



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **179253**

(13) B

(51) Int Cl⁶ C 12 N 15/12, C 07 K 14/775, C 12 N 15/70,
15/72, 15/73, 15/81

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	882341	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	27.05.88	søknadsnummer	
(24) Løpedag	27.05.88	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	29.11.88	(30) Prioritet	28.05.87, GB, 8712540
(44) Utlegningsdato	28.05.96		

(71) Søker	UCB SA, 326, avenue Louise, B-1050 Brussel, BE
(72) Oppfinner	Alex Bollen, Itterbeek, BE Jean Gobert, Brussel, BE Ernst Wulfert, Brussel, BE
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 OSLO

(54) **Benevnelse** **Rekombinant DNA-sekvens som koder for humant proapolipoprotein A-I, ekspresjonsvektorer, cellekulturer samt fremgangsmåte for fremstilling av proteinet**

(56) **Anførte publikasjoner** NO 882763, WO 86/05810, FEBS letters, vol. 194, no. 2, jan. 1986, pp. 343-346, Nucleic Acids Research, vol. 13, no. 6, mars 1985, pp. 1923-38

(57) **Sammendrag**

Foreliggende oppfinnelse til-
veiebringer rekombinante DNA-
sekvenser som omfatter en sekvens som
koder for humant proapolipoprotein A-I
hvor i en del av den naturlige kodings-
sekvens er erstattet av et DNA-
fragment som koder for de samme amino-
syrer, men som består av en ulik
nucleotidsekvens slik at dannelsen av
hårnåler kan reduseres eller for-
hindres, kloning og ekspresjons-
vektorer inneholdende disse DNA-
sekvenser, cellekulturer eller mikro-
organismer transformert med disse
ekspresjonsvektorer og fremgangsmåter

Foreliggende oppfinnelse angår en ny, rekombinant DNA-sekvens som koder for humant proapolipoprotein A-I, ekspresjonsvektorer som inneholder disse DNA-sekvenser, cellekulturer transformert med disse ekspresjonsvektorer og fremgangsmåter for fremstilling av humant proapolipoprotein A-I ved anvendelse av de nye, rekombinante DNA-sekvenser, vektorer og transformanter.

Humant apolipoprotein A-I (apo A-I) er hovedproteinbestanddelen av høy tetthets-lipoproteiner (HDL) og lymfe-chylomikroner. Lever og tynntarm er hovedsetene for syntese av apo A-I. I disse organer syntetiseres apo A-I som et forløperprotein (preproapo A-I). Co-translasjonell spaltning av prepeptidet finner sted intracellulært, og proapo A-I utskilles i plasmaet og lymfen.

Proapo A-I har ytterligere seks aminosyrer (Arg-His-Phe-Trp-Gln-Gln) festet ved den aminoternale ende av apo A-I. Når det kommer frem til det vaskulære rom, spaltes proapo A-I, in vivo, av et spesifikt, proteolytisk enzym (apo A-I propeptidase) og gir modent apo A-I.

Modent apo A-I er et enkelt uglycosylert polypeptid med kjent sekvens sammensatt av 243 aminosyrerester (H.B. Brewer et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80 (1978), 623-630); det tjener som en cofaktor for plasma-enzymet lecithin: kolesterol-acyltransferase som er ansvarlig for dannelsen av de fleste kolesterollestere i plasma. Defekter i apolipoproteinstruktur eller biosyntese kan føre til forstyrrelser av transportsystemet for plasmalipid og til utvikling av kransarteriesykdom. Lave nivåer av apo A-I og HDL i plasma er vist å være en sterk risikofaktor for hjerteanfall (myocardialt infarkt) og andre atherosclerotiske, vaskulære sykdommer. Mutasjoner i genet som koder for apo A-I, har nemlig vært forbundet med reduserte HDL-nivåer og med for tidlig kransarteriesykdommer. Apo A-I og HDL er hovedbestanddelene i plasma som deltar i transporten av kolesterol fra perifert vev (arterier) til leveren, (såkalt omvendt kolesteroltrans-

port) for utskillelse fra kroppen. Fordi akkumulering av kolesterol i arteriene er kjennetegnet for, og den viktigste prosess ved atherosclerose, kan stimulering av omvendt kolesteroltransport ved å tilføre apo A-I, forsinke og snu den atherosclerotiske prosess og følgelig redusere forekomsten av hjerteanfall.

Modning av proapo A-I til apo A-I kan forekomme kvantitativt og ekstracellulært med en oppholdstid i blodet på mindre enn 12 timer. Fordi proapo A-I er den viktigste, hvis ikke den eneste, forløper for det modne apo A-I, kan det anvendes i erstatningsterapi hver gang HDL-nivåer avtar, f.eks. ved arvelige eller ervervede mangler. På grunn av den terapeutiske anvendelighet av apo A-I i alminnelighet, har forskere søkt etter fremgangsmåter for å fremstille apo A-I i store mengder. Vanligvis har slike fremgangsmåter omfattet rensing av apo A-I fra blodplasma. Flere publikasjoner (P. Cheung og L. Chan, *Nucleic Acids Res.* 11, (1983), 3703-3715; J.J. Seilhamer et al., *DNA*, 3, (1984), 309-317 og japansk patentsøknad nr. 96998/86) har vist at det komplementære DNA som koder for preproapo A-I, kan erholdes ved hjelp av velkjente genetiske konstruksjonsfremgangsmåter. R. Lorenzetti et al., (*FEBS Lett.* 194, (1986), 343-346) har vist at apo A-I kan uttrykkes i *E. coli* som et ikke-spaltbart, sammensmeltet protein med β -galactosidase. Forsøk på å uttrykke modent apo A-I som et ikke-sammensmeltet protein, lyktes imidlertid ikke.

I den ovenfor anførte japanske patentsøknad nr. 96998/86, beskrives ekspresjonen av et humant apolipoprotein A-I-lignende protein i *E. coli* som er transformert med et plasmid pHAIE-I som inneholder det strukturelle apo A-I-gen under kontroll av tac-promoterens. Det strukturelle gen er imidlertid ikke fullstendig og består av kodonene for aminosyrer +4 til +243, med et foranliggende ATG translasjonsinnledningskodon. Som en konsekvens inneholder det erholdte ekspresjonsprodukt N-terminalt methionin (som svarer til ATG-kodonet) som kan forårsake sekundære effekter når det anvendes i terapi. J.B. Mallory et al. (*J. Biol. Chem.*

262, (1987), 4241-4247; PCT internasjonal patentsøknad WO 86/04920 og WO 87/02062) fremlegger ekspresjon av humant apolipoprotein A-I i eggstokkceller fra kinesisk hamster (animalsk cellekultur). Den anvendte sammensetning inneholder det fullstendige, humane preproapolipoprotein A-I-gen. Eggstokkcellene fra kinesisk hamster synes å forandre proapo-formen til den modne apo-form, fordi bare 5-10% av det utskilte apo A-I-protein er proapo A-I, resten er det modne apo A-I-protein. Produktiviteten av systemet er relativt lav fordi $0,5 \times 10^6$ celler utskiller bare 25-30 µg/ml av apo A-I i løpet av en 24-timers periode. I den PCT internasjonale patentsøknad WO 87/02062 angår noen eksempler ekspresjon av humant apolipoprotein A-I i andre verter som E. coli (bakteriell vert) og S. cerevisiae (gjær). Ingen av de anvendte sammensetninger inneholder imidlertid den genetiske informasjon for proapo-formen, og det dannede protein er ikke humant proapolipoprotein A-I.

Foreliggende oppfinnelse angår en rekombinant DNA-sekvens som koder for humant proapolipoprotein A-I, ekspresjonsvektorer, cellekulturer samt fremgangsmåte for fremstilling av proteinet via rekombinant DNA-teknologi, dvs. modent proapo A-I-protein som kan spaltes ved hjelp av det spesifikke proteolytiske apo A-I-proteptidaseenzym. Betegnelsen "moden" som anvendt heri, innebærer humant proapo A-I som sådant, men omfatter også det tilsvarende protein hvor methionin går foran som en første aminosyre og som er til stede i kraft av ATG-translasjons-innledningskodonet i ekspersjonsvektorbbygningen derav. Foreliggende oppfinnelse angår således fremstillingen av ekspresjonsvektorer omfattende en DNA-sekvens som koder for humant proapo A-I, for å muliggjøre utvidelsen og følgelig ekspresjonen av det modne, humane proapo A-I-protein, såvel som Met-, sammensmeltet, eller signal N-terminale konjugater derav. Likeledes angår foreliggende oppfinnelse levedyktige cellekulturer eller mikroorganismer som er genetisk endret i kraft av at de lagrer slike vektorer, og at de er i stand til å danne humant proapo A-I-polypeptid. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre en fremgangsmåte for fremstilling av humant proapo A-I i en fysisk tilstand som er forskjellig fra dets tilstedeværelse i, eller

isolering fra, en naturlig omgivelse eller kilde; i kraft av fremstillingsfremgangsmåten beskrevet heri, foreligger det humane proapo A-I vesentlig fritt for vanlige endogene proteiner og andre naturlig forekommende materialer eller stoffer.

En grunnleggende side av foreliggende oppfinnelse er fremstillingen av et protein som består av eller inneholder modent, humant proapo A-I, og følgelig kan omdannes in vitro og in vivo, til modent, humant apo A-I ved hjelp av den proteolytiske virkning av apo A-I-propeptidase. For terapeutiske formål kan det humane proapo A-I-produkt anvendes som sådant, innbefattet Met-proapo A-I dersom tilstedeværelsen av methionylresten viser seg å være farmasøytisk akseptabel, fordi produktet kan omdannes naturlig og effektivt i blodstrømmen ved hjelp av den naturlig forekommende propeptidase for å gi det ekte, modne, humane apo A-I. Om ønsket, kan det humane proapo A-I-produkt fremstilles i utvalgte mikroorganismer eller cellekulturer som er i stand til å bearbeide det N-terminale methionin og følgelig danne det humane proapo A-I-produkt i en form som mangler det amino-terminale methionin. Alternativt kan det humane proapo A-I-produkt, uten hensyn til hvorvidt det inneholder eller mangler en amino-terminal methioninrest, spaltes in vitro for å erholde modent, humant apo A-I som kan anvendes for terapeutiske formål. Det samme gjelder sammensmeltningsskonjugater og signal N-terminale konjugater av proapo A-I: spaltning fører til ekte humant apo A-I som mangler det N-terminale methionin.

En annen viktig side av foreliggende oppfinnelse er anvendelsen av en modifisert kodingssekvens for i det minste en del av det humane proapo A-I-molekyl, den modifiserte kodingssekvens forbedrer translasjonseffektiviteten i kraft av redusert eller til og med forhindret hårnålsdannelse. Det er mulig at R. Lorenzetti et al. (FEBS Lett. 194, (1986), 343-346) ikke var i stand til å påvise ekspresjon av ikke-sammensmeltet, modent apo A-I-protein fordi deres DNA-sammensetninger var mottåkelige for vesentlig dannelse av hårnålsstrukturer, noe som fører til meget ineffektiv ekspresjon. Vi har overraskende funnet at effektiv

ekspressjon kan sikres ved hjelp av riktig modifisering av noen få kodoner i kodingssekvensen av aminosyrene -6 til +14 av humant proapo A-I. Ordene "riktig modifisering" som anvendt heri, innebærer at noen av de naturlige kodoner

- 5 erstattes med alternative kodoner, dvs. kodoner som ifølge den genetiske kode representerer de samme aminosyrer og innebærer videre at modifiseringene tilsammen fører til en reduksjon eller til og med en forhindring av hårnålsdannelse. Det er viktig å legge merke til at modifiseringene av DNA-
- 10 sekvensen ikke har noen effekt på beskaffenheten av propeptidase-spaltningssetet fordi aminosyresekvensen som gjenkjennes av propeptidasen, bevares i sammensetningen.

- På proteinnivået angår foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for fremstilling av humant proapo A-I som et
- 15 produkt av en genetisk endret cellekultur eller mikroorganisme. Fremgangsmåten er kjennetegnet ved at en cellekultur eller mikroorganisme transformeres med en ekspresjonsvektor som er i stand til å uttrykke humant proapolipoprotein A-I, etterfulgt av dyrkningen under egnede dyrkningsbetingelser og
- 20 gjenvinning av det således dannede humane proapolipoprotein A-I. Det humane proapo A-I kan være i form av et modent proapo A-I med en forutgående methioninrest, i form av et sammensmeltet protein, som f.eks. et sammensmeltet β -galactosidase-proapo A-I-protein, og i form av preproapo A-I-
- 25 produktet. Produktet vil foreligge vesentlig fritt for vanlige endogene proteiner og andre naturlig forekommende materialer eller stoffer som er vanlige for den naturlige kilde (blodplasma) for det anliggende protein. Cellekulturen eller mikroorganismen anvendt i fremstillingen er
- 30 utvalgt fra *E. coli*-bakterier, gjær som *Saccharomyces cerevisiae* og insektceller smittet av baculovirus.

- Humant apo A-I erholdes ved behandling av det ovenfor beskrevne, humane proapo A-I med apo A-I-propeptidase. Det humane apo A-I vil være identisk med den ekte form av modent,
- 35 humant apo A-I og vil være fritt for enhver aminoterminal methioninrest.

På DNA-nivået angår foreliggende oppfinnelse en rekombinant DNA-sekvens som koder for humant proapolipoprotein

A-I, og som er i stand til å redusere eller forhindre dannelse av hårnålsstrukturer i mRNA, kjennetegnet ved at den har en nukleotidsekvens ifølge fig. 8 som omfatter (a) et syntetisk DNA-fragment med sekvensen (bare én tråd er vist): 5'-ATG-
5 AGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3', som koder for aminosyrene -6 til +14 av proapolipoprotein A-I og omfatter et tilføyd ATG-translasjons-startkodon og modifiserte kodoner for aminosyrerestene -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 og +14, og (b) nedstrøms fra det syntetiske DNA-fragment, den naturlige DNA-sekvens som koder for aminosyrene +15 til +243 i humant proapolipoprotein A-I.

På DNA-nivået angår foreliggende oppfinnelse også en ekspresjonsvektor som er i stand til, i en transformert vert, å uttrykket humant proapolipoprotein A-I, kjennetegnet ved at
15 den inneholder en rekombinant DNA-sekvens som koder for humant proapo A-I opererbart bundet til en regulator-DNA-sekvens som regulerer ekspresjonen av den rekombinante DNA-sekvens. Foreliggende oppfinnelse angår spesielt de rekombinante plasmider pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612 og pNIV1613,
20 fremstillingen av disse er beskrevet i det etterfølgende. De førstnevnte plasmider pULB9291 og pULB9292 inneholder det modifiserte proapo A-I-strukturelle gen som forutgåas av et ATG-kodon, og som er under kontroll av fag-lambda P_L -promoteren. Plasmidene er egnede ekspresjonsvektorer for
25 E. coli og styrer syntesen av humant proapo A-I som kan spaltes av propeptidasen under dannelsen av ekte, modent, humant apo A-I. Plasmidet pULB9296, når det innføres i E. coli, styrer ekspresjonen av et sammensmeltet protein som omfatter β -galactosidase og humant proapo A-I under kon-
30 troll av E. coli lac-promoterområdet. Fordi det sammensmeltede produkt ennå inneholder propeptidase-spaltningsssekvensen, kan det spaltes for å gi ekte, modent, humant apo A-I.

Plasmidet pULB9299 er en passende ekspresjonsvektor
35 for gjærarter og omfatter ARG3-promoteren og transkripsjons-terminatorområder for å sikre effektiv ekspresjon i gjær. Igjen kan det humane proapo A-I-produkt spaltes av propeptidasen for å gi ekte, modent, humant apo A-I. Plasmidet pNIV1612 inneholder det proapo A-I-strukturelle gen

som er sammensmeltet med DNA-sekvensen av *E. coli* ompA-protein-signalpeptidet og under kontroll av lpp- (lipo-protein) promoter og av lac-promoter-operatoren. I sammensetningen ligger sekvensen som koder for ompA-
5 signalpeptidet forut for proapo A-I-sekvensen uten ATG-translasjons-startkodonet. Plasmidet er en egnet ekspressjonsvektor for *E. coli* og styrer syntesen av humant proapo A-I som kan uttrykkes i periplasmaet uten N-terminalt methionin. Plasmidet pNIV1613 er en overføringsvektor for
10 innføringen av humant proapo A-I cDNA-sekvensen i baculovirus. Plasmidet omfatter polyhedrin-promoter til baculoviruset og det proapo A-I-strukturelle gen, innbefattet ATG-translasjons-startkodonet. I forbindelse med villtypen baculovirus (*Autographa californica* nukleære polyhedrosis-
15 virus, AcNPV), styrer plasmidet pNIV1613 syntesen i insektceller av proapo A-I som kan foreligge fritt for methionin etter post-translasjons-modifikasjoner i insektceller.

Til sist angår foreliggende oppfinnelse også cellekulturer og mikroorganismer utvalgt fra *E. coli*, gjær og
20 baculovirus-infiserte insektceller, kjennetegnet ved at de er transformert med en ekspresjonsvektor, og hvilke derved er i stand til å uttrykke humant proapolipoprotein A-I. Betegnelsen "transformert" som anvendt heri, har den vide betydning av "genetisk endret" og er ikke begrenset til det trange begrep
25 "bakteriell transformasjon". Avhengig av typen vektor som anvendes og verten som derfor velges, kan enhver sammenlignbar genetikk anvendes for å erholde den søkte genetiske endring, innbefattet transfeksjon og transduksjon, etc. Cellekulturer og mikroorganismer ifølge foreliggende oppfinnelse, kan
30 anvendes i industriell skala for fermenteringsfremstilling av humant proapolipoprotein A-I.

Oppfinnelsen beskrevet heri, ble utført ved anvendelse av, bl.a., mikroorganismen *E. coli* K12 stamme MM 294 (endoA thi-, hsdR, supE); denne stamme er deponert hos the
35 American Type Culture Collection (ATCC nr. 33625) uten restriksjon med hensyn til tilgjengelighet. Imidlertid er flere forskjellige andre mikrobestammer anvendelige, innbefattet kjente *E. coli*-stammer som *E. coli* B, *E. coli* x 1776 (ATCC nr. 31537, deponert 3. juli 1979 uten restriks-

sjon), *E. coli* AR58 et N 99 (ATCC nr. 33956) derivat med $cIII^-$, cI 857, bio^- , lambda defekte delta-H-funksjoner, solgt av 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 nr. 33876) (J. Messing et al., Nucleic Acids Res. 9, (1981) 309-321), eller *E. coli* JA221 (lpp^- , $hdsM^+$, $trpE5$, $leuB6$, $lacY$, $recAI/F'$, $laqI^Q$, lac^+ , pro^+) (J. Ghrayeb et al., Embo J., 3, (1984), 2437-2442).

Ekspresjonsplasmider for bakteriell anvendelse, f.eks. *E. coli*, erholdes vanligvis ved anvendelse av pBR322 som vektor (deponert i ATCC under deponeringsnr. 37017) og ved hensiktsmessig innføring av den heterologe gensekvens sammen med translasjonsstart- og stoppsignaler i opererbar avlesningsramme med en funksjonell promoter under benyttelse av fordelen av vanlige eller syntetisk dannede restriksjonssteder. Vektoren vil bære én eller flere fenotype utvelgelses-karakteristiske gener og et replikasjonsutspring for å forsikre utvidelse inne i verten. Igjen kan den heterologe innføring stilles på linje for å uttrykkes sammen med en sammensmeltet forsekvens, som f.eks. kan avledes fra lac-system-genene.

Baculovirus-ekspresjonsvektorer, f.eks. pAcRP6 eller pAcYM1 (Y. Matsuura et al., J. Gen. Virol. 68, (1987), 1233-1250) og villtype baculovirus (*Autographa californica* nukleær polyhedrosis virus, AcNPV) anvendes nå i stor utstrekning. De er beskrevet i detalj i litteraturen og kan erholdes fra the Texas Agricultural Experiment Station.

Ifølge foreliggende oppfinnelse kan det også anvendes forskjellige insektceller som vert for forenlige ekspresjonsvektorer, slik som *Spodoptera frugiperda*-celler, Sf9 (M.D. Summer og G.E. Smith, A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect cell culture Procedures, Texas University, College Station, (1987); ATCC CRL 1711).

Ifølge foreliggende oppfinnelse kan det også anvendes forskjellige gjærstammer inneholdende forenlige ekspresjonsvektorer som plasmidet YRp7 (D.T. Stinchcomb et al., Nature, 282, (1979), 39-43) som er i stand til

seleksjon og replikasjon i både *E. coli* og gjær, spesielt *Saccharomyces cerevisiae*. Anvendelige gjærstammer er stamme RH218 (G. Miozzari et al., *J. Bacteriol.* 134, (1978), 48-59) deponert hos the American Type Culture Collection uten begrensning (ATCC nr. 44076), 10S44c-stammen (T. Cabezon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, (1984), 6594-6598) som inneholder leu2-3, leu2-112, pep 4-3-genotypen (M. Hoylaerts et al., *FEBS Lett.* 204, (1986), 83-87) og stammen Ic 1697d (argJ, leu2-1) en arginin bradotrof (ATCC nr. 20631).

For å uttrykke et heterologt gen som cDNA for humant proapo A-I i gjær er det nødvendig å fremstille en plasmid vektor som inneholder fire bestanddeler.

Den første bestanddel er delen som tillater transformasjon av både *E. coli* og gjær og må således inneholde et utvelgbart gen fra hver organisme. Dette kan være genet for ampicillinresistens fra *E. coli* (jfr. "AmpA") og genet leu2 fra gjær. Denne bestanddel krever også et replikasjonsutspring fra begge organismer for å opprettholdes som et plasmid DNA i begge organismer. Dette kan være *E. coli*-utspringet fra pBR322 og arsI-utspringet fra kromosom III i gjær, eller replikasjonsutspringet fra 2 μ sirkel-DNA. Den andre bestanddel av plasmidet er en 5'-flankerende sekvens fra et i høy grad uttrykt gjærgen for å fremme transkripsjon av et strukturelt gen beliggende i replikasjonsretningen. Den 5'-flankerende sekvens kan være sekvensen fra gjæren TDH3 eller ARG3-gener. Fragmentet er oppbygget på en slik måte for å fjerne de TDH3 eller ARG3 strukturelle sekvenser, erstattet med en sekvens inneholdende alternative restriksjons seter, slik som NcoI eller BamHI-restriksjons seter, for en egnet tilknytning av denne 5'-flankerende sekvens til det strukturelle gen. Den tredje bestanddel av systemet er et strukturelt gen oppbygget på en slik måte at det inneholder både et ATG-translasjons-startsignal og translasjons-stoppsignaler.

Den fjerde bestanddel er en gjær-DNA-sekvens inneholdende den 3'-flankerende sekvens av et gjærgen som inneholder de egnede signaler for transkripsjonsterminering og

polyadenylering. F.eks. kan plasmider som styrer dannelsen av humant proapo A-I i gjær, fremstilles ved å innføre genfragmenter for det humane proapo A-I-polypeptid inn i BamHI-setet av ekspresjonsplasmid pRIT10774 som beskrevet i europeisk patentsøknad nr. 151102.

Figurene 1A, B viser nucleotid- og aminosyresekvensen av humant preproapo A-I. Nucleotidsekvensen av det humane preproapo A-I-mRNA ble bestemt fra DNA-sekvensanalyse av cDNA-klonen pULB1609. Beregnede aminosyrer i signalpeptidet, propeptidet og det modne apo A-I-polypeptid, er vist og er nummerert fra den første aminosyrerest av apo A-I-proteinet. Området som tilsvarende den syntetiske DNA-probe anvendt for å isolere klonen, er understreket.

En-bokstav-forkortelsene for aminosyrerester er:
A, alanin; C, cystein; D, asparaginsyre; E, glutaminsyre; F, fenylalanin; G, glycin; H, histidin; I, isoleucin, K, lysin; L, leucin; M, methionin; N, asparagin; P, prolin; Q, glutamin; R, arginin; S, serin; T, threonin; V, valin; W, tryptofan; og Y, tyrosin.

Fig. 2 avbilder det syntetiske skjema for en oligonucleotidadapter for fremstillingen av et DNA-fragment som koder for de 6 aminosyrer i propeptidet og for de 14 første aminosyrer i modne apo A-I-polypeptid, sammen med start-ATG-kodonet. Pilene angir de anvendte oligonucleotider for å syntetisere det 65/61 bp NcoI-BalI-fragment.

Fig. 3 viser fremstillingen av pULB9291 som bærer de P_L lambda regulatorområder og proapo A-I-nucleotidsekvensen.

Fig. 4 viser fremstillingen av pULB9296 som bærer E. coli lac-promoteren og en sammensmeltet beta-galactosidase-proapo A-I-nucleotidsekvens.

Fig. 5 viser fremstillingen av pULB9299 som bærer gjær-ARG3-regulatorområdene og proapo A-I-nucleotidsekvensen.

Fig. 6A, B, C viser fremstillingen av pNIV1612 som bærer lac og lpp-regulatorområdene, sekvensen som koder for ompA-signalpeptidet og proapo A-I-nucleotidsekvensen.

Fig. 7 viser fremstillingen av pNIV1613 som bærer polyhedrin-gen-regulatorområdet og proapo A-I-nucleotid-sekvensen.

Figur 8 viser den fullstendige sekvens for det rekombinante DNA ifølge foreliggende oppfinnelse som koder for humant proapolipoprotein A-I.

RNA-fremstilling: Komplette RNA fra human lever ble fremstilt ved hjelp av guanidinklorid-fremgangsmåten (R.A. Cox, Methods Enzymol. XII, del B, (1968), 120-129). Dette komplette RNA-preparat ble deretter overført til en oligo(dT)-cellulosekolonne for å erholde de totale polyA⁺RNA (T. Maniatis et al., i Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982)). 200 µg polyA⁺RNA ble erholdt fra 10 g human lever.

Syntese in vitro av det komplementære DNA (cDNA)

De omvendte transkripsjonsreaksjoner inneholdende fra 0,1 til 5 µg totalt polyA⁺RNA, ble preparert med oligo (dT)₁₂₋₁₈ (tilnærmet 1 µg; kilde: Boehringer). Det enkelt-trådede cDNA ble deretter omdannet til det dobbelt-trådede molekyl (cDNAds) med det samme revers transkriptase-enzym. cDNAds-preparater, vanligvis 1 µg, ble behandlet med S1-nuclease for å danne butt-endede ytterender. Fremgangsmåtene er velkjente i teknikken og beskrevet i detalj av T. Maniatis et al., loc. cit. cDNAds ble deretter oligo(dC)-endepåfestet ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet av L. Villa-Komaroff et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, (1978), 3727-3731). Vanligvis behandles 100 ng cDNAds med enzymet terminal deoxynucleotidyl-transferase. Vanligvis tilføyes 15-baser lange utvidelser til 3'-endene av cDNAds-molekylene.

Kloning av de endepåfestede cDNAds inn i den plasmidevektor pBR322

pBR322-plasmid DNA ble linearisert ved hjelp av enzymet PstI og oligo(dG)-endepåfestet som beskrevet av R.M. Lawn et al. (Nucleic Acids Res. 9, (1981), 6103-6114). Oligo(dC)-endepåfestet cDNAds ble blandet med oligo(dG)-endepåfestet pBR322-DNA i ekvimolare forhold. Vanligvis

ble 50 µg av blandingen herdet for å resirkulere plasmidet. Betingelser er velkjente i teknikken og er beskrevet i detalj av R.M. Lawn et al., loc. cit. Den herdede blanding ble deretter anvendt for å transformere kompetente E. coli-celler, stamme MM294, som beskrevet av R.M. Lawn et al., loc. cit. Flere hundre transformanter ble erholdt ved utvelgelse for dyrking på tetracyclin, resistensen mot dette antibiotikum gis av pBR322-plasmidet. Transformanter ble også analysert med henblikk på sensitivitet overfor ampicillin. De transformanter som er sensitive, inneholder et chimerisk plasmid, ettersom innføyelse av fremmed DNA i vektoren inaktiverer ampicillin-genet.

Sorteringsanalyse av cDNA-biblioteket

E. coli-transformanter ble sorteringsanalysert med ³²P 5'-ende-merkede, syntetiske oligonucleotider tilsvarende et fragment av apo A-I-genet. Nucleotidsekvensen av humant apo A-I er kjent (se P. Cheung et L. Chan. loc. cit. og J.J. Seilhamer et al., loc. cit.); det er derfor egnet å syntetisere kjemisk ved hjelp av fremgangsmåten ifølge N.D. Sinha et al., (Nucleic Acids Res. 12, (1984), 4539-4557), en 22-baser lang oligonucleotidprobe som tilsvarende 5'-enden av genet. Den utvalgte sekvens er som følger: 5'-GCTGCGGTGCTGACCTTGGCCG-3'. Det syntetiske oligonucleotid ble fosforylert ved dets 5'-ende ved anvendelse av T4-polynucleotidkinase (P-L Biochemicals) og [gamma-³²P]ATP før det ble anvendt i hybridiseringeksperimenter. Betingelser for merking og for hybridisering er velkjente i teknikken og er beskrevet i detaljer av T. Maniatis et al., loc. cit. og av A. Bollen et al., (DNA, 2, (1983), 255-264).

Fremstilling av ekspresjonsplasmidene

Fremgangsmåtene for DNA-fremstilling, DNA-fragmentisering, såvel som betingelsene for restriksjonsenzym-analyser og for ligeringer av fragmenter, er velkjente i teknikken og er beskrevet i detalj av R.M. Lawn et al.,

loc. cit. og av T. Cabezon et al., loc. cit., og er anvendelige heri. Syntese av fragmenter som forbinder ekspressjonsvektorenes promoter og 5'-enden av genet, er beskrevet i det etterfølgende.

Syntese av NcoI-BalI-fragment

Prinsippene som ligger til grunn for utformingen av de 35-mer, 30-mer, 18-mer og 43-mer oligonucleotider anvendt for å syntetisere det 65/61 bp NcoI-BalI-fragment, er vist i detalj i figur 2. De 30-mer og de 18-mer syntetiske fragmenter ble fosforylert ved deres 5'-ender ved anvendelse av T4 polynucleotid-kinase (P-L Biochemicals). 1 µg av hvert oligonucleotid, innbefattet det ikke-fosforylerte 35-mer og 43-mer, ble herdet sammen i 3 minutter ved 95°C i 300 mM natriumacetat (pH 7,0) og tillatt å sakte avkjøles til 4°C. Herdingsreaksjonen ble anvendt som sådan i kloningsfremgangsmåten for fremstillingen av ekspresjonsplasmidene.

DNA-sekvensanalyse

DNA-sekvensanalyse ble utført ved hjelp av fremgangsmåtene ifølge A.M. Maxam og W. Gilbert (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, (1977), 560-564) og F. Sanger et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, (1977), 5463-5467).

Proteinanalyse

Celle-pelleter inneholdende 1 OD₆₃₀ enhet, ble erholdt ved forskjellige stadier i løpet av fermenteringen av stammer som bærer de humane proapo A-I ekspresjonsplasmider pULB9291, pULB9292, pULB9296 og pULB9299 (transformert inn i hhv. E. coli-stamme AR58, JM101 eller inn i gjærstamme 10S44c). Hver prøve ble resuspendert i 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6,8, inneholdende 2% natriumdodecylsulfat (SDS), 6 M urea, 10% glycerol og 5% 2-mercaptoethanol, og kokt i 3 minutter. Prøver ble underkastet elektroforese i polyacrylamidgeler ifølge U.K. Laemmli, (Nature, 227,

(1970), 680-685). Totalt protein ble visualisert ved farging med Coomassie brilliantblått og syntetisert, humant proapo A-I ble identifisert ved Western blot-analyse (se A. Bollen et al., loc. cit.).

Fremstilling av rekombinante vektorer for ekspresjonen av humant proapo A-I i bakterier, gjær og baculovirus-smittede insektceller

1. Utgangs-cDNA-klon for humant preproapo A-I: pULB1609 (figur 1)

Flere hundre transformanter, avledet fra kloningen inn i PstI-setet til pBR322, av cDNAs tilsvarende human lever polyA⁺ RNA, ble sorteringsanalysert med den ovenfor beskrevne 22-mer apo A-I syntetiske probe. En av klonene ga et sterkt hybridiseringssignal i analysen. Denne klon, betegnet pULB1609, ble gjenvunnet, og DNA-innskuddet som er til stede i det rekombinante plasmid, ble karakterisert ved hjelp av DNA-sekvensanalyse. Dets lengde er 878 basepar (bp); det koder for det komplette preproapo A-I-polypeptid. Som vist i fig. 1, bærer det klonede cDNA-fragment 5' og 3' ikke-kodende områder (hhv. 19 bp og 55 bp), sekvensen med 54 bp koder for forløperpeptidet (aminosyre-24 til aminosyre-7), sekvensen med 18 bp koder for propeptidet (aminosyre-6 til aminosyre-1), og sekvensen med 732 bp koder for modent apo A-I (aminosyre 1 til aminosyre 243) og innbefatter translasjons-stoppkodonet. Proteinsekvensen avledet fra DNA-sekvensen, passer perfekt med aminosyresekvensen erholdt fra proteinet og fra uavhengig isolerte cDNA-kloner for preproapo A-I (W.C. Barker et al., Comp. Biochem. Physiol. 57B, (1977), 309-315; japansk patentsøknad nr. 96998/86; P. Cheung og L. Chan, loc. cit. og J.J. Seilhamer et al., loc. cit.).

2. Fremstilling av en bakteriell ekspresjonsvektor inne-
holdende den humane proapo A-I-cDNA-sekvens:
pULB9291 (fig. 2 og 3)

pULB9291, et plasmid som danner humant proapo A-I,
ble fremstilt ved å plassere et segment fra klon pULB1609
bak den regulerbare P_L lambda promoter (fig. 3). Fremstill-
ingen av dette ekspresjonsplasmid fordret syntesen av
DNA-fragmenter omfattende et NcoI-spaltningssete, et ATG-
translasjons-startkodon og nucleotidsekvensen som koder for
aminosyrene ved aminoterminalen av det humane proapo A-I
strukturelle gen, frem til det første entydige restriks-
jonssete, BalI (fig. 2).

Denne adapter ble syntetisert ved hjelp av kjemiske
fremgangsmåter (N.D. Sinha et al., loc. cit.). Fire syn-
tetiske oligonucleotider ble syntetisert; når de er herdet,
koder de for methionin tilsvarende ATG-translasjons-start-
kodonet, de 6 aminosyrer tilsvarende propeptidet og de
første 14 aminosyrer i modent, humant apo A-I (fig. 2). Den
syntetiske adapter ble utformet for å minimere sekundære
strukturer i 5'-enden av genet. For å oppnå dette til-
svaret kodonene utvalgt for å kode for aminosyrerester -6,
-1, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 og 14, ikke de naturlige
kodoner observert i pULB1609 cDNA-klonen.

Den ovenfor beskrevne, syntetiske adapter ble an-
vendt for å forbinde et 744 bp DNA-fragment avledet fra
pULB1609 med P_L lambda-promoterens i ekspresjonsplasmidet
pULB1221.

Fremstillingen av ekspresjonsvektor pULB1221, er
beskrevet i europeisk patentsøknad nr. 186.643. Fremstill-
ingen omfatter tre hovedtrinn som starter fra plasmid
pCQV2. Plasmid pCQV2 er beskrevet av C. Queen i J. Mol.
Appl. Genet. 2, (1983), 1-10, og er fritt tilgjengelig.

Valget av denne spesielle vektor er ikke tvungent;
enhver annen vektor med en promoter og et egnet NcoI-sete
i replikasjonsretningen i forhold til denne, kan anvendes.
Tilnærmet 0,1 µg av herdede, syntetiske fragmenter, som be-

skrevet ovenfor, ble ligert ved hjelp av T4 DNA-ligase til 1 µg av det 744 bp BalI-PstI-fragment avledet fra pULB1609, og 1 µg av vektoren pULB1221 spaltet med NcoI og BalI. Forut for ligeringen ble det 744 bp BalI-PstI-fragment behandlet med T4 DNA-polymerase for å glatte 3'-utstikkende ender; fremgangsmåten er velkjent i teknikken og er beskrevet i detalj i T. Maniatis et al., loc. cit.

Rekonstruerte plasmider, tidligere forøket i E. coli AR58-kompetente celler, ble karakterisert ved restriksjonssete-analyse og DNA-sekvensanalyse av de syntetiske deler og av sammenbindingssetene. Ett rekombinant plasmid, pULB9291, tilfredsstilte alle kriterier ettersom det hadde fragmentene i den korrekte rekkefølge og orientering, og dette ble anvendt for ekspresjonsstudier.

3. Fremstilling av en bakteriell ekspresjonsvektor inneholdende de sammensmeltede sekvenser tilsvarende beta-galactosidase og humant proapo A-I: pULB9296 (figur 4)

I denne fremstilling ble DNA-sekvensen som koder for humant proapo A-I, sammensmeltet, i replikasjonsretningen og i den korrekte avlesningsramme, med DNA-sekvensen av beta-galactosidase. Genet for beta-galactosidase er til stede i et fritt tilgjengelig E. coli-ekspresjonsplasmid, pUR288 (U. Ruther og B. Muller-Hill, Embo J. 2, (1983), 1791-1794) som bærer med seg en effektivt induserbar lac-promoter og egnede restriksjonsseter inn i beta-galactosidase-sekvensen. Det egnede, rekombinante plasmid ble fremstilt som vist i fig. 4. Først ble pUR288 plasmid-DNA suksessivt spaltet med BamHI, behandlet med T4 DNA-polymerase og på nytt spaltet med SalI. Derne ble et 805 bp DNA-fragment avledet fra pULB9291 ved suksessiv fordøyelse med KpnI, behandling med T4 DNA-polymerase og deretter fordøyelse med SalI. De to fragmenter ble ligert sammen, i molare forhold, med T4 DNA-ligase, og det dannede plasmid ble anvendt for å transformere E. coli-kompetente celler, stamme JM101, en alminnelig og fritt tilgjengelig stamme (ATCC nr. 33876). Transformanter ble kontrollert

ved hjelp av restriksjonsanalyse for den korrekte orientering av den humane proapo A-I-sekvens med hensyn til beta-galactosidase-genet, og for tilstedeværelsen av et rekonstituert BamHI-sete ved sammenføyingen av de to sekvenser. Dette anga at den humane proapo A-I-sekvens var sammen-smeltet i replikasjonsretningen fra beta-galactosidase-DNA-sekvensen, og i den korrekte avlesningsramme. En av transformantene, pULB9296, tilfredsstilte alle kriterier og ble anvendt for ekspresjonseksperimenter.

4. Fremstilling av et gjær-ekspresjonsplasmid som bærer den humane proapo A-I-cDNA-sekvens: pULB9299 (figur 5)

I denne fremstilling ble cDNA-sekvensen som koder for humant proapo A-I, klonet mellom promoter- og terminator-signalene båret av et gjær-ekspresjonsplasmid. Gjær-ekspresjonsvektoren pRIT 10774 ble utvalgt for eksperimentet. Fremstillingen av ekspresjonsplasmid pRIT 10774 er beskrevet i europeisk patentsøknad nr. 151.102. Plasmidet ble på den ene side fremstilt ved å starte fra plasmid pRIT 10749 som er deponert under betingelsene ifølge Budapest-avtalen i ATCC med tilgangsnr. 39133, og på den annen side, fra *E. coli*-*S. cerevisiae* skyttelvektor YEpl3, beskrevet av J.R. Broach et al., i *Gene*, 8, (1979), 121-133, som er tilgjengelig fra ATCC under tilgangsnr. 37115. Vektor pRIT 10774 kan replikere i både *E. coli* og gjær og bærer ornithin-carbamoyltransferase (ARG3)-promoter og transkripsjonsterminatoren adskilt av et entydig BamHI-restriksjonssete egnet for innføyelsen av et fremmed DNA som har sitt eget ATG-translasjons-startkodon. I tillegg bærer vektoren gjær-2 μ -sekvenser, metabolske markører for seleksjon i gjær, og AmpA-seleksjonsmarkøren for skyttelfunksjon i *E. coli*. Dette er ikke den eneste vektor som kan anvendes for ekspresjonen av humant proapo A-I i gjær; enhver annen gjærvektor som bærer regulatorsignaler, kan anvendes og vil føre til kvalitativt lignende resultater. Fremstillingen avbildet i fig. 5, foregår som følger.

pRIT 10774-plasmid-DNA ble linearisert med enzymet BamHI og behandlet med T4 DNA-polymerase.

På den annen side ble et 810 bp DNA-fragment avledet fra pULB9291 ved fordøyelse med enzymene Asp718 og SalI, etterfulgt av behandling med T4 DNA-polymerase. Dette fragment koder for humant proapo A-I og innbefatter ATG-translasjons-startkodonet. De to fragmenter, erholdt som beskrevet ovenfor, ble ligert sammen i ekvimolare forhold med T4 DNA-ligase, og blandingen ble anvendt for å transformere E. coli MM294 kompetente celler. Transformanter ble kontrollert ved restriksjonsanalyse for å bekrefte den korrekte orientering av proapo A-I DNA-sekvensen med hensyn til ARG3-promotersekvensen. En av transformantene bar et rekombinant plasmid, pULB9299, som tilfredsstiller denne betingelse. Plasmidet pULB9299 ble forøket i E. coli og anvendt for å transformere sferoplaster av gjæren *Saccharomyces cerevisiae* stamme 10S44c (pep4-3, leu2-3, leu2-112); (T. Cabezón et al., loc. cit.). Anvendelsen av stamme Ic 1697d (ATCC nr. 20631) vil føre til kvalitativt lignende resultater. Gjærtransformanter ble deretter analysert for ekspresjon av humant proapo A-I.

5. Fremstilling av en bakteriell sekresjonsvektor inneholdende den humane proapo A-I-cDNA-sekvens:
pNIV1612 (figurene 6A, B og C)

I denne fremstilling ble DNA-sekvensen som koder for humant proapo A-I, sammensmeltet, i replikasjonsretningen og i den korrekte avlesningsramme, med DNA-sekvensen av E. coli Ompa-protein-signalpeptidet. Sekresjonsvektoren pIN-III-ompA-2 (J. Ghayeb et al., *Embo J.* 3, (1984), 2437-2442) ble utvalgt til dette eksperiment. Denne vektor og dens vertstamme E. coli JA221 er tilgjengelig på forespørsel fra avdelingen for biokjemi ved State University of New York, Stony Brook.

Sekresjonsvektoren bærer en sterk lpp (lipoprotein)-promoter, et lac-promoter-operatorfragment, lacI-sekvensen

av lac-repressoren, og egnede restriksjons seter beliggende umiddelbart etter sekvensen som koder for ompA-signal-peptidet. Det egnede, rekombinante plasmid ble fremstilt som vist i figurene 6A, B, C. Først ble sekresjonsvektor
 5 pIN-III-ompA-2 linearisert med EcoRI og behandlet med T4 DNA-polymerase. Deretter ble et 805 bp DNA-fragment avledet fra pULB9291 ved suksessiv fordøyelse med restriksjonsenzymene KpnI og SalI, etterfulgt av behandling med
 10 T4 DNA-polymerase. Dette fragment koder for humant proapo A-I og omfatter ATG-translasjons-startkodonet. De to fragmenter erholdt som beskrevet ovenfor, ble ligert sammen i ekvimolare forhold med T4 DNA-ligase, og blandingen ble anvendt for å transformere *E. coli* JA221 kompetente celler dyrket i M9 medium (J.H. Miller, i "Experiments in Molecular
 15 Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972, s. 431) inneholdende tryptofan (20 mg/l), leucin (20 mg/l), lactose (2 g/l) og ampicillin (50 mg/l).

Transformanter ble utvalgt med henblikk på deres
 20 ampicillinresistens og sorteringsanalysert med 18-mer syntetisk oligonucleotid (det samme som ble anvendt i syntesen av adapteren, som vist i fig. 2). De utvalgte transformanter ble kontrollert ved restriksjonsanalyse for å bekrefte den korrekte orientering av proapo A-I-DNA-sekvensen
 25 med hensyn til signalpeptidsekvensen båret av sekresjonsvektoren (rekonstituert EcoRI-setet ved sammenføyningen av de to sekvenser). En av transformantene bar et rekombinant plasmid som tilfredsstiller denne betingelse. Den ekstra sekvens etter fremstillingen som skyldes linkerens under-
 30 streket i den følgende nucleotidsekvens,

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

35 ble fjernet ved hjelp av oligonucleotid-styrt sete-spesifikk mutagenese. For dette formål ble det 24-mer oligonucleotid

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

5 som mangler de tolv overskridende baser, syntetisert og
anvendt for å fjerne den 12-basers linkersekvens.

Til mutagenesen anvendes Amersham-systemet. Dette
system baserer seg på fremgangsmåten ifølge F. Eckstein et al.
(Nucleic Acids Res. 13, (1985), 8765-8785). Fremgangsmåten
10 gir et høyt utbytte av plakker, og den høyest tilgjengelige
effektivitet: opptil 95%. Først klones området av DNA som
skal mutagenes, i en M13-vektor. For å oppnå dette inn-
føyas XbaI-BalI-DNA-fragmentet av det rekombinante plasmid
pIN-III-ompA-2 som bærer proapo A-I-genet, i M13mpl9-vektoren
15 som er spaltet av XbaI og HindII. Vektor M13mpl9 er
kommersielt tilgjengelig; den kan erholdes fra Amersham
Buckinghamshire, England). Deretter herdes det mutagene
24-mer-oligonucleotid til det enkelt-trådede templat og ut-
vides ved hjelp av Klenow-fragmentet av DNA-polymerase
20 under tilstedeværelse av T4 DNA-ligase for å danne en mutant
heterodupleks.

Selektiv fjerning av den ikke-mutante tråd gjøres
mulig ved hjelp av inkorporeringen av et thionucleotid i den
mutante tråd under in vitro-syntesen, og innsnitting ved
25 hjelp av NCiI av ikke-fosforthionat-tråden. Slike innsnitt
fremlegger seter for exonuclease III som fordøyer den ikke-
mutante tråd. Den mutante tråd anvendes deretter som et
templat for å rekonstruere det dobbelt-trådede, sirkulære
molekyl, ved dannelse av et homodupleks mutant molekyl.
30 Mutagenesen ble kontrollert ved sekvensanalyse av sammenføy-
ningen av signalpeptidet og begynnelsen av proapo A-I-genet.
Det rekombinante plasmid, pNIV1612, ble rekonstruert ved
ligering av XbaI-HindIII-fragmentet av pIN-III-ompA-2-
vektoren med XbaI-BalI-DNA-fragmentet, fra hvilket de
35 12 overskytende baser er utslettet, og med BalI-HindIII-
fragmentet av proapo A-I-genet. De tre fragmenter ble ligert

med T4 DNA-ligase, og blandingen ble anvendt for å transformere *E. coli* JA221 kompetente celler som beskrevet ovenfor. Transformanter ble utvalgt med henblikk på deres ampisillinresistens og sorteringsanalysert med det ovenfor beskrevne 18-mer oligonucleotid. En av transformantene bar et rekombinant plasmid pNIV1612. I den endelige fremstilling ligger sekvensen som koder for ompA-signalpeptidet forut for den fullstendige proapo A-I-sekvens uten ATG-kodonet (fig. 6A, B og C). *E. coli*-transformanter ble deretter analysert for ekspresjon av humant proapo A-I.

6. Fremstilling av en overføringsvektor for innføringen av human proapo A-I-cDNA-sekvens i baculovirus: pNIV1613 (figur 7)

pNIV1613, et plasmid som bærer human proapo A-I-DNA-sekvens, ble fremstilt ved å plassere et segment avledet fra klon pULB9291 med replikasjonsretningen i forhold til polyhedrin-genpromoterens i baculoviruset (fig. 7). Baculovirus-overføringsvektoren pACRP6 (Y. Matsuura et al., J. Gen. Virol., 67, (1986), 1515-1529), ble anvendt i eksperimentene; det kan erholdes fra avdelingen for mikrobiologi og immunologi ved universitet i Ottawa. Plasmidet bærer polyhedrin-genpromoterens frem til nucleotid -7 i 5'-ledersekvensen; det mangler polyhedrin-ATG-kodonet og de første 170 nucleotider i polyhedrin-kodingssekvensen. Et egnet BamHI-sete er beliggende med replikasjonsretningen fra nucleotid -7. Fremstillingen avbildet i fig. 7, foregår som følger. pACRP6 plasmid DNA ble linearisert med BamHI. På den annen side ble et 810 bp DNA-fragment avledet fra pULB9291 ved fordøyelse med restriksjonsenzymene Asp718 og SalI. Dette fragment koder for humant proapo A-I og innbefatter ATG-translasjons-startkodonet. De to fragmenter, i ekvimolare forhold, ble behandlet sammen med T4 DNA-polymerase, ligert med T4 DNA-ligase og anvendt for å transformere *E. coli* AR58-kompetente celler. Transformanter ble utvalgt med henblikk på deres ampisillinresistens, sorter-

ingsanalysert med et ^{32}P -merket, syntetisk 35-mer oligo-nucleotid (se fig. 2) tilsvarende deler av proapo A-I-DNA-sekvensen og kontrollert ved hjelp av restriksjonsanalyse for å bekrefte den korrekte orientering av proapo A-I-DNA-sekvensen med hensyn til polyhedrin-genpromoteren. En av transformantene bar et rekombinant plasmid, pNIV1613, som tilfredsstilte denne betingelse og ble anvendt for eks-presjonseksperimenter.

7. Fremstilling av humant proapo A-I ved hjelp av transformerte mikroorganismer

20 ml's kulturer av E. coli stamme AR58 eller JM101, transformert med hhv. pULB9291 og pULB9296, ble dyrket i rikt medium supplert med 50 µg/ml ampicillin (LB dyrknings-medium, se T. Maniatis et al., loc. cit., for eksperimenterelle detaljer) inntil den optiske tetthet ved 630 nm (OD_{630}) nådde 0,6. I tilfellet med pULB9291, ble induksjon av P_L lambda-promoteren oppnådd ved å endre kulturen fra dens innledende vekstbetingelser (30°C), til 42°C for å inaktivere repressoren av P_L lambda-promoteren (M. Rosenberg et al., Methods Enzymol. 101, (1983), 123-138). Induksjon ble utført i 20 minutter.

I tilfellet med pULB9296 ble induksjon av lac-promoteren oppnådd ved tilsetning til kulturen som ble dyrket ved 37°C , den kjemiske induktor IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactosid) til en sluttkonsentrasjon på 1 mM (L. Lorenzetti et al., loc. cit.). Induksjon ble utført i 60 minutter. På den annen side ble 20 ml's kulturer av gjærceller 10S44c transformert med pULB9299, dyrket ved 30°C i gjær-nitrogenbase-medium (Difco) supplert med glucose (1%) opptil en OD_{630} på 0,3. Ingen induktor var nødvendig ettersom ekspresjonen er grunnleggende i dette spesielle tilfelle. Aliquoter på 1 ml av de ovenfor beskrevne kulturer ble innsamlet og sentrifugert ved 15.000 g i 5 minutter. De erholdte pelleten ble lysert i kokende natriumdodecylsulfat (SDS) som følger. Pelletene ble resuspendert

i 50 µl SDS-prøvebuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 6 M urea, 5% 2-mercaptoethanol og 10% glycerol) og kokt i 3 minutter ved 100°C. Ekstrakter ble deretter sentrifugert i 10 minutter ved 15.000 g. Prøvene er deretter klare for utføring av den elektroforetiske analyse på 15% eller 7,5% SDS-polyacrylamid-plategeler under denaturerende betingelser (U.K. Laemmli, loc. cit.).

Etter elektroforese ble polyacrylamid-plategelene vasket i kort tid med 40 ml destillert vann og med 40 ml 50 mM natriumfosfatbuffer ved pH 7,5. Overføring av proteinene fra gelene til nitrocellulose-ark ble deretter utført elektrisk i to timer ved 60 V og 1,5 A i den samme fosfatbuffer (T. Cabezón et al., loc. cit.). Nitrocellulose-arkene ble mettet med albumin (1%) i 50 mM natriumfosfatbuffer, pH 7,5, deretter inkubert over natten ved romtemperatur under tilstedeværelse av en 1/500 fortynning av kanin-anti-humant apo A-I-serum (og i tilfelle med pULB9296, under tilstedeværelse av mus-anti-beta-galactosidase-monoklonale antistoffer) i den samme buffer, men uten albumin.

Arkene ble vasket 5 ganger med 40 ml av den samme fosfatbuffer og deretter inkubert med peroksydase-merket geit-anti-kanin (eller anti-mus)-serum (10 µg/ml) i 40 ml fosfatbuffer. Etter inkubasjon i 4 timer ved romtemperatur ble arkene igjen vasket 5 ganger i 40 ml fosfatbuffer og til slutt fremkalt ved tilsetning av 50 ml av en kromogen substratopløsning (10 mg diaminobenzidin, 100 µl urea-peroksyd (10%), 100 mM Tris-HCl ved pH 7,6). Et enkelt produkt som reagerte med de anti-humane apo A-I-antistoffer, ble funnet i tilfellet med pULB9291 og pULB9299. Dette produkt har en molekylvekt i overensstemmelse med produktet av normalt, naturlig apo A-I. I tilfellet med pULB9296 ble et sammensmeltet polypeptid som reagerte med anti-humant apo A-I-serum og med anti-beta-galactosidase-serum, funnet ved den ventede størrelse for summen av beta-galactosidase og proapo A-I polypeptider (144 kDa). Størrelsen ble

bestemt fra en kalibreringskurve basert på bevegelsen av molekylvektstandarder kjørt på den samme gel som celle-ekstraktene.

I et annet eksperiment ble 20 ml's kulturer av E. coli stamme JA221 transformert med pNIV1612, dyrket i rikt medium supplert med 50 µg/ml ampicillin (LB dyrkningsmedium, se T. Maniatis et al., loc. cit) inntil den optiske tetthet ved 630 nm når 0,6. Induksjon av lac-promoterens ble oppnådd ved tilsetning til kulturen som ble dyrket ved 37°C, den kjemiske induktor IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactosid) til en sluttkonsentrasjon på 2 mM. Induksjon ble utført i 60 minutter. Aliquoter å 1 ml av kulturene ble innsamlet og sentrifugert ved 15.000 g i 5 minutter. De erholdte pelletter ble utsatt for et mildt osmotisk sjokk for å frigjøre den periplasmiske fraksjon (D. Koshland og D. Botstein, Cell, 20, (1980), 749-760). Den frigjorte fraksjon ble resuspendert i den ovenfor beskrevne SDS-prøvebuffer uten urea, kokt, sentrifugert og underkastet en 12,5% SDS-polyacrylamidgelelektroforese, etterfulgt av en Western blot-analyse. En fraksjon av det syntetiserte 965 proapo A-I er funnet i cellen og ikke i periplasmaet. Dette skyldes enten det faktum at noe proapo A-I ikke utskilles, eller at effektiviteten av det osmotiske sjokk ikke er optimal. Hovedfraksjonen av proapo A-I ble funnet å frigjøres til mediet etter det osmotiske sjokk som angir at proteinet ble utskilt av cellene.

8. Fremstilling av humant proapo A-I ved hjelp av baculovirus-infiserte insektceller

Det rekombinante plasmid pNIV1613 er anvendt i forbindelse med villtype baculoviruset for å coinfisere Spodoptora frugiperda-celler i kultur. Sorteringsanalyse med henblikk på polyhedrin-defekte, rekombinante vira ga rekombinante plakker. Det rekombinante virus, rensset fra en plakk, ble anvendt for å infisere insektceller. Frem-

gangsmåten er velkjent i teknikken og er beskrevet i detalj av M.D. Summers og G.E. Smith i "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect cell culture Procedures, Texas University, College Station, (1987)". Det rekombin-
5 ante virus ble analysert med hensyn på produksjonen av proapo A-I ved hjelp av Western blot-analyse og ved hjelp av elektroforese på en 12,5% SDS-polyacrylamidgel etter lyse av cellene med RIPA-bufferen (0,05 M Tris-HCl-buffer, pH 7,2, inneholdende 0,15 M NaCl, 1% "Triton" X100, 0,1% SDS, 0,1%
10 natriumdeoxycholat og 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) og behandling med kokende natriumdodecylsulfat. Et enkelt produkt som reagerte med de anti-humant apo A-I-antistoffer, ble funnet. Det har en molekylvekt som er i overensstemmelse med molekylvekten av normalt, naturlig apo A-I, og det
15 uttrykte protein representerer en hovedbestanddel av det totale proteininnhold. Konsentrasjonen av proapo A-I målt ved hjelp av enkel, radial immunodiffusjon (G. Mancini et al., Immunochem. 2, (1965), 235-254), ble beregnet å være tilnærmet 100 mg proapo A-I pr. liter kultur.

9. Cytoplasmisk fremstilling av humant proapo A-I i E. coli. Anvendelse av et definert minimumsmedium

Til den cytoplasmiske fremstilling av humant
20 proapo A-I i E. coli i minimumsmedium ble plasmidet pULB9292 anvendt. pULB9292 ble fremstilt ved å utskifte fragmentet EcoRI-NcoI av plasmidet pULB 9291 som koder for P_L lambda-promoteren, med det samme fragment EcoRI-NcoI av plasmidet pOTS. (M. Rosenberg et al., Methods Enzymol. 101, (1983), 123-138). Fragmentet EcoRI-NcoI av pOTS-vektoren (G. Devare
30 et al., Cell, 36, (1984), 43-49) inneholder også den effektive regulerbare P_L -promoter til fag-lambda. 20 ml's kulturer av E. coli stamme AR58 transformert med pULB9292, ble dyrket i et definert minimumsmedium. Sammensetningen av minimumsmediet er (pr. liter): 3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
35 3 g KH_2PO_4 ; 0,5 g NaCl; 1 g NH_4Cl ; 1,37 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 29,5 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 263 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 10 g glucose; 1 mg

vitamin B1, 50 mg ampicillin; LB dyrkningsmedium 1/20 (volum/volum). Celler ble dyrket i dette minimumsmedium til en OD₆₃₀ på 0,5. Induksjon av P_L lambda-promoterer ble oppnådd ved forandring av de innledende vekstbetingelser for kulturen fra 30°C til 42°C for å inaktivere repressoren av P_L lambda-promoterer (M. Rosenberg et al., loc. cit.). Induksjon ble utført i 60 minutter. Aliquoter av 1 ml av kulturene ble innsamlet og passert gjennom French presse eller sentrifugert ved 15.000 g i 5 minutter. Den erholdte, totale celleekstrakt eller pellet ble behandlet med kokende SDS som beskrevet i §7. Etter elektroforese og Western blot-analyse ble det funnet et enkelt produkt som reagerte med de anti-humane apo A-I-antistoffer. Produktet har en molekylvekt som er i overensstemmelse med molekylvekten til normalt, naturlig apo A-I. Mengden av uttrykt proapolipoprotein A-I i det definerte minimumsmedium representerer 13,5% av det totale proteininnhold, dvs. en beregnet konsentrasjon av proapo A-I på tilnærmet 270 mg pr. liter kultur.

10. Isolering, rensing og karakterisering av humant proapo A-I fremstilt ved hjelp av transformerte mikroorganismer

10.1. Isolering og rensing

Råekstrakter av det rekombinante proapo A-I ble sentrifugert i 15 minutter ved 4.000 g, og pelleten ble kastet. Supernatanten ble sentrifugert ved 100.000 g i 2 timer. Den dannede pellet ble resuspendert i et minimumsvolum av en buffer (TEN100) bestående av 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1,75 µg/ml PMSF og 100 µg/ml natriummerthiolat ([o-carboxyfenyl]-thio]-ethyl-kvikksølv-natriumsalt), og volumene av denne suspensjon og av supernatanten ble justert hver for seg til det opprinnelige ekstraktvolum med den samme buffer. Deretter ble protein bunnfelt fra begge suspensjoner ved anvendelse av økende konsentrasjoner av isopropylalkohol. Den bunnfalte protein-

fraksjon av hver suspensjon som inneholdt hoveddelen av den humane apo A-I-beslektede immunreaktivitet, ble bestemt ved hjelp av radial immunodiffusjon (G. Mancini et al., loc. cit.) ved anvendelse av kommersielt apo A-I som standard. Hver av de således erholdte fraksjoner ble videre rensset ved kromatografi gjennom en kolonne av "Sephacryl" S200 ved anvendelse av den samme buffer som elueringsmiddel. Fraksjoner på 0,9 ml ble innsamlet, og mengdene av totalt protein med immunreaktiviteten til apo A-I ble bestemt i hver fraksjon ved radial immunodiffusjon. Molekylvekten av det eluerte protein i fraksjonene ble bestemt ved kalibrering av kolonnen med molekylvektstandarder som aldolase, bovint serumalbumin, ovalbumin, chymotrypsinogen og cytokrom C2, under identiske betingelser.

Renheten av proapo A-I pr. mg totalt protein i hovedfraksjonene som inneholdt rekombinant proapo A-I, uttrykt i mg protein med den samme immunreaktivitet som et standard kommersielt fremstilt apo A-I, ble beregnet å være 95%.

10.2. Karakterisering

10.2.1. Fysiske egenskaper av rekombinant proapo A-I.

Når det underkastes isoelektrisk fokusering, i overensstemmelse med fremgangsmåten ifølge N. Catsimopoulos (Anal. Biochem. 26, (1969), 54-62), og det anvendes en selv-utviklende gradient fra pH 4 til pH 6, viser rekombinant proapo A-I isolert og rensset fra supernatanten og fra pelleten etter sentrifugering ved 100.000 g (10.1 ovenfor), ett enkelt bånd med et beregnet isoelektrisk punkt på 4,95.

Humant plasma apo A-I ble vist å være svakt surere; det har et beregnet isoelektrisk punkt på 4,75. Denne differanse på 0,2 pH-enheter mellom isoelektrisk punkt-verdiene av rekombinant proapo A-I og plasma apo A-I er i god overensstemmelse med den kjente differanse i isoelek-

trisk punkt-verdier mellom plasma apo A-I og plasma proapo A-I; denne differanse er rapportert å være 0,17 (G.L. Mills et al., Lab. Tech. Biochem., Mol. Biol. 14, (1984), 244-245). Med hensyn til molekylvekt, består både pellet- og supernatant-rekombinant proapo A-I av en enkel polypeptidkjede med identiske molekylvekter som ble funnet å være $29,9 \pm 1,4$ kDa. Humant plasma apo A-I ble funnet å være ubetydelig mindre, med en molekylvekt på $29,3 \pm 1,3$ kDa.

10.2.2. Peptid-kartlegging av rekombinant proapo A-I med BNPS-skatol.

Kjemisk spaltning med 3-brom-3-methyl-2-[(2-nitrofenyl)-thio]-3H-indol (BNPS-skatol) ble utført i overensstemmelse med fremgangsmåten ifølge A. Fontana (Methods Enzymol. 25, (1972), 419-423). 5-10 µg rensede proteinpreparater ble oppløst i 100 µl av en 0,15% (volum/volum) oppløsning av fenol i 50% (volum/volum) vandig eddiksyre. Deretter ble 50 µl av en oppløsning av 4,8 mg BNPS-skatol pr. ml iseddik tilsatt, etterfulgt av en inkubering ved 25°C i 72 timer. Deretter ble 50 µl 2-mercaptoethanol tilsatt, etterfulgt av en andre inkubering ved 37°C i 5 timer. Oppløsningene ble inndampet, oppløst på nytt i 100 µl vann og ekstrahert tre ganger med 200 µl ethylacetat. De organiske faser ble kastet, og de vandige faser ble lyofilisert og analysert ved SDS-polyacrylamidgel-elektroforese.

I tilfelle med kjemisk spaltning med BNPS-skatol, kan antall og størrelse av apo A-I-avlede fragmenter mer eller mindre forutberegnes, ettersom BNPS-skatol under de anvendte eksperimentelle betingelser, selektivt spalter etter tryptofanrester. Antar man en 100% effektivitet ved hvert

spaltningssete, er det største fragment som kan ventes, et C-terminalt fragment på 15,4 kDa. Molekylvektene av de resterende fragmenter varierer fra 0,5 opptil 5,3 kDa og er derfor for små til å påvises.

I tilfelle med ufullstendig spaltning vil det 15,4 kDa fragment bli "utvidet" i retning av N-terminalen, og gi fragmenter på hhv. 20,7 kDa, 23,1 kDa og 27,6 kDa. Disse forventninger blir godt tilfredsstilt for humant plasma apo A-I såvel som for de forskjellige rensede preparater av rekombinant proapo A-I.

P a t e n t k r a v

1. Rekombinant DNA-sekvens som koder for humant proapolipoprotein A-I, og som er i stand til å redusere eller forhindre dannelse av hårnålsstrukturer i mRNA, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har en nukleotid-sekvens ifølge fig. 8 som omfatter (a) et syntetisk DNA-fragment med sekvensen (bare én tråd er vist): 5'-ATGAGACATTTCTGG-CAGCAGGACGAACCTCCACAATCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTG-3', som koder for aminosyrene -6 til +14 av proapolipoprotein A-I og omfatter et tilføyd ATG-translasjons-startkodon og modifiserte kodoner for aminosyrerestene -6, -1, +1, +3, +4, +5, +6, +7, +10, +11 og +14, og (b) nedstrøms fra det syntetiske DNA-fragment, den naturlige DNA-sekvens som koder for aminosyrene +15 til +243 i humant proapolipoprotein A-I.

2. Ekspresjonsvektor som er istand til, i en transformert vert, å uttrykke humant proapolipoprotein A-I, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en rekombinant DNA-sekvens ifølge krav 1 opererbart bundet til en regulator-DNA-sekvens som regulerer ekspresjonen av den rekombinante DNA-sekvens.

3. Ekspresjonsvektor ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at regulator-DNA-sekvensen
omfatter fag lambda P_L -promoter-området.
- 5 4. Ekspresjonsvektor ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den rekombinante DNA-
sekvens er sammensmeltet nedstrøms fra beta-galactosidase-DNA-
sekvensen og at regulator-DNA-sekvensen omfatter *E. coli* lac-
promoter-området.
- 10 5. Ekspresjonsvektor ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at regulator-DNA-sekvensen
omfatter gjær ARG3-promoteren og transkripsjonsterminator-
områdene.
- 15 6. Ekspresjonsvektor ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den rekombinante DNA-
sekvens som mangler ATG-kodonet, er sammensmeltet nedstrøms
fra DNA-sekvensen av *E. coli* OmpA-protein-signalpeptidet, og
20 at regulator-DNA-sekvensen omfatter lpp-promoteren, lac-promo-
teroperatoren og lac-I-sekvensen av lac-repressoren.
7. Ekspresjonsvektor ifølge krav 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at regulator-DNA-sekvensen
25 omfatter baculovirus polyhedrin-genpromoterområdet
8. Rekombinant plasmid,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er utvalgt fra
pULB9291, pULB9292, pULB9296, pULB9299, pNIV1612 og pNIV1613
30 ifølge figur 3, eksempel 9 og figurene 4, 5, 6c og 7.
9. Cellekultur eller mikroorganisme utvalgt fra *E. coli*,
gjær og baculovirus-infiserte insektceller,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med
35 en ekspresjonsvektor ifølge ethvert av kravene 2 til 7, og
hvilken derved er istand til å uttrykke humant proapolipo-
protein A-I.

10. Cellekultur eller mikroorganisme,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med
et rekombinant plasmid ifølge krav 8 og kan uttrykke humant
proapolipoprotein A-I.

5

11. Fremgangsmåte for fremstilling av humant proapolipo-
protein A-I,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at en cellekultur eller
mikroorganisme ifølge krav 9 eller 10 transformeres med en
ekspressjonsvektor ifølge ethvert av kravene 2-7, etterfulgt av
dyrkning under egnede dyrkningsbetingelser, og gjenvinning av
det således dannede, humane proapolipoprotein A-I.

15

20

25

30

35

179253

10 20 30 40 50 60 70
TCCCCACGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTGGCCGTGCTCTTCCTGACGGGGAGCCAGGCTCGGCA
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
TTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCCAGAGCCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGTACGTGGATGTGCTC
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
AAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCCAGTTTGAAGGCTCCGCCCTGGGAAAACAGCTAAACCTAAAGCTCCTTGACA
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
ACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCT
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
GGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTG
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
GACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAG
D D F Q K K W Q E E M E L Y R Q K V E T L R A E L Q
110 120

FIG. 1A

179253

480 490 500 510 520 530 540 550
AGGGCGCGCGCCAGAAGCTGCACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCSAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCGC
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
CCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCT
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
CTCAAGGAGAACGGCGCGCGCCAGACTGSCCGAGTACCAAGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGG
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
CCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCCGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCT
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
CTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGAGGCGCCCGCGCCGCCCCCTTCCCGGTGCTCAGAATAAACGT
L E E Y T K K L N T Q
240 Stopp

870 878
TTCCAAAGTGGG

FIG. 1B

NcoI sete

5' ← 35-mer → 3' 5' ← 30-mer → 3'

CATG AGA CAT TTC TGG CAG CAG GAC GAA CCT CCA C AA TCT CCT TGG GAT AGA GTT AAG GAC TTG G

3' ← 18-mer → 5' 3' ← 43-mer → 5'

TCT GTA AAG ACC GTC CTC GTC CTT GGA GGT G TT AGA AGA ACC CTA TCT CAA TTC CTG AAC C

Met Arg His Phe Trp Gln Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Leu A(1a)

-6 -3 -1 +1 +3 +6 +9 +12 +14

NH₂-terminalt propeptid

, methionin (aa₋₆ - aa₋₁)

modent apo A-I (aa₁ - aa₁₄)

Spaltningssete
for apo A-I
propeptidase

FIG. 2

179253

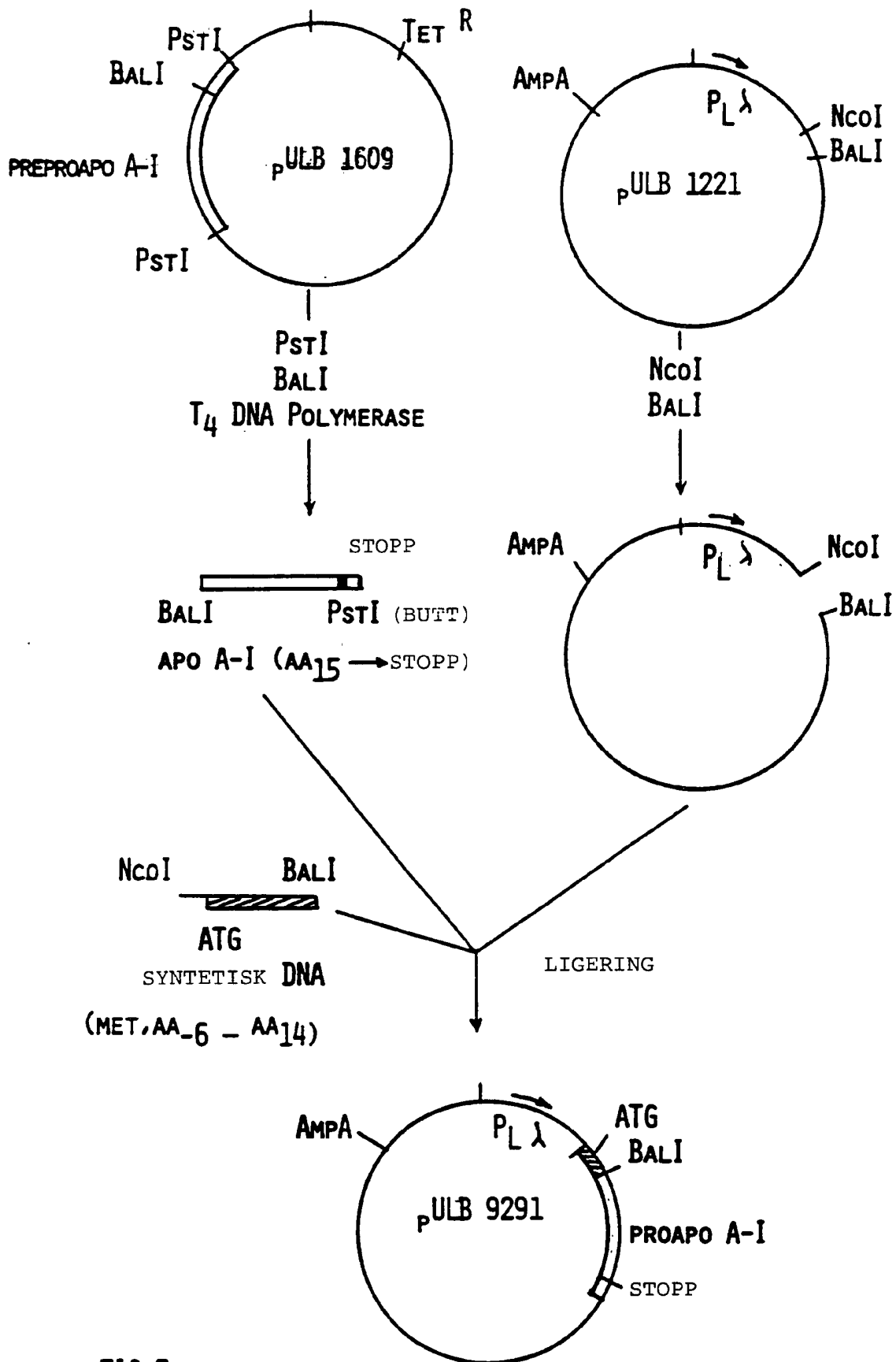


FIG.3

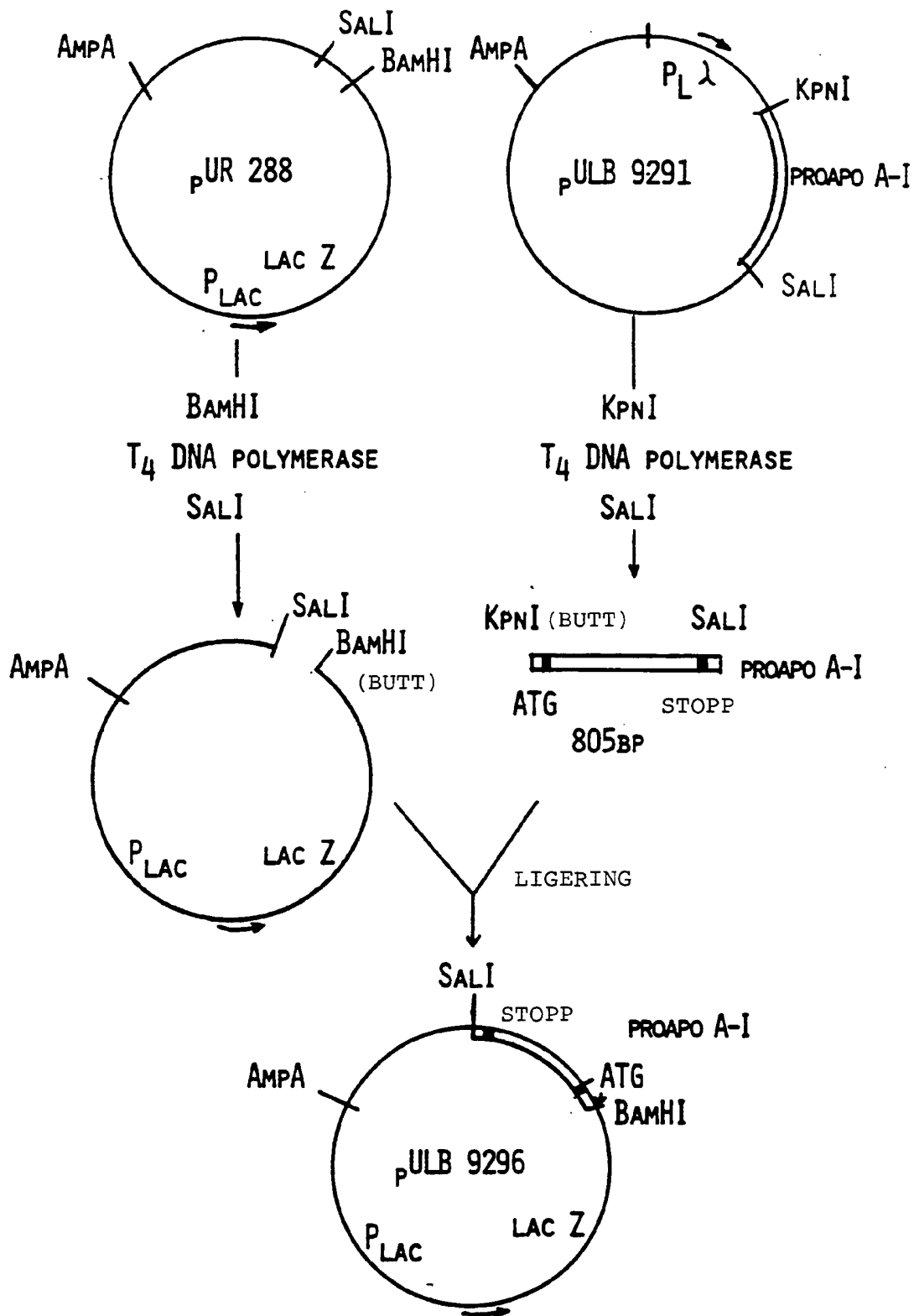


FIG.4

179253

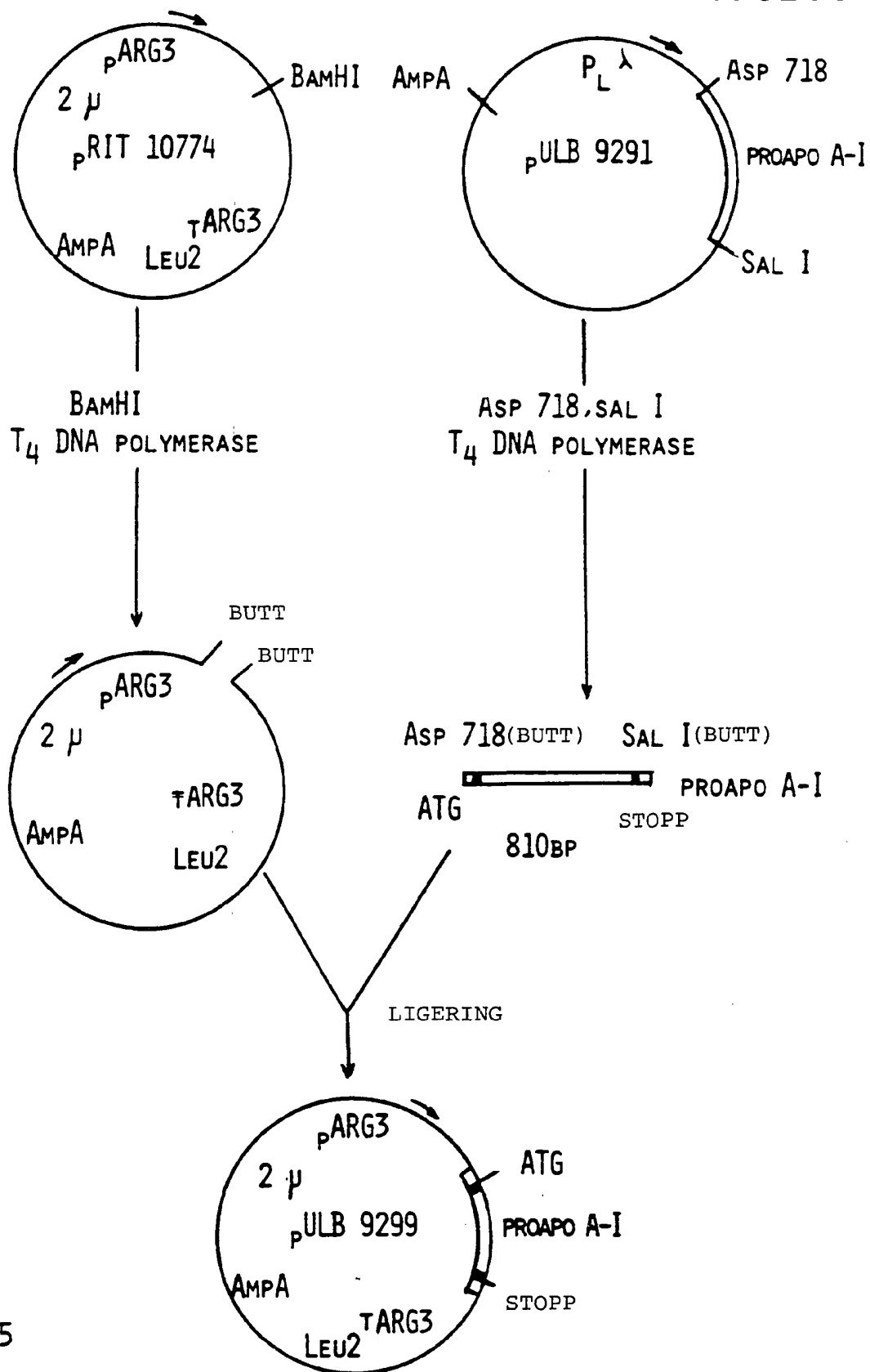


FIG.5

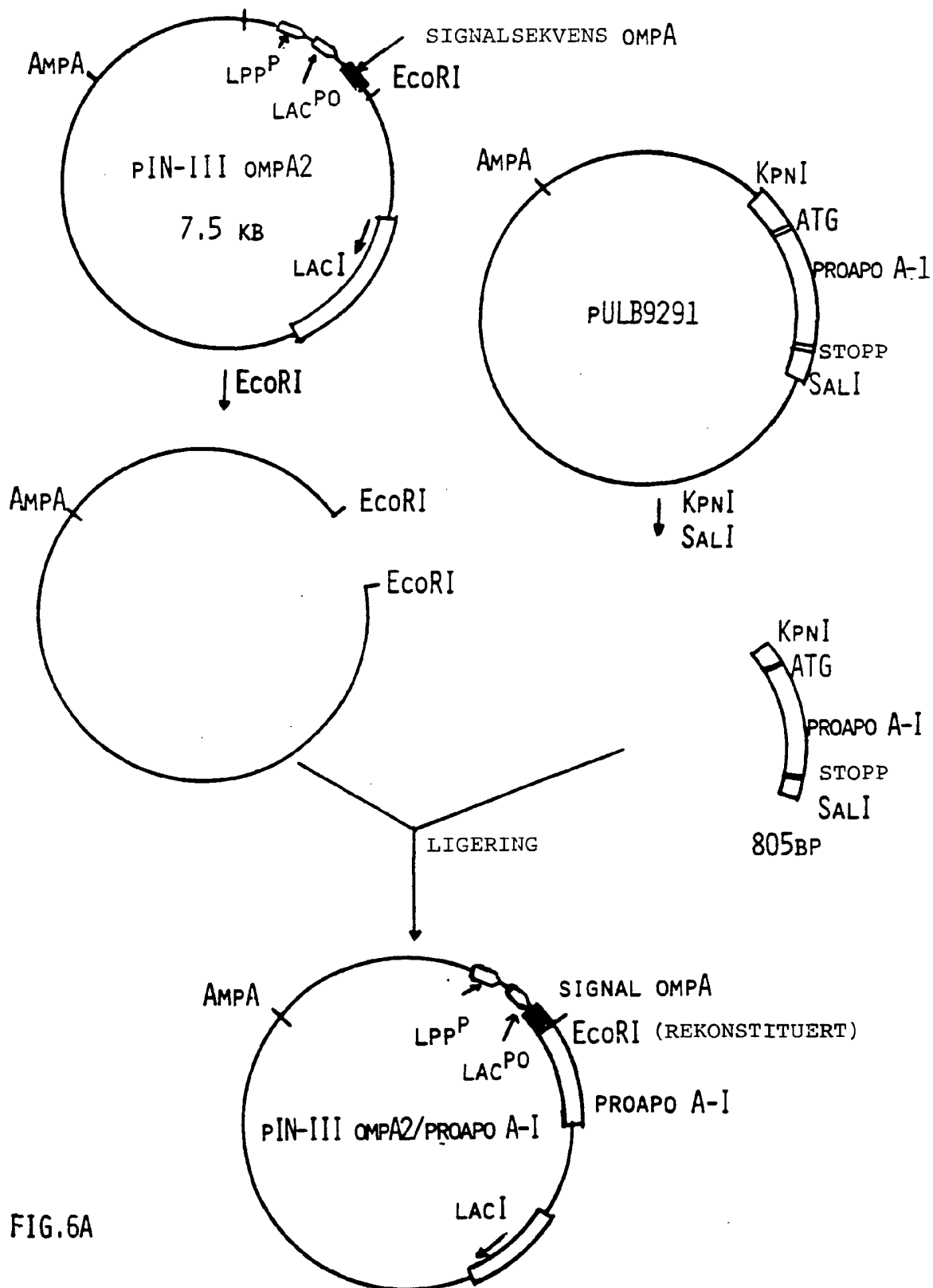
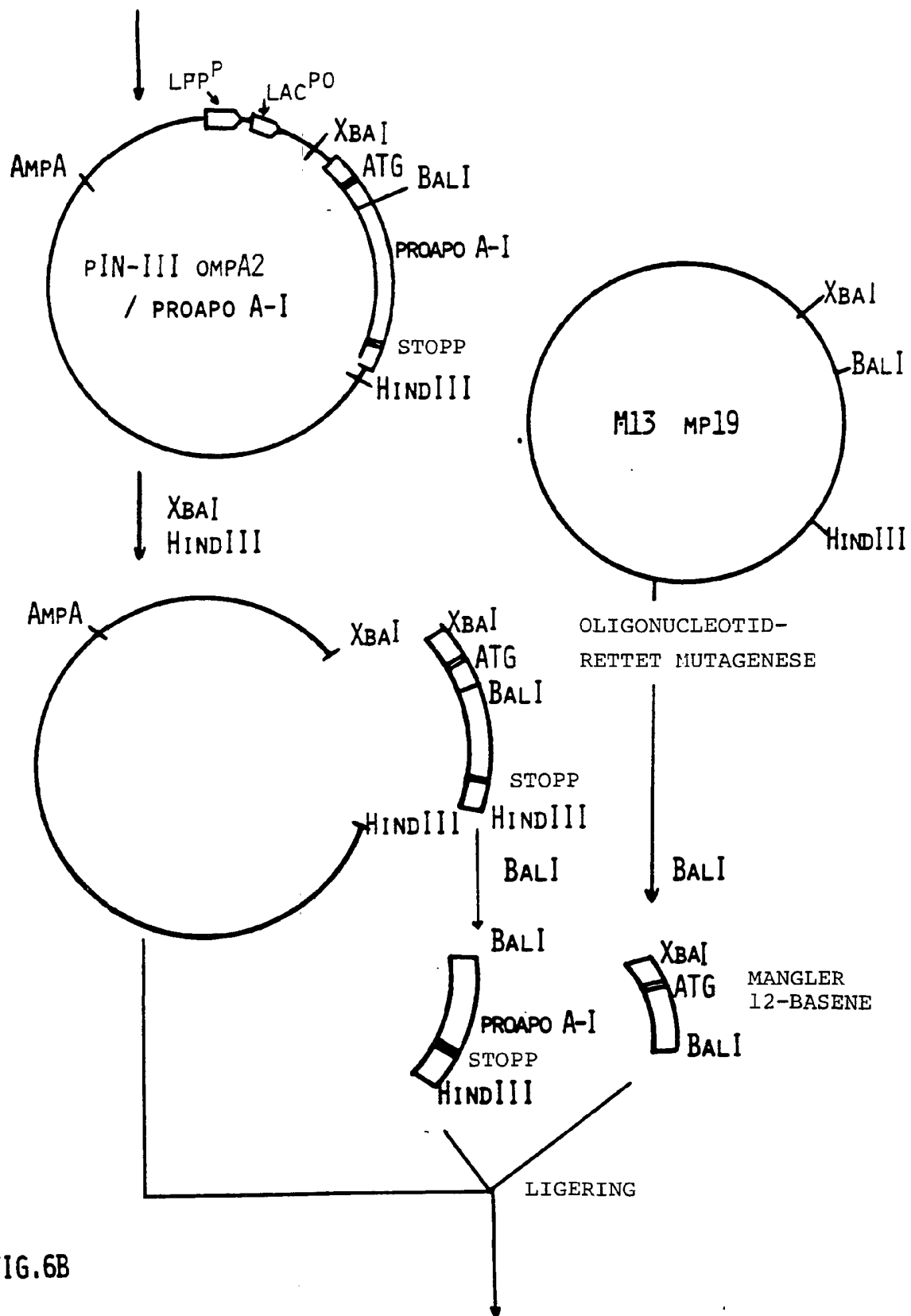


FIG.6A



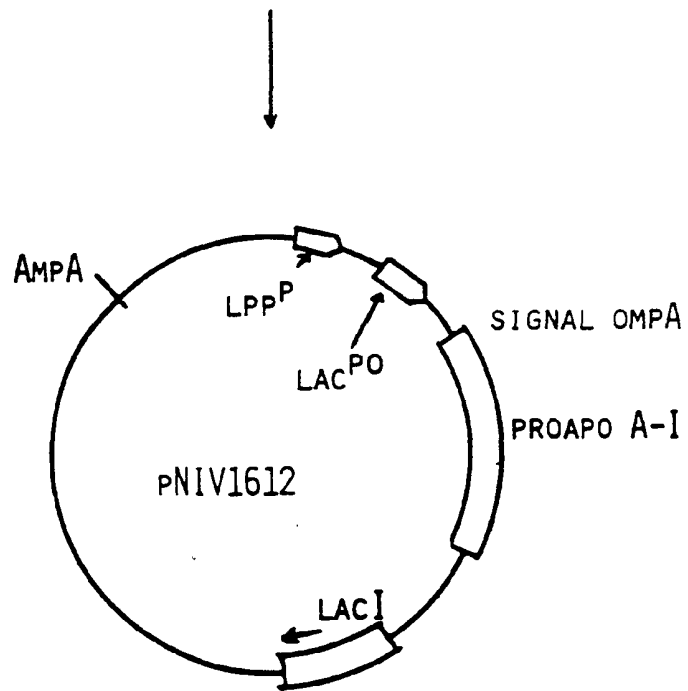


FIG. 6C

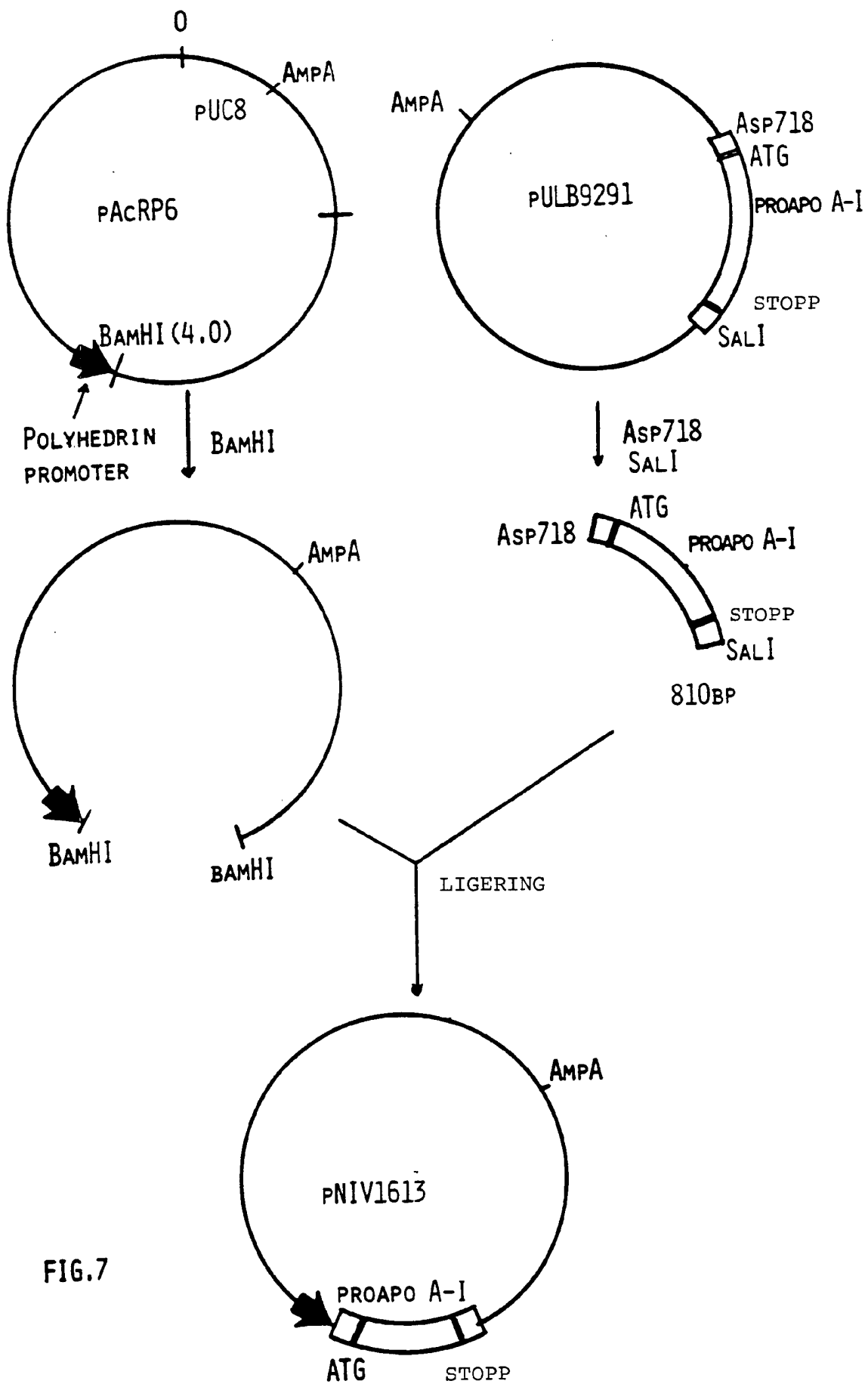


FIG.7

179253

—ATGAGACATTTCTGGCAGCAGGACGAACCTCCACAACTCTCCTTGGGATAGAGTTAAGGACTTGGCCACTGTGT
R H F W Q Q D E P P Q S P W D R V K D L A T V
10 +14

ACGTGGATGTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAACAGCT
Y V D V L K D S G R D Y V S Q F E G S A L G K Q L
20 30 40

AAACCTAAAGCTCCTTGACAACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTCGGCCCTG
N L K L L D N W D S V T S T F S K L R E Q L G P
50 60

TGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAAAGGAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCAAGGATCTGGA
V T Q E F W D N L E K E T E G L R Q E M S K D L E
70 80 90

GGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGAGATGGAGCTCTA
E V K A K V Q P Y L D D F Q K K W Q E E M E L Y
100 110

CCGCCAGAAAGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGGCGCGGCCAGAAAGCTGCACGAGCTGCAAGA
R Q K V E T L R A E L Q E G A R Q K L H E L Q E
120 130

GAAGGTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCCCATGTGGACGCGCTGCGCACGCATCTG
K L S P L G E E M R D R A R A H V D A L R T H L
140 150 160

GCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGCGGCGCC
A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K E N G G A
170 180

AGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGCCCGCGCTC
R L A E Y H A K A T E H L S T L S E K A K P A L
190 200 210

GAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCCCGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCAGCTTCTGAGCGCTCTCGAGGAG
E D L R Q G L L P V L E S F K V S F L S A L E E
220 230

TACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGA.
Y T K K L N T Q
240

Fig. 8