, l'ADN du plasmide pUR288 est, successivement, coupé par BamHI, traité par l'ADN polymérase de T4 et à nouveau coupé par Sall. En second lieu, un fragment d'ADN de 805 pb est isolé de pULB9291 successivement par digestion avec KpnI, traitement par l'ADN polymérase de T4 et finalement digestion avec Sall. Les deux fragments sont ligués ensemble, dans des proportions molaires, au moyen de l'ADN ligase de T4 et le plasmide obtenu est utilisé pour transformer les cellules compétentes de la souche JM101 de *E. coli*, une souche largement et librement accessible (ATCC No. 33876). Les transformants sont vérifiés par analyse de restriction pour l'orientation correcte de la séquence de la proapo A-I humaine par rapport au gène de la beta-galactosidase et pour la présence d'un site BamHI reconstitué à la jonction des deux séquences. Ceci indique que la séquence de la proapo A-I humaine est bien fusionnée en aval de la séquence d'ADN de la beta-galactosidase et dans la phase de lecture correcte. Un des transformants, contenant le plasmide pULB9296, satisfait à tous les critères et a été utilisé dans des essais d'expression.

4. Construction d'un plasmide d'expression de levure porteur de la séquence de l'ADNc de la proapo A-I humaine: pULB9299 (figure 5).

Dans cette construction, la séquence de l'ADNc codant pour la proapo A-I humaine est clonée entre les signaux du promoteur et du terminateur portés par un plasmide d'expression de levure. Le vecteur d'expression de levure pRIT 10774 a été choisi pour cette expérience. La construction du plasmide d'expression pRIT 10774 est décrite dans la demande de brevet européen 151.102. On le construit, d'une part, à partir du plasmide pRIT 10749 déposé à l'ATCC sous le numéro d'accès 39133 conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et d'autre part, à partir du vecteur-navette YEpl3 pour *E. coli*-*S. cerevisiae*, décrit par J.R. BROACH et coll., dans Gene,8,(1979),121-133 et qui est accessible à l'ATCC sous le numéro d'accès 37115. Le vecteur pRIT 10774 peut se répliquer à la fois dans *E. coli* et dans la levure et porte le promoteur et le terminateur de la transcription de l'ornithine carbamoyl transférase (ARG3) séparés par un site unique de restriction BamHI convenant pour l'insertion d'un ADN étranger possédant son propre codon ATG d'initiation de la traduction. En outre, le vecteur porte les séquences 2μ de la levure, des marqueurs métaboliques pour la sélection dans la levure et le marqueur de sélection AmpA pour faire la navette dans *E. coli*. Ce n'est pas le seul vecteur qui peut être utilisé pour l'expression de la proapo A-I humaine dans des levures: tout autre vecteur pour levure porteur de signaux de régulation peut être utilisé et conduira à des résultats qualitativement similaires. La construction illustrée à la figure 5 procède de la manière suivante. L'ADN du plasmide pRIT 10774 est linéarisé au moyen de l'enzyme BamHI et est traité par l'ADN polymérase de T4.

D'autre part, un fragment d'ADN de 810 pb est isolé de pULB9291 par digestion avec les enzymes Asp718 et Sall, suivie du traitement par l'ADN polymérase de T4. Ce fragment code pour la proapo A-I humaine et comporte le codon ATG d'initiation de la traduction. Les deux fragments, obtenus comme décrit ci-dessus, sont ligués ensemble, dans des proportions équimoléculaires, au moyen de l'ADN ligase de T4 et le mélange est utilisé pour transformer les cellules compétentes de *E. coli* MM294. Les transformants sont contrôlés par analyse de restriction pour vérifier l'orientation correcte de la séquence de l'ADN de la proapo A-I par rapport à la séquence du promoteur de l'ARG3. Un des transformants contient un plasmide

recombinant, pULB9299, qui satisfait à cette condition. Le plasmide pULB9299 est amplifié dans *E. coli* et est utilisé pour transformer des sphéroplastes de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, souche 10S44c (pep4-3, leu2-3, leu2-112); (T. CABEZON et coll., loc.cit.).

L'emploi de la souche lc 1697d (ATCC No. 20631) conduirait à des résultats qualitativement similaires. Les transformants de levure ont ensuite été testés pour l'expression de la proapo A-I humaine.

5. Construction d'un vecteur bactérien de sécrétion contenant la séquence de l'ADNc de la proapo A-I humaine: pNIV1612 (figures 6A, B et C).

Dans cette construction, la séquence d'ADN codant pour la proapo A-I humaine est fusionnée, dans la phase de lecture correcte, en aval de la séquence d'ADN du peptide signal de la protéine OmpA de *E. coli*. Le vecteur sécrétion pIN-III-ompA-2 (J. GHRAYEB et coll., EMBO J.3,(1984),2437-2442) a été choisi pour cet essai. Ce vecteur et sa souche hôte *E. coli* JA221 sont accessibles sur demande auprès du "Department of Biochemistry of the State University of New York", à Stony Brook.

Le vecteur de sécrétion porte un puissant promoteur *lpp* (lipoprotéine), un fragment du promoteur *opérateur lac*, la séquence *lacI* du répresseur *lac* et des sites de restriction appropriés situés immédiatement après la séquence codant pour le peptide signal du gène *ompA*. Le plasmide recombinant approprié est construit comme montré aux figures 6A, B et C. En premier lieu, le vecteur de sécrétion pIN-III-ompA-2 est linéarisé avec *EcoRI* et traité par l'ADN polymérase de T4. En second lieu, un fragment d'ADN de 805 pb est excisé de pULB9291 par digestion, successivement avec les enzymes de restriction *KpnI* et *Sall*, suivie du traitement par l'ADN polymérase de T4. Ce fragment code pour la proapo A-I humaine et contient le codon ATG d'initiation de la traduction. Les deux fragments obtenus comme décrit ci-dessus, sont ligués ensemble, en proportions équimolaires, au moyen de l'ADN ligase de T4, et le mélange est utilisé pour transformer les cellules compétentes de la souche JA221 de *E. coli* cultivées sur le milieu M9 (J.H. MILLER, dans "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972, p.431) contenant 20 mg/l de tryptophane, 20 mg/l de leucine, 2 g/l de lactose et 50 mg/l d'ampicilline. Les transformants sont sélectionnés pour leur résistance à l'ampicilline et criblés avec un oligonucléotide synthétique 18-mère (le même que celui utilisé dans la synthèse de l'adapteur comme montré à la figure 2).

Les transformants sélectionnés sont contrôlés par analyse de restriction pour vérifier l'orientation correcte de la séquence d'ADN de la proapo A-I par rapport à la séquence du peptide signal porté par le vecteur de sécrétion (site *EcoRI* reconstitué à la jonction des deux séquences). Un des transformants porte un plasmide recombinant qui satisfait à cette condition. La séquence excédentaire provenant de la construction avec l'adapteur, soulignée dans la séquence nucléotidique suivante,

5' GTA GCG GAG GCC GCT GAA TTC ATG AGA CAT TTC TGG 3'

Val Ala Gln Ala Ala Glu Phe Met Arg His Phe Trp

aa-6

est éliminée par mutagénèse dirigée. A cet effet, on synthétise l'oligonucléotide 24-mère suivant

peptide signal ---> <--- proapo A-I

5' GTA GCG GAG GCC AGA CAT TTC TGG 3'

Val Ala Gln Ala Arg His Phe Trp

dépourvu des 12 bases excédentaires et on l'utilise pour éliminer la séquence excédentaire de 12 bases provenant de l'adapteur.

Pour la mutagénèse, on utilise le système de Amersham. Ce système est basé sur la méthode de F. ECKSTEIN et coll. (Nucleic Acids Res.13,(1985),8765-8785). La méthode donne un haut rendement en plages et l'efficacité la plus élevée dont on dispose: jusqu'à 95%.

En premier lieu, la région de l'ADN devant être mutagénisée est clonée dans un vecteur M13. A cet effet, le fragment d'ADN *XbaI*-*BalI* du plasmide recombinant pIN-III-ompA-2 portant le gène de la proapo A-I est inséré dans le vecteur M13mp19 coupé par *XbaI* et *HindII*. Le vecteur M13mp19 est disponible dans le commerce; on peut se le procurer auprès de Amersham (Buckinghamshire, Grande -

Bretagne). Ensuite, l'oligonucléotide 24-mère mutagène est hybridé avec la matrice monocaténaire et allongé par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase en présence de l'ADN ligase de T4, pour produire un mutant hétéroduplex.

L'élimination sélective du brin non mutant est rendue possible par l'incorporation d'un thionucléotide dans le brin mutant pendant la synthèse *in vitro*, et clivage par *NCII* du brin non phosphorothionaté. De tels clivages présentent des sites pour l'exonucléase III qui digère le brin non mutant. Le brin mutant est alors utilisé comme matrice pour reconstruire la molécule circulaire à double brin, créant ainsi une molécule mutante homoduplex. La mutagenèse est vérifiée par séquençage de la jonction entre le peptide signal et le début du gène de la proapo A-1. Le plasmide recombinant pNIV1612, est reconstruit en ligant le fragment *XbaI* - *HindIII* du vecteur pIN - III - *ompA* - 2 avec le fragment *XbaI* - *BalI* qui a été débarrassé des 12 bases excédentaires, et avec le fragment *BalI* - *HindIII* du gène de la proapo A-1.

Les trois fragments sont ligués au moyen de l'ADN ligase de T4 et le mélange est utilisé pour transformer les cellules compétentes de *E. coli* JA221, comme décrit plus haut. Les transformants sont sélectionnés pour leur résistance à l'ampicilline et criblés avec l'oligonucléotide 18-mère cité ci-dessus.

Un des transformants porte un plasmide recombinant pNIV1612. Dans la construction finale, la séquence codant pour le peptide signal de *ompA* précède la séquence complète de la proapo A-1 sans le codon ATG (figures 6A, B et C). Les transformants *E. coli* sont ensuite testés pour l'expression de la proapo A-1 humaine.

6. Construction d'un vecteur de transfert pour l'introduction de la séquence de l'ADNc de la proapo A-1 humaine dans baculovirus: pNIV1613 (figure 7).

Le plasmide pNIV1613, portant la séquence d'ADN de la proapo A-1 humaine, est construit en plaçant un segment provenant du clone pULB9291, en aval du promoteur du gène de la polyhédrine du baculovirus (figure 7). Dans ces essais, on a utilisé le vecteur de transfert pAcRP6 du Baculovirus (Y. MATSUURA et coll., J.Gen.Virol.67,(1986),1515 - 1529); il peut être obtenu auprès du "Department of Microbiology and Immunology" de l'Université d'Ottawa. Le plasmide porte le promoteur du gène de la polyhédrine jusqu'au nucléotide -7 dans la séquence leader en 5'; il lui manque le codon ATG de la polyhédrine et les 170 premiers nucléotides de la séquence codante de la polyhédrine. Un site *BamHI* approprié est localisé en aval du nucléotide -7. La construction illustrée à la figure 7 est réalisée de la façon suivante. L'ADN du plasmide pAcRP6 est linéarisé au moyen de *BamHI*. Par ailleurs, un fragment d'ADN de 810 pb est excisé de pULB9291 par digestion avec les enzymes de restriction *Asp718* et *Sall*. Ce fragment code pour la proapo A-1 humaine et contient le codon ATG d'initiation de la traduction. Les deux fragments, en proportions équimolaires, sont traités ensemble par l'ADN polymérase de T4, ligués au moyen de l'ADN ligase de T4 et utilisés pour transformer les cellules compétentes de la souche AR58 de *E. coli*. Les transformants sont sélectionnés pour leur résistance à l'ampicilline, criblés au moyen d'un oligonucléotide synthétique 35-mère marqué au ³²P (voir la figure 2), correspondant à une partie de la séquence d'ADN de la proapo A-1, et contrôlés par analyse de restriction pour vérifier l'orientation correcte de la séquence d'ADN de la proapo A-1 par rapport au promoteur de gène de la polyhédrine. Un des transformants porte un plasmide recombinant, pNIV1613, qui satisfait à cette condition; il a été utilisé dans des essais d'expression.

7. Production de la proapo A-1 humaine par les microorganismes transformés.

Des cultures de 20 ml de la souche AR58 ou JM101 de *E. coli* transformées respectivement par pULB9291 et par pULB9296, sont cultivées en milieu riche supplémenté de 50 µg/ml d'ampicilline (bouillon de culture LB, voir T. MANIATIS et coll., loc.cit. pour les détails expérimentaux) jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,6 à 630 nm. Dans le cas de pULB9291, l'induction du promoteur P_L lambda est réalisée en portant les conditions initiales de croissance de la culture de 30°C à 42°C, de manière à inactiver le répresseur du promoteur P_L lambda (M. ROSENBERG et coll., Methods Enzymol.101,(1983),123 - 138). L'induction est poursuivie pendant 20 minutes.

Dans le cas de pULB9296, l'induction du promoteur *lac* est réalisée en ajoutant à la culture, incubée à 37°C, l'inducteur chimique IPTG (isopropyl - beta - D - thiogalactoside) jusqu'à atteindre une concentration finale de 1 mM (R. LORENZETTI et coll., loc.cit.). L'induction est poursuivie pendant 60 minutes.

D'autre part, des cultures de 20 ml de cellules de levure 10S44c, transformées par pULB9299, sont cultivées à 30°C en milieu de base azoté pour levure (Difco) supplémenté de glucose (1%), jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,3 à 630 nm. Aucun inducteur n'est nécessaire puisque dans ce cas particulier l'expression est constitutive.

On prélève des échantillons de 1 ml des cultures ci-dessus et on les centrifuge à 15.000 g pendant 5 minutes. Les culots obtenus sont lysés comme suit dans du dodécylsulfate de sodium (DSS) bouillant. Les culots sont remis en suspension dans 50 µl de tampon d'échantillon contenant du DSS (50 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 2% de DSS, 6 M d'urée, 5% de 2-mercaptoéthanol et 10% de glycérol) et chauffés à l'ébullition pendant 3 minutes à 100°C. Les extraits sont ensuite centrifugés à 15.000 g pendant 10 minutes. Les échantillons sont ainsi prêts pour l'analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide à 15% ou 7,5%, en présence de DSS, dans des conditions dénaturantes (U.K. LAEMMLI, loc.cit.).

Après l'électrophorèse, les gels de polyacrylamide sont lavés brièvement avec 40 ml d'eau distillée et avec 40 ml de tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 7,5. Les protéines sont ensuite transférées électriquement des gels sur des feuilles de nitrocellulose pendant 2 heures à 60 V et 1,5 A dans le même tampon phosphate. (T. CABEZON et coll., loc.cit.). Les feuilles de nitrocellulose sont saturées d'albumine (1%) dans 50 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7,5, puis elles sont incubées à la température ambiante pendant une nuit en présence de sérum de lapin anti-apo A-I humaine à une dilution de 1/500 (et d'anticorps anti-beta-galactosidase monoclonaux de souris dans le cas de pULB9298) dans le même tampon dépourvu d'albumine.

Les feuilles sont lavées 5 fois avec 40 ml du même tampon phosphate et sont ensuite incubées dans 40 ml de tampon phosphate contenant 10 µg/ml de sérum de chèvre anti-anticorps de lapin (ou anti-anticorps de souris) et marqué à la peroxydase. Après 4 heures d'incubation à la température ambiante, les feuilles sont à nouveau lavées 5 fois dans 40 ml de tampon phosphate et sont finalement révélées en ajoutant 50 ml d'une solution d'un substrat d'un substrat chromogène (10 mg de diaminobenzidine, 100 µl de peroxyde d'urée à 10% et 100 mM de Tris-HCl à pH 7,6).

Dans le cas de pULB9291 et de pULB9299, on trouve un produit unique réagissant avec les anticorps anti-apo A-I humaine. Il a un poids moléculaire qui est conforme à celui d'un étalon d'apo A-I naturelle. Dans le cas de pULB9298, on trouve à la dimension prévue pour la somme des polypeptides beta-galactosidase et proapo A-I (144 kDa), un polypeptide fusionné réagissant avec le sérum anti-apo A-I humaine et avec le sérum anti-beta-galactosidase. Ces dimensions ont été déterminées au préalable au moyen d'une courbe de calibrage basée sur la migration de poids moléculaires étalons placés sur les mêmes gels que les extraits cellulaires.

Dans une autre expérience, des cultures de 20 ml de la souche JA221 de *E. coli* transformée par pNIV1612 sont cultivées en milieu riche supplémenté de 50 µg/ml d'ampicilline (bouillon de culture LB, voir T. MANIATIS et coll., loc.cit.) jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,6 à 630 nm. L'induction du promoteur *lac* est effectuée en ajoutant à la culture, incubée à 37°C, l'inducteur chimique IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactoside) jusqu'à la concentration finale de 2 mM. L'induction est poursuivie pendant 60 minutes. On prélève des échantillons de 1 ml de ces cultures et on centrifuge à 15.000 g pendant 5 minutes. Les culots obtenus sont soumis à un choc osmotique léger en vue de libérer la fraction périplasmique (D. KOSHLAND et D. BOTSTEIN, Cell, 20, (1980), 749-760). La fraction libérée est remise en suspension dans le tampon d'échantillon contenant du DSS mentionné plus haut, mais dépourvu d'urée, elle est portée à l'ébullition, centrifugée et soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12,5% en présence de DSS, suivie d'une immunodétection après transfert électrophorétique. Une fraction de la proapo A-I synthétisée est retrouvée dans la cellule et non pas dans le périplasme. Ceci est dû soit au fait que de la proapo A-I n'est pas sécrétée, soit à ce que l'efficacité du choc osmotique n'est pas optimale. La fraction principale de la proapo A-I se retrouve libérée dans le milieu après le choc osmotique, indiquant ainsi que la protéine est bien sécrétée par les cellules.

8. Production de la proapo A-I humaine par des cellules d'insectes infectées par baculovirus.

Le plasmide recombinant pNIV1613 a été utilisé conjointement avec la souche sauvage de baculovirus pour coinfecter des cellules de *Spodoptera frugiperda* en culture. Le tri des virus recombinants dépourvus de polyhédrine fournit des plaques recombinantes. Le virus recombinant, purifié à partir d'une plaque, est utilisé pour infecter des cellules d'insectes. Le procédé est bien connu de l'homme du métier et est décrit en détail par M.D. SUMMERS et G.E. SMITH dans "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect cell culture Procedures, Texas University, College Station, (1987)". Le virus recombinant a été testé pour la production de proapo A-I, immunologiquement après transfert électrophorétique et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12,5% en présence de DSS, après lyse des cellules au moyen du tampon RIPA [0,05 M de tampon Tris-HCl, pH 7,2, contenant 0,15 M de NaCl, 1% de Triton X100, 0,1% de DSS, 0,1% de désoxycholate de sodium et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (FPMS)] et traitement par du DSS bouillant. Un seul produit réagissant avec les anticorps anti-apo A-I humaine a été trouvé. Il a un poids moléculaire qui concorde avec celui d'un étalon d'apo A-I naturelle et la protéine

exprimée représente le constituant majeur des protéines totales. La concentration en proapo A-I par litre de culture, mesurée par immunodiffusion radiale simple (G. MANCINI et coll., *Immunochem.* 2, (1965), 235 - 254) est estimée à environ 100 mg.

9. Production cytoplasmique de la proapo A-I humaine dans *E. coli*. Utilisation d'un milieu minimal défini.

Le plasmide pULB9292 a été utilisé pour la production cytoplasmique de proapo A-I humaine par *E. coli* dans un milieu minimal. pULB9292 est construit en échangeant le fragment EcoRI-NcoI du plasmide pULB9291, codant pour le promoteur P_L lambda, avec le même fragment EcoRI-NcoI du plasmide pOTS (M. ROSENBERG et coll., *Methods Enzymol.* 101, (1983), 123 - 138). Le fragment EcoRI-NcoI du vecteur pOTS (G. DEVARE et coll., *Cell* 36, (1984), 43 - 49) contient aussi le promoteur P_L , efficace et régulable, du phage lambda. On fait croître sur un milieu minimal défini des cultures de 20 ml de la souche AR58 de *E. coli* transformée avec pULB9292. La composition du milieu minimal est (par litre): 3 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl, 1 g de NH_4Cl , 1,37 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 29,5 μM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 236 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 g de glucose, 1 mg de vitamine B1, 50 mg d'ampicilline, bouillon de culture LB 1/20 (v/v). Les cellules sont cultivées dans ce milieu minimal jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,5 à 630 nm. L'induction du promoteur P_L lambda est effectuée en portant les conditions initiales de croissance de la culture de 30°C à 42°C, de manière à inactiver le répresseur du promoteur P_L lambda (M. ROSENBERG et coll., loc.cit.). L'induction est poursuivie pendant 60 minutes. On prélève des échantillons de 1 ml des cultures et on les fait passer dans la presse de French ou on les centrifuge à 15.000 g pendant 5 minutes. L'extrait cellulaire total obtenu ou le culot sont traités par du DSS à l'ébullition comme décrit au paragraphe 7. Après électrophorèse et transfert électrophorétique, on trouve un seul produit qui réagit avec les anticorps anti-Apo A-I humaine. Il a un poids moléculaire qui concorde avec celui d'un étalon d'apo A-I naturelle. Le taux de proapolipoprotéine A-I exprimé dans le milieu minimal défini représente 13,5% des protéines totales, soit une concentration estimée de proapo A-I d'environ 270 mg par litre de culture.

10. Isolement, purification et caractérisation de la proapo A-I humaine produite par les microorganismes transformés.

10.1 Isolement et purification.

On centrifuge les extraits bruts de la proapo A-I recombinante à 4.000 g pendant 15 minutes et on écarte le culot. On centrifuge le surnageant à 100.000 g pendant deux heures. On remet le culot obtenu en suspension dans un volume minimum d'un tampon (TEN100) composé de 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM d'EDTA, 100 mM de NaCl; 1,75 $\mu\text{g/ml}$ de FPMS et 100 $\mu\text{g/ml}$ de merthiolate de sodium (sel de sodium de l'acide éthylmercuri-thiosalicylique) et les volumes de la suspension et du surnageant sont ajustés séparément au volume initial de l'extrait au moyen du même tampon. Ensuite, la protéine est précipitée à partir des deux suspensions en utilisant des concentrations croissantes d'alcool isopropylique. On détermine par immunodiffusion radiale (G. MANCINI et coll., loc.cit.), en utilisant un étalon commercial d'apo A-I, la fraction de protéine précipitée de chaque suspension qui contient la majeure partie de l'immunoréactivité correspondant à l'apo A-I humaine. Chaque fraction ainsi obtenue est davantage purifiée par chromatographie sur une colonne de Sephacryl S200, en utilisant le même tampon comme éluant. On recueille des fractions de 0,9 ml et on détermine par immunodiffusion radiale, dans chaque fraction, la quantité de protéine totale ayant une immunoréactivité correspondant à celle de l'apo A-I. Le poids moléculaire de la protéine éluée dans les fractions est déterminé par calibrage de la colonne avec des étalons de poids moléculaires connus tels que l'aldolase, l'albumine de sérum de bovin, l'ovalbumine, le chymotrypsinogène et le cytochrome C, dans des conditions identiques. La pureté de la proapo A-I par mg de protéine totale dans les fractions principales contenant la proapo A-I recombinante, exprimée en mg de protéine ayant la même immunoréactivité qu'un étalon commercial d'apo A-I, est estimée à 95%.

10.2. Caractérisation.

10.2.1. Propriétés physiques de la proapo A-I recombinante.

Lorsqu'on soumet la proapo A-I recombinante purifiée et isolée du surnageant et du culot de la centrifugation à 100.000 g, à une focalisation isoélectrique selon le procédé de N. CATSIMPOOLAS (*Anal.Biochem.* 26, (1969), 54 - 62) et en appliquant un gradient autogénéré de pH 4 à pH 6, on obtient une bande unique ayant un point isoélectrique estimé à 4,95. L'apo A-I plasmatique humaine apparaît

légèrement plus acide et a un point isoélectrique estimé à 4,75. Cette différence de 0,2 unité de pH entre les valeurs des points isoélectriques de la proapo A-I recombinante et de l'apo A-I plasmatisque est en bon accord avec la différence connue entre les valeurs des points isoélectriques de l'apo A-I plasmatisque et de la proapo A-I plasmatisque, qui a été rapportée comme étant égale à 0,17 (G.L. MILLS et coll., Lab.Tech.Biochem.Mol.Biol.14,(1984),244 - 245).

En ce qui concerne le poids moléculaire, les proapo A-I recombinantes du culot et du surnageant consistent toutes deux en une chaîne polypeptidique unique ayant des poids moléculaires identiques égaux à $29,9 \pm 1,4$ kDa. L'apo A-I plasmatisque humaine apparaît légèrement plus petite, ayant un poids moléculaire égal à $29,3 \pm 1,3$ kDa.

10.2.2. Etablissement d'une carte de peptides de la proapo A-I recombinante au moyen de BNPS-scatole.

Le clivage chimique a été effectué au moyen de 3-bromo-3-méthyl-2-[(2-nitrophényl)thio]-3H-indole (BNPS-scatole) selon le procédé de A. FONTANA (Methods Enzymol.25,(1972),419 - 423). On dissout 5 à 10 µg des préparations de protéine purifiée dans 100 µl d'une solution à 0,15% (v/v) de phénol dans une solution aqueuse à 50% (v/v) d'acide acétique. Ensuite, on ajoute 50 µl d'une solution de 4,8 mg de BNPS-scatole par ml d'acide acétique glacial et on incube à 25°C pendant 72 heures. Ensuite, on ajoute 50 µl de 2-mercaptoéthanol et on incube une seconde fois pendant 5 heures à 37°C. Les échantillons sont évaporés, redissous dans 100 µl d'eau et extraits 3 fois par 200 µl d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont écartées et les phases aqueuses sont lyophilisées et analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide - DSS.

Dans le cas d'un clivage chimique par le BNPS-scatole, le nombre et la dimension des fragments provenant d'apo A-I peuvent être plus ou moins prédits étant donné que, dans les conditions expérimentales utilisées, le BNPS-scatole coupe sélectivement après les résidus de tryptophane. En supposant une efficacité de 100% à chaque site de clivage, le fragment le plus grand auquel on peut s'attendre est un fragment C-terminal de 15,4 kDa. Les poids moléculaires des fragments restants sont compris entre 0,5 et 5,3 kDa et sont par conséquent trop petits pour être détectés.

Dans le cas d'un clivage incomplet, le fragment de 15,4 kDa sera "allongé" dans la direction de l'extrémité N-terminale, formant des fragments de 20,7 kDa, 23,1 kDa et 27,6 kDa respectivement. Ces prévisions sont très bien réalisées pour l'apo A-I plasmatisque humaine de même que pour les différentes préparations purifiées de proapo A-I recombinante.

Revendications

Revendications pour les Etats contractants suivants : AT, BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. Séquence d'ADN recombinante qui code pour la proapolipoprotéine A-I humaine et capable de réduire ou prévenir la formation de structures en épingle, caractérisée en ce qu'elle comprend (a) un fragment d'ADN synthétique ayant la séquence (un seul brin indiqué):
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3'
codant pour les acides aminés -6 à +14 de la proapolipoprotéine A-I humaine et comprenant un codon supplémentaire ATG d'initiation de la traduction et des codons modifiés pour les résidus des acides aminés -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 et +14 et (b) en aval du fragment d'ADN synthétique, la séquence d'ADN naturelle codant pour les acides aminés +15 à +243 de la proapolipoprotéine A-I humaine.
2. Vecteur de clonage répliquable, caractérisé en ce qu'il contient la séquence d'ADN recombinante selon la revendication 1.
3. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il contient la séquence d'ADN recombinante selon la revendication 1 liée de manière opérationnelle à une séquence d'ADN régulatrice qui règle l'expression de ladite séquence d'ADN recombinante.
4. Vecteur d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend la région du promoteur P_L du phage lambda.
5. Vecteur d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN recombinante est fusionnée en aval de la séquence d'ADN de la beta-galactosidase et en ce que la séquence

d'ADN régulatrice comprend la région du promoteur lac de E. coli.

6. Vecteur d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend les régions du promoteur et du terminateur de la transcription de l'ARG3 de la levure.
7. Vecteur d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN recombinante dépourvue du codon ATG est fusionnée en aval de la séquence d'ADN du peptide signal de la protéine OmpA de E. coli et en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend le promoteur lpp, le promoteur - opérateur lac et la séquence lac I du répresseur lac.
8. Vecteur d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend la région du promoteur du gène de la polyhédrine de baculovirus.
9. Culture de cellules ou microorganisme transformés avec un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 3 à 8.
10. Procédé de production de la proapolipoprotéine A-I humaine, caractérisé en ce qu'on cultive dans des conditions de culture appropriées une cellule ou un microorganisme transformé selon la revendication 9, et en ce qu'on recueille la proapolipoprotéine A-I humaine ainsi produite.

Revendications pour l'Etat contractant suivant : ES

1. Procédé de préparation d'une séquence d'ADN recombinante qui code pour la proapolipoprotéine A-I humaine et capable de réduire ou prévenir la formation de structures en épingle, caractérisé en ce qu'on ligue la séquence d'ADN naturelle codant pour les acides aminés +15 à +243 de la proapolipoprotéine A-I humaine en aval d'un fragment d'ADN synthétique ayant la séquence (un seul brin indiqué):
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3'
codant pour les acides aminés -6 à +14 de la proapolipoprotéine A-I humaine et comprenant un codon supplémentaire ATG d'initiation de la traduction et des codons modifiés pour les résidus des acides aminés -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 et +14.
2. Procédé de préparation d'un vecteur de clonage réplicable, caractérisé en ce qu'on introduit la séquence d'ADN recombinante préparée selon le procédé de la revendication 1 dans un vecteur approprié.
3. Procédé de préparation d'un vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'on ligue de manière opérationnelle la séquence d'ADN recombinante préparée selon le procédé de la revendication 1 à une séquence d'ADN régulatrice qui règle l'expression de ladite séquence d'ADN recombinante.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend la région du promoteur P_L du phage lambda.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN recombinante est fusionnée en aval de la séquence d'ADN de la beta-galactosidase et en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend la région du promoteur lac de E. coli.
6. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend les régions du promoteur et du terminateur de la transcription de l'ARG3 de la levure.
7. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN recombinante dépourvue du codon ATG est fusionnée en aval de la séquence d'ADN du peptide signal de la protéine OmpA de E. coli et en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend le promoteur lpp, le promoteur - opérateur lac et la séquence lac I du répresseur lac.
8. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la séquence d'ADN régulatrice comprend la région du promoteur du gène de la polyhédrine de baculovirus.

9. Procédé de préparation d'une cellule ou d'un microorganisme, caractérisé en ce qu'on transforme une cellule ou un microorganisme avec un vecteur d'expression préparé selon un procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 3 à 8.

10. Culture de cellules ou microorganisme transformés avec un vecteur d'expression préparé selon un procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 3 à 8.

11. Procédé de production de la proapolipoprotéine A-I humaine, caractérisé en ce qu'on cultive dans des conditions de culture appropriées une cellule ou un microorganisme transformé selon la revendication 10, et en ce qu'on recueille la proapolipoprotéine A-I humaine ainsi produite.

Claims

Claims for the following Contracting States : AT, BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. Recombinant DNA sequence coding for human proapolipoprotein A-I and capable of reducing or preventing the formation of hairpins, characterised in that it comprises (a) a synthetic DNA fragment having the sequence (only one strand shown):

5' - ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG - 3'
coding for the amino acids -6 to +14 of human proapolipoprotein A-I and comprising an added ATG translation initiation codon and modified codons for the amino acid residues -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 and +14 and (b) downstream from the synthetic DNA fragment, the natural DNA sequence coding for the amino-acids +15 to +243 of human proapolipoprotein A-I.

2. Replicable cloning vector, characterised in that it contains a recombinant DNA sequence according to claim 1.

3. Expression vector, characterised in that it contains a recombinant DNA sequence according to claim 1 operably linked to a regulatory DNA sequence which regulates the expression of said recombinant DNA sequence.

4. Expression vector according to claim 3, characterised in that the regulatory DNA sequence comprises the phage lambda P_L promoter region.

5. Expression vector according to claim 3, characterised in that the recombinant DNA sequence is fused downstream from the beta-galactosidase DNA sequence and in that the regulatory DNA sequence comprises the E. coli lac promoter region.

6. Expression vector according to claim 3, characterised in that the regulatory DNA sequence comprises the yeast ARG3 promoter and transcription terminator regions.

7. Expression vector according to claim 3, characterised in that the recombinant DNA sequence lacking the ATG codon is fused downstream from the DNA sequence of the E. coli OmpA protein signal peptide and in that the regulatory DNA sequence comprises the lpp promoter, the lac promoter-operator and the lac I sequence of the lac repressor.

8. Expression vector according to claim 3, characterised in that the regulatory DNA sequence comprises the baculovirus polyhedrin gene promoter region.

9. Cell culture or microorganism transformed with an expression vector as claimed in any of claims 3 to 8.

10. Process for producing human proapolipoprotein A-I characterised in that a transformed cell or microorganism according to claim 9 is cultured under appropriate cultivation conditions, and in that the human proapolipoprotein A-I so produced is recovered.

Claims for the following Contracting State : ES

1. Process for the preparation of a recombinant DNA sequence coding for human proapolipoprotein A-I and capable of reducing or preventing the formation of hairpins, characterised in that the natural DNA

sequence coding for the amino-acids +15 to +243 of human proapolipoprotein A-I is ligated downstream from a synthetic DNA fragment having the sequence (only one strand shown):

5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3'
coding for the amino acids -6 to +14 of human proapolipoprotein A-I and comprising an added ATG translation initiation codon and modified codons for the amino acid residues -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 and +14.

2. Process for the preparation of a replicable cloning vector, characterised in that a recombinant DNA sequence prepared according to the process of claim 1 is introduced in an appropriate vector.
3. Process for the preparation of an expression vector characterised in that a recombinant DNA sequence prepared according to the process of claim 1 is operably ligated to a regulatory DNA sequence which regulates the expression of said recombinant DNA sequence.
4. Process according to claim 3, characterised in that the regulatory DNA sequence comprises the phage lambda P_L promoter region.
5. Process according to claim 3, characterised in that the recombinant DNA sequence is fused downstream from the beta-galactosidase DNA sequence and in that the regulatory DNA sequence comprises the E. coli lac promoter region.
6. Process according to claim 3, characterised in that the regulatory DNA sequence comprises the yeast ARG3 promoter and transcription terminator regions.
7. Process according to claim 3, characterised in that the recombinant DNA sequence lacking the ATG codon is fused downstream from the DNA sequence of the E. coli OmpA protein signal peptide and in that the regulatory DNA sequence comprises the lpp promoter, the lac promoter-operator and the lac I sequence of the lac repressor.
8. Process according to claim 3, characterised in that the regulatory DNA sequence comprises the baculovirus polyhedrin gene promoter region.
9. Process for the preparation of a cell or a microorganism, characterised in that a cell or a microorganism is transformed with an expression vector prepared according to a process as defined in any of claims 3 to 8.
10. Cell culture or microorganism transformed with an expression vector prepared according to a process as defined in any of claims 3 to 8.
11. Process for producing human proapolipoprotein A-I, characterised in that a transformed cell or microorganism according to claim 10 is cultured under appropriate cultivation conditions, and in that the human proapolipoprotein A-I so produced is recovered.

Patentansprüche

Patentansprüche für folgende die Vertragsstaaten : AT, BE, CH, DE, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

1. Rekombinante DNA-Sequenz, die für das menschliche Proapolipoprotein A-I codiert und die Bildung von Haarnadel-Strukturen reduzieren oder verhindern kann, dadurch gekennzeichnet, daß sie umfaßt (a) ein synthetisches DNA-Fragment mit der Sequenz (nur ein Strang dargestellt):
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3'
das für die Aminosäuren -6 bis +14 des menschlichen Proapolipoproteins A-I codiert und ein zusätzliches ATG-Codon zur Initiation der Translation und modifizierte Codons für die Reste der Aminosäuren -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 and +14 umfaßt und (b) stromabwärts des Synthetischen DNA-Fragments die natürliche DNA-Sequenz, die für die Aminosäuren +15 bis +243 des menschlichen Proapolipoproteins A-I codiert.
2. Replizierbarer Klonierungsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er die rekombinante DNA-Sequenz nach Anspruch 1 enthält.

3. Expressionsvektor, dadurch gekennzeichnet, daß er die rekombinante DNA-Sequenz nach Anspruch 1 enthält, die auf operative Weise mit einer regulatorischen DNA-Sequenz, die die Expression der rekombinanten DNA-Sequenz steuert, verbunden ist.
- 5 4. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische DNA-Sequenz den Bereich des Promotors P_L des Phagen lambda umfaßt.
5. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA-Sequenz stromabwärts mit der DNA-Sequenz der Beta-Galactosidase fusioniert ist und daß die regulatorische
10 DNA-Sequenz den Bereich des Promotors lac von E. coli umfaßt.
6. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische DNA-Sequenz die Bereiche des Promotors und des Terminators der Transkription von ARG3 der Hefe umfaßt.
- 15 7. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA-Sequenz ohne ATG-Codon stromabwärts von der DNA-Sequenz des Signalpeptids des OmpA-Proteins von E. coli fusioniert ist und daß die regulatorische DNA-Sequenz den Promotor lpp, den Promotor-Operator lac und die Sequenz lac I des Repressors lac umfaßt.
- 20 8. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische DNA-Sequenz den Bereich des Promotors des Polyhedrin-Gens des Baculovirus umfaßt.
9. Zellkultur oder Mikroorganismus, transformiert mit einem Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 8.
- 25 10. Verfahren zur Herstellung des menschlichen Proapolipoproteins A-I, dadurch gekennzeichnet, daß man unter geeigneten Kulturbedingungen eine transformierte Zelle oder Mikroorganismus gemäß Anspruch 9 kultiviert und, daß man das so hergestellte menschliche Proapolipoprotein A-I gewinnt.

30 **Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat : ES**

1. Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten DNA-Sequenz, die für das menschliche Proapolipoprotein A-I codiert und die Bildung von Haarnadel-Strukturen reduzieren oder verhindern kann, dadurch gekennzeichnet, daß man die natürliche DNA-Sequenz, die für die Aminosäuren +15 bis
35 +243 des menschlichen Proapolipoproteins A-I codiert, verbindet stromabwärts von einem synthetischen DNA-Fragment der Sequenz (nur ein Strang dargestellt):
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3'
das für die Aminosäuren -6 bis +14 des menschlichen Proapolipoproteins A-I codiert und ein
40 zusätzliches ATG-Codon zur Initiation der Translation und modifizierte Codons für die Reste der Aminosäuren -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 and +14 umfaßt.
2. Verfahren zur Herstellung eines replizierbaren Klonierungsvektors, dadurch gekennzeichnet, daß man die gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellte rekombinante DNA-Sequenz in einen
45 geeigneten Vektor einfügt.
3. Verfahren zur Herstellung eines Expressionsvektors, dadurch gekennzeichnet, daß man auf operative Weise die gemäß dem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellte rekombinante DNA-Sequenz mit einer regulatorischen DNA-Sequenz, die die Expression der rekombinanten DNA-Sequenz steuert, ver-
50 bindet.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische DNA-Sequenz den Bereich des Promotors P_L des Phagen lambda umfaßt.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA-Sequenz stromabwärts mit der DNA-Sequenz der Beta-Galactosidase fusioniert ist und daß die regulatorische DNA-
55 Sequenz den Bereich des Promotors lac von E. coli umfaßt.

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische DNA-Sequenz die Bereiche des Promotors und des Terminators der Transkription von ARG3 der Hefe umfaßt.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA-Sequenz ohne ATG-Codon stromabwärts von der DNA-Sequenz des Signalpeptids des OmpA-Proteins von E. coli fusioniert ist und daß die regulatorische DNA-Sequenz den Promotor lpp, den Promotor-Operator lac und die Sequenz lac I des Repressors lac umfaßt.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische DNA-Sequenz den Bereich des Promotors des Polyhedrin-Gens des Baculovirus umfaßt.
9. Verfahren zur Herstellung einer Zelle oder eines Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Zelle oder einen Mikroorganismus mit einem Expressionsvektor transformiert, der nach einem Verfahren wie in einem der Ansprüche 3 bis 8 beschrieben hergestellt wurde.
- 15 10. Zellkultur oder Mikroorganismus, transformiert mit einem Expressionsvektor, der nach einem Verfahren wie in einem der Ansprüche 3 bis 8 beschrieben hergestellt wurde.
- 20 11. Verfahren zur Herstellung des menschlichen Proapolipoproteins A-I, dadurch gekennzeichnet, daß man unter geeigneten Kulturbedingungen eine transformierte Zelle oder Mikroorganismus gemäß Anspruch 10 kultiviert und, daß man das so hergestellte menschliche Proapolipoprotein A-I gewinnt.

10 20 30 40 50 60 70
 TCCCCACGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGGGGTGCTGACCTTGGCCGTGCTCTTCTGACGGGGAGCCAGGCTCGGCA
 M K A A V L T L A V L F L T G S Q A R H
 -20 -10

80 90 100 110 120 130 140 150
 TTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCCAGAGCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTC
 F W Q Q D E P P Q S P W D R V K D L A T V Y V D V L
 1 10 20

160 170 180 190 200 210 220 230
 AAAGACAGGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCGGCTTGGGAAAACAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACA
 K D S G R D Y V S Q F E G S A L G K O L N L K L L D
 30 40

240 250 260 270 280 290 300 310
 ACTGGGACAGGGTACCTCCACCTTCAGCAAGCTGGCGAAGCTGGGCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCT
 N W D S V T S T F S K L R E Q L G P V T Q E F W D N L
 50 60 70

320 330 340 350 360 370 380 390
 GGAAGAGGAGACAGAGGGCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTG
 E K E T E G L R Q E M S K D L E E V K A K V Q P Y L
 80 90 100

400 410 420 430 440 450 460 470
 GAGGACTTCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACGCCAGAGGTGGAGCCGCTGCGGCGAGAGCTCCAG
 D D F Q K K W Q E E M E L Y R Q K V E P L R A E L Q
 110 120

FIG. 1A

480 490 500 510 520 530 540 550
 ATGGGCGGGGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGGGAGGAGATGGGCGACGGGCGGGCGC
 E G A R Q K L H E L Q E K L S P L G E E M R D R A A
 130 140 150

560 570 580 590 600 610 620 630
 CCATGTGGAGGGCTGGCAGCATCTGGCCCCCTACAGCGAGAGCTGGGCGAGGCTTGGGCGGGGCGCTTGGAGCT
 H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A A R L E A
 160 170 180

640 650 660 670 680 690 700 710
 CTCAGGAGAGCGGGGCGCAGACTGGCGAGTACCAGCGCAAGGCCAGCGAGCATCTGAGCAGCTCAGCGAGAAGG
 L K E N G G A R L A E Y H A K A T E H L S T L S E K
 190 200

720 730 740 750 760 770 780
 CCAAGCGGGGCTGGAGGACCTCGCCAGGGCTGCTGGCGGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTGAGCTTCTGAGGCT
 A K P A L E D L R Q G L L P V L E S F K V S F L S A
 210 220 230

790 800 810 820 830 840 850 860
 CTGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGAGGGCGGGGCGGGGCGGGGCTTCCCGGTGCTCAGAATAAGCT
 L E E Y T K K L N T Q
 240 Stop

870 878
 TTCCAAGTGGG

FIG. 1B

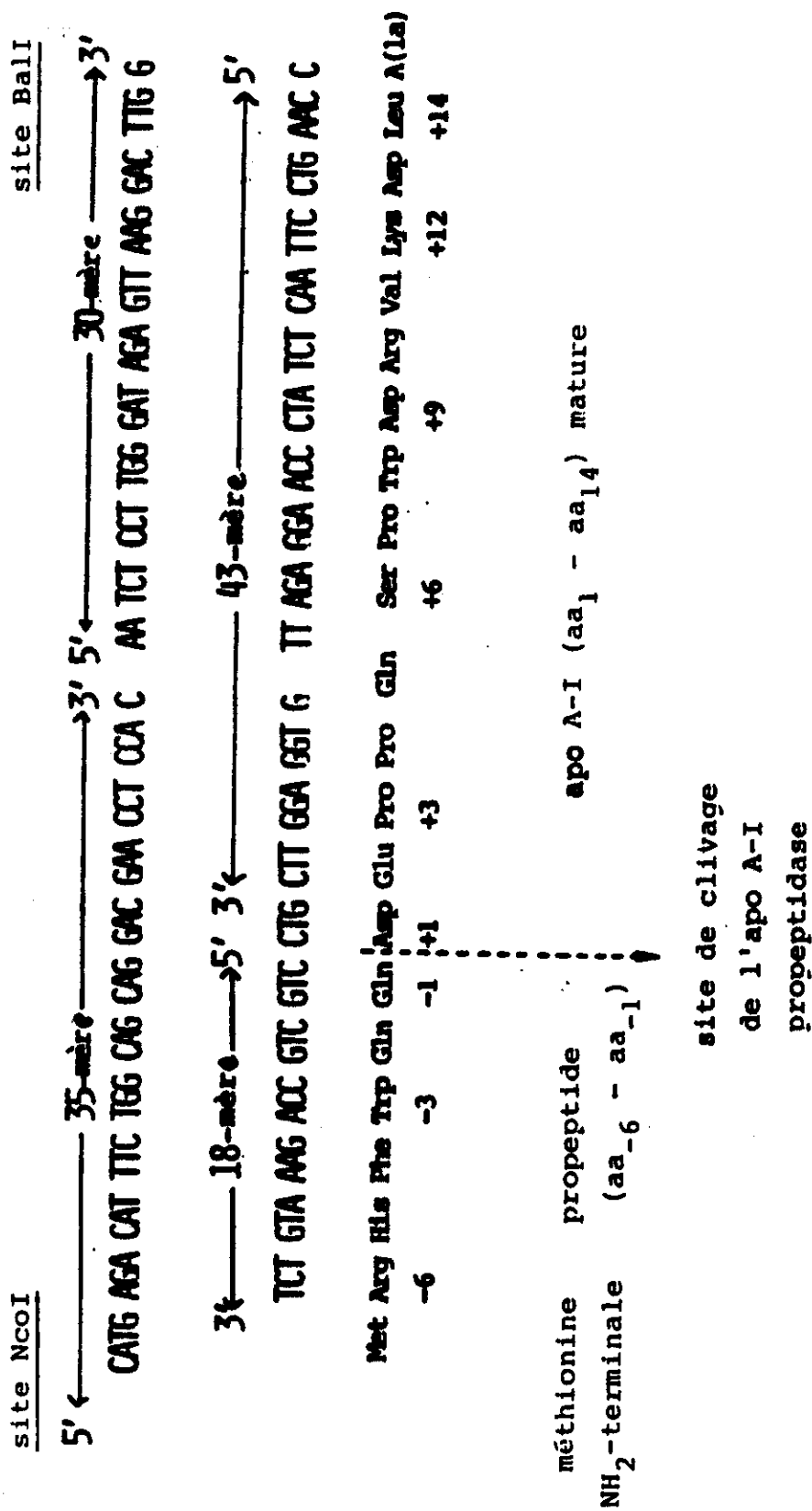


FIG.2

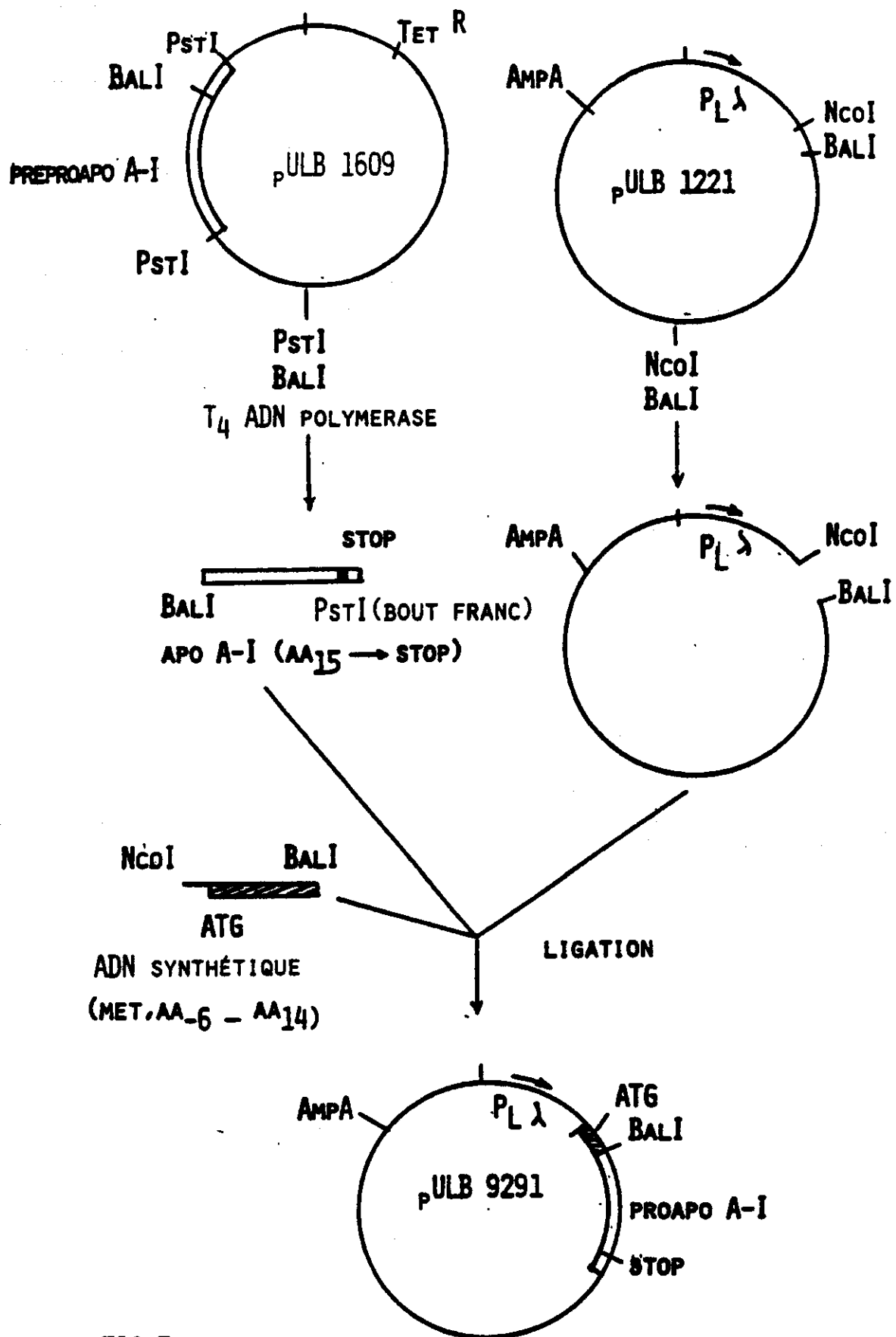


FIG.3

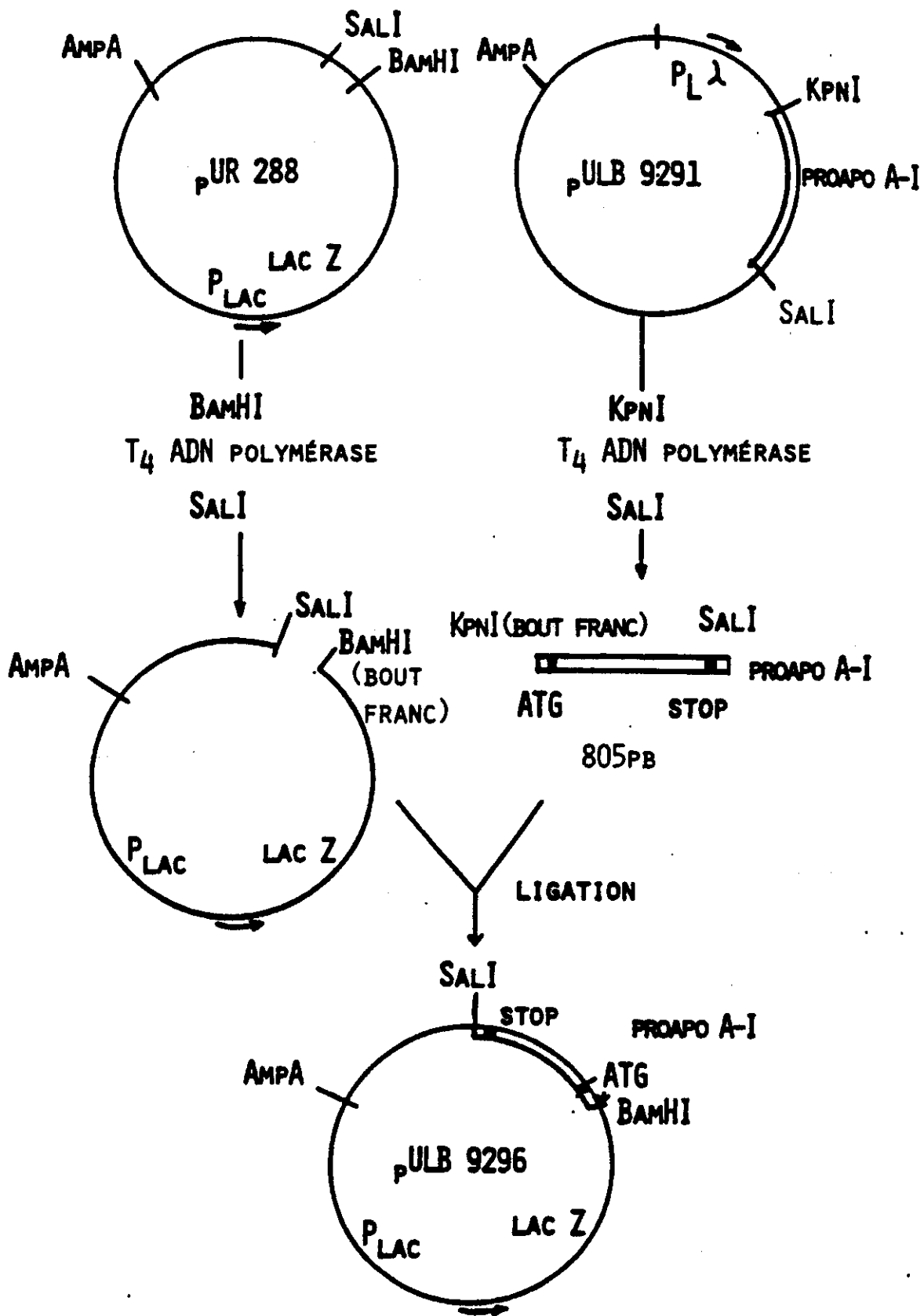


FIG.4

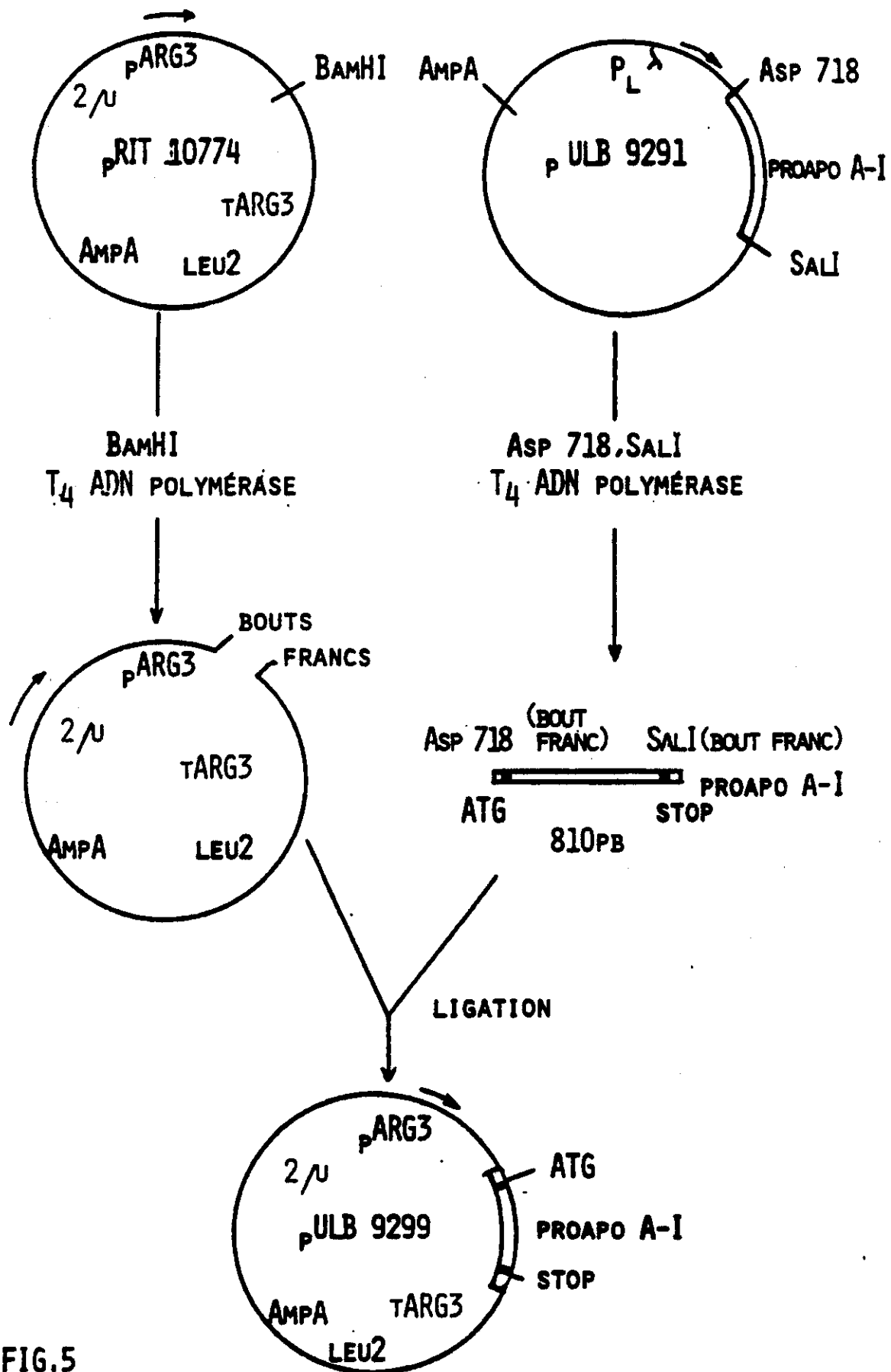


FIG.5

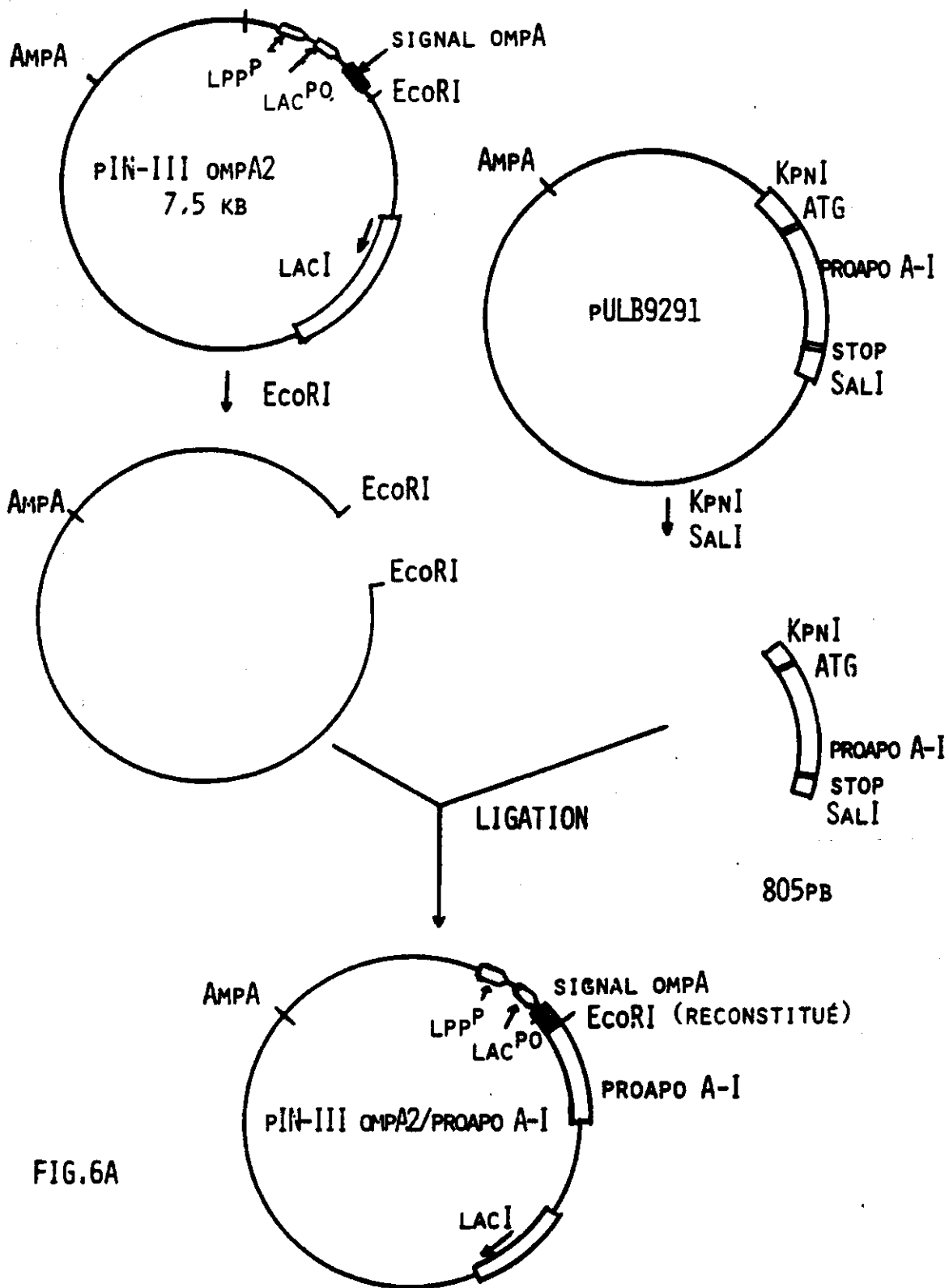
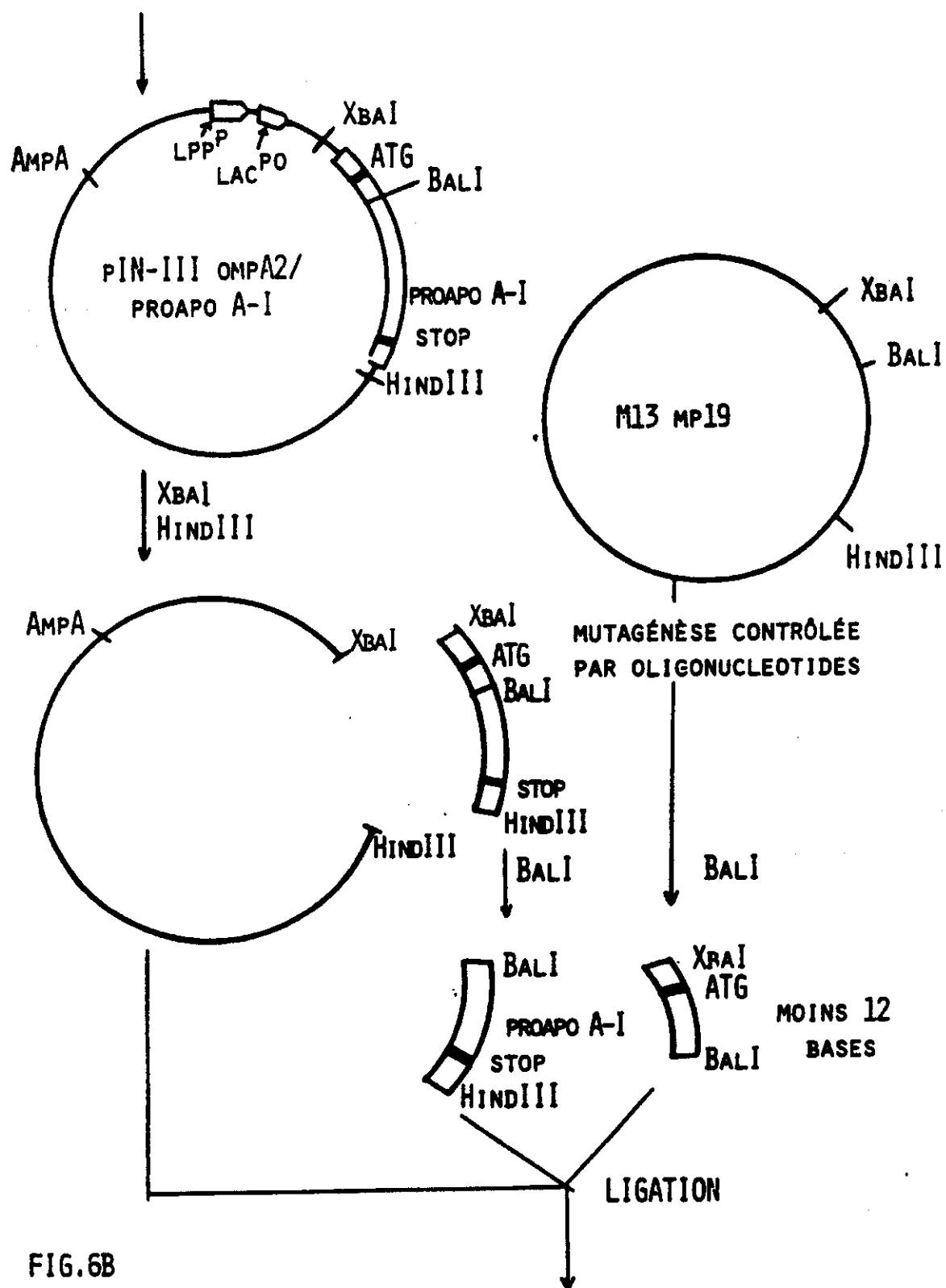


FIG.6A



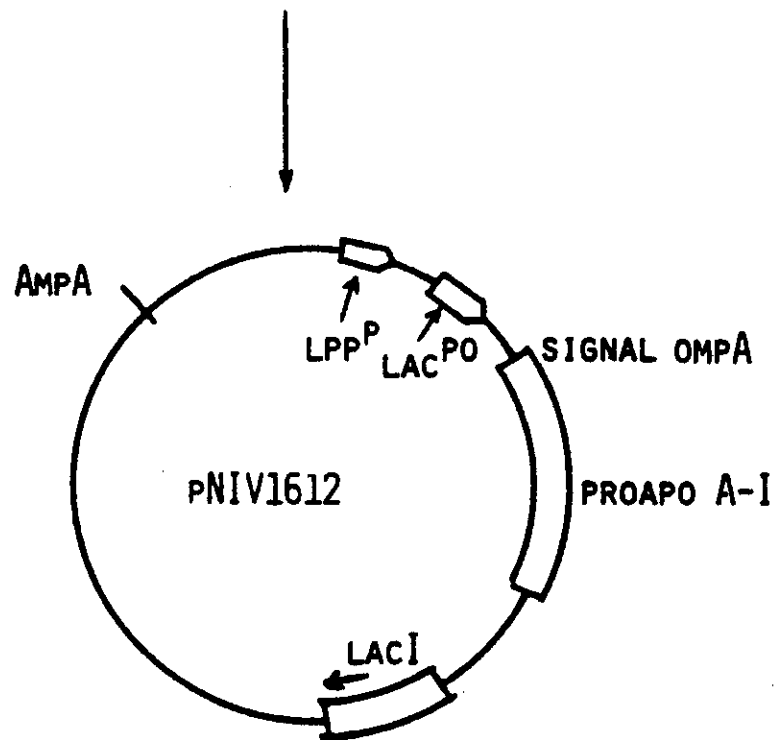


FIG.6C

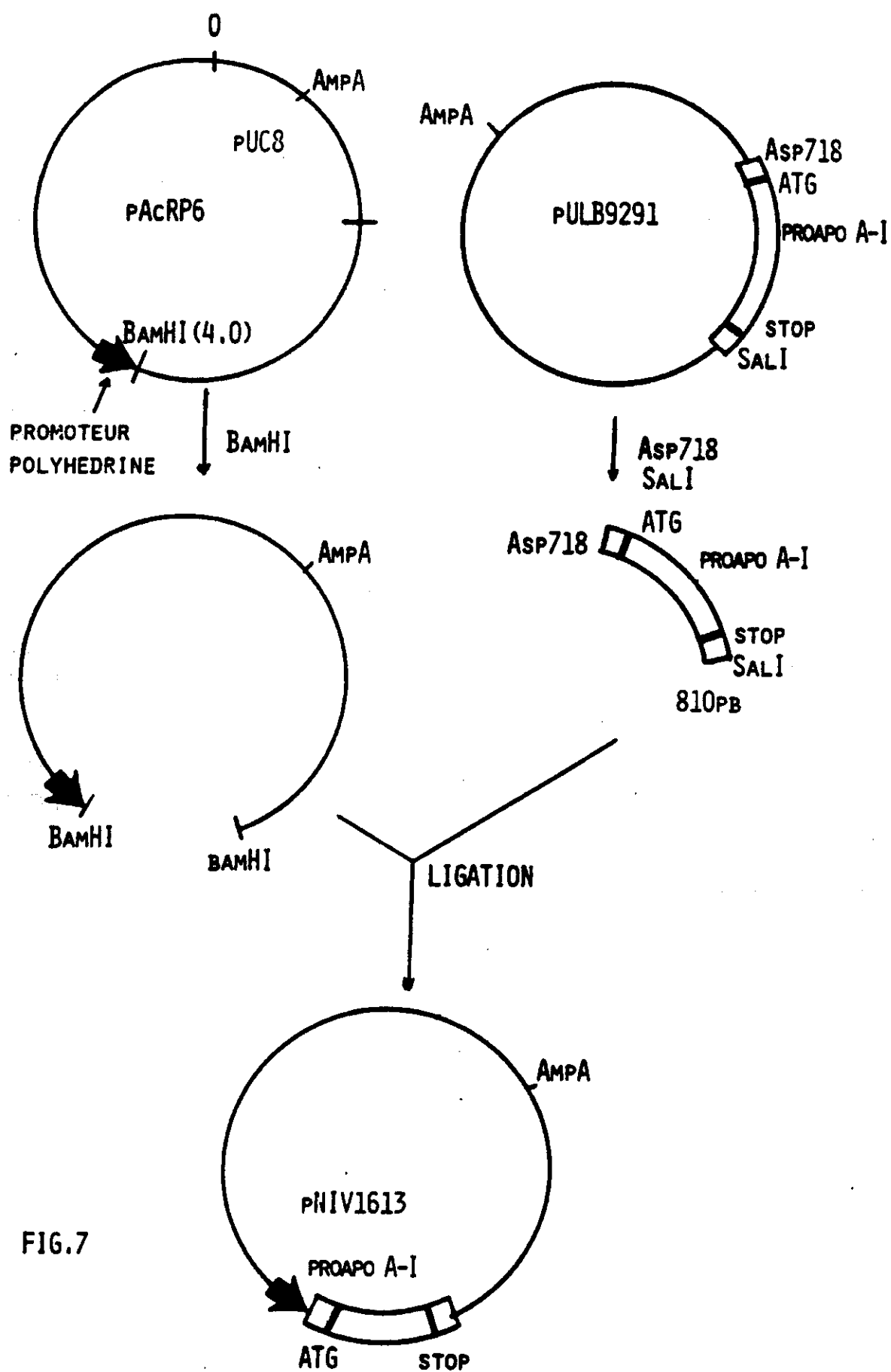


FIG.7

REGISTER ENTRY FOR EP0293357

European Application No EP88870095.2 filing date 24.05.1988

Application in French

Priority claimed:

28.05.1987 in United Kingdom - doc: 8712540

Designated States BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE AT

Title EXPRESSION OF HUMAN PROAPOLIPOPROTEIN A-1.

Applicant/Proprietor

U C B, S.A., 326, Avenue Louise, B-1050 Bruxelles, Belgium

[ADP No. 50049394001]

Inventors

ALEX BOLLEN, 65, Gaasbeekstraat, B-1711 Itterbeek, Belgium

[ADP No. 56181654001]

JEAN GOBERT, 120, rue du Cornet, B-1040 Bruxelles, Belgium

[ADP No. 53655577001]

ERNST WÜLFERT, 52, Avenue des Aubépines, B-1180 Bruxelles, Belgium

[ADP No. 56181662001]

Classified to

C07K C12N C12P

Address for Service

VENNER SHIPLEY & CO, 20 Little Britain, LONDON, EC1A 7DH, United Kingdom

[ADP No. 00001669004]

EPO Representative

RAYMOND DUSSELDORP, U.C.B. S.A. Département D.T.B. 326, avenue Louise, Bte

7, B-1050 Bruxelles, Belgium

[ADP No. 50451624001]

Publication No EP0293357 dated 30.11.1988 and granted by EPO 05.05.1993.

Publication in French

Examination requested 08.05.1989

Patent Granted with effect from 05.05.1993 (Section 25(1)) with title

EXPRESSION OF HUMAN PROAPOLIPOPROTEIN A-1. Translation filed 14.05.1993

05.04.1993 Notification from EPO of change of Applicant/Proprietor details
from

U C B, S.A., 326, Avenue Louise, B-1050 Bruxelles, Belgium

[ADP No. 50049394001]

to

U C B, S.A., 326, Avenue Louise, Bte 7, B-1050 Bruxelles, Belgium

[ADP No. 50049394001]

Entry Type 25.14 Staff ID. RD06 Auth ID. EPT

06.04.1993 FILE RAISED.

Entry Type 10.1 Staff ID. SS1 Auth ID. AA

REGISTER ENTRY FOR EP0293357 (Cont.)

TIMED: 21/06/94 16:19:46

PAGE: 2

24.05.1993 VENNER SHIPLEY & CO, 20 Little Britain, LONDON, EC1A 7DH, United
Kingdom [ADP No. 00001669004]
registered as address for service
Entry Type 8.11 Staff ID. RL2 Auth ID. F54

**** END OF REGISTER ENTRY ****

OA80-01
EP

OPTICS - PATENTS

21/06/94 16:19:00
PAGE: 1

RENEWAL DETAILS

PUBLICATION NUMBER EP0293357

PROPRIETOR(S)

U C B, S.A., 326, Avenue Louise, Bte 7, B-1050 Bruxelles, Belgium

DATE FILED 24.05.1988

DATE GRANTED 05.05.1993

DATE NEXT RENEWAL DUE 24.05.1995

DATE NOT IN FORCE

DATE OF LAST RENEWAL 12.05.1994

YEAR OF LAST RENEWAL 07

STATUS PATENT IN FORCE

GREAT BRITAIN)
ENGLAND)
)

IN THE MATTER OF an Application
for a Hong Kong Registration
Patent

I, John Patrick Bryon, BSc., C.Chem., AIL.,
do hereby certify:

THAT I am a translator to

Taylor & Meyer, of 29 Kingsmead Road, London SW2 3HY, England and
known as such to the undersigned Notary Public;

THAT I have a competent knowledge of the French and English
languages;

AND THAT the attached document is a true and correct translation
of the European Patent in the name of
UCB S.A.

granted under Number 0 293 357

Signed by JOHN PATRICK BRYON)

This 9 day of August

1994)

.....
JOHN PATRICK BRYON

I hereby certify the authenticity of the above signature of
JOHN PATRICK BRYON whose identity I attest.

9
Tuesday

, the

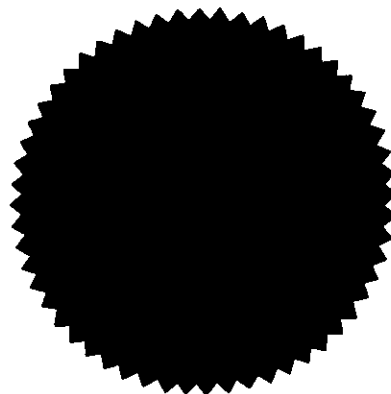
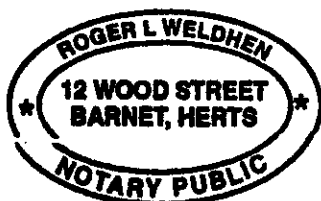
9

day of

August

1994

.....



(19) **European Patent Office**

(11) Publication Number: **0 293 357 B1**

(12)

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Publication date of the patent specification **05.05.93**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 15/00**

(21) Filing number: **88870095.2**

(22) Date of filing: **24.05.88**

(54) **Expression of the human proapolipoprotein A-I**

(30) Priority: **28.05.87 GB 8712540**

(73) Patentee: **U C B, S.A.
326, Avenue Louise, Bte 7
B- 1050 Brussels (BE)**

(43) Publication date of application:
30.11.88 Bulletin 88/48

(72) Inventor: **Bollen, Alex
65, Gaasbeekstraat
B-1711 Itterbeek(BE)**

(45) Date of publication of notice of grant
05.05.93 Bulletin 93/18

Inventor: **Gobert, Jean
120, rue du Cornet
B-1040 Brussels(BE)**

(84) Designated contracting states:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Inventor: **Wülfert, Ernst
52, Avenue des Aubépines
B-1180 Brussels(BE)**

(56) Citations:
**EP-A- 0 267 703
WO-A- 86/05810**

FEBS LETTERS, vol 194, no.2, january
1986, pages 343-346, Federation of
European Biochemical Societies;
R. LORENZETTI et al.:
"Expression of the human apolipoprotein AI
gene fused to the E.coli gene for beta-
galactosidase"

NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.13, no.6,
march 1985, pages 1923-1938, IRL Press Ltd,
GB; **G. BUELL et al.:** "Optimizing the expres-
sion in E. coli of a synthetic gene encoding
somatomedin- C (IGF-I)"

(74) Attorney: **Dusseldorp, Raymond et al
U.C.B. S.A. Département D.T.B.
326, avenue Louise, Bte 7
B-1050 Brussels (BE)**

The reminder is given that: Within a period of nine months, reckoning from the date of publication of the mention of the granting of the European patent, any person can give notice to the European Patent Office of opposition to the granted European patent. The opposition must be filed in writing, stating the grounds on which it is based. It is not considered to be filed until after payment of the opposition fee (Art. 99(1) European Patent Convention).

The present invention relates to new recombinant DNA sequences comprising a sequence coding for human proapolipoprotein A-I, to cloning and expression vectors containing these DNA sequences, to host cells transformed with these expression vectors, as well as to production processes for human proapolipoprotein A-I using new recombinant DNA sequences, vectors and transformants.

Human apolipoprotein A-I (apo A-I) is the main protein constituent of high density lipoproteins (HDL) and of lymph chylomicrons. The liver and the small intestine are primary centres for the synthesis of apo A-I. Apo A-I is synthesized in these organs in the form of a protein precursor (preproapo A-I). Cotranslational cleavage of the prepeptide takes place within the cell and the proapo A-I is secreted in the plasma and lymph.

Proapo A-I contains six additional amino acids (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln) which are attached to the terminal amino group of the apo A-I. On reaching the vascular region, proapo A-I is cleaved in vivo by a specific proteolytic enzyme (apo A-I propeptidase) to give mature apo A-I.

Mature apo A-I is a single non glycosylated polypeptide of known sequence, composed of 243 amino acids (H.B.BREWER et al., Biochem.Biophys.Res.Comm. 80, (1978), 623-630); it serves as a cofactor for the plasma enzyme of lecithin: cholesterol acyltransferase, which is responsible for the formation of most cholesterol esters in the plasma. Defects in apolipoprotein structures or biosynthesis may result in disorders of the plasma lipid transport system and in the development of coronary artery disease. It has been shown that low levels of apo A-I and of HDL in plasma constitute a high risk factor in heart attacks (myocardial infarction) and in other atherosclerotic vascular diseases. Mutations in the gene coding for apo A-I in particular, have been associated with reduced HDL levels as well as premature coronary artery diseases.

Apo A-I and HDL are the major plasma constituents that participate in the transfer of cholesterol from peripheral

tissues (arteries) to the liver (also known as reverse cholesterol transport) to be excreted from the system. Since accumulation of cholesterol in the arteries is the characteristic feature and most important mechanism in atherosclerosis, stimulation of reverse cholesterol transport by means of apo A-I may retard and reverse the atherosclerotic process and hence reduce the incidence of heart attacks.

Maturation of proapo A-I into apo A-I can occur quantitatively outside the cell with a residence time in the blood of less than 12 hours. Since proapo A-I is the major, if not the only, precursor of mature apo A-I, it could be used in replacement therapy whenever HDL levels decrease, for example in hereditary or acquired deficiencies. Because of the therapeutic utility of apo A-I in general, researchers have been looking for techniques which would enable apo A-I to be produced in large quantities. Conventionally, such techniques comprise purification of apo A-I from blood plasma.

Several publications (P.CHEUNG and L.CHAN, *Nucleic Acids Res.* 11, (1983), 3703-3715; J.J.SEILHAMER et al., *DNA*, 3, (1984), 309-317 and Japanese Patent Application N° 96998/86) have shown that the complementary DNA coding for preproapo A-I can be obtained by well-known genetic engineering techniques.

R.LORENZETTI et al., (*FEBS Lett.* 194, (1986), 343-346) have shown that apo A-I can be expressed in E.Coli as an uncleavable protein fused to beta-galactosidase. However, attempts to express mature apo A-I in the form of an unfused protein have remained unsuccessful.

In the above-mentioned Japanese Patent Application 96998/86, the expression is described of a protein similar to human apolipoprotein A-I in E.Coli, which has been transformed with a pHAIE-I plasmid containing the structural apo A-I gene under the control of the tac promoter. However, the structural gene is incomplete, and consists of the codons for amino acids +4 to +243, preceded by an ATG translation initiation codon. As a result, the expression product obtained contains N-terminal methionine (corresponding to the ATG

codon) which might cause secondary effects when used in therapy.

J.B. MALLORY et.al. (J.Biol.Chem.262, (1987), 4241-4247; PCT International Patent Applications WO 86/04920 and WO 87/02062) describe the expression of human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells (animal cell culture). The construction used contains the complete human preproapolipoprotein A-I gene. The Chinese hamster ovary cells appear to transform the proapo form into the mature apo form, since only 5 to 10% of the secreted apo A-I protein is proapo A-I, the remainder being the mature apo A-I protein. The productivity of the system is relatively low, since 0.5×10^6 cells secrete only 25-30 $\mu\text{g/ml}$ of apo A-I in 24 hours. In PCT International Patent Application WO 87/02062, some examples relate to expression of human apolipoprotein A-I in other hosts, such as E. coli (bacterial host) and S. cerevisiae (yeast). However, none of the constructions used contains the genetic information for the proapo form, and the expressed protein is not human proapolipoprotein A-I.

The present invention concerns the means and methods of preparing human proapolipoprotein A-I by means of recombinant DNA technology; that is to say, mature proapo A-I protein which is susceptible to cleavage by the specific proteolytic apo A-I propeptidase enzyme. The term "mature", as used herein, is understood to mean not only proapo A-I as such, but also the corresponding protein, of which the first amino acid is methionine the presence of which is due to the ATG translation initiation codon in the expression convector construction.

The present invention relates to the construction of cloning and expression vectors containing a DNA sequence encoding human proapo A-I, so as to enable the amplification, and hence expression, of the mature human proapo A-I protein as well as met-proapo A-I, its fused conjugates or its signal N-terminal conjugates. Similarly, the present invention concerns viable cell cultures or micro-organisms genetically altered by virtue of their harbouring such vectors, and

capable of producing human proapo A-I polypeptide. In addition, the present invention provides human proapo A-I in a physical state distinct from that which is found in, or isolated from, a natural source or environment; by virtue of its method of preparation, the human proapo A-I is essentially free from usual endogenous proteins and other native materials or substances.

The present invention concerns the production of human proapo A-I by means of the recombinant DNA technique in all its aspects and should not be interpreted as being limited to specific details described herein and encompassed within the scope of the invention.

One fundamental aspect of the present invention concerns the production of a protein which consists of or contains mature human proapo A-I and which, on account of this, can be converted, in vitro and in vivo, into mature human apo A-I by means of the proteolytic action of apo A-I propeptidase. The human proapo A-I product may be used as such for therapeutic purposes; met-proapo A-I may also be used if the presence of the methionyl radical is pharmaceutically acceptable, because this product may be converted naturally and efficiently in the blood stream by naturally occurring propeptidase to provide authentic mature human apo A-I. If desired, human proapo A-I may be produced in selected micro-organisms or cell cultures which are capable of processing N-terminal methionine, and which, consequently, are capable of producing human proapo A-I in a form which does not contain N-terminal methionine. Alternatively, whether or not it contains an N-terminal methionyl radical, human proapo A-I may be cleaved in vitro to obtain mature human apo A-I, which can be used for therapeutic applications. The same applies to fusion conjugates and conjugates including the N-terminal signal of proapo A-I; cleavage produces authentic human apo A-I lacking the N-terminal methionine.

A second important aspect of the present invention lies in the use of a modified sequence encoding at least part of the human proapo A-I molecule, this modified coding sequence

improving the translational efficiency by virtue of the reduction or even prevention of hairpin structure formation. It is possible that R. LORENZETTI et.al. (FEBS Lett. 194, (1986), 343-346) were not able to detect expression of an unfused mature apo A-I protein because their DNA constructions were susceptible to forming hairpin structures to an appreciable extent, leading to very inefficient expression. Surprisingly, it has been found that efficient expression can be ensured by appropriate modification of a few codons in the coding sequence for amino acids - 6 to +14 of human proapo A-I. The words "appropriate modification" as used herein imply that some of the natural codons are replaced by other codons which, according to the genetic code, represent the same amino acids, and further imply that all the modifications taken together lead to a reduction in, or even prevention of, hairpin structure formation. It is important to note that the modifications to the DNA sequence have no effect on the nature of the propeptidase cleavage site, since the amino acid sequence recognized by the propeptidase is preserved in the construction.

On the protein level, the present invention relates to human proapo A-I as a product of a genetically modified cell culture or micro-organism. This human proapo A-I may be in the form of mature proapo A-I, in the form of mature proapo A-I preceded by a methionine residue, in the form of a fused protein such as for example beta galactosidase-proapo A-I protein and in the form of the preproapo A-I compound. The product obtained is essentially free of usual endogenous proteins and other native materials or substances common to the natural source (blood plasma) of the protein concerned. The cell culture or microorganism used in the production is not limited to specific cell lines and organisms: both prokaryotic and eukaryotic cells can be utilized, including animal and human cell lines. For illustrative purposes only, we give herein as an example, expression in E. coli bacterium (as representative of prokaryotic cells) and in the yeast

Saccharomyces cerevisiae as well as in insect cells infected by baculovirus (as representative of eukaryotic cells).

On the protein level, the present invention also relates to human apo A-I obtained by treatment of the human proapo A-I prepared as above, with apo A-I propeptidase. This human apo A-I will be identical to the authentic form of human apo A-I and will be lacking in any N-terminal methionine residue.

On the application level, the present invention relates to pharmaceutical compositions containing the above human proapo A-I and/or apo A-I, and containing in addition, at least one pharmaceutically acceptable carrier, solvent, diluent or excipient, suitably selected in accordance with the route of administration and the normal requirements for the formulation of pharmaceutical compositions.

On the DNA level, the present invention relates to a recombinant DNA sequence comprising a sequence which codes for human proapo A-I, in which part of the natural coding sequence has been replaced by a DNA fragment coding for the same amino acids but consisting of a different nucleotide sequence, so as to reduce or prevent formation of hairpin structures. In a specific preferred embodiment, the natural sequence coding for the amino acids -6 to +14 of proapo A-I has been replaced by the sequence (only one strand shown):

5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGG ACTTG-3' the said sequence comprising an additional ATG translation initiation codon and modified codons for the amino acid residues -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7 +10, +11 and +14.

On the DNA level, the present invention also relates to replicable cloning vectors and expression vectors comprising the aforesaid recombinant DNA sequence which codes for human proapo A-I. The present invention more especially relates to the recombinant plasmids pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIVI612 and pNIV1613, the construction of which is described hereinafter. The first mentioned plasmids pULB9291 and pULB9292 contain the modified proapo A-I structural gene preceded by an ATG codon and under the control of the phage lambda P_L promoter. These plasmids are suitable expression

vectors for E. coli and direct the synthesis of human proapo A-I, which can be cleaved by the propeptidase to generate authentic mature human apo A-I. When the plasmid pULB9296 is introduced into E. coli, it directs the expression of a fused protein containing beta-galactosidase and human proapo A-I under control of the lac promoter region of E. coli. Since the fused product still contains the propeptidase cleavage sequence, it can be cleaved to yield authentic mature human apo A-I.

The plasmid pULB9299 is an expression vector which is suitable for yeast species and contains ARG3 promoter and translation terminator regions to ensure efficient expression in yeast. Once again, the human proapo A-I obtained may be split up by propeptidase to provide authentic mature human apo A-I.

The pNIV1612 plasmid contains the proapo A-I structural gene fused to the DNA sequence of the E. Coli OmpA protein signal peptide and under the control of the lpp (lipoprotein) and of the lac promoter-operator. In the construction, the sequence coding for the signal peptide of ompA precedes the proapo A-I sequence without the ATG translation initiation codon. The plasmid is an appropriate secretion vector for E. coli and directs the synthesis of human proapo A-I which can be secreted into the periplasm without N-terminal methionine. The pNIV1613 plasmid is a transfer vector for introducing the human proapo A-I cDNA sequence into baculovirus. It comprises the polyhedrin promoter of baculovirus and the structural gene of proapo A-I, including the ATG translation initiation codon. In conjunction with the wild strain of baculovirus (Autographa Californica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV), the pNIV1613 plasmid directs the synthesis of proapo A-I in insect cells, and can be found free of methionine following post-translational modifications in insect cells.

Finally, the present invention also relates to cell cultures and micro-organisms which have been transformed by a cloning vector or a translation vector as described above, and

in particular, to transformed cell cultures and transformed micro-organisms which are capable of producing human proapo A-I . The expression "transformed", as used herein, has the broad meaning of "genetically modified" and is certainly not limited to the narrow concept of "bacterial transformation". Depending on the nature of the vector employed and the host selected, any compatible genetic engineering technique for obtaining the desired genetic modification can be used, including transfection, transduction etc.

Cell cultures and micro-organisms prepared according to the invention may be used for industrial scale production of human proapolipoprotein A-I by fermentation.

The invention described herein has been carried out using, among others, the MM 294 strain of micro-organism E. coli K12 (endoA thi⁻, hsdR, supE); this strain has been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC n° 33625) without restriction as regards access. However, various other microbial strains may be used, including known strains of E. coli such as E. coli B, E. coli x 1776 (ATCC n° 31537, deposited on 3rd July 1979, without restriction), E. coli AR 58, N99 derivative (ATCC n°33956) with cIII⁻, cI 857, bio⁻ and delta H functions devoid of lambda, sold by PL-PHARMACIA (J.E.MOTT et al., Proc.Natl.Acad.Sci,USA, 82, (1985), 88-92; G.DEVARE et al., Cell,36, (1984), 43-49), E. coli JM101 (ATCC n° 33876) (J.MESSING et al., Nucleic Acids Res.9, (1981), 309-321), or E. coli JA 221 (lpp⁻, hdsM⁺, trpE5, leuB6, lacY, recAI/F', lacI^q, lac⁺, pro⁺) (J. GHAYEB et al., EMBO J.3, (1984), 2437-2442), or other microbial strains many of which have been deposited and are accessible at recognized micro-organism depository institutions, such as the American Type Culture Collection (ATCC) -- cf the ATCC catalogue listing. These other microorganisms include, for example, Bacilli such as Bacillus subtilis and other Enterobacteriaceae among which may be mentioned as examples Salmonella Typhimurium and Serratia marcesans, utilizing plasmids that can replicate and express heterologous gene sequences.

Expression plasmids for use with bacteria, e.g. E. coli, are usually obtained from plasmid pBR322 used as a vector (deposited in the ATCC under accession number 37017) and appropriately inserting the heterologous gene sequence together with translational start and stop signals in the correct reading frame with a functional promoter, taking advantage of natural or synthetically created restriction sites. The vector will carry one or more phenotypic selection characteristic genes and an origin of replication to ensure amplification within the host. Once again, the heterologous insert can be aligned so as to be expressed at the same time as a fused presequence, derived for example from the lac system genes.

Baculovirus expression vectors, for example pAcRP6 and pAcYM1 (Y.MATSUURA et al., J.Gen.Virol.68, (1987), 1233-1250) and wild type baculovirus (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) are now widely used. They are described in detail in the literature and can be obtained mainly from the Texas Agricultural Experiment Station.

According to the present invention, various insect cells may also be used as host for compatible expression vectors, such as for example Spodoptera frugiperda cells Sf9 (M.D. SUMMER and G.E. SMITH. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas University, College Station, (1987); ATCC CRL 1711).

According to the present invention, various yeast strains may also be used, hosting compatible expression vectors, such as the plasmid YRp7 (D.T. STINCHCOMB et al., Nature, 282, (1979), 39-43) which is capable of selection and replication in both E. coli and yeast, particularly Saccharomyces cerevisiae.

Yeast strains which may be used are strain RH218 (G.MIOZZARI et al., J.Bacteriol.134, (1978), 48-59) deposited with the American Type Culture Collection without restriction (ATCC No. 44076), the 10S44c strain (T.CABEZON et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81, (1984), 6594-6598) which has the leu2-3, leu2-112, pep 4-3 genotype (M.HOYLAERTS et al., FEBS

Lett.204, (1986), 83-87) and strain Ic 1697d (argJ, leu2-1) an arginine bradotroph (ATCC No.20631).

To express a heterologous gene such as the cDNA for human proapo A-1 in yeast, it is necessary to construct a plasmid vector containing four components.

The first component is the fragment which allows for transformation of both E. coli and yeast and which must consequently contain a selectable gene from each organism. This can be the gene responsible for ampicillin resistance derived from E. coli (cf. "AmpA") and the gene leu2 from yeast. This component also requires an origin of replication from each organism to be maintained as a plasmid DNA in both organisms. This can be the E. coli origin from pBR322 and the ars1 origin from chromosome III of yeast or the origin of replication from 2 μ circle DNA.

The second component of the plasmid is a sequence situated at 5' from a highly expressed yeast gene in order to promote transcription of a structural gene placed downstream. The sequence situated at 5' can be that from the yeast TDH3 or ARG3 genes. The fragment is constructed in such a way as to remove the TDH3 or ARG3 structural sequences, which are replaced with a sequence containing alternative restriction sites, such as NcoI or BamHI restriction sites, for the convenient attachment of this sequence situated at 5' in the structural gene.

The third component of the system is a structural gene constructed in such a way that it contains both an ATG translational start and translational stop signal.

The fourth component is a yeast DNA sequence containing the yeast gene sequence situated at 3', which contains the appropriate signals for transcription termination and polyadenylation. For example, plasmids directing the production of human proapo A-I in yeast can be constructed by inserting gene fragments for the human proapo A-I polypeptide into the BamHI site of expression plasmid pRIT 10774 as described in European Patent Application No.151102.

Additional characteristics of the invention will furthermore become apparent in the course of the following description of preferred constructions for vectors containing a recombinant DNA sequence according to the invention and of the conditions in which these vectors can be used. Reference will be made on this occasion to diagrams in which :

- Figures 1A and B show the nucleotide and amino acid sequence of human preproapo A-I. The nucleotide sequence of the human preproapo A-I messenger RNA was determined from DNA sequence analysis of the cDNA clone pULB1609. Predicted amino acids in the signal peptide, propeptide and mature apo A-I polypeptide are shown and are numbered from the first amino acid residue of the apo A-I protein. The region corresponding to the synthetic DNA probe used to isolate the clone is underlined. Single-letter abbreviations used for designating amino acids are as follows :
A, alanine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenyl-alanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophane; and Y, tyrosine.
- Figure 2 represents the synthetic scheme of an oligonucleotic adapter for the construction of a DNA fragment coding for the 6 amino acids of the propeptide and for the first 14 amino acids of mature apo A-I polypeptide, together with the initiation ATG codon. The arrows indicate the oligonucleotides used to synthesize the 65/61 base pair (bp) NcoI-BalI fragment.
- Figure 3 shows the construction of plasmid pULB9291 which carries the P_L lambda regulatory regions and the proapo A-I nucleotide sequence.
- Figure 4 shows the construction of plasmid pULB9296 which carries the E. coli lac promoter and a beta-galactosidase sequence fused with that of proapo A-I.

- Figure 5 shows the construction of plasmid pULB9299 which carries the yeast ARG3 regulatory regions and the proapo A-I nucleotide sequence.
- Figures 6A, B and C show the construction of plasmid pNIV1612 which carries the lac and the lpp regulatory regions, the sequence coding for the ompA signal peptide and the proapo A-I nucleotide sequence.
- Figure 7 shows the construction of plasmid pNIV1613 which carries the polyhedrin gene regulatory region and the proapo A-I nucleotide sequence.

Detailed description of the invention.

RNA preparation : Human liver total RNA was prepared by the guanidinium chloride method (R.A. COX, Methods Enzymol. XII, part B, (1968), 120-129). This total RNA preparation was then passed onto an oligo(dT)-cellulose column to obtain the total polyA⁺RNAs (T.MANIATIS et al., in Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982). 200 µg of polyA⁺RNAs were obtained from 10 g of human liver.

Synthesis in vitro of the complementary DNA (cDNA).

The reverse transcription reactions, starting from 0.1 to 5 µg of total polyA⁺RNAs, were primed with oligo (dT)₁₂₋₁₈ (approximately 1 µg; source: BOEHRINGER). The single-stranded cDNA was then transformed into the double stranded molecule (cDNAds) with the same reverse transcriptase enzyme. cDNAds preparations, usually 1 µg, were treated with S1 nuclease to create blunt ended extremities. The procedures are well-known in the art and described in detail by T. MANIATIS et al., loc.cit. dDNAds was then oligo(dC)-tailed by the technique described by L.VILLA-KOMAROFF et al., (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, (1978)), 3727-3731). Usually, 100 ng of cDNAds are treated with the enzyme terminal deoxynucleotidyl transferase. In general, 15-base-long extensions are added to the 3' ends of the cDNAds molecules.

Cloning of the tailed cDNAs into the plasmid vector pBR322.

pBR322 plasmid DNA was linearized by the enzyme PstI and oligo(dG)-tailed as described by R.M. LAWN et al. (Nucleic Acids Res. 9, (1981), 6103-6114). Oligo(dC)-tailed cDNAs were mixed with oligo(dG)-tailed pBR322 DNA in equimolar proportions. Usually, 50 µg of the mixture were hybridized to recircularize the plasmid. Conditions are well-known in the art and are described in detail by R.M. LAWN et al., loc.cit. The hybridized mixture was then used to transform competent E. coli cells, strain MM 294, for example according to the method described by R.M. LAWN et al., loc.cit. Several hundred transformants were obtained by selecting for growth on tetracycline medium, the resistance to this antibiotic having been conferred by the pBR322 plasmid. Transformants were also assessed for sensitivity to ampicillin. Those which are sensitive contain a chimeric plasmid since insertion of foreign DNA into the vector inactivates the ampicillin gene.

Screening of the cDNA library.

E. coli transformants were screened with ³²P 5' end labelled synthetic oligonucleotides corresponding to a fragment of the apo A-I gene. The nucleotide sequence of human apo A-I is known (see P CHEUNG and L. CHAN, loc.cit and J.J. SEILHAMER et al., loc.cit); it is therefore practical to synthesize chemically by the method of N.D. SINHA et al., (Nucleic Acids Res. 12, (1984), 4539-4557), an oligonucleotide probe having a length of 22 bases corresponding to the 5' end of the gene. The selected sequence is as follows : 5'-GCTGCGGTGCTGACCTTGCCG-3'. Before being used in hybridization experiments, the synthetic oligonucleotide was phosphorylated at its 5' end by means of T4 polynucleotide kinase (P-L Biochemicals) and [gamma-³²P] ATP before being used for hybridization experiments. Conditions for labelling and for hybridization are well-known in the art and are described in detail by T. MANIATIS et al., loc.cit. and by A. BOLLEN et al., (DNA, 2, (1983), 255-264).

Construction of the expression plasmids.

Methods for DNA preparation and DNA fragment isolation, as well as the conditions for restriction enzyme analysis and for ligation of fragments are well known in the art and are described in detail by R.M.LAWN et al., loc. cit. and by T.CABEZON et al., loc. cit. and are applicable herein.

Synthesis of fragments connecting the promoter of expression vectors to the 5' end of the gene are described below.

Synthesis of the NcoI-BalI fragment

Figure 2 shows in detail the principles which are the bases for the design of the 35-mer, 30-mer, 18-mer and 43-mer oligonucleotides used to synthesize the 65/61 bp NcoI-BalI fragment. The 30-mer and 18-mer synthetic fragments were phosphorylated at their 5' ends using T4 polynucleotide kinase (P-L Biochemicals). 1 μ g of each oligonucleotide, including the non-phosphorylated 35-mer and 43-mer, were hybridized for 3 minutes at 95°C in 300 mM sodium acetate (pH 7.0) and then allowed to cool slowly to 4°C. The hybridization mixture was used as such in the cloning procedure for the construction of the expression plasmids.

DNA sequencing.

DNA sequence analysis was carried out according to the method described by A.M. MAXAM and W. GILBERT (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, (1977), 560-564) and by F.SANGER et al., (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, (1977), 5463-5467).

Protein analysis

Cell pellets having an optical density of 1 unit at 630 nm (1 OD₆₃₀) were obtained at various stages during the fermentation of strains carrying the human proapo A-I expression plasmids, pULB9291, pULB9292, pULB9296 and pULB9299 (transformed into E. coli strain AR58 and JM101 and into yeast strain 10S44c respectively). Each sample was resuspended in a pH 6.8, 50 mM Tris-HCl buffer, containing 2%

sodium dodecyl sulphate (SDS), 6 M urea, 10% glycerol and 5% 2-mercaptoethanol, and was boiled for 3 minutes. Samples were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gels (U.K. LAEMMLI, (Nature, 227, (1970), 680-685). Total proteins were visualized by Coomassie Blue staining and synthesized human proapo A-I was identified by immunological recognition following electrophoretic transfer (see A. BOLLEN et al., loc.cit.).

Construction of recombinant vectors for the expression of human proapo A-I in bacteria, yeast and baculovirus infected insect cells.

1. Initial cDNA clone for human preproapo A-I: pULB1609 (Figure 1)

Several hundred transformants, derived from the cloning of cDNAs corresponding to human liver polyA⁺ RNA, into the pstI site of pBR322, were screened by means of the 22-mer apo A-I synthetic probe described above. One of the clones gave an intense hybridization signal during the experiment. This clone, designated pULB1609, was isolated and the DNA insert present in the recombinant plasmid was characterized by DNA sequence analysis. Its length corresponds to 878 base pairs (bp); it encodes the complete preproapo A-I polypeptide. As shown in Figure I, the cloned cDNA fragment carries 5' and 3' non-coding regions (19 bp and 55 bp respectively), the 54 bp sequence coding for the precursor peptide (aa-24 to aa-7), the 18 bp sequence coding for the propeptide (aa-6 to aa-1) and the 732 bp sequence coding for mature apo A-I (aa1 to aa243) and including the translational stop codon. The protein sequence, deduced from the DNA sequence, corresponds perfectly well with the amino acid sequence found for the preproapo A-I from the protein and from independently isolated cDNA clones (W.C. BARKER et al., Comp.Biochem.Physiol. 57B, (1977), 309-315; Japanese Patent Application No.96998/86; P.CHEUNG and L.CHAN, Loc.cit. and J.J. SEILHAMER et.al., loc.cit.).

2. Construction of a bacterial expression vector containing the human proapo A-I cDNA sequence: pULB9291 (Figures 2 and 3).

pULB9291, a plasmid producing human proapo A-I, was constructed by placing a segment derived from clone pULB1609 behind the regulatable P_L lambda promoter (Fig.3). The construction of this expression plasmid required the synthesis of DNA fragments comprising an NcoI restriction site, an ATG translation initiation codon and the nucleotide sequence encoding the amino acids at the amino end of the human proapo A-I structural gene, up to the first unique restriction site, BalI (Figure 2).

This adapter was synthesized by chemical procedures (N.D.SINHA et al., loc.cit.). Four synthetic oligonucleotides were prepared and after having been hybridized they coded for methionine corresponding to the ATG translation initiation codon, for the 6 amino acids corresponding to the propeptide and for the first 14 amino acids of mature human apo A-I (Figure 2). The synthetic adapter was designed to minimize the formation of secondary structures at the 5' end of the gene. In order to achieve this, the codons selected to encode amino acid residues -6, -1, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 and 14 did not correspond to the natural codons observed in the cDNA of the pULB1609 clone.

The synthetic adapter described above was used to join a 744 bp DNA fragment, derived from pULB1609 to the P_L lambda promoter in the expression plasmid pULB1221.

The construction of expression vector pULB1221 is described in European Patent Application 186,643. It comprises three major steps starting from plasmid pCQV2. Plasmid pCQV2 has been described by C.QUEEN in J.Mol.Appl.Genet.2, (1983), 1-10 and is freely available.

The choice of this particular vector is not compulsory; any other vector having a promoter and an appropriate NcoI site downstream to it can be used.

Approximately 0.1 μ g of synthetic fragments, such as described above, were ligated by means of T4 DNA ligase to approximately 1 μ g of the 744 bp BalI-PstI fragment derived from pULB1609 and approximately 1 μ g of the vector pULB1221 cut with NcoI and BalI.

Prior to the ligation, the 744 bp BalI-PstI fragment was treated with T4 DNA polymerase so as to convert the protruding 3' ends into blunt ends. The procedure is well-known in the art and is described in detail by T. MANIATIS et al., loc. cit.

After having been amplified in competent cells of the AR58 strain of E. coli, reconstructed plasmids were characterized by restriction site analysis and DNA sequence of the synthetic fragments and of the junction sites. A recombinant plasmid, pULB9291, satisfied all the criteria since it had the fragments in the correct orientation and order; it was used for expression studies.

3. Construction of a bacterial expression vector containing the fused sequences corresponding to beta-galactosidase and human proapo A-I : pULB9296. (figure 4)

In this construction, the DNA sequence coding for human proapo A-I was fused in the correct reading frame, downstream from the DNA sequence of beta-galactosidase. The beta-galactosidase gene is present on a freely available E. coli expression plasmid, pUR288 (U. RUTHER and B.MULLER-HILL, EMBO J.2, (1983), 1791-1794) which carries an efficiently inducible lac promoter and appropriate restriction sites into the beta-galactosidase sequence. The appropriate recombinant plasmid was constructed as shown in Figure 4. First of all, pUR288 plasmid DNA was successively cut with BamHI, treated with T4 DNA polymerase and cut once again with SalI. Secondly, an 805 bp DNA fragment was isolated from pULB9291 by successively digesting with KpnI, treating with T4 DNA polymerase and finally digesting with SalI. The two

fragments were ligated together, in molar proportions, with T4 DNA ligase and the resulting plasmid was used to transform the competent cells of the E. coli JM101 strain, a strain which is widely and freely available (ATTC 33876). Transformants were checked by restriction analysis for the correct orientation of the human proapo A-I sequence with respect to the beta-galactosidase gene and for the presence of a reconstituted BamHI site at the junction of the two sequences. This indicated that the human proapo A-I sequence was indeed fused downstream from the beta-galactosidase DNA sequence and in the correct reading frame. One of the transformants, containing the plasmid pULB9296, satisfied all the criteria and was used for expression experiments.

4. Construction of a yeast expression plasmid carrying the human proapo A-I cDNA sequence : pULB9299 (Figure 5).

In this construction, the cDNA sequence coding for human proapo A-I was cloned between the promoter and terminal signals carried by a yeast expression plasmid. The yeast expression vector pRIT 10774 was selected for this experiment. The construction of expression plasmid pRIT 10774 is described in European Patent Application 151,102. It was constructed starting, on the one hand from plasmid pRIT 10749, which has been deposited under the terms of the Budapest Treaty in the ATCC under accession number 39133 and, on the other hand, from E.coli-S.cerevisiae shuttle vector YEp13, described by J.R.BROACH et al., in Gene, 8, 1979, 121-133 and which is available from the ATCC under accession number 37115. Vector pRIT 10774 can replicate in both E. coli and yeast and carries the promoter and transcription terminator of ornithine carbamoyl transferase (ARG3) separated by a unique BamHI restriction site convenient for the insertion of a foreign DNA having its own ATG translation initiation codon. In addition, the vector carries yeast 2 μ sequences, metabolic markers for selection in yeast

and the AmpA selection marker for shuttling in E. coli. It is not the only vector which can be used for the expression of human proapo A-I in yeasts : any other yeast vector carrying regulatory signals can be used and will yield qualitatively similar results. The construction illustrated in fig.5 proceeded as follows. pRIT 10774 plasmid DNA was linearized by means of the enzyme BamHI and treated with T4 DNA polymerase.

On the other hand, an 810 bp DNA fragment was derived from pULB9291 by digestion with the enzymes Asp718 and SalI, followed by treatment with T4 DNA polymerase. This fragment encodes human proapo A-I and includes the ATG translation initiation codon. The two fragments, obtained as described above, were ligated together in equimolar proportions with T4 DNA ligase and the mixture was used to transform E. coli MM294 competent cells. Transformants were checked by restriction analysis to verify the correct orientation of the proapo A-I DNA sequence with respect to the ARG3 promoter sequence. One of the transformants contained a recombinant plasmid, pULB9299, which satisfied this condition. The plasmid pULB9299 was amplified in E. coli and used to transform spheroplasts of the yeast Saccharomyces cerevisiae strain 10S44c (pep4-3, leu2-3, leu2-112); (T. CABEZON et al., loc.cit.,).

The use of strain Ic 1697d (ATCC No.20631) would lead to qualitatively similar results. Yeasts transformants were then assayed for expression of human proapo A-I.

5. Construction of a bacterial secretion vector containing the human proapo A-I cDNA sequence: pNIV1612 (Figures 6A, B and C).

In this construction, the DNA sequence coding for human proapo A-I was fused, in the correct reading frame,

downstream from the DNA sequence of the E. coli OmpA protein signal peptide. The secretion vector pIN-III-ompA-2 (J. GHAYEB et al., EMBO J.3, (1984), 2437-2442) was selected for this test. This vector and its host strain E. coli JA221 are available on request from the Department of Biochemistry of the State University of New York at Stony Brook.

The secretion vector contains a powerful lpp (lipoprotein) promoter, a lac promoter-operator fragment, the lac I sequence of the lac repressor and appropriate restriction sites situated immediately after the sequence coding for the ompA gene signal peptide. The appropriate recombinant plasmid was constructed as shown in figures 6A, B and C. First of all, the secretion vector pIN-III-ompA-2 was linearized with EcoRI and treated with T4 DNA polymerase. Secondly, an 805bp DNA fragment was removed from pULB9291 by successively digesting with the restriction enzymes KpnI and SalI, followed by treatment with T4 DNA polymerase. This fragment encodes human proapo A-I and contains the ATG translation initiation codon. The two fragments obtained, as described above, were ligated together, in equimolar proportions by means of T4 DNA ligase, and the mixture was used to transform E. coli JA221 strain competent cells grown on M9 medium (J.H.MILLER, in "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1972, p.431.) containing 20 mg/l of tryptophane, 20 mg/l of leucine, 2 g/l of lactose and 50 mg/l of ampicillin. Transformants were selected for their ampicillin resistance and screened with an 18-mer synthetic oligonucleotide (the same as was used in the synthesis of the adapter as shown in figure 2).

The selected transformants were checked by restriction analysis to verify the correct orientation of the proapo A-I DNA sequence with respect to the signal peptide sequence carried by the secretion vector (reconstituted EcoRI site at the junction of the two

sequences). One of the transformants carried a recombinant plasmid which satisfied this condition. The extra sequence derived from the construction with the adapter, underlined in the following nucleotide sequence,

5' GTA GCG GAG GCC GCT GAA TTC ATG AGA CAT TTC TGG 3'
Val Ala Gln Ala Ala Glu Phe Met Arg His Phe Trp

aa₆

was removed by directed mutagenesis. For this purpose, the following 24-mer oligonucleotide sequence

signal peptide --- > < --- proapo A-I
5' GTA GCG GAG GCC AGA CAT TTC TGG 3'
Val Ala Gln Ala Arg His Phe Trp

lacking the 12 extra bases, was synthesized and used to remove the 12-base extra sequence derived from the adapter.

The Amersham system was used for the mutagenesis. This system is based on the method of F.ECKSTEIN et al. (Nucleic Acids Res. 13, (1985), 8765-8785). The method gives a high yield of plaques and the highest available efficiency : up to 95%.

First of all, the region of the DNA to be mutagenized was cloned in an M13 vector. For this purpose, the XbaI-BalI DNA fragment of the recombinant plasmid pIN-III-ompA-2 carrying the proapo A-I gene was inserted in the M13mp19 vector cut by XbaI and HindII. Vector M13mp19 is commercially available; it can be obtained from Amersham (Buckinghamshire, Great Britain). The mutagenic 24-mer oligonucleotide was then hybridized with the single-strand template and extended by the Klenow fragment of DNA polymerase in the presence of T4 DNA ligase, to produce a mutant heteroduplex.

Selective removal of the non-mutant strand was made possible by the incorporation of a thionucleotide into the mutant strand during the in vitro synthesis, and

cleavage of the non-phosphorothionated strand by NCiI. Such cleavages present sites for exonuclease III, which digests the non mutant strand. The mutant strand was then used as a template for reconstructing the double-stranded circular molecule, thus creating a homoduplex mutant molecule. The mutagenesis was verified by sequencing the junction between the signal peptide and the beginning of the proapo A-I gene. The recombinant plasmid, pNIV1612, was reconstructed by ligating the XbaI-HindIII fragment of the pIN-III-ompA-2 vector with the XbaI-BalI fragment from which the 12 extra bases had been deleted and with the BalI-HindIII fragment of the proapo A-I gene.

The three fragments were ligated with T4 DNA ligase and the mixture was used to transform E. coli JA221 competent cells, as described above. Transformants were selected for their ampicillin resistance and screened with the above-mentioned 18-mer oligonucleotide. One of the transformants carried a recombinant plasmid pNIV1612. In the final construction, the sequence coding for the ompA signal peptide preceded the complete proapo A-I sequence without the ATG codon (figures 6A, B and C). E. coli transformants were then assayed for the expression of human proapo A-I.

6. Construction of a transfer vector for the introduction of human proapo A-I cDNA sequence into baculovirus: pNIV1613. (figure 7).

The pNIV1613 plasmid, carrying the human proapo A-I sequence was constructed by placing a segment derived from the clone pULB9291 downstream from the polyhedrin gene promoter of the baculovirus (Figure 7). The baculovirus transfer vector pAcRP6 (Y. MATSUURA et al., J.Gen. Virol., 67, (1986), 1515-1529) was used in these experiments; it can be obtained from the Department of Microbiology and Immunology of the University of Ottawa. The plasmid carries the polyhedrin gene promoter up to

nucleotide -7 in the 5' leader sequence; it lacks the polyhedrin ATG codon and the first 170 nucleotides of the polyhedrin coding sequence. An appropriate BamHI site is located downstream from nucleotide -7. The construction depicted in Figure 7 proceeded as follows. pAcRP6 plasmid DNA was linearized with BamHI. On the other hand an 810 bp DNA fragment was removed from pULB9291 by digesting with the restriction enzymes Asp718 and SalI. This fragment encodes human proapo A-I and contains the ATG translation initiation codon. The two fragments, in equimolar proportions, were treated together with T4 DNA polymerase, ligated with T4 DNA ligase and used to transform E. coli AR58 strain competent cells. Transformants were selected for their ampicillin resistance, screened by means of a ³²P -labelled synthetic 35-mer oligonucleotide (see Figure 2) corresponding to part of the proapo A-I DNA sequence, and checked by restriction analysis to verify the correct orientation of the proapo A-I DNA sequence with respect to the polyhedrin gene promoter. One of the transformants carried a recombinant plasmid, pNIV1613, which satisfied this condition; it was used for expression experiments.

7. Production of human proapo A-I by transformed micro-organisms.

20 ml cultures of strain AR58 or JM101 of E. coli transformed with pULB9291 and pULB9296 respectively, were grown in rich medium supplemented by 50 µg/ml ampicillin (LB broth, see T. MANIATIS et al., loc.cit. for experimental details) until the optical density reached 0.6 at 630 nm. In the case of pULB9291, induction of the P_L lambda promoter was achieved by changing the initial growth conditions of the culture from 30°C to 42°C, so as to inactivate the repressor of the P_L lambda promoter (M. ROSENBERG et al., Methods Enzymol. 101, (1983), 123-138). Induction was carried out for 20 minutes.

In the case of pULB9296, induction of the lac promoter was achieved by adding to the culture, incubated at 37°C, the chemical inducer IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactoside) until a final concentration of 1 mM was reached (L.LORENZETTI et al., loc.cit.) Induction was carried out for 60 minutes.

On the other hand, 20 ml cultures of yeast cells 10S44c, transformed with pULB9299, were grown at 30°C in yeast nitrogen base medium (Difco) supplemented with glucose (1%) until the optical density reached 0.3 at 630nm. No inducer was necessary since the expression is constitutive in this particular case.

One ml samples of the above cultures were taken and centrifuged at 15,000 g for 5 minutes. The pellets obtained were lysed in boiling sodium dodecyl sulphate (SDS) as follows. The pellets were resuspended in 50 μ l of SDS sample buffer (50 mM of Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 6M urea, 5% 2-mercaptoethanol and 10% glycerol) and boiled for 3 minutes at 100°C. Extracts were then centrifuged at 15,000 g for 10 minutes. The samples were then ready for electrophoretic analysis on 15% or 7.5% polyacrylamide gels, in the presence of SDS, in denaturing conditions (U.K. LAEMMLI, loc.cit.).

After electrophoresis, the polyacrylamide gels were washed briefly with 40 ml of distilled water and with 40 ml of 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.5. The proteins were then transferred electrically from the gels onto nitrocellulose sheets for 2 hours at 60 V and 1.5 A in the same phosphate buffer (T.CABEZON et al., loc cit.) The nitro cellulose sheets were saturated with albumin (1%) in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 7.5, then incubated at ambient temperature over night in the presence of rabbit anti-human apo A-I serum at a dilution of 1/500 (and of mouse anti-beta-galactosidase monoclonal antibodies in the case of pULB9296) in the same buffer without albumin.

The sheets were washed five times with 40 ml of the same phosphate buffer and were then incubated in 40 ml of phosphate buffer containing 10 μ g/ml of goat anti-rabbit (or anti-mouse) serum and labelled with peroxylase. After 4 hours of incubation at ambient temperature, the sheets were washed again five times with 40 ml phosphate buffer and finally revealed by adding 50 ml of a chromogenic substrate solution (10 mg diaminobenzidine, 100 μ l of 10% urea peroxide and 100 mM Tris-HCl at pH 7.6).

In the case of pULB9291 and pULB9299, a single product was found reacting with the anti-human apo A-I antibodies. It had a molecular weight consistent with that of standard natural apo A-I. In the case of pULB9296, a fused polypeptide reacting with anti-human apo A-I serum and with anti-beta-galactosidase serum was found at the expected size for the sum of the beta-galactosidase and proapo A-I polypeptides (144kDa). These sizes were previously determined from a calibration curve based on the migration of molecular weight standards placed on the same gels as the cell extracts.

In another experiment, 20 ml cultures of E. coli strain JA221, transformed with pNIV1612 were grown in rich medium supplemented with 50 μ g/ml of ampicillin (LB broth, see T.MANIATIS et al., loc.cit.,) until the optical density reached 0.6 at 630 nm. Induction of the lac promoter was performed by adding to the culture, incubated at 37°C, the chemical inducer IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactoside) to a final concentration of 2mM. Induction was performed for 60 minutes. One ml samples of the cultures were taken and centrifuged at 15,000 g for five minutes. The pellets obtained were submitted to a mild osmotic shock in order to release the periplasmic fraction (D.KOSHLAND and D.BOTSTEIN, Cell, 20, (1980), 749-760). The released fraction was resuspended in the above-mentioned SDS sample buffer, but without urea, boiled, centrifuged and subjected to electrophoresis on

12.5% polyacrylamide gel in the presence of SDS, followed by immunodetection after electrophoretic transfer. A fraction of the synthesized proapo A-I was found in the cell and not in the periplasm. This was due either to the fact that some proapo A-I was not secreted or that the efficiency of the osmotic shock was not optimal. The main fraction of proapo A-I was found to be released into the medium after the osmotic shock, indicating that the protein was indeed secreted by the cells.

8. Production of human proapo A-I by baculovirus infected insect cells.

The recombinant plasmid pNIV1613 has been used in conjunction with the wild strain baculovirus to coinfect Spodoptera frugiperda cells in culture. Screening of recombinant viruses, lacking polyhedrin, gave recombinant plaques. The recombinant virus, purified from a plaque, was used to infect insect cells. The procedure is well-known in the art and is described in detail by M.D. SUMMERS and G.E. SMITH in "A manual of methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas University, College Station, (1987)". The recombinant virus was assayed immunologically for the production of proapo A-I, following electrophoretic transfer and by electrophoresis on a 12.5 % polyacrylamide gel in the presence of SDS, after lysis of the cells with the RIPA buffer (0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl, 1 % Triton 100, 0.1 % SDS, 0.1 % deoxycholate and 1 mM of phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)) and treatment with boiling sodium dodecyl sulphate. A single product reacting with the anti-human apo A-I antibodies was found. It had a molecular weight consistent with that of standard natural apo A-I and the expressed protein represented the major constituent of the total protein content. The concentration of proapo A-I per litre of culture, measured by single radial immunodiffusion

(G. MANCINI et al., *Immunochem.* 2, (1965), 235-254) was estimated as being approximately 100 mg.

9. Cytoplasmic production of human proapo A-I in *E. coli*.
Use of a defined minimal medium.

The plasmid pULB9292 was used for the cytoplasmic production of human proapo A-I in *E. coli* in a minimal medium. pULB9292 was constructed by exchanging the fragment EcoRI-NcoI of the plasmid pULB9291 coding for the P_L lambda promoter, with same fragment EcoRI-NcoI of the plasmid pOTS. (M. ROSENBERG et al., *Methods Enzymol.* 101, (1983), 123-138). The fragment EcoRI-NcoI of the pOTS vector (G. DEVARE et al., *Cell*, 36, (1984) 43-49) also contains the efficient regulatable P_L promoter of phage lambda. 20 ml cultures of *E. coli* strain AR58 transformed with pULB9292 were grown in a defined minimal medium. The composition of the minimal medium was (per litre): 3g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3 g KH_2PO_4 ; 0.5 g NaCl ; 1 g NH_4Cl ; 1.37mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 29.5 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 236 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10 g glucose; 1 mg vitamin B1; 50 mg ampicillin; LB broth 1/20 (v/v). Cells were grown in this minimal medium until the optical density reached 0.5 at 630 nm. Induction of the P_L lambda promoter was achieved by changing the initial growth conditions of the culture from 30°C to 42°C in order to inactivate the repressor of the P_L lambda promoter (M. ROSENBERG et al., loc.cit.). Induction was performed for 60 minutes. One ml samples of the cultures were taken and passed through the French's press or were centrifuged at 15,000 g for 5 minutes. The total cell extract obtained or the pellet were treated with boiling SDS as described in paragraph 7. After electrophoresis and electrophoretic transfer, a single product was found which reacted with the anti-human apo A-I antibodies. It had a molecular weight consistent with that of standard natural apo A-I. The amount of expressed proapolipoprotein A-I in the defined

minimal medium represented 13.5% of the total proteins content, i.e. an estimated concentration of proapo A-I of about approximately 270 mg per litre of culture.

10. Isolation, purification and characterization of human proapo A-I produced by transformed micro-organisms.

10.1 Isolation and purification.

Crude extracts of the recombinant proapo A-I were centrifuged at 4,000 g for 15 minutes and the pellet was discarded. The supernatant was centrifuged at 100,000 g for two hours. The resulting pellet was resuspended in a minimal volume of a buffer (TEN100) consisting of 20 mM of Tris-HCl, pH 7.5; 1mM of EDTA, 100 mM of NaCl; 1.75 µg/ml of PMSF and 100 µg/ml of sodium merthiolate (sodium salt of ethyl-mercuri-thiosalicylic acid) and the volumes of the suspension and of the supernatant were adjusted separately to the original extract volume by means of the same buffer. Protein was then precipitated from the two suspensions using increasing concentrations of isopropyl alcohol. The precipitated protein fraction from each suspension which contained the major part of the immunoreactivity corresponding to human apo A-I, was determined by radial immunodiffusion (G. MANCINI et al., loc. cit.), using a commercial apo A-I standard. Each fraction thus obtained was further purified by chromatography on a Sephacryl S200 column, using the same buffer as eluent. 0.9 ml fractions were collected and the total quantity of protein having an immunoreactivity corresponding to that of apo A-I was determined in each fraction by radial immunodiffusion. The molecular weight of the eluted protein in the fractions was determined by calibrating the column with standards having known molecular weights such as aldolase, bovine serum, ovalbumin, albumin, chymotrypsinogen and cytochrome

C, under identical conditions. The purity of the proapo A-I per mg of total protein in the principal fractions containing recombinant proapo A-I, expressed in mg of protein having the same immunoreactivity as a commercial apo A-I standard, was estimated as being 95 %.

10.2. Characterization.

10.2.1. Physical properties of recombinant proapo A-I.

When the recombinant proapo A-I, purified and isolated from the supernatant and from the pellet from centrifuging at 100,000 g, is subjected to isoelectric focusing according to the process of N. CATSIMPOOLAS (Anal. Biochem. 26, (1969), 54-62) and an autogenerated gradient of pH 4 to pH 6 is applied, a single band is obtained having an estimated isoelectric point of 4.95. Human plasma apo A-I appears to be slightly more acidic and has an estimated isoelectric point of 4.75. This difference of 0.2 pH units between the values of isoelectric points of recombinant proapo A-I and plasma apo A-I is in good agreement with the known difference between the values of isoelectric points for plasma apo A-I and plasma proapo A-I, which has been reported as being equal to 0.17 (G.L. MILLS et al., Lab.Tech.BiochemMol.Biol.14, (1984), 244-245).

As regards molecular weight, both the pellet and supernatant recombinant proapo A-I consist of a single polypeptide chain having identical molecular weights equal to 29.9 ± 1.4 kDa. Human plasma apo A-I

appears to be slightly smaller, having a molecular weight equal to 29.3 ± 1.3 kDa.

10.2.2. Peptide mapping of recombinant proapo A-I with BNPS-skatol.

Chemical cleavage was carried out by means of 3-bromo-3-methyl-2-[(2-nitrophenyl)thio] -3H-indole (BNPS-skatol) according to the process by A. FONTANA (Methods Enzymol. 25, (1972), 419-423).

5 to 10 μ g of purified protein preparations were dissolved in 100 μ l of a 0.15 % (v/v) solution of phenol in 50 % (v/v) aqueous acetic acid solution. 50 μ l of a solution of 4.8 mg of BNPS-skatol per ml of glacial acetic acid were then added, followed by incubation at 25°C for 72 hours. 50 μ l of 2-mercaptoethanol were then added, followed by incubation a second time at 37°C for 5 hours. The samples were evaporated, redissolved in 100 μ l of water and extracted 3 times with 200 μ l of ethyl acetate. The organic phases were discarded and the aqueous phases were lyophilized and analysed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel.

In the case of chemical cleavage by BNPS-skatol, the number and size of the fragments derived from apo A-I can be more or less predicted since, under the experimental conditions used, the BNPS-skatol selectively cuts after the tryptophane residues. Assuming an efficiency of 100 % at each cleavage site, the largest fragment which may be expected is a C-terminal fragment of 15.4kDa. The molecular weights of the remaining

fragments are between 0.5 and 5.3 kDa and are consequently too small to be detected.

In the case of incomplete cleavage, the 15.4 kDa fragment will be "elongated" in the direction of the N-terminus, yielding fragments of 20.7 kDa, 23.1 kDa and 27.6 kDa respectively. These predictions are very successfully achieved for human plasma apo A-I as well as for the various purified preparations of recombinant proapo A-I.

CLAIMS for the contracting States : AT, BE, CH, DE, FR, GB,
GR, IT, LI, LU, NL, SE.

1. Recombinant DNA sequence coding for human proapolipoprotein A-I and capable of reducing or preventing the formation of hairpin structures, characterized in that it comprises (a) a synthetic DNA fragment having the sequence (only one strand shown):
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3', coding for the amino acids -6 to +14 of human proapolipoprotein A-I and comprising an added ATG translation initiation codon and modified codons for the amino acid residues -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 and +14 and (b) downstream from the synthetic DNA fragment, the natural DNA sequence coding for the amino-acids +15 to +243 of human proapolipoprotein A-I.
2. Replicable cloning vector, characterised in that it contains the recombinant DNA sequence according to Claim 1.
3. Expression vector, characterized in that it contains the recombinant DNA sequence according to Claim 1 operably linked to a regulatory DNA sequence which regulates the expression of the said recombinant DNA sequence.
4. Expression vector according to Claim 3, characterized in that the regulatory DNA sequence comprises the phage lambda P_L promoter region.
5. Expression vector according to Claim 3, characterized in that the recombinant DNA sequence is fused downstream from the beta-galactosidase DNA sequence and in that the regulatory DNA sequence comprises the E. coli lac promoter region.

6. Expression vector according to Claim 3, characterized in that the regulatory DNA sequence comprises the yeast ARG3 promoter and transcription terminator regions.
7. Expression vector according to Claim 3, characterized in that the recombinant DNA sequence lacking the ATG codon is fused downstream from the DNA sequence of the E. coli Ompa protein signal peptide, and in that the regulatory DNA sequence comprises the lpp promoter, the lac promoter-operator and the lac I sequence of the lac repressor.
8. Expression vector according to Claim 3, characterized in that the regulatory DNA sequence comprises the baculovirus polyhedrin gene promoter region.
9. Cell culture or micro-organism transformed with an expression vector according to any one of Claims 3 to 8.
10. Process for producing human proapolipoprotein A-I characterized in that a transformed cell or microorganism according to Claim 9 is cultured under appropriate conditions, and in that the human proapolipoprotein A-I thus produced is recovered.

CLAIMS for Contracting States : ES

1. Process for the preparation of a recombinant DNA sequence coding for human proapolipoprotein A-I and capable of reducing or preventing the formation of hairpin structures, characterized in that the natural DNA sequence coding for amino acids +15 to +243 of human proapolipoprotein A-I is ligated downstream from a synthetic DNA fragment having the sequence (only one strand shown) :
5'-ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3' coding for the amino acids -6 to +14 of human proapolipoprotein A-I and comprising an additional ATG translation initiation codon and modified codons for the amino acid residues -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 and +14.
2. Process for the preparation of a replicable cloning vector, characterized in that the recombinant DNA sequence prepared according to the process in Claim 1 is introduced into an appropriate vector.
3. Process for the preparation of an expression vector, characterized in that the recombinant DNA sequence prepared according to the process of Claim 1 is operably ligated to a regulatory DNA sequence which regulates the expression of the said recombinant DNA sequence.
4. Process according to Claim 3, characterized in that the regulatory DNA sequence comprises the phage lambda P_L promoter region.
5. Process according to Claim 3, characterized in that the recombinant DNA sequence is fused downstream from the beta-galactosidase DNA sequence and in that the regulatory DNA sequence comprises the E. coli lac promoter region.

6. Process according to Claim 3, characterized in that the regulatory DNA sequence comprises the yeast ARG3 promoter and transcription terminator regions.
7. Process according to Claim 3, characterized in that the recombinant DNA sequence lacking the ATG codon is fused downstream from the DNA sequence of the E. coli Ompa protein signal peptide and in that the regulatory DNA sequence comprises the lpp promoter, the lac promoter-operator and the lac I sequence of the lac repressor.
8. Process according to Claim 3, characterized in that the regulatory DNA sequence comprises the baculovirus polyhedrin gene promoter region.
9. Preparation process for a cell or micro-organism, characterised in that a cell or micro-organism is transformed with an expression vector prepared according to a process such as defined in any one of Claims 3 to 8.
10. A cell culture or micro-organism transformed with an expression vector prepared according to a process such as defined in any one of Claims 3 to 8.
11. Process for the production of human proapolipoprotein A-I, characterized in that a transformed cell or micro-organism according to Claim 10, is cultured under suitable cultivating conditions and in that the human proapolipoprotein A-I thus produced is recovered.

10 20 30 40 50 60 70
 TCCCCAAGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGGGGTGTGACCTTGGCGTGCTCTTCCTGACGGGGAGCCAGGCTGGCA
 M K A A V L T L A V L F L T G S Q A R H
 -20 -10

80 90 100 110 120 130 140 150
 TTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCCAGAGCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTC
 F W Q Q D E P P Q S P W D R V K D L A T V Y V D V L
 1 10 20

160 170 180 190 200 210 220 230
 AAAGACAGGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCGGCTTGGGAAAACAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACA
 K D S G R D Y V S Q F E G S A L G K Q L N L K L L D
 30 40

240 250 260 270 280 290 300 310
 ACTGGGACAGGGTGAACCTCCACCTTCAGCAAGCTGGGGAACAGCTGGGCCCTGTGAGCCAGGAGTTCTGGGATAACCT
 N W D S V T S T F S K L R E Q L G P V T Q E F W D N L
 50 60 70

320 330 340 350 360 370 380 390
 GGAAAAGGAGACAGAGGGCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTG
 E K E T E G L R Q E M S K D L E E V K A K V Q P Y L
 80 90 100

400 410 420 430 440 450 460 470
 GACGACTTCCAGAAGAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGAGCGGCTGGGCGCAGAGCTCCAAG
 D D F Q K K W Q E E M E L Y R Q K V E P L R A E L Q
 110 120

FIG. 1A

480 490 500 510 520 530 540 550
 AGGGGGGGGGCCAGAAGCTGCAGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGGGAGGAGATGGGGGACGGGGGGGGGGC
 E G A R Q K L H E L Q E K L S P L G E E M R D R A R A
 130 140 150

560 570 580 590 600 610 620 630
 CCATGTGGAGGGCTGGGCAGGCATCTGGCCCCCTACAGGACGAGCTGGGGCAGCGCTTGGGGGGGGGGCTTGAGGCT
 H V D A L R T H L A P Y S D E L R Q R L A A R L E A
 160 170 180

640 650 660 670 680 690 700 710
 CTCAGGGAGAAAGGGGGGGGGCCAGACTGGCGAGTACCAAGGCAAGGGCACGGAGCATCTGAGCAGGCTCAGGAGAAAGG
 L K E N G G A R L A E Y H A K A T E H L S T L S E K
 190 200

720 730 740 750 760 770 780
 CCAAGCCCGGGCTGGAGGAGCTCCGCCAAGGCTGCTGCCCGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGGGCT
 A K P A L E D L R Q G L L P V L E S F K V S F L S A
 210 220 230

790 800 810 820 830 840 850 860
 CTGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCTTCCGGGTGCTCAGAATAAAGCT
 L E E Y T K K L N T Q
 240 Stop

870 878
 TTCCAAAGTGGG

FIG. 1B

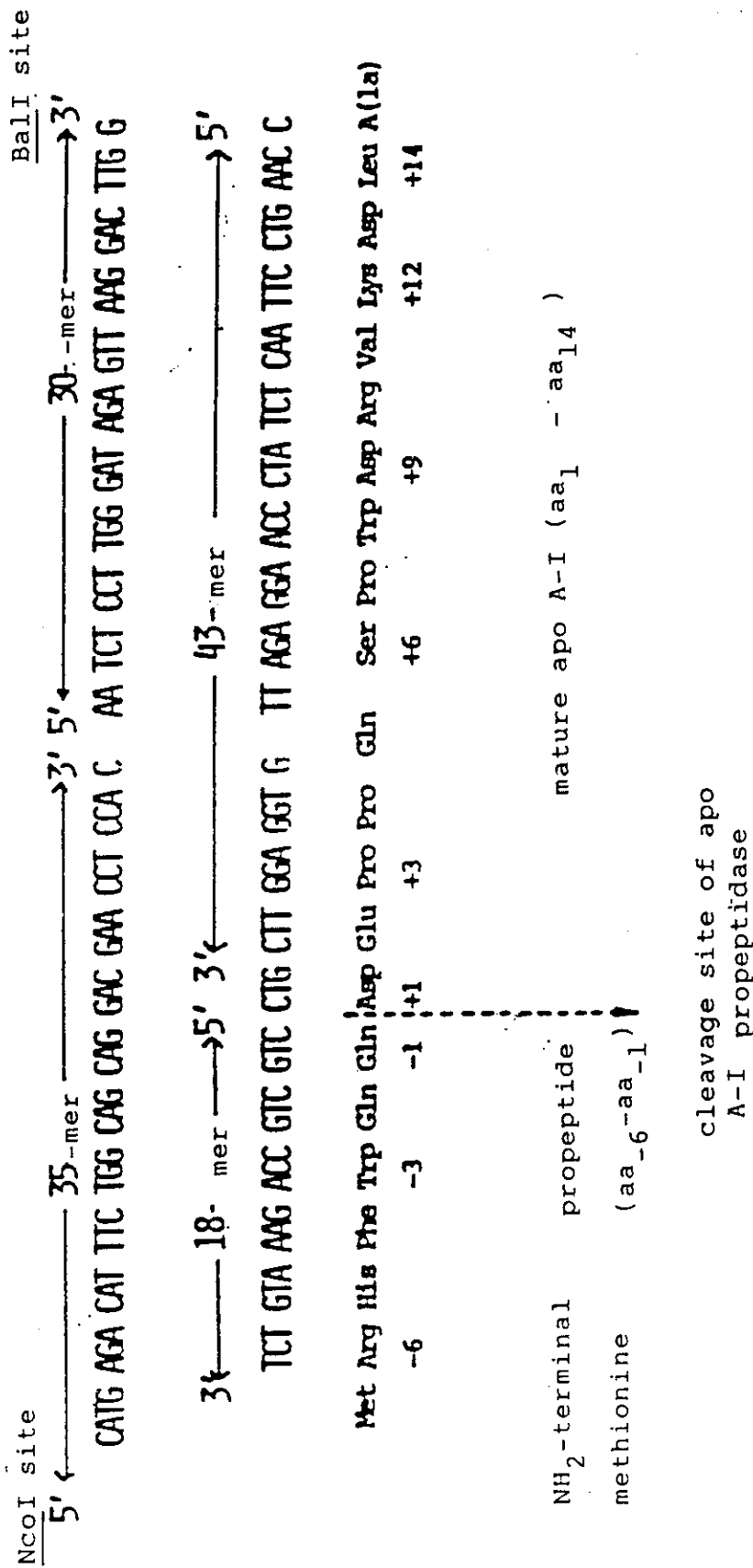


FIG.2

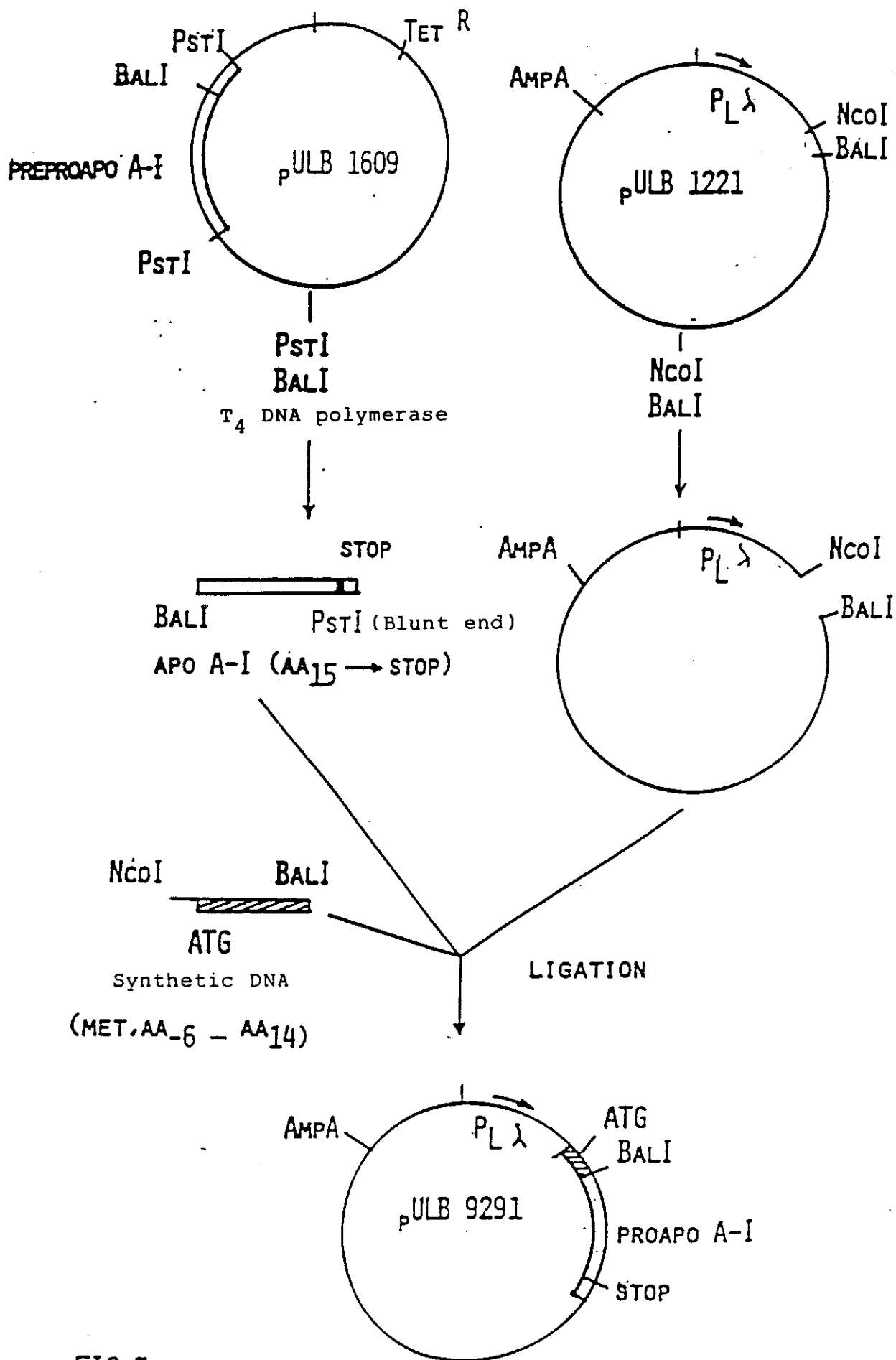


FIG.3

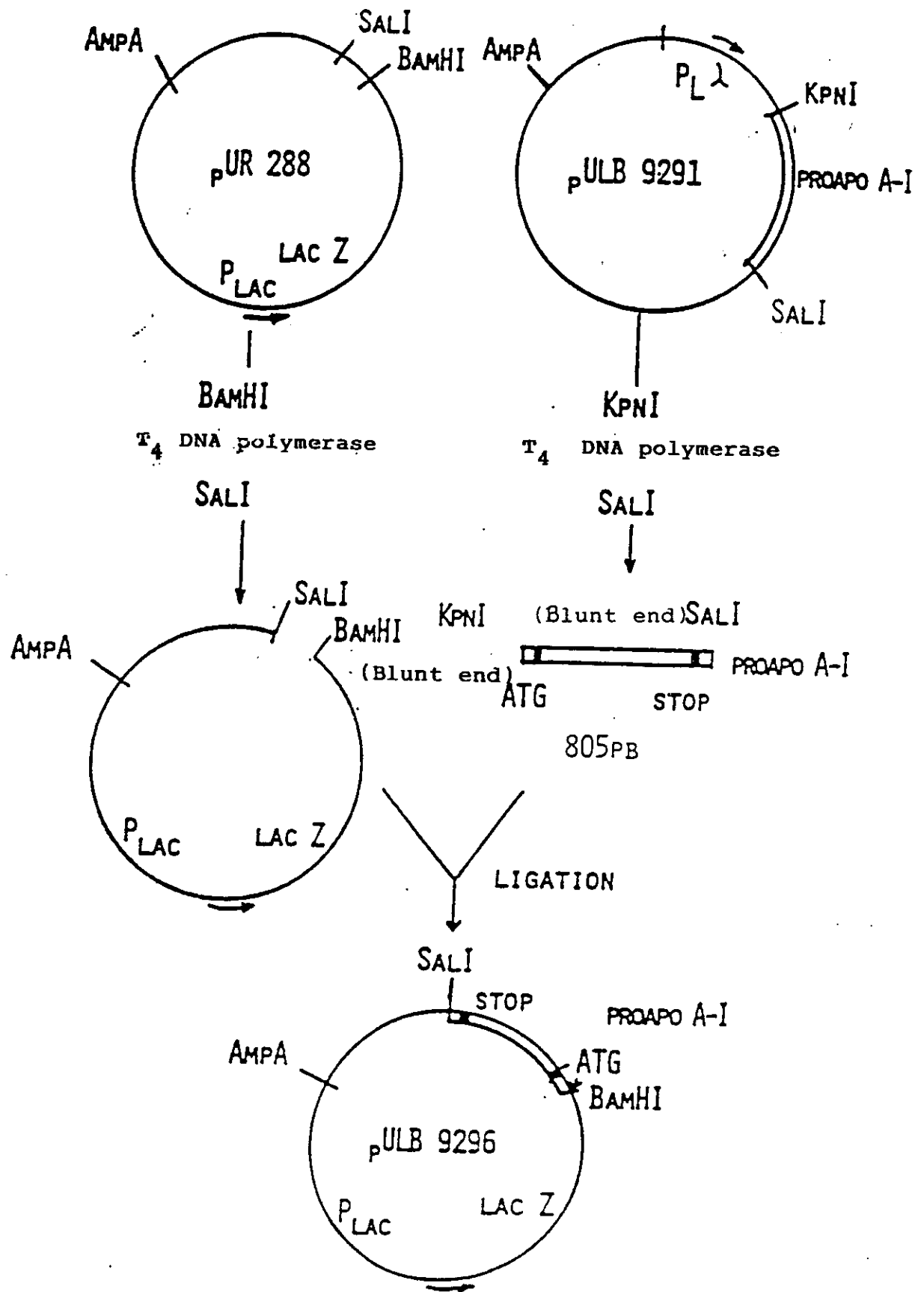


FIG.4

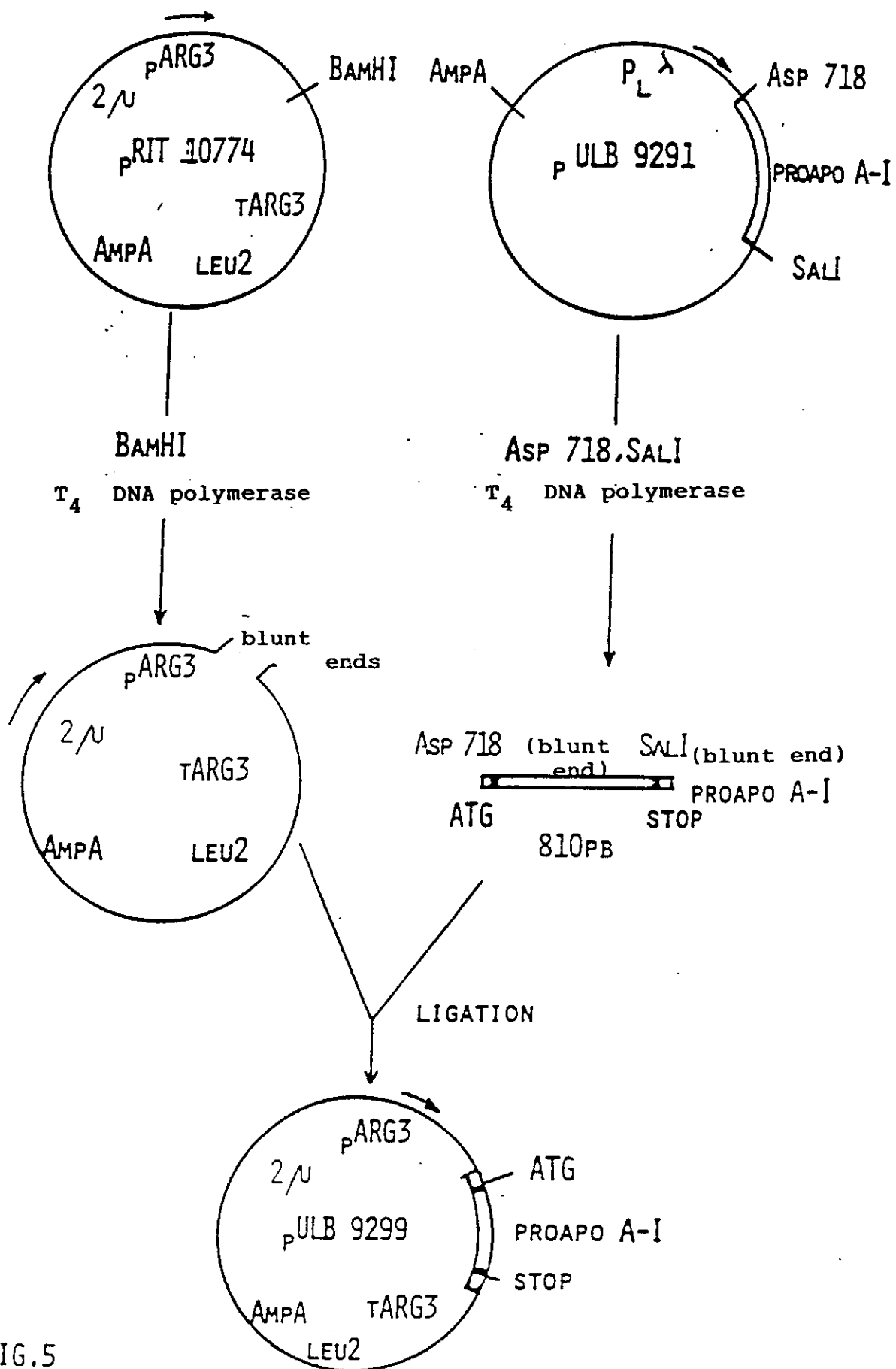


FIG.5

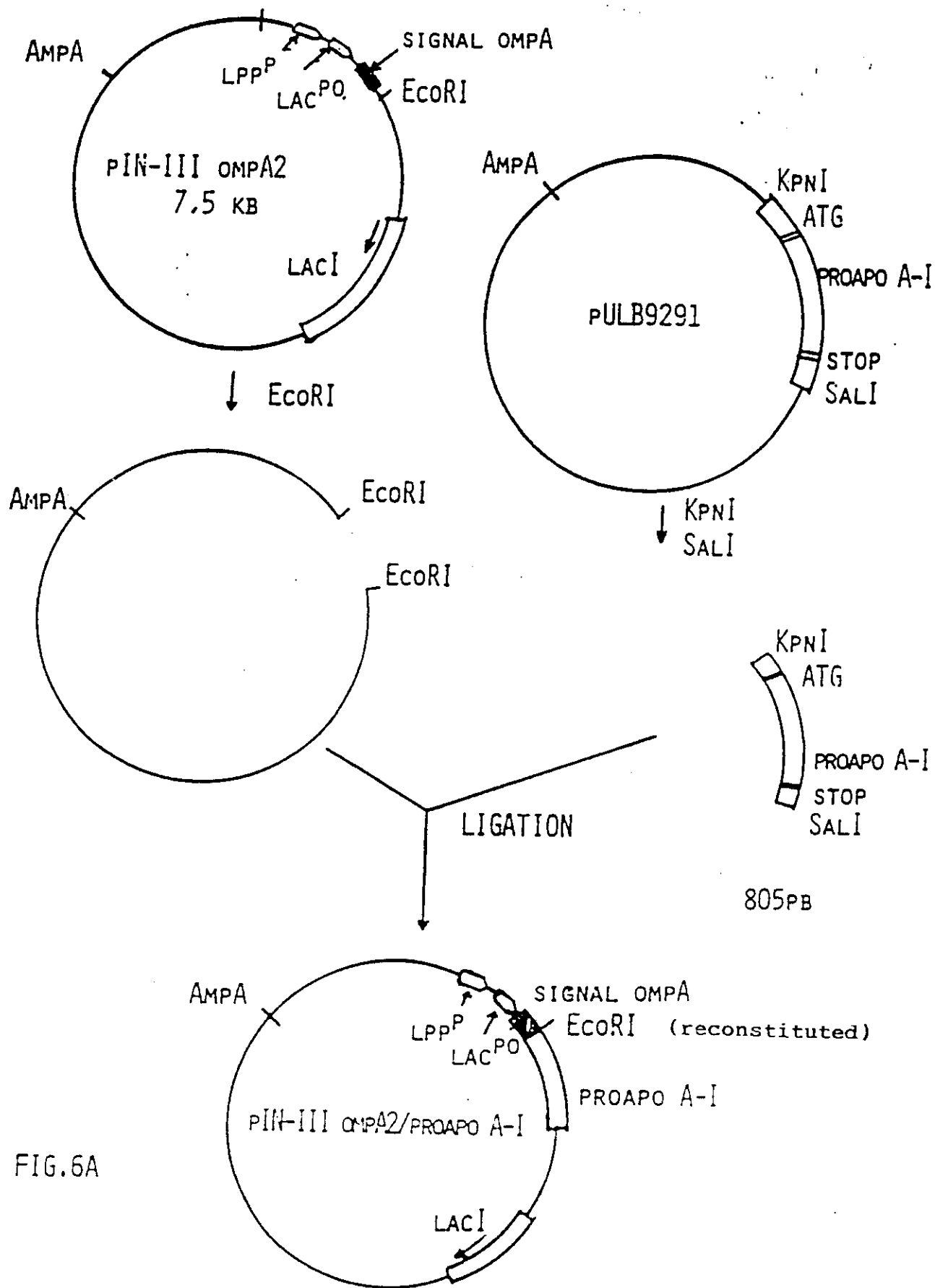
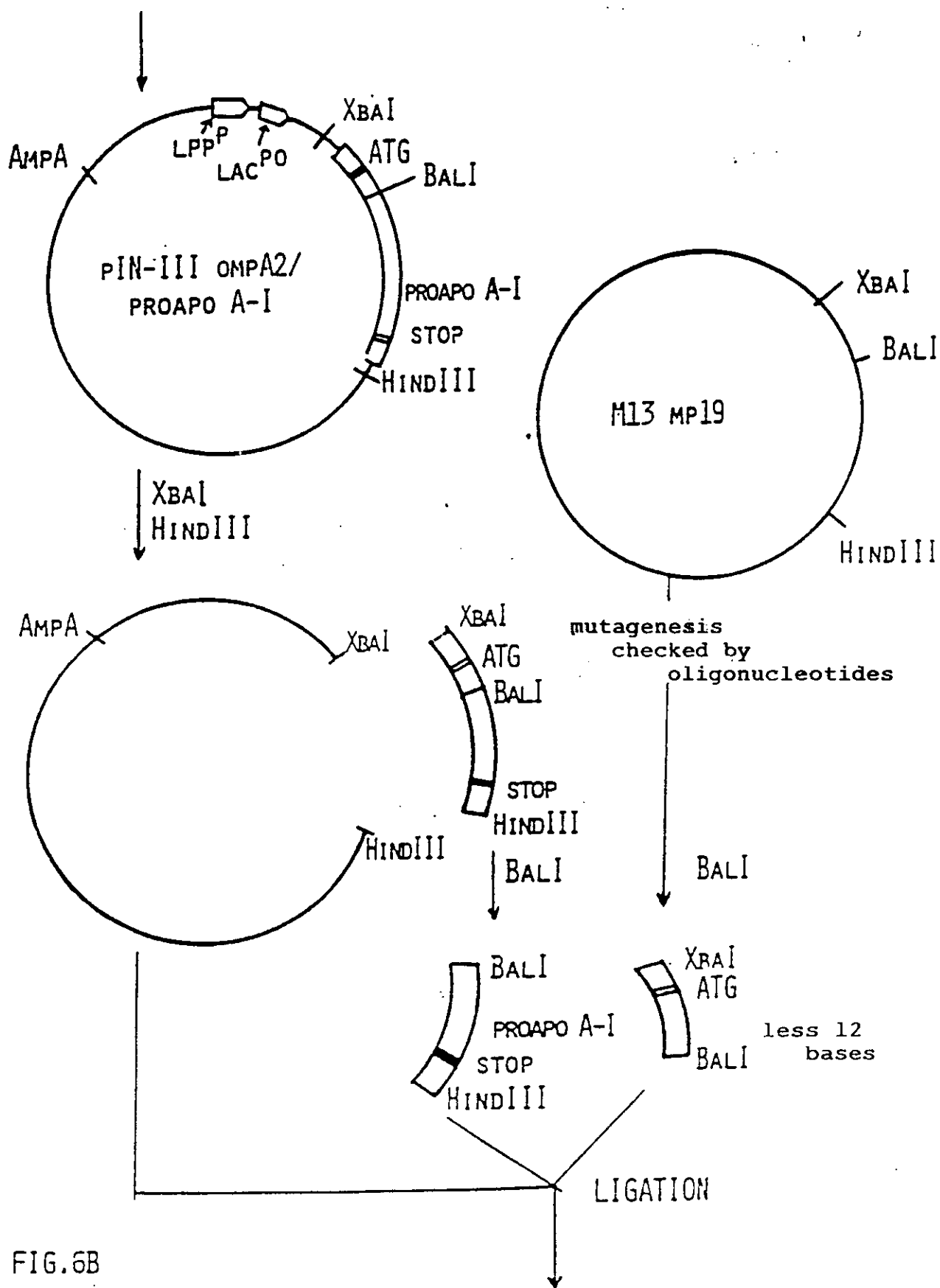


FIG.6A



7/10

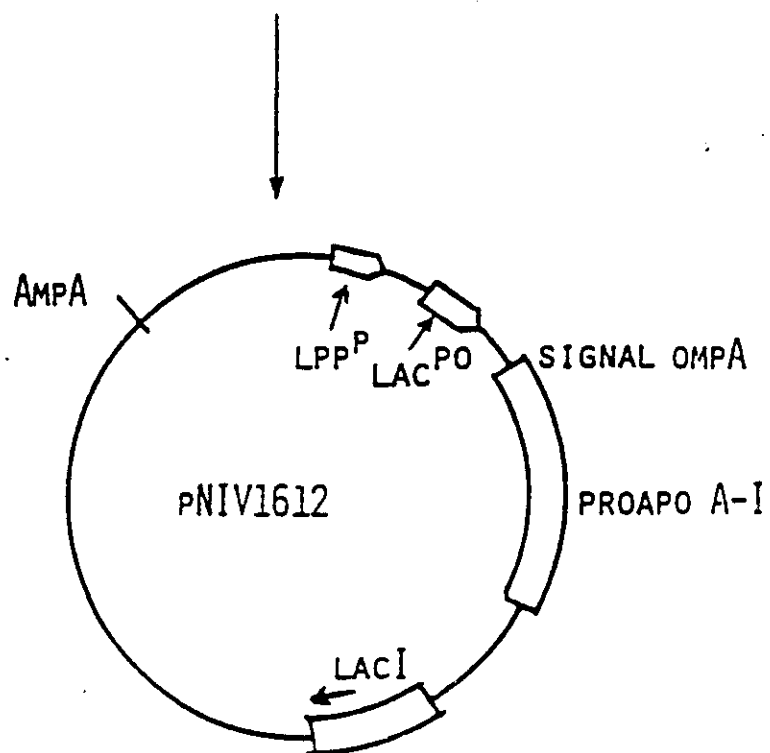


FIG.6C

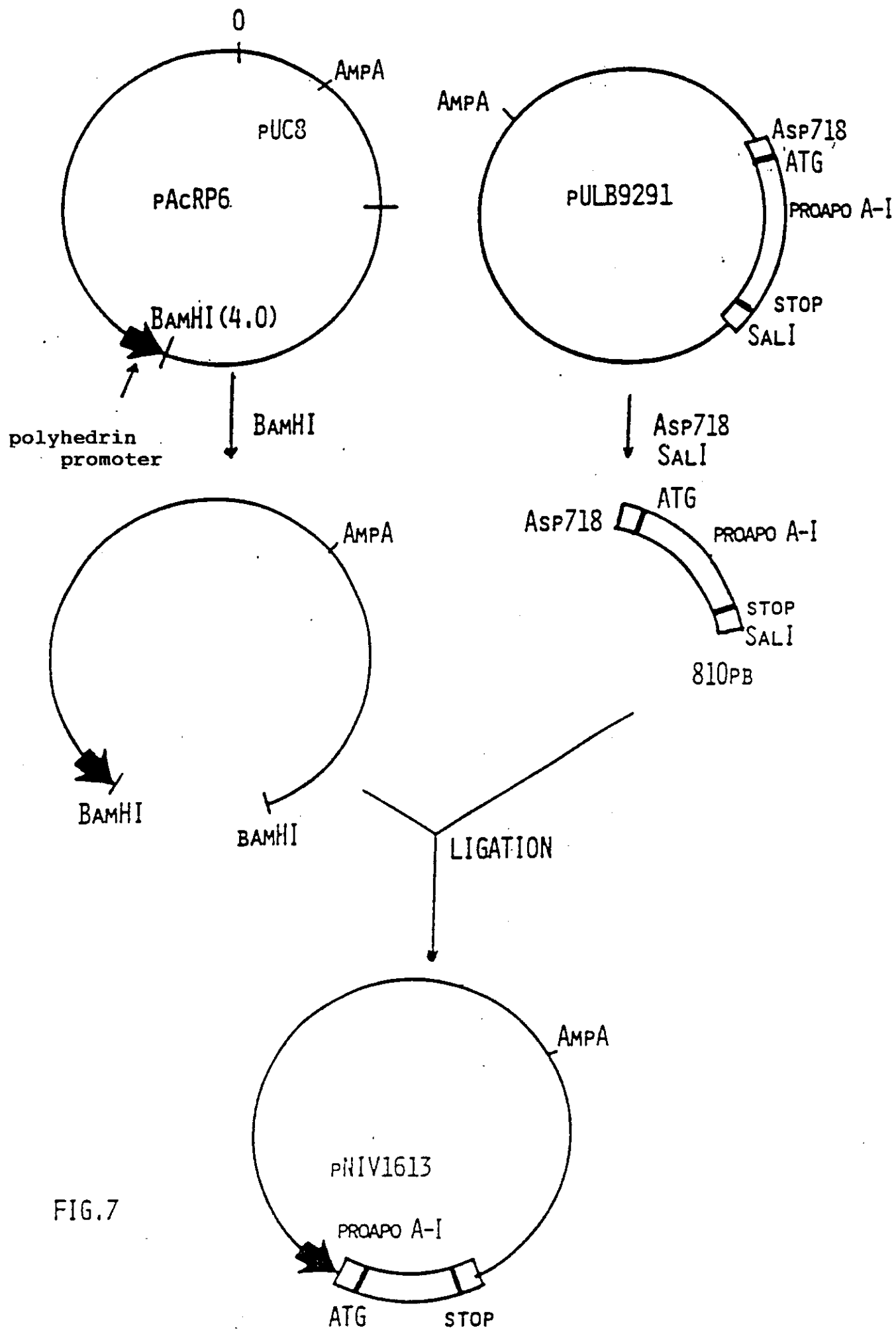


FIG.7