

ÖZET

DOĞAL OLMAYAN AMİNO ASİT REPLİKASYONUNA BAĞIMLI MİKROORGANİZMALAR VE AŞILAR

Doğal olmayan, doğadışı veya doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asitlerin kullanımı yoluyla, sınırlı replikasyon kabiliyetine sahip tam organizma aşılarda sağlandığı, böylece aşı güvenliğinin ve etkinliğinin artırıldığı usuller dahil olmak üzere, aşılarda üretimi için bileşimler ve usuller.

İSTEMLER

1. Doğal olmayan bir amino asidin, replikasyon için gereken bir gen ürününe bölgeye özgü olarak dahil edildiği bir hücre olup, burada bahsedilen hücre, söz konusu doğal olmayan amino asidin mevcudiyetinde replikasyon kabiliyetine sahiptir ve söz konusu doğal olmayan amino asit mevcut olmadığında sınırlı bir replikasyon kabiliyetine sahiptir veya hiç sahip değildir.
2. İstem 1'e uygun hücre olup, burada hücre, bir mycobacterium avium alt türü paratuberculosis (MAP) hücresidir.
3. İstem 2'ye uygun MAP olup, burada birden çok doğal olmayan amino asit, replikasyon için gereken birden çok gen ürününe dahil edilir.
4. İstem 1'e uygun hücre olup, burada hücre, bir *E. coli* hücresidir.
5. İstem 1'e uygun hücre olup, burada hücre, bir bakteri hücresidir.
6. İstem 1 ila 5'ten herhangi birine uygun hücre olup, burada doğal olmayan amino asit, p-karboksi fenilalanin, p-nitrofenilalanin, p-sülfotirosin, p-karboksifenilalanin, bir o-nitrofenilalanin, bir m-nitrofenilalanin, bir p-boronil fenilalanin, bir o-boronilfenilalanin, bir m-boronilfenilalanin, bir p-aminofenilalanin, bir o-aminofenil alanin, bir m-aminofenilalanin, bir p-açilfenilalanin, bir o-açilfenilalanin, bir m-açilfenilalanin, bir p-OMe fenilalanin, bir o-OMe fenilalanin, bir m-OMe fenilalanin, bir p-sülfofenil alanin, bir o-sülfofenilalanin, bir m-sülfofenilalanin, bir 5-nitro His, bir 3-nitro Tyr, bir 2-nitro Tyr, bir nitro sübstitüentli Leu, bir nitro sübstitüentli His, bir nitro sübstitüentli De, bir nitro sübstitüentli Trp, bir 2-nitro Trp, bir 4-nitro Trp, bir 5-nitro Trp, bir 6-nitro Trp, bir 7-nitro Trp, 3-amino tirosin, 2-aminotirosin, O-sülfotirosin, 2-sülfooksifenilalanin, 3-sülfooksioksifenilalanin, o-karboksifenilalanin, m-karboksifenilalanin, bir p-asetil-L-fenil alanin, bir p-proparjil-fenilalanin, O-metil-L-tirosin, bir L-3-(2-naftil)alanin, bir 3-metil-fenilalanin, bir O-4-alil-L-tirosin, bir 4-propil-L-tirosin, bir tri-O-asetil-GlcNAc β -serin, bir L-Dopa, bir florlu fenilalanin, bir izopropil-L-fenilalanin, bir p-azido-L-fenilalanin, bir p-açil-L-fenilalanin, bir p-benzoil-L-fenilalanin, bir L-fosfoserin, bir fosfonoserin, bir fosfonotirosin, bir p-iyodo-fenilalanin, bir p-bromofenilalanin, bir p-amino-L-fenilalanin, bir izopropil-L-fenilalanin ve bir p-proparjiloksi-fenilalaninden oluşan gruptan seçilir.
7. İstem 6'ya uygun hücre olup, burada doğal olmayan amino asit, p-asetil fenilalanindir.

8. İstem 5 ila 7'den herhangi birine uygun hücre olup, burada hücre, bir *E. coli* hücresidir ve replikasyon için gereken gen ürünü, ileS, lspA, ispH, ftsL, ftsI, murE, murD, ftsW, murG, murC, ftsQ, ftsA, ftsZ, secA, map, rpsB, pyrH, frr, uppS, cdsA, fabZ, lpxA, lpxB, dnaE, accA, proS, nusB, dxs, ispA, dnaX, adk, cysS, mrdB, mrdA, holA, leuS, glnS, serS, msbA, kdsB, asnS, fabA, rne, fabD, fabG, tmk, holB, lolC, lolD, lolE, trmU, prsA, topA, fabI, pheS, rplT, infC, nadE, aspS, argS, rplY, nrdA, nrdB, fabB, gltX, ligA, zipA, yfgE, hisS, acpS, rplS, trmD, rpsP, ffh, grpE, plsC, parC, parE, ribB, rpoD, rpsO, yhbZ, rpsI, rplM, def, rpsM, secY, rplO, rpsE, rplR, rplF, rpsN, rplX, rplN, rpsQ, rpsS, rplB, rplW, rplD, rplC, rpsJ, fusA, rpsL, trpS, ftsY, glyS, kdtA, coaD, dut, gmk, dnaA, glmU, engB, murI, rplJ, rplL, rpoB, rpoC, dnaB, groS, groL, efp, rpsF, ppa, valS, dnaC ve dnaT'den oluşan gruptan seçilir.
9. İstem 8'e uygun hücre olup, burada replikasyon için gereken gen ürünü, metiyonin aminopeptidazdır (map).
10. Bir aşı olup, İstem 1 ila 9'dan herhangi birin uygun hücreyi içerir.

TARİFNAME

DOĞAL OLMAYAN AMİNO ASİT REPLİKASYONUNA BAĞIMLI MİKROORGANİZMALAR VE AŞILAR

Açıklama

MEVCUT BULUŞUN ALANI

Bu buluş, hücreler ve hücreleri içeren aşılarda ilgilidir. Bazı düzenlemelerde mevcut buluş, doğal olmayan, doğadışı veya doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asitlerin kullanımı yoluyla, tam organizma aşılarda dahil olmak üzere, sınırlı replikasyon kabiliyetlerine sahip olan veya hiç sahip olmayan bileşimlerle ilgilidir.

MEVCUT BULUŞLA İLGİLİ BİLİNER HUSUSLAR

Şimdiye kadar, nispeten yavaş bir teknik ilerleme gerçekleşmiştir ve Louis Pasteur'ün ölümünün ardından 100 yıldan uzun bir süre geçtiği halde, "III" (Isolation, Inactivation, Injection (İzolasyon, İnaktivasyon, Enjeksiyon)) protokolü geçerliliğini sürdürmektedir.

Bununla birlikte, moleküler biyoloji ve rekombinant protein teknolojisinin ortaya çıkmasıyla, insanlar alt birim aşılarda ve genetik olarak tasarlanmış tam organizma benzeri aşılarda geliştirmeye başlamışlardır. Daha yakın zamanlarda, immünolojideki gelişmeler, Toll Benzeri Reseptör (TLR) ligandları dahil olmak üzere, çeşitli immünopotansiyatör sınıflarının kullanımını sağlamıştır. Genel olarak daha yeni nesil aşılarda ve bunların adjuvanları kimyasal ve genetik açıdan giderek daha iyi tanımlanmış hale gelmektedir.

Virüsler, bakteriler, protozoanlar, mantarlar gibi patojenlere karşı terapötiklerin ve özellikle aşılarda geliştirilmesine devam edilmektedir. Bu tür araştırmaların, insanlar dahil olmak üzere, hayvanlarda hastalığın yayılmasının önlenmesinde çok değerli olduğu kanıtlanmıştır. Gerçekten de modern tıpta, aşılama da içeren immünoterapi, çiçek hastalığını ortadan kaldırmış ve çocuk felci, tetanos, tüberküloz, su çiçeği ve kızamık gibi hastalıkları hemen hemen yok etmiştir.

Genel olarak, ideal aşılarda uzun bir raf ömrüne sahiptir, önceden seçilmiş patojene ve tüm fenotipik varyantlarına karşı uzun süreli immünite indüklemeye kabiliyetine sahiptir, aşının hedeflediği hastalığa yol açma kabiliyetine sahip değildir, terapötik ve profilaktik açıdan etkindir, ekonomik standart metodolojiler kullanılarak kolayca hazırlanır ve sahada kolayca uygulanabilir.

Ticari olarak temin edilebilen aşıların başlıca dört sınıfı mevcuttur. Bunlar, canlı olmayan tam organizma aşılarını, zayıflatılmış canlı aşıları, vektör aşılarını ve alt birim aşıları içerir. Proteinler gibi canlı olmayan malzemelerle aşılama, genellikle bir antikor tepkisine veya CD4+ yardımcı T hücre tepkisine yol açarken, canlı malzemelerle (örneğin, enfeksiyöz virüsler) aşılama genellikle bir CD8+ sitotoksik T-lenfosit (CTL) tepkisine yol açar. Bir CTL tepkisi, enfeksiyöz virüsler ve bakteriler gibi patojenlere karşı koruma için çok önemlidir. Bu, pratik bir sorun oluşturur, çünkü bir CTL tepkisi elde etmenin tek kesin yolu, kendileri patojenik olan canlı maddeler kullanmaktır. Bu sorun, genellikle zayıflatılmış virüs ve bakteri suşları kullanılarak ya da aşılama için kullanılabilen tam hücreleri öldürerek çözülür. Bu stratejiler işe yaramıştır, ancak zayıflatılmış suşların kullanılması, her zaman, zayıflatılmış maddenin konakçının içinde genetik olarak tekrar birleşmesi ve bir virulan suşa dönüşme riskini taşır. Bu nedenle, spesifik bir şekilde, proteinler gibi canlı olmayan malzemelerle aşılama yoluyla CD8+ CTL tepkisine yol açabilen terapötiklere ve usullere ihtiyaç duyulmaktadır.

Alt birim aşılar, bu sorunlardan bazılarının ele alınması için bir araç sağlamıştır. Bu tür aşılar genellikle ilgilenilen bir patojenden türetilmiş bir hücre altı bileşen içerir. Bir alt birim bileşeni, patojenin tanımlanmış bir hücre altı fraksiyonundan üretilir; saflaştırılmış bir protein, nükleik asit veya bir polisakarit olabilir. Bu elemanların tümü, ilgilenilen patojene karşı bir immün tepkiyi stimüle etme kabiliyetine sahip bir antijenik determinanta sahiptir. Genel olarak, alt birim aşının hücre altı bileşeni, parçalanmış patojenin bir terkininin saflaştırılmasıyla elde edilir veya iyi bilinen prosedürler kullanılarak sentezlenir.

Bununla birlikte, alt birim aşılarla ilgili bazı sınırlamalar mevcuttur. İlk olarak, bu tip bir aşının üretiminin bir koşulu, antijenik determinantı/determinantları karakterize etmek ve tanımlamak gerekmesidir. Bu, özellikle oldukça değişken antijenik determinantlara karşı bunların kullanımında sınırlamalar getirir. İkinci olarak, alt birim aşılar genellikle sitotoksik T hücre tepkilerini stimüle etmekte etkisizdir. Üçüncü olarak, alt birim aşılarla kazandırılan immünite çoğu zaman kısa ömürlüdür ve dolayısıyla devamlı destek enjeksiyonları gerektirir. Çok az sayıda rekombinant olarak eksprese edilen alt birim aşının, aşılanmış hayvanlarda (insanlar dahil) güçlü ve uzun süreli immünite indüklediği gösterilmiştir. Önemli bir istisna, insanlarda kullanılan rekombinant yüzey antijeni Hepatit B aşısıdır. Bu tip aşıların kullanımıyla ilişkili sorunlardan birinin, güçlü humoral immünite ve güçlü hücre aracılı immünitenin indükleneyeceği şekilde, antijenlerin immün sistemine

doğru bir biçimde sunulmasıyla ilgili olduğu görülmektedir. Özel olarak, mevcut rekombinant (alt birim) aşılardan, aşılanmış hayvanların, bir patojenin neden olduğu doğal enfeksiyonlara maruz kaldıklarında çok hızlı tepki verecekleri şekilde güçlü 'bellek' tepkileri meydana getirmedikleri görülmektedir.

- 5 Sadece örnek olarak, sığır viral ishal virüsü (BVDV) gibi pestivirüslerden hazırlanan mevcut alt birim aşılardaki eksiklikler kapsamlı bir şekilde rapor edilmiştir. Bu çalışmalar, aşılarda büyük miktarlarda rekombinant protein kullanılsa bile, yetersiz koruma oranlarının görüldüğünü ortaya koymuştur; bu da, aşılardan, canlı BVDV izolatlarıyla bağışıklamaya karşı korumada (homolog koruma veya heterolog koruma) başarısız olduğunu gösterir.
- 10 Etkin bir aşının henüz geliştirilmediği birçok enfeksiyöz hastalık mevcuttur ve halen kullanılabilen aşılardan birçoğu, hastalığa karşı sadece kısmi koruma sağlar. Ayrıca, aşı alanında boşluklar mevcuttur. Canlı aşılardan, diğer aşı türlerine kıyasla daha güçlü, daha geniş ve daha kalıcı immünite meydana getirir. İmmün baskılama uygulanmış bireylerde bile hastalığa yol açamayacak daha güvenli bir canlı aşı aracına ihtiyaç duyulmaktadır.
- 15 Ayrıca, sadece antikor bazlı immünite değil, hücre aracılı immünite de indükleyen aşılar da ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, doğrudan patojenlerin çoğunun giriş yaptığı vücudun mukoza yüzeylerinde koruyucu immün tepkiler indüklenmesi de gerekmektedir. Bu nedenle, gelişmiş aşılar da ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut buluş, mevcut önceki tekniğe kıyasla bu dezavantajlardan en azından bazılarını gideren gelişmiş bir terapötik aşı sağlamaya çalışmaktadır.
- 20

WO 01/00234'te, aşılardan oluşturmada kullanılabilen zayıflatılmış hücreleri üretme usulleri açıklanmaktadır. Bahsedilen hücreler, çoğalmak için baskılayıcı tRNA'ya ihtiyaç duyar, ancak çoğalmak için doğal olmayan bir amino asidin mevcudiyetine ihtiyaç duymaz.

MEVCUT BULUŞUN ÖZETİ

- 25 Mevcut açıklamada, kimyasal olarak düzenlenmiş replikasyona bağımlı tam organizmalar sağlanmaktadır. Bazı düzenlemelerde mevcut açıklama, çoğalma kabiliyetinin doğal olmayan bir amino asidin mevcudiyetine bağımlı olduğu bir modifikasyon içeren kimyasal olarak düzenlenmiş bir tam organizma sağlamaktadır. Bazı düzenlemelerde mevcut açıklama, organizmanın çoğalma kabiliyetinin, doğal olmayan bir amino asidin mevcudiyetinde kültürlenmesine bağlı olduğu bir veya daha çok modifikasyon içeren bir tam organizma sağlar. Bazı düzenlemelerde mevcut açıklama, organizmanın çoğalma kabiliyetinin, bir veya daha çok sayıda doğal olmayan amino asidin mevcudiyetinde
- 30

kültürlenmesine bağlı olduğu bir veya daha çok modifikasyon içeren bir tam organizma sağlar. Bazı düzenlemelerde mevcut açıklama, organizmanın çoğalma kabiliyetinin, bir veya daha çok sayıda doğal olmayan amino asidin mevcudiyetinde kültürlenmesine bağlı olduğu iki veya daha çok modifikasyon içeren bir tam organizma sağlar. Mevcut

5 açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam organizma, azaltılmış bir aşı (bölgeye özgü olarak dahil edilmiş bir veya daha çok sayıda doğal olmayan amino asitle düzenlenmiş bir aşı) olup, burada immünize edici maddenin replikasyonu veya ekspresyonu, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir.

Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam organizmanın replikasyonu veya

10 ekspresyonu, tek bir genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir. Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam organizmanın replikasyonu veya ekspresyonu, bir veya daha çok genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir. Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam

15 organizmanın replikasyonu veya ekspresyonu, iki adet genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir. Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam organizmanın replikasyonu veya ekspresyonu, üç adet genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir. Mevcut açıklamanın bazı

20 düzenlemelerinde, tam organizmanın replikasyonu veya ekspresyonu, dört adet genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir. Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam organizmanın replikasyonu veya ekspresyonu, beş adet genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir.

25 Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, tam organizmanın replikasyonu veya ekspresyonu, dört veya daha çok genetik modifikasyon vasıtasıyla, doğal olmayan bir amino asidin mevcut olması veya mevcut olmaması yoluyla düzenlenir.

Mevcut buluş, doğal olmayan bir amino asidin, replikasyon için gereken bir gen ürününe bölgeye özgü olarak dahil edildiği bir hücre sağlamakta olup, burada bahsedilen hücre, söz

30 konusu doğal olmayan amino asidin mevcudiyetinde replikasyon kabiliyetine sahiptir ve söz konusu doğal olmayan amino asit mevcut olmadığında sınırlı bir replikasyon kabiliyetine sahiptir veya hiç sahip değildir. Mevcut buluş ayrıca, bu tür bir hücre içeren bir aşı sağlamaktadır. Mevcut buluş ayrıca bu tür bir hücre, farmasötik açıdan geçerli bir

taşıyıcı ve isteğe bağlı olarak bir veya daha çok başka biyolojik açıdan aktif madde içeren bir aşı formülasyonu sağlamaktadır. Hücre, bir tam organizma için bir örnektir.

- Organizmalara, antijenlere, proteinlere veya öz proteinlere karşı seçici olarak bir immün tepki indükleme ya da yabancı antijenlerin spesifik epitoplarının immünojenikliğini artırma kabiliyeti, çeşitli hastalık evreleri (sınırlayıcı olmamak üzere, kanser ve protein katlanma hastalıkları dahil) ve enfeksiyöz hastalıklar (örneğin, bakteri veya virüs enfeksiyonları) için aşılarda üretiminde önemlidir. Mevcut buluş, tam organizma aşılamlarında kullanılacak replikasyona bağımlı ve/veya eksik replikasyonlu immünojenleri üretmek için, doğal olmayan amino asitlerin organizmalara dahil edilmesinden yararlanır. Pasif immünizasyonda kullanılacak antikorları üretmek için doğal olmayan amino asitlerin organizmalara dahil edilmesi de açıklanmaktadır. Mevcut açıklama ayrıca, aşılamlarda kullanılacak immünojenleri üretmek için doğal olmayan amino asitlerin proteinlere, antijenlere ve/veya polipeptitlere dahil edilmesinden yararlanır. Bu buluşta, doğal olmayan amino asitlerin eklendiği immünojenler, aşılacak/immünize edilecek deneğin içindeki hedef parçalara (örneğin, hastalıkla ilgili parçalar) tekabül eder ya da deneğin içinde olması mümkün olan hedef parçalara (örneğin, hastalıkla ilgili parçalar) tekabül eder. Doğal olmayan amino asidi içeren immünojenin bir deneğe verildiği düzenlemelerde, doğal olmayan amino asidin mevcudiyeti, hedef (örneğin, hastalıkla ilgili) parçaya karşı çapraz reaktif immünojene karşı immünojenik bir tepkiye yol açar.
- Deneğin içinde olan veya deneğin içinde olması mümkün olan bir hedef parçaya (örneğin bir polipeptit, bir karbonhidrat veya bu ikisinin bir kombinasyonu) karşı bir denekte immünolojik bir tepki, örneğin B hücresi aracılı bir tepki ve/veya T hücresi aracılı bir tepki üretmeye veya bu tepkiyi arttırmaya yönelik usuller sağlanmaktadır. Bu usuller, genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan amino aside bağımlı bir organizmanın sağlanmasını ve bu organizmanın deneğe verilmesini içerir. Usuller ayrıca, bir veya daha çok doğadışı amino asit içeren, genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan bir immünojenin sağlanmasını ve doğal olmayan immünojenin deneğe verilmesini içerir. Denek (örneğin, bir insan, maymun, fare, sıçan, çiftlik hayvanı, domuz, sığır, tavuk, kafes kuşu, büyük kafes kuşu, ev hayvanı, köpek, kedi, sürüngen ve/veya bir amfibik hayvan), doğadışı immünojene karşı bir veya daha çok antikor üretmekte olup, bu antikorlar, hedef parçaya karşı çapraz reaktiftir (dolayısıyla, hedefe karşı immünojenik tepki üretir veya bu tepkiyi artırır).

Belirli düzenlemelerde, genetik olarak modifiye edilmiş tam organizma, karşısında deneğin immünize edilmesi arzu edilen herhangi bir tam organizma, örneğin bir bakteri, bir virüs, bir mantar, bir Mikoplazma, bir protozoan, bir helmint veya bir prion olabilir. Bir tam organizma aşısı, isteğe bağlı olarak aşağıdakilerden birini veya daha fazlasını içerebilir: bir

5 bakteri antijeni, bir virüs antijeni, bir mantar antijeni, bir mikoplazma antijeni, bir protozoa antijeni, bir helmint antijeni, bir prion antijeni, bir HIV antijeni, HIVgpl20, HIV gp41, HIV gag, HIV pol, HIV env, HTV tat, HIV nef, HIV rev, bir kalısivirüs kapsid antijeni, bir hepatit B nüve antijeni, bir hepatit B yüzey antijeni, hepatit delta ajanı, bir herpes simpleks virüs glikoproteini, bir varisella zoster virüs glikoproteini, bir grip virüsü hemaglütinin, bir

10 grip virüsü nöraminidaz, bir grip virüsü nükleoprotein, bir HPV kapsid protein, bir parainfluenza virüs hemaglütinin/nöraminidaz, bir poliovirüs kapsid polipeptid, bir Hep A antijeni, bir vaksinia virüs polipeptid, bir kuduz virüs glikoproteini G, B. burgdorferi OspA, H. influenzae tip b dış membran proteini, Mycobacterium lipoarabinomannan, Mycobacterium mAPG, S. pyogenes M proteini, S. pneumoniae kapsüler polisakarit, Y.

15 pestis Fl, Y. pestis V antijeni, P. falciparum circumsporozoite (PfCSP), P. falciparum sporozoit yüzey proteini 2 (PfSSP2), karaciğer evre antijeni 1'in (PfLSA1 c-term) P. falciparum karboksil terminusu, P. falciparum eksport protein 1 (PfExp-1), Pfs 48/45, Pfs 28, Pfs 25 veya Pfs 230.

Genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan amino asit replikasyonuna bağımlı

20 organizma, aşağıdakilerden biri veya daha fazlası olabilir: bir bakteri, bir virüs, bir mantar, bir Mikoplazma, bir protozoan, bir helmint, bir prion, bir Actinomyces, bir Bacillus, bir Bacteroides, bir Bordetella, bir Bartonella, bir Borrelia, bir Brucella, bir Campylobacter, bir Capnocytophaga, bir Chlamydia, bir Clostridium, bir Corynebacterium, bir Coxiella, bir Dermatophilus, bir Enterococcus, bir Ehrlichia, bir Escherichia, bir Francisella, bir

25 Fusobacterium, bir Haemobartonella, bir Haemophilus, bir Helikobakter, bir Klebsiella, bir L form bakteri, bir Leptospira, bir Listeria, bir Mycobacterium, bir Mikoplazma, bir Neisseria, bir Neorickettsia, bir Nocardia, bir Pasteurella, bir Peptococcus, bir Peptostreptococcus, bir Pneumococcus, bir Proteus, bir Pseudomonas, bir Rickettsia, bir Rochalimaea, bir Salmonella, bir Shigella, bir Staphylococcus, bir Streptococcus, bir

30 Treponema, bir Yersinia, bir adenovirüs, bir alfavirüs, bir kalısivirüs, bir koronavirüs, bir CMV, bir köpek gençlik hastalığı virüsü, bir Ebola virüsü, bir enterovirüs, bir EBV, bir flavivirüs, bir Hep C, bir hepadnavirüs, bir Hep B, bir hepatitis delta ajanı, bir Hep E veya F virüsü, bir GBV-C, bir herpesvirüs, bir herpes simpleks virüsü, bir varicella zoster

- virüsü, bir bağışıklık eksikliği virüsü, bir HIV, bir enfeksiyöz peritonitis virüsü, bir grip virüsü, bir grip A virüsü, bir lösemi virüsü, bir Marburg virüsü, bir ortomiksovirüs, bir papilloma virüsü, bir HPV, bir parainfluenza virüsü, bir paramiksovirüs, bir RSV, bir parvovirüs, bir pestivirüs, bir pikorna virüsü, bir poliovirüs, bir poks virüsü, bir vaksinia virüsü, bir kuduz virüsü, bir reovirüs, bir retrovirüs, bir rotavirüs, bir Absidia, bir Acremonium, bir Alternaria, bir Aspergillus, bir Basidiobolus, bir Bipolaris, bir Blastomyces, bir Candida, bir Coccidioides, bir Conidiobolus, bir Cryptococcus, bir Curvalaria, bir Epidermophyton, bir Exophiala, bir Geotrichum, bir Histoplasma, bir Madurella, bir Malassezia, bir Microsporum, bir Moniliella, bir Mortierella, bir Mucor, bir Paecilomyces, bir Penicillium, bir Phialemonium, bir Phialophora, bir Prototheca, bir Pseudallescheria, bir Pseudomicrodochium, bir Pythium, bir Rhinosporidium, bir Rhizopus, bir Scolecobasidium, bir Sporothrix, bir Stemphylium, bir Trichophyton, bir Trichosporon, bir Xylohypha, bir Babesia, bir Balantidium, bir Besnoitia, bir Cryptosporidium, bir Eimeria, bir Encephalitozoon, bir Entamoeba, bir Giardia, bir Hammondia, bir Hepatozoon, bir Isospora, bir Leishmania, bir Microsporidia, bir Neospora, bir Nosema, bir Pentatrichomonas, bir Plasmodium, bir P. falciparum, bir Pneumocystis, bir Sarcocystis, bir Schistosoma, bir Theileria, bir Toxoplasma, bir Trypanosoma, bir Acanthocheilonema, bir Aelurostrongylus, bir Ancylostoma, bir Angiostrongylus, bir Ascaris, bir Brugia, bir Bunostomum, bir Capillaria, bir Chabertia, bir Cooperia, bir Crenosoma, bir Dictyocaulus, bir Dioctophyme, bir Dipetalonema, bir Diphyllbothrium, bir Diplydium, bir Dirofilaria, bir Dracunculus, an Enterobius, bir Filaroides, bir Haemonchus, bir Lagochilascaris, bir Loa polypeptide, bir Mansonella, bir Muellerius, bir Nanophyetus, bir Necator, bir Nematodirus, bir Oesophagostomum, bir Onchocerca, bir Opisthorchis, bir Ostertagia, bir Parafilaria, bir Paragonimus, bir Parascaris, bir Physaloptera, bir Protostrongylus, bir Setaria, bir Spirocerca, bir Spirometra, bir Stephanofilaria, bir Strongyloides, bir Strongylus, bir Thelazia, bir Toxascaris, bir Toxocara, bir Trichinella, bir Trichostrongylus, bir Trichuris, bir Uncinaria veya bir Wuchereria.

- Ayrıca, örneğin bir denekte B hücresi aracılı bir tepki ve/veya T hücresi aracılı bir tepki üretme yoluyla, denekte bir hastalık evresini profilaktik veya terapötik olarak tedavi etme usulleri açıklanmaktadır. Çeşitli düzenlemelerde, hastalık evresi bir bakteri enfeksiyonu, bir virüs enfeksiyonu, bir mantar enfeksiyonu, bir Mikoplazma enfeksiyonu, bir prion enfeksiyonu, bir protozoa protozoan veya bir helmint enfeksiyonu olabilir, ancak bunlarla

sınırlı değildir. Bu özelliğe uygun usullerin bir kümesi, genetiği modifiye edilmiş bir tam organizmanın bir deneğe, örneğin bir insana, bir maymuna, bir fareye, bir sıçana, bir domuza, bir sığıra, bir tavuğa, bir kafes kuşuna, bir büyük kafes kuşuna, bir sürüngene veya bir amfibik hayvana verilmesini içerir. Böylece genetiği modifiye edilmiş tam

5 organizma, deneğin içinde antikorların üretimini stimüle eder. Usullerin ikinci bir kümesi, bir antikor tepkisinin üretilmesini içeren bir veya daha çok hastalık, rahatsızlık veya organizmaya karşı bir antikor üretme ve sonradan bir deneğe verilen antikoru veya antikorları izole etme yoluyla bir denekte bir hastalık evresini profilaktik veya terapötik olarak tedavi etmeyi kapsar.

10 En ileri protein mühendisliği teknolojisi olan Ambrx' teknolojisiyle, doğal olmayan amino asitlerin bölgeye özgü olarak dahil edilmesi, aşı geliştirmede büyük bir imkan sağlamaktadır. Antijenleri immünopotansiyatörlerle birleştirme yoluyla, kimyasal olarak iyi tanımlanmış nanoyapılar oluşturabilir. Alt birim aşı geliştirmek için kullanılabilen bu nanoyapılar, antijen bilgilerine ve immünopotansiyalizasyon fonksiyonelliğine sahiptir.

15 İlave olarak, Ambrx teknolojisi, doğal olmayan amino asitlerin, proteine doğal olmayan fonksiyonel gruplar eklemek için araçlar yerine, patojenik organizmalarda zorunlu genlerin ekspresyonu için anahtarlar olarak görev yapacağı zayıflatılmış tam organizma benzeri yeni aşılar oluşturmak için de kullanılabilir. Ortaya çıkan organizmalar, vahşi tip organizmaya benzeyebilir, ancak sadece, doğada mevcut olmayan Ambrx doğal olmayan

20 amino asitlerinin mevcudiyetinde replikasyon kabiliyetine sahip olacaktır.

Alt Birim Aşı:

Alt birim aşılarda düşük etkinliğinden dolayı, bir immün tepki stimüle etmek için adjuvanlar gereklidir. Geleneksel olarak, adjuvanlar, antijenlerle karışımlar halinde formüle edilir. Antijenler, uygulamadan sonra, dendritik hücre (DC) tarafından alınır ve T

25 hücrelerine verilir. Adjuvanlar, sitokin salımı, gelişmiş antijen sunumu ve dendritik hücre olgunlaşması için dendritik hücreleri stimüle eder. Bu iki bağımsız süreç (antijen sunumu ve immünoaktivasyon) aynı DC'de birleştiklerinde, etkin bir antijene özgü immün tepki elde edilir. Nispeten büyük bir dozaj gereklidir. Bununla birlikte, büyük adjuvan dozajı, istenmeyen bir yan etki olan antijenden bağımsız immün aktivasyona neden olur. Bu

30 nedenle, doğal olarak bu yaklaşım ideal değildir ve aşı üzerinde düşük bir etkinliğe ve yüksek toksisiteye yol açar.

Yeni bulunan birçok adjuvan, alum gibi geleneksel adjuvanların aksine, moleküler olarak iyi tanımlanmıştır. Ambrx teknolojisi, benzersiz bölgeye özgü, doğal olmayan amino asit ilavesi ve bölgeye özgü konjugasyon imkanlarıyla, bize yüksek güç ve düşük toksisiteye sahip gelecek nesil aşıları oluşturmak için gerekli araçları sağlamaktadır. Ambrx alt birim

5 aşılarının temel özelliği, antijen ve immünopotansiyatörün, bir adet kimyasal olarak iyi tanımlanmış nanoyapı içinde kombinasyonu olacaktır. İki süreç (antijen sunumu ve immün aktivasyon), bir DC tarafından alındığında, aynı DC'de birleşirler.

Doğal olmayan amino asitlerin bölgeye özgü olarak dahil edilmesi, mononitrofenil, dinitrofenil gibi oldukça immünojenik parçalar içeren doğal olmayan amino asitleri,

10 doğrudan protein antijenlerine dahil etmemize imkan veren bir teknolojidir. Yakın zamanlarda, Toll Benzeri Reseptör 7 (TLR7) ligand imidazokuinolin gibi küçük molekülü immünopotansiyatörler kullanılabilir hale gelmektedir. Yan zincirleri olarak bu küçük molekülü immünopotansiyatörlere sahip doğal olmayan amino asitlerin tasarlanması ve bunların bir protein antijenine dahil edilmesi, uygulanabilir bir işlemdir.

15 Ambrx'in bölgeye özgü konjugasyon teknolojisi, daha da fazla esneklik sağlamaktadır. Sadece söz konusu küçük molekülleri değil, başka çeşitli immünopotansiyatörleri de (örneğin, lipid, lipopeptid, polisakarit, DNA, RNA ve nanopartiküller) protein antijenlerinin yüzeyine konjüge etmemize imkan verir.

Tek zincirli DNA'nın protein yüzeylerine bölgeye özgü konjugasyonu, aşı tasarımı da bir

20 başka serbestlik boyutunu oluşturur. Metilatsız olmayan CpG içeren DNA'lar, ilginç bir şekilde hücre yüzeyinin üstünde değil, hücrelerin içinde mevcut olan TLR-9 ligandlarıdır. Antijene eşlenik DNA, sadece immünopotansiyatör olarak değil, aynı zamanda diziye özgü hibridizasyon işlemleri yoluyla bir ila üç boyut ve birden çok antijen değerlikli nanoyapı oluşturmak için bir yapı bloğu olarak da görev yapabilir. Bu genel şema, antijenleri, APC

25 hedefleme reaktifleri ve diğer TLR ligandları gibi başka elemanlarla birleştirmek için de kullanılabilir. APC hedeflemesinin (antikor veya peptit) aşı etkinliğini arttırabildiği ve çapraz sunumu destekleyebildiği gösterilmiştir. İki farklı TLR ligandının kombinasyonu, daha büyük sinerjistik etkiye sahip olacaktır.

Ambrx bölgeye özgü konjugasyonu, aşılarda kesin tasarım ve optimizasyonuna imkan

30 verir. Ambrx teknolojisi olmadan, bölgeye özgü olmayan bir konjugasyon işlemi, protein antijenindeki modifikasyon bölgeleri üzerinde sınırlı denetime sahiptir veya hiç sahip değildir. Spesifik olmayan konjugasyon, T ve B epitoplarını değiştirebilir. Antijenin, antikor tanıma için kritik olan 3D konformasyonunu da modifiye edebilir. Ayrıca, bazı

modifikasyonlar, antijen işlemeyi engelleyebilir. Bu faktörlerin tümü, spesifik olmayan şekilde eşlenik aşığı daha az etkin hale getirir.

Tam organizma aşısı:

Aşı bilimi, tam organizma aşlarıyla başlamıştır ve bugün hâlâ bunlar, zayıflatılmış canlı veya öldürülmüş olarak sınıflandırılan en başarılı aşılardır. Tam organizma aşılarının esası, konakçıda çok sınırlı replikasyon imkanlarına sahip olarak veya hiç sahip olmadan koruyucu bir immün tepkiye yol açmak için, aşının, patojenik organizmanın kendisine mümkün olduğu kadar yakın olmasının gerekmesidir.

Bu durumda, replikasyonun sınırlı olması veya hiç olmaması arzu edilirse, daha iyi ve daha güvenli aşılar oluşturmak üzere, mikroorganizmaların yaşam döngüsünü denetlemek için küçük moleküller kullanmak mümkün müdür? Ambrx teknolojisi kullanıldığında, yanıt artık olumludur. Doğal olmayan amino asidin, bir bakteri, virüs, hatta parazit içinde, mikroorganizmanın replikasyonu için zorunlu olan bir gene dahil edilmesi halinde, bu organizmaların yaşamı, doğal olmayan amino asidin mevcudiyetine bağımlı olacaktır.

Dahil edilen doğal olmayan amino asidin doğada mevcut olmaması nedeniyle, sonuç, konakçının içinde çoğalma kabiliyetine sahip olmayan, hemen hemen tam virüs ve hücre bileşenlerine ve yapılarına sahip, virüsler ve bakteriler gibi organizmalar olacaktır. İlave olarak, Ambrx teknolojisiyle modifiye edilmiş virüs veya bakteri, sadece aşının kendisi olarak değil, aynı zamanda gen ve antijen iletimi için vektörler olarak da görev yapabilir.

Ambrx alt birim aşı platformu, hem enfeksiyöz hastalık, hem terapötik kanser aşısı alanlarında çok çeşitli uygulamalara sahiptir. Mevcut kanser aşıları genellikle etkisizdir. Sistemik T hücre aktivasyonu ve negatif düzenleyici yol inhibisyonu yaklaşımları önerilmiştir ve bunların bazıları klinik deney sürecindedir. T hücre aktivasyonu ile antijen tanınmanın ayrılması, ağır yan etkilere neden olabilir. Kanser aşılarının etkisizliği, ağır yan etkilere yol açmadan güçlü, tümöre özgü immün tepkiler indüklemeye teknolojisinin eksikliğinden kaynaklanır. Ambrx, T hücre ve B hücre tepkileri dahil olmak üzere, kansere özgü güçlü immün tepkilere yol açabilen nanoyapılar oluşturma teknolojisini sağlar ve bunu gerçekleştirerek, hem terapötik hem koruyucu açıdan avantajlı imkanlarla yeni bir alan açar.

Tam organizma aşı platformu, enfeksiyöz hastalık alanında sayısız uygulama alanı bulabilir. Kültürlenebilen ve mutasyon gerçekleştirebilen bir genoma sahip olan virüs, bakteri, hatta parazit, iyi adaylardır. Mevcut buluşun aşıları, aşı geliştirme alanında risk

yönetimini ileriye götürecektir ve bu aşılar, hem kimyasal hem genetik açıdan daha iyi tanımlanmıştır ve daha önce görülmemiş etkinlikler sağlar.

Genetik kodu genişletmek için, ortogonal tRNA'ların bileşimleri ve üretim usulleri sağlanmaktadır. Aminoasıl-tRNA sentetazları, açıklandığı gibi tRNA'ları, doğal olmayan şekilde kodlanmış bir amino asitle aminoasiller. Bu translasyonel bileşenler, tRNA tarafından tanınan bir selektör kodona tepki olarak, seçilmiş bir amino asidi, büyüyen bir polipeptit zincirinde (nükleik asit translasyonu sırasında) spesifik bir konuma dahil etmek için kullanılabilir.

Bir hücrede, belirtilen bir konumda seçilmiş bir amino asitle bir protein üretme usulleri de açıklanmaktadır. Örneğin bir usul, bir hücrenin uygun bir ortamda büyütülmesini (burada hücre, en az bir adet selektör kodon içeren ve bir proteini kodlayan bir nükleik asit içerir), ve seçilmiş amino asidin sağlanmasını içerir. Bu hücre ayrıca, hücrenin içinde fonksiyon gerçekleştiren ve selektör kodonu tanıyan bir ortogonal tRNA (O-tRNA); ve tercih edilen şekilde O-tRNA'yı seçilmiş amino asitle aminoasılleyen bir ortogonal aminoasıl-tRNA sentetaz (O-RS) içerir. Tipik olarak O-tRNA, aynı türden bir sentetaz mevcudiyetinde baskılama aktivitesi içerir. Bu usulle üretilen bir protein de açıklanmaktadır.

ÇİZİMLERE YÖNELİK ÖZET AÇIKLAMALAR

Şekil 1 - TΨC kökü mutasyon bölgeleriyle birlikte J17 tRNA'nın yonca yaprağı yapısı gösterilmektedir.

Şekil 2 - J17 veya J17 mutantları (F12, F13, F14) kullanılarak, insan büyüme hormonunda bir amber mutasyonu gösterilmektedir. Her numune için toplam hücre ligazı SDS PAGE ile analiz edilmiştir.

Şekil 3 - F13 kullanılarak farklı hücre türlerinde, insan büyüme hormonunda bir amber mutasyonunun baskılanması gösterilmektedir.

Şekil 4 - Ambrx Baskılama Sistemi içeren pVK10-camR vektörünün bir diyagramı gösterilmektedir.

Şekil 5 - Lambda Red bileşenleri (bet, gam, ekzonükleaz) içeren pKD46 vektörünün bir diyagramı gösterilmektedir.

Şekil 6 - Örnek 5'te kullanılan örtüşen primerlerin ve usullerin bir şeması gösterilmektedir.

Primerler, oklar ve sayısal tanımlayıcı ile belirtilmektedir ve örneğin Y31 ve N51 klonları için primer 1'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 18 ve 26 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer

2'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 19 ve 27 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer 3'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 20 ve 28 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer 4'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 21 ve 29 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer 5'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 22 ve 30 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer 6'lar sırasıyla DİZİ ID NO: 23 ve 31 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer 7'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 24 ve 32 olacaktır; Y31 ve N51 klonları için primer 8'ler sırasıyla DİZİ ID NO: 25 ve 33 olacaktır. PCR ürünleri bir harfle belirtilmektedir. Amber bölge içeren metiyonin amino peptidaz, amber mutasyon (A ve B) üzerinde örtüşmeli PCR ile oluşturuldu ve böylece bir tam organizma olarak, *E. coli* için koşullu olarak ölümcül olması sağlandı. Mutant metiyonin amino peptidaz daha sonra bir tam gene (C) kaynaştırıldı ve akış aşağı yönde seçim için bir seçilebilir işaret (D) ve mutant metiyonin amino peptidazın kısmi bir parçasıyla (E) birleştirildi.

Şekil 7 - Yapay amino asit bağımlılığının taranması için bir şema gösterilmektedir. Gösterilen üç aşama: 1) plakaların işlenmesiyle, KanR, AmpR pozitif transformantlar gibi transformantları seçme; 2) hayatta kalanları KanR, AmpR, + doğal olmayan amino asit içinde kültürleme; ve 3) ayrı ayrı kolonileri, doğal olmayan amino asit içeren ve içermeyen plakalarda büyütme ve doğal olmayan amino asit mevcudiyetinde büyüyen ve doğal olmayan amino asit olmadan kültürlendiğinde ölen kolonileri seçme.

Şekil 8 - Y31'de metiyonin amino peptidaz geninde bir amber mutasyonu için taranmakta olan, her biri LB agar ile ve 50 µg/mL Ampisilin ve 50 µg/mL Kanamisin içeren ortamlarla kaplı iki *E. coli* hücre kültürü plakası gösterilmekte olup, soldaki plaka ayrıca 2 mM para-asetilfenilalanin içerirken, sağdaki plaka içermez. A12, C5 ve E3, kimyasal olarak düzenlenmiş replikasyona bağımlı *E. coli*'nin örnekleridir.

Şekil 9 - N51'te metiyonin amino peptidaz geninde bir amber mutasyonu için taranmakta olan, her biri LB agar ile ve 50 µg/mL Ampisilin ve 50 µg/mL Kanamisin içeren ortamlarla kaplı iki *E. coli* hücre kültürü plakası gösterilmekte olup, soldaki plaka ayrıca 2 mM para-asetilfenilalanin içerirken, sağdaki plaka içermez. A12, C5 ve E3, kimyasal olarak düzenlenmiş replikasyona bağımlı *E. coli*'nin örnekleridir.

Şekil 10A ve 10B - Permisif ve permisif olmayan ortamlarda büyüme gösterilmektedir. Gecelik kültürler, her panelin sağ üst köşesinde gösterilen optimum dilüsyon oranlarında glukoz (baklava biçimleri) veya arabinoz (daireler) ortamında inoküle edildi. OD600, 37°C'de sallamalı bir Spectramax plaka okuyucuda 96 hazneli bir plakada, numunelerin mikroskopi için periyodik olarak alınması ve arabinoz plakalarına yerleştirilmesi yoluyla

izlendi. Sağ ekseninde verilen yaşama kabiliyeti değişimi (üçgenler), OD600 ile bölme yoluyla normalleştirilen CFU konsantrasyonu kullanılarak hesaplandı. Bu değer, her zaman noktası için $T = 0$ 'daki değere bölünmüş olup, o değer logu burada sunulmaktadır. Doymuş inokülümden ölçülen ve dilüsyon için düzeltilen $T = 0$ 'daki her OD birimi için 5 milimetre başına CFU sayıları aşağıdaki gibiydi: WT, 4.6×10^9 ; *frr* mutanlığı, 3.2×10^9 ; *gcpE* mutanlığı, 3.4×10^9 ; *lpxC* mutanlığı, 2.2×10^9 ; *map* mutanlığı, 2.9×10^9 ; *murA* mutanlığı, 8.7×10^8 ; *ppa* mutanlığı, 1.5×10^9 ; *rpsA* mutanlığı, 1.2×10^9 . Bozulan kültürlerin dinamiklerini en iyi şekilde göstermek için, OD, logaritmik değil lineer bir ölçekte gösterilir, ve sağ eksenin ölçeği, eğilim çizgilerinin çakışmasını önlemek üzere, *lpxC* ve 10 *map* için farklıdır. *murA* ölçümünün son iki zaman noktası için hiçbir koloni büyütülmemiştir. Herring ve Blattner JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 2004, sf. 2673-2681'den.

Şekil 11 - Reversiyon oranlarının karakterizasyonunun bir şeması gösterilmekte olup, burada genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan amino asit replikasyonuna bağımlı 15 hücreler, ortam + doğal olmayan amino asit içinde 1.0 optik yoğunluğa kadar büyütülür; daha sonra bu hücreler, koloni oluşturucu birimleri hesaplamak için ilave doğal olmayan amino asit içeren ortamda seri dilüsyonlarda plakalara yerleştirilir ve revertantların saptanması için, geri kalan hücreler, doğal olmayan amino asit mevcut olmaksızın kültürlenir.

Şekil 12 - Bir mutajenez stratejisinin şeması gösterilmektedir. Örtüşme uzatma PCR'si ile, WT şablonu genomik DNA'dan lineer bir DNA fragmanı üretilir. Primerlerin pozisyonları tek taraflı oklarla belirtilmektedir. PCR füzyon ürününün hücrelere elektroporasyonu yapılır ve çift rekombinasyon olayından kaynaklanan entegrasyonlar seçilir. Takipçi amber stop kodunu taşıyan bir klonun tanımlanmasından sonra, I-SceI geni indüklenerek, Camr'yi 25 kodlayan genin giderilmesi sağlanır. Kopyalanmış kısa bir rejyon içinde rekombinasyon, aksi halde iz içermeyecek bir amber mutantın oluşmasına yol açar.

Şekil 13 - Takipçi mutajenezde kullanılan plazmitler gösterilmektedir.

Şekil 14 - *E. coli*'de bir koşullu ölümcül mutant oluşturulması için, üstten başlayarak, 1) bir koşullu mutant şablonu oluşturma; 2) lambda RED rekombinant, amber baskılama 30 kompetan suşuna dönüştürme; ve 3) lambda RED rekombinasyonu, aşamalarını içeren bir şema gösterilmektedir.

Şekil 15 - *E. coli*'de bir koşullu ölümcül mutantın karakterize edilmesi için, üstten başlayarak, 1) başarıyla dönüştürülmüş bir organizmanın bağımlı olacağı doğal olmayan amino asidin mevcut olduğu ve mevcut olmadığı durumda, büyümeyi karakterize etme; 2) mutasyonu bakterisidal veya bakteriyostatik olarak karakterize etme, ve 3) revertant sıklığını karakterize etme, aşamalarını içeren bir şema gösterilmektedir

Şekil 16 - MAP kalıntı seçimlerinin yapısal bir görünümü gösterilmektedir.

Şekil 17 - MAP kalıntı seçimlerinin yapısal bir görünümü gösterilmektedir.

TANIMLAR

Burada ve ekteki istemlerde kullanıldığı gibi, içeriğin açıkça başka türlü gerektirdiği yerler dışında, tekil biçimler çoğul karşılıklarını da içerir. Dolayısıyla, "bir hücre"ye yapılan atıf, iki veya daha çok hücrenin bir kombinasyonunu içerir ve bunların, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinen eşdeğerlerini ve benzerlerini de kapsar. "Bakteriler"e yapılan atıf, bakteri karışımlarını ve benzerlerini de kapsar.

Burada ve aşağıda, tarifnamenin geri kalanında başka türlü tanımlanmadıkça, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ilgili olduğu alanda normal deneyim sahibi kişilerce yaygın olarak anlaşılan anlamları taşır.

Proteinler ve/veya protein dizileri, doğal veya yapay olarak, ortak bir atasal protein veya protein dizisinden türetildiklerinde, "homolog"dur. Benzer şekilde, nükleik asitler ve/veya nükleik asit dizileri, doğal veya yapay olarak, ortak bir atasal nükleik asit veya nükleik asit dizisinden türetildiklerinde, homologdur. Örneğin, doğal olarak meydana gelen herhangi bir nükleik asit, mevcut herhangi bir mutajenez usulüyle, bir veya daha çok selektör kodon içerecek şekilde modifiye edilebilir. Bu mutajenize olmuş nükleik asit, eksprese edildiğinde, bir veya daha çok seçilmiş amino asit, örneğin doğadışı amino asit içeren bir polipeptiti kodlar. Mutasyon işlemi, elbette, ilave olarak bir veya daha çok standart kodonu değiştirebilir ve böylece ortaya çıkan mutant proteinde de bir veya daha çok standart amino asidi değiştirebilir. Bir veya daha çok standart amino asit, doğadışı bir amino asit veya doğal bir amino asit haline getirilebilir. Homoloji, genelde iki veya daha çok nükleik asit veya protein (veya bunların dizileri) arasındaki dizi benzerliğinden çıkarılır. Dizilerin arasındaki, homoloji kurulmasında yararlı olan kesin benzerlik yüzdesi, söz konusu nükleik aside ve proteine göre değişir, ancak dizi benzerliğinin %25 kadar küçük bir kısmı, homoloji kurmak için rutin olarak kullanılır. Homoloji kurmak için, örneğin %30, %35, %40, %45, %50, %55, %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %91, %92, %93, %94,

%95, %96, %97, %98 veya %99 veya daha yüksek seviyelerde dizi benzerliği de kullanılabilir. Dizi benzerliği yüzdelerini belirleme usulleri (örneğin, varsayılan parametrelerin kullanıldığı BLASTP ve BLASTN) burada açıklanmaktadır ve genel olarak kullanılabilir.

- 5 Burada kullanıldığı şekilde "ortogonal" terimi, ilgilenilen bir sistem (örneğin, bir translasyonel sistem, örneğin bir hücre) tarafından daha az verimlilikle kullanılan bir molekül (örneğin, bir ortogonal tRNA (O-tRNA) ve/veya bir ortogonal aminoasit tRNA sentetazı (O-RS)) ifade eder. Ortogonal, bir ortogonal tRNA ve/veya ortogonal RS'nin, ilgilenilen translasyon sisteminde fonksiyon gerçekleştirme kabiliyetinin olmamasını veya
- 10 verimliliğin azalmasını (örneğin, %20'den az verimli, %10'dan az verimli, %5'ten az verimli, veya %1'den az verimli) ifade eder. Örneğin, ilgilenilen bir translasyon sistemindeki bir ortogonal tRNA, bir endojen RS tarafından bir endojen tRNA'nın aminoasitasyonu ile karşılaştırıldığında, ilgilenilen bir translasyon sisteminin herhangi bir endojen RS'si tarafından daha az, hatta sıfır verimlilikle aminoasitlenir. Bir başka örnekte,
- 15 bir ortogonal RS, endojen tRNA'nın bir endojen RS tarafından aminoasitasyonu ile karşılaştırıldığında, ilgilenilen translasyon sistemindeki herhangi bir endojen tRNA'yı daha az, hatta sıfır verimlilikle aminoasitler. İkinci bir ortogonal molekül, birinci ortogonal molekülle birlikte işlev gören hücrenin içine katılabilir. Örneğin, bir ortogonal tRNA/RS çifti, hücrenin içinde, mükabil bir tRNA/RS endojen çiftine göre verimli bir şekilde
- 20 (örneğin, yaklaşık %50 verimlilik, yaklaşık %60 verimlilik, yaklaşık %70 verimlilik, yaklaşık %75 verimlilik, yaklaşık %80 verimlilik, yaklaşık %85 verimlilik, yaklaşık %90 verimlilik, yaklaşık %95 verimlilik veya yaklaşık %99 veya daha yüksek verimlilik) birlikte işlev gören, eklenmiş tamamlayıcı bileşenler içerir. "Ortogonalitede gelişme", bir başlangıç malzemesine veya doğal olarak meydana gelen bir tRNA veya RS'ye kıyasla
- 25 artan ortogonaliteyi ifade eder.

"Aynı türden" terimi, birlikte işlev gören bileşenleri, örneğin bir tRNA ve bir aminoasit-tRNA sentetazı ifade eder. Bu bileşenler, tamamlayıcı olarak da ifade edilebilir.

- "Tercihen aminoasitler" terimi, doğal olarak meydana gelen bir tRNA'yı, veya O-tRNA'yı oluşturmak için kullanılan bir başlangıç malzemesini aminoasitleyen O-RS ile
- 30 karşılaştırıldığında, bir O-RS'nin, seçilmiş bir amino asitle, örneğin doğadışı bir amino asitle bir O-tRNA'yı aminoasitlettiği bir verimliliği ifade eder (örneğin yaklaşık %70 verimli, yaklaşık %75 verimli, yaklaşık %80 verimli, yaklaşık %85 verimli, yaklaşık %90 verimli, yaklaşık %95 verimli veya yaklaşık %99 veya daha fazla verimli). Doğadışı amino

asit, daha sonra, yüksek doğrulukla büyüyen bir polipeptit zincirine, örneğin, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %70'ten fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %75'ten fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %80'den fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %85'ten fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %90'dan fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %95'ten fazla verimlilikle, veya belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %99'dan fazla verimlilikle dahil edilir.

Bir "profilaktik tedavi", bir hastalık, patoloji veya tıbbi rahatsızlığın belirtilerini veya semptomlarını göstermeyen, ya da bir hastalık, patoloji veya rahatsızlığın sadece erken belirtilerini veya semptomlarını gösteren bir deneğe uygulanan bir tedavidir; bu durumda tedavi, hastalık, patoloji veya tıbbi rahatsızlığın gelişme riskini hafifletme, önleme veya azaltma amacıyla uygulanır. Profilaktik bir tedavi, bir hastalık veya rahatsızlığa karşı koruyucu bir tedavi olarak işlev görür. Bir "profilaktik aktivite", bir patoloji, hastalık veya rahatsızlığın belirtilerini veya semptomlarını göstermeyen (veya sadece bunların erken belirtilerini veya semptomlarını gösteren) bir deneğe verildiğinde, deneğin, patoloji, hastalık veya rahatsızlığı geliştirme riskini hafifleten, önleyen veya azaltan doğadışı bir immünojen ve/veya antikör veya bunların bileşimi gibi bir maddenin bir aktivitesidir. "Profilaktik açıdan yararlı" bir madde veya bileşik (örneğin, bu maddenin doğadışı bir immünojeni ve/veya antikörü), patoloji, hastalık veya rahatsızlığı hafifletme, önleme, tedavi etme veya gelişimini azaltmada yararlı maddeyi veya bileşiği ifade eder.

Tedaviler, aşılar ve/veya profilaktik tedaviler, bunlara ihtiyacı olan bir hastaya uygulanabilir. Tedaviler, aşılar ve/veya profilaktik tedaviler ayrıca, örneğin sığır, domuz, keçi, koyun, tavuk gibi evcil çiftlik hayvanları ve/veya yaygın çiftlik hayvanları ve kedi, köpek, papağan, muhabbet kuşu ve benzerleri gibi genel ev hayvanları dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, çeşitli hayvanlara da uygulanabilir.

"Selektör kodon" terimi, translasyon işleminde O-tRNA tarafından tanınan ve bir endojen tRNA tarafından tanınmayan kodonları ifade eder. O-tRNA antikodon ilmeği, mRNA'daki selektör kodonu tanır ve onun amino asidini, örneğin, doğadışı bir amino asit gibi seçilmiş bir amino asidini, bu bölgede polipeptite dahil eder. Selektör kodonlar, örneğin, amber, okra ve opal kodonlar dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, stop kodonları gibi nonsens kodonlar; dört veya daha çok bazlı kodon; nadir kodonlar; doğal veya doğadışı baz çiftlerinden türetilmiş kodonlar ve/veya benzerlerini içerebilir. Belirtilen bir sistem için, bir selektör kodon ayrıca, doğal üç bazlı kodondan birini içerebilmekte olup, burada

endojen sistem, söz konusu doğal üç bazlı kodonu kullanmaz (veya seyrek olarak kullanır). Örneğin bu, doğal üç bazlı kodonu tanıyan bir tRNA'nın eksik olduğu bir sistemi ve/veya doğal üç bazlı kodonun bir nadir kodon olduğu bir sistemi içerir.

Bir baskılayıcı tRNA, örneğin, bir selektör kodona tepki olarak bir amino asidin bir polipeptit zincirine dahil edilmesi için bir mekanizma sağlama yoluyla, belirli bir translasyon sisteminde bir haberci RNA'nın (mRNA) okunmasını değiştiren bir tRNA'dır. Örneğin, bir baskılayıcı tRNA; bir stop kodonu, dört bazlı bir kodon veya bir nadir kodon içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan bir kodon vasıtasıyla okuyabilir.

"Baskılama aktivitesi" terimi, bir tRNA'nın, örneğin bir baskılayıcı tRNA'nın, bir selektör kodon vasıtasıyla okuma kabiliyetini ifade eder. Aktivite, bir kontrole (örneğin, aynı türden bir sentetazı eksik olan) kıyasla gözlenen aktivitenin bir yüzdesi olarak ifade edilebilir.

"Translasyon sistemi" terimi, doğal olarak meydana gelen bir amino asidi, büyüyen bir polipeptit zincirine (protein) dahil etmek için gereken bileşenleri ifade eder. Bir translasyon sisteminin bileşenleri, örneğin ribozomları, tRNA'ları, sentetazları, mRNA ve benzerlerini içerebilir. Mevcut açıklamanın bileşenleri, bir *in vitro* veya *in vivo* translasyon sistemine ilave edilebilir. Translasyon sistemlerinin örnekleri, ökaryotik olmayan bir hücre, örneğin bir bakteri (*E. coli* gibi), bir ökaryotik hücre, örneğin bir maya hücresi, bir memeli hücresi, bir bitki hücresi, bir yosun hücresi, bir mantar hücresi, bir böcek hücresi, bir hücresiz translasyon sistemi, örneğin bir hücre lizatı ve/veya benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Translasyon sistemleri hücresel veya hücresiz olabilir, ve prokaryotik veya ökaryotik olabilir. Hücresel translasyon sistemleri, arzu edilen nükleik asit dizisinin mRNA'ya kopyalanabildiği ve mRNA'nın translasyona uğratılabildiği geçirgen hale getirilmiş hücreler veya hücre kültürleri gibi tam hücre terkiplerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Hücresiz translasyon sistemleri ticari olarak temin edilebilir ve birçok farklı tür ve sistem iyi bilinmektedir. Hücresiz sistemlerin örnekleri, *Escherichia coli* lizatları gibi prokaryotik lizatları ve buğday tohumu ekstraktları, böcek hücresi lizatları, tavşan retikülosit lizatları, tavşan oosit lizatları ve insan hücresi lizatları gibi ökaryotik lizatları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Ortaya çıkan protein glikosilatlanmış, fosforillenmiş veya başka türlü modifiye edilmiş olduğunda ökaryotik ekstraktlar veya lizatlar tercih edilebilir çünkü bu tip birçok modifikasyon, sadece ökaryotik sistemlerde mümkündür. Bu ekstraktlardan ve lizatlardan bazıları ticari olarak temin edilebilir (Promega; Madison, Wis.; Stratagene; La Jolla, Calif.; Amersham; Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL; Grand

Island, N.Y.). Salgılayıcı proteinlerin translasyonu için yararlı olan, mikrozomal membranlar içeren köpek pankreatik ekstraktları gibi membranöz ekstraktlar da temin edilebilir.

Sulandırılmış translasyon sistemleri de kullanılabilir. Saflaştırılmış translasyon faktörlerinin karışımlarının yanı sıra, lizatların kombinasyonları veya başlatma faktörü-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α veya β), uzama faktörü T (EF-Tu) veya terminasyon faktörleri gibi saflaştırılmış translasyon faktörleriyle desteklenen lizatlar da mRNA'yı proteine çevirmek için başarıyla kullanılmıştır. Hücresiz sistemler ayrıca, sisteme DNA'nın dahil edildiği, mRNA'ya kopyalandığı ve mRNA'nın Current Protocols in Molecular Biology'de (F. M. Ausubel ve diğerleri, editörler, Wiley Interscience, 1993) açıklandığı gibi translasyona uğratıldığı birleştirilmiş kopyalama/translasyon sistemleri de olabilir. Ökaryotik kopyalama sisteminde kopyalanmış RNA, heteronükleer RNA (hnRNA) veya 5' uç kapakları (7-metil guanosin) ve 3' ucu poli A kuyruklu olgun mRNA formunda olabilir; bu, belirli translasyon sistemlerinde bir avantaj olabilir. Örneğin, kapatılmış mRNA'lar, retikülosit lizat sisteminde yüksek verimlilikle translasyona uğratılabilir.

"Seçilmiş amino asit" terimi, herhangi bir arzu edilen, doğal olarak meydana gelen amino asidi veya doğadışı amino asidi ifade eder. Burada kullanıldığı şekilde "doğadışı amino asit" veya "doğal olmayan bir şekilde kodlanmış amino asit" terimi, doğal olarak meydana gelen 20 genel amino asit ya da selenosistein veya pirolizinden biri olmayan herhangi bir amino asidi, modifiye edilmiş amino asidi ve/veya amino asit analogunu ifade eder. "Doğal olmayan bir şekilde kodlanmış amino asit" ve "doğadışı amino asit" ile eşanlamlı olarak kullanılabilen diğer terimler, "doğal olmayan amino asit", "doğal olmayan bir şekilde meydana gelen amino asit" ve bunların çeşitli tireli ve tiresiz versiyonlarıdır. "Doğal olmayan bir şekilde kodlanmış amino asit" terimi ayrıca, doğal olarak kodlanmış bir amino asidin (sınırlayıcı olmamak üzere, 20 genel amino asit ya da pirolizin ve selenosistein dahil) modifikasyonu (örneğin, posttranslasyonel modifikasyonlar) yoluyla meydana gelen, ancak kendileri, translasyon kompleksi tarafından büyüyen bir polipeptit zincirine doğal olarak dahil edilmeyen amino asitleri de içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bu tip doğal olmayan yolla meydana gelen amino asitlerin örnekleri, *N*-asetilglükozaminil-L-serin, *N*-asetilglükozaminil-L-treonin ve O-fosfotirosini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Doğal Olmayan Amino Asit: Burada kullanıldığı şekilde, doğal olmayan bir amino asit veya doğadışı bir amino asit, selenosistein ve/veya piroliz ile aşağıdaki yirmi kanonik, genetik olarak kodlanmış alfa-amino asit dışındaki herhangi bir amino asit, modifiye

edilmiş amino asit veya amino asit analogunu ifade eder: alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glütamin, glütamik asit, glisin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, valin. Buluşun çeşitli düzenlemelerinde, doğadışı immünojene dahil edilen bir veya daha çok doğadışı amino asit, herhangi bir

5 doğadışı amino asit olabilir. Bu nedenle, burada belirli doğadışı amino asitlerden söz edilmesinin, buluşu sınırlayıcı biçimde anlaşılmasını gerektirmediği kabul edilecektir. Çok çeşitli doğadışı amino asit, in vivo olarak, örneğin ortogonal elemanlar içeren translasyon sistemi kullanılarak kodlanmaları yoluyla proteinlere dahil edilmiştir. Bir gözden geçirme için, bakınız örneğin Liu ve diğerleri (2007) "Genetic incorporation of unnatural amino

10 acids into proteins in mammalian cells" *Nat Methods* 4:239-244; Wang ve diğerleri (2006) "Expanding the genetic code" *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:225-249; Xie ve Schultz (2006) "A chemical toolkit for proteins-an expanded genetic code" *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:775-782; Wang ve Schultz "Expanding the Genetic Code," *Angewandte Chemie Int. Ed*, 44(1):34-66 (2005) ve Chin ve diğerleri (2003) "An expanded eukaryotic

15 genetic code" *Science* 301:964-967.

Mevcut buluşun bazı düzenlemelerinde, doğal olarak meydana gelen 20 genel amino asit ya da doğal olarak meydana gelen nadir amino asitlerden, örneğin selenosistein veya pirolizinden biri olmayan, doğal olmayan amino asitlerin kullanılması arzu edilebilir. Örneğin, doğal olmayan amino asitler, p-nitrofenilalanin, p-sülfotirosin ve p-

20 karboksifenilalanin, buradaki çeşitli düzenlemelerde kullanım alanı bulmaktadır. Bazı düzenlemelerde, doğal olmayan amino asit aşağıdakileri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir: p-nitrofenilalanin; bir o-nitrofenilalanin; bir m-nitrofenilalanin; bir p-boronil fenilalanin; bir o-boronilfenilalanin; bir m-boronilfenilalanin; bir p-aminofenilalanin; bir o-aminofenilalanin; bir m-aminofenilalanin; bir p-asilfenilalanin; bir o-asilfenilalanin; bir m-

25 asilfenilalanin; bir p-OMe fenilalanin; bir o-OMe fenilalanin; bir m-OMe fenilalanin; bir p-sülfofenilalanin; bir o-sülfofenilalanin; bir m-sülfofenilalanin; bir 5- nitro His; bir 3-nitro Tyr; bir 2-nitro Tyr; bir nitro sübstitüentli Leu; bir nitro sübstitüentli His; bir nitro sübstitüentli De; bir nitro sübstitüentli Trp; bir 2-nitro Trp; bir 4-nitro Trp; bir 5-nitro Trp; bir 6- nitro Trp; bir 7-nitro Trp; 3-aminotirosin, 2-aminotirosin, O-sülfotirosin, 2-

30 sülfooksifenilalanin, 3-sülfooksiksifenilalanin veya p-karboksifenilalanin, o-karboksifenilalanin ve m-karboksifenilalanin. Yine bu buluşun, belirli doğal olmayan amino asitlerle sınırlı olmadığı kabul edilecektir.

İlave olarak mevcut buluşun çeşitli düzenlemelerinde, doğadışı amino asitler, in vitro olarak, örneğin bir baskılayıcı tRNA'nın, arzu edilen bir doğadışı amino asitle kimyasal olarak açillendiği ve immünojen biyosentezini destekleme kabiliyetine sahip bir in vitro ekstrakta ilave edildiği biyosentetik usuller kullanılarak, immünojenlere dahil edilebilir. Bu tip in vitro sentetik usullerin bir açıklaması için bakınız, örneğin, V. W. Cornish, D. Mendel ve P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, "A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins," *Science* 244 182-188 (1989); ve, J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Dala, "Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide," *J. Am. Chem. Soc.* 111 8013-8014 (1989). Doğadışı amino asitler ayrıca, mevcut sentetik peptit kimyaları (veya doğal amino asitler, bu tip usullerle doğadışı amino asitlere dönüştürülebilir), ya da posttransyonel işlemlerle, doğal veya sentetik olarak üretilmiş proteinlere ilave edilebilir. Bununla birlikte, yine bu tip posttranslasyonel ve kimyasal modifikasyonların, tipik olarak, bir molekülün sentezi sırasında bir veya daha çok doğadışı amino asidin dahil edilmesiyle (örneğin, ortogonal translasyon, katı faz sentezi vs. gibi doğrudan dahil etme) birlikte veya buna ilave olarak yapıldığı kabul edilecektir. Bu nedenle, amino asitlerin posttranslasyonel eklenmesi veya kimyasal modifikasyonu, tipik olarak sadece, molekülün sentezi sırasında ilave edilmiş doğadışı amino asitlere önceden sahip olan moleküller üzerinde yapılır (veya hiç yapılmaz). Doğadışı amino asitlerin immünojenlere ortogonal olmayan şekilde dahil edilmesiyle ilgili ilave bilgiler aşağıda verilmektedir.

Burada kullanıldığı şekilde "türetilen" terimi, belirtilen bir molekül veya organizmadan izole edilen veya ondan sağlanan bilgiler kullanılarak yapılan bir bileşeni ifade eder.

Bir "rekombinant konakçı hücre" veya "konakçı hücre", ekleme için kullanılan usulden (örneğin, doğrudan alım, transdüksiyon, f-eşleştirme veya rekombinant konakçı hücreler oluşturmak için teknikte bilinen diğer usuller) bağımsız olarak, bir ekzojen polinükleotit içeren bir hücreyi ifade eder. Ekzojen polinükleotit, birleştirilmemiş bir vektör (örneğin bir plazmit) olarak korunabilir veya alternatif olarak konakçı genomuna eklenebilir.

Burada kullanıldığı şekilde "ortam" veya "ortamlar" terimi, bakteri konakçı hücreleri, maya konakçı hücreleri, böcek konakçı hücreleri, bitki konakçı hücreleri, ökaryotik konakçı hücreler, memeli konakçı hücreleri, CHO hücreleri, prokaryotik konakçı hücreler, *E. coli*, veya *Pseudomonas* konakçı hücreleri, ve hücre içerikleri dahil olmak üzere, herhangi bir konakçı hücreyi destekleyebilen veya içerebilen herhangi bir kültür ortamı,

solüsyon, katı, yarı katı veya sert desteği içerir. Bu nedenle, terim, içinde konakçı hücrenin büyüdüğü ortamı, örneğin bir kültür veya tam organizma veya hücrenin büyüdüğü ortamı kapsayabilir, ve ortam (bir çoğaltma aşamasından önceki veya sonraki ortam dahil), eksik replikasyonlu organizmaların veya hücrelerin büyümesini desteklemek için dahil edilmiş, doğal olmayan bir amino aside sahip olabilir. Terim ayrıca, antijenlerin hücre içi olarak üretildiği ve konakçı hücrelerin, antijenleri veya rekombinant antijenleri açığa çıkarmak için parçalandığı veya bozulduğu durumda olduğu gibi, konakçı hücre lizatları içeren tamponları veya reaktifleri kapsayabilir.

Burada protein yeniden katlanması açısından kullanıldığı şekilde "indirgeyici madde", sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde muhafaza eden ve hücre içi veya hücreler arası disülfür bağlarını indirgeyen herhangi bir bileşik veya malzeme olarak tanımlanmaktadır. Uygun indirgeyici maddeler, ditiyotritol (DTT), 2-merkaptetanol, ditiyoeritritol, sistein, sisteamin (2-aminoetantiyol) ve indirgenmiş glutathionu içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Çok çeşitli indirgeyici maddenin, burada açıklanan bileşimlerde kullanılmaya uygun olduğu, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce kolayca görülebilir.

Burada protein yeniden katlanması açısından kullanıldığı şekilde "oksitleyici madde", oksitlenmekte olan bir bileşikten bir elektron çıkarma kabiliyetine sahip herhangi bir bileşik veya malzeme olarak tanımlanmaktadır. Uygun oksitleyici maddeler, oksitlenmiş glutathion, sistin, sistamin, oksitlenmiş ditiyotritol, oksitlenmiş eritritol ve oksijeni içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Çok çeşitli oksitleyici maddenin, burada açıklanan usullerde kullanılmaya uygun olduğu, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce kolayca görülebilir.

Burada kullanıldığı şekilde "yeniden katlama", disülfür bağı içeren polipeptitleri, düzgün olmayan bir şekilde katlanmış veya katlanmamış bir halden, disülfür bağlarına göre doğal veya düzgün bir şekilde katlanmış bir konformasyona dönüştüren herhangi bir işlem, reaksiyon veya usulü açıklar.

Burada kullanıldığı şekilde "birlikte katlama", spesifik olarak, birbiriyle etkileşime giren en az iki polipeptiti kullanan ve katlanmamış veya düzgün olmayan şekilde katlanmış polipeptitlerin doğal, düzgün katlanmış polipeptitlere dönüşmesine yol açan yeniden katlama işlemlerini, reaksiyonlarını veya usullerini ifade eder.

Bir "amino terminusu modifikasyon grubu", bir polipeptitin amino terminusuna bağlanabilen herhangi bir molekülü ifade eder. Benzer şekilde, bir "karboksi terminusu modifikasyon grubu", bir polipeptitin karboksi terminusuna bağlanabilen herhangi bir

molekölü ifade eder. Terminus modifikasyon grupları, serum albümin gibi çeşitli suda çözünür polimerleri, peptitleri veya proteinleri, veya peptitlerin serum yarı ömrünü arttıran diğer parçaları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

"Fonksiyonel grup", "aktif parça", "aktivasyon grubu", "ayrılma grubu", "reaktif bölge", "kimyasal açıdan reaktif grup" ve "kimyasal açıdan reaktif parça" terimleri teknikte ve burada, bir molekülün ayrı, tanımlanabilir bölümlerini veya birimlerini ifade etmek için kullanılmaktadır. Terimler kimya alanında bir ölçüde eşanlamlıdır ve burada, moleküllerin, bazı fonksiyon ve aktiviteleri yerine getiren ve diğer moleküllerle reaktif olan bölümlerini belirtmek için kullanılır.

- 10 "Bağlantı" veya "bağlayıcı" terimi, burada, normalde bir kimyasal reaksiyonun sonucu olarak oluşan ve tipik olarak eşdeğerli bağlantılar olan grupları veya bağları ifade etmek için kullanılır. Hidrolitik açıdan stabil bağlantılar, bağlantıların su içinde esas itibariyle stabil olduğu ve uzun bir süre boyunca, hatta belki süresiz olarak, sınırlayıcı olmamak üzere fizyolojik koşullar dahil olacak şekilde, yararlı pH değerlerinde suyla reaksiyona
- 15 girmediği anlamına gelmektedir. Hidrolitik açıdan stabil olmayan veya çözünebilir bağlantılar, bağlantıların su veya sulu solüsyonlarda (örneğin kan dahil) çözünebilir olduğu anlamına gelir. Enzimatik açıdan stabil olmayan veya çözünebilir bağlantılar, bağlantının bir veya daha çok enzimle çözündürülebildiği anlamına gelir. Teknike anlaşıldığı şekilde, PEG ve ilgili polimerler, polimer omurgasında ya da polimer omurgası ile polimer
- 20 molekülünün bir veya daha çok terminal fonksiyonel grubu arasındaki bağlayıcı grubunda çözünebilir bağlantılar içerebilir. Örneğin, PEG karboksilik asitlerinin veya aktif hale getirilmiş PEG karboksilik asitlerinin, biyolojik açıdan aktif bir maddedeki alkol gruplarıyla reaksiyonu yoluyla oluşan ester bağlantıları, genellikle maddeyi açığa çıkarmak üzere fizyolojik koşullar altında hidrolizlenir. Diğer hidrolitik açıdan çözünebilir
- 25 bağlantılar, karbonat bağlantılarını; bir amin ile bir aldehitin reaksiyonundan kaynaklanan imin bağlantılarını; bir alkol ile bir fosfat grubunun reaksiyonundan kaynaklanan fosfat ester bağlantılarını; bir hidrazit ile bir aldehitin reaksiyon ürünü olan hidrazon bağlantılarını; bir aldehit ile bir alkolün reaksiyon ürünü olan asetal bağlantılarını; bir format ile bir alkolün reaksiyon ürünü olan ortoester bağlantılarını; PEG gibi bir polimerin
- 30 bir ucundaki dahil, ancak onunla sınırlı olmamak üzere, bir amin grubu, ve bir peptitin bir karboksil grubu ile oluşan peptit bağlantılarını; ve bir polimerin bir ucundaki dahil, ancak onunla sınırlı olmamak üzere, bir fosforamidit grubu ve bir oligonükleotitin bir 5' hidroksil grubu ile oluşan oligonükleotit bağlantılarını içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Burada kullanıldığında "biyolojik açıdan aktif molekül", "biyolojik açıdan aktif parça" veya "biyolojik açıdan aktif madde" terimi, virüsler, bakteriler, bakteriyofaj, transpozon, prion, böcekler, mantarlar, bitkiler, hayvanlar ve insanlar dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir organizma ile ilgili bir biyolojik sistem, yol, molekül veya etkileşimin herhangi bir fiziksel veya biyokimyasal özelliklerini etkileyebilen herhangi bir madde anlamına gelir. Özel olarak, burada kullanıldığı şekilde biyolojik açıdan aktif moleküller, insanlarda veya diğer hayvanlarda hastalığın teşhisi, iyileştirilmesi, hafifletilmesi, tedavisi veya önlenmesi ya da insanların veya hayvanların fiziksel veya ruhsal sağlığının başka türlü iyileştirilmesi için tasarlanmış herhangi bir maddeyi içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Biyolojik açıdan aktif moleküllerin örnekleri, peptitler, proteinler, enzimler, küçük moleküllü ilaçlar, aşılar, immünojenler, sert ilaçlar, yumuşak ilaçlar, karbonhidratlar, inorganik atomlar veya moleküller, boyar maddeler, lipidler, nükleozitler, radyonüklidler, oligonükleotitler, toksoidler, toksinler, prokaryotik ve ökaryotik hücreler, virüsler, polisakaritler, nükleik asitler ve bunların virüslerden, bakterilerden, böceklerden, hayvanlardan ve herhangi bir başka hücre veya hücre türünden elde edilmiş veya türetilmiş bölümleri, lipozomlar, mikropartiküller ve miçelleri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bu buluşla kullanılmaya uygun biyolojik açıdan aktif madde sınıfları, ilaçları, ön ilaçları, radyonüklidleri, görüntüleme maddelerini, polimerleri, antibiyotikleri, fungusitleri, anti-viral maddeleri, antienflamatuar maddeleri, anti-tümör maddeleri, kardiyovasküler maddeleri, anti-anksiyete maddeleri, hormonları, büyüme faktörlerini, steroid maddeleri, mikrobiyal olarak türetilmiş toksinleri ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

"Aril" terimi, başka türlü belirtilmedikçe, birbirine kaynaşmış veya eşdeğerli bir şekilde bağlanmış tek halkalı veya birden çok halkalı (sınırlayıcı olmamak üzere, 1 ila 3 halkalı dahil) olabilen çoklu doymamış, aromatik, hidrokarbon süstitüent anlamına gelir.

"Heteroaril" terimi, N, O veya S arasından seçilmiş bir ila dört heteroatom içeren aril gruplarını (veya halkalarını) ifade etmekte olup, burada azot ve kükürt atomları isteğe bağlı olarak oksitlenir ve azot atomu/atomları isteğe bağlı olarak kuaternize edilir. Bir heteroaril grubu, bir heteroatom vasıtasıyla molekülün geri kalanına bağlanabilir. Aril ve heteroaril gruplarının sınırlayıcı olmayan örnekleri, fenil, 1-naftil, 2-naftil, 4-bifenil, 1-pirolil, 2-pirolil, 3-pirolil, 3-pirazolil, 2-imidazolil, 4-imidazolil, pirazinil, 2-oksazolil, 4-oksazolil, 2-fenil-4-oksazolil, 5-oksazolil, 3-izoksazolil, 4-izoksazolil, 5-izoksazolil, 2-tiyazolil, 4-tiyazolil, 5-tiyazolil, 2-füril, 3-füril, 2-tiyenil, 3-tiyenil, 2-piridil, 3-piridil, 4-piridil, 2-pirimidil, 4-pirimidil, 5-benzotiyazolil, pürinil, 2-benzimidazolil, 5-indolil, 1-izokuinolil,

5-izokuinolil, 2-kuinoksalinil, 5-kuinoksalinil, 3-kuinolil ve 6-kuinolili içerir. Yukarıda belirtilen aril ve heteroaril halka sistemlerinin her biri için sübstitüentler, aşağıda açıklanan geçerli sübstitüentler grubundan seçilir.

Kısalık açısından, "aril" terimi, başka terimlerle (sınırlayıcı olmamak üzere, ariloksi, ariltiyoksi, arilalkil dahil) birlikte kullanıldığında, burada tanımlandığı gibi hem aril, hem heteroaril halkalarını içerir. Bu nedenle, "arilalkil" teriminin, bir aril grubunun, içinde bir karbon atomunun (sınırlayıcı olmamak üzere, bir metilen grubu dahil) örneğin bir oksijen atomuyla (sınırlayıcı olmamak üzere, fenoksimetil, 2-piridiloksimetil, 3-(1-naftiloksi)propil ve benzerleri dahil) değiştirilmiş olduğu alkil grupları dahil olmak üzere, bir alkil grubuna (sınırlayıcı olmamak üzere, benzil, fenetil, piridilmetil ve benzerleri dahil) eklendiği radikalleri içermesi amaçlanmıştır.

Yukarıdaki terimlerin her birinin (sınırlayıcı olmamak üzere, "alkil," "heteroalkil," "aril" ve "heteroaril" dahil), belirtilen radikalın hem sübstitüe edilmiş, hem de sübstitüe edilmemiş formlarını içermesi amaçlanmaktadır. Her tip radikal için örnek sübstitüentler aşağıda verilmektedir.

Alkil ve heteroalkil radikalleri (çoğu zaman alkilen, alkenil, heteroalkilen, heteroalkenil, alkinil, sikloalkil, heterosikloalkil, sikloalkenil ve heterosikloalkenil olarak ifade edilen gruplar dahil) için sübstitüentler, aşağıdakilerin arasından seçilen çeşitli gruplardan biri olabilir, fakat bunlarla sınırlı değildir: Sıfır ile $(2m'+1)$ arasındaki bir sayıda $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, -halojen, $-SiR'R''R'''$, $OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $NR' C(O)NR''R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $NR C(NR'R'')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $NRSO_2R'$, $-CN$ ve $-NO_2$, burada m' , söz konusu radikaldeki karbon atomlarının toplam sayısıdır. Her bir R' , R'' , R''' ve R'''' , bağımsız olarak hidrojen, sübstitüe edilmiş veya sübstitüe edilmemiş heteroalkil, sübstitüe edilmiş veya sübstitüe edilmemiş aril (sınırlayıcı olmamak üzere, 1-3 halojenle sübstitüe edilmiş aril dahil), sübstitüe edilmiş veya sübstitüe edilmemiş alkil, alkoksi veya tiyoalkoksi grupları, ya da arilalkil gruplarını ifade eder. Örneğin, bu açıklamanın bir bileşiği birden çok R grubu içerdiğinde, R gruplarının her biri, bu gruplardan birden fazlası mevcut olduğunda her bir R' , R'' , R''' ve R'''' grubunda olduğu gibi bağımsız olarak seçilir. R' ve R'' aynı azot atomuna bağlandığında, bunlar 5, 6 veya 7 üyeli bir halka oluşturmak için azot atomuyla birleştirilebilir. Örneğin, $-NR'R''$ 'nin, sınırlayıcı olmamak üzere, 1-pirolidinil ve 4-morfolinili içermesi amaçlanmaktadır. Teknikte deneyimli kişiler, sübstitüentlerle ilgili yukarıdaki değerlendirmeden, "alkil"

teriminin, haloalkil (sınırlayıcı olmamak üzere, -CF₃ ve -CH₂CF₃ dahil) ve açıl (sınırlayıcı olmamak üzere, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃ ve benzerleri dahil) gibi, hidrojen grupları dışındaki gruplara bağlı karbon atomlarını kapsayan grupları içerdiği anlamına geldiğini anlayacaktır.

- 5 Alkil radikali için açıklanan sübstitüentlere benzer şekilde, aril ve heteroaril grupları için sübstitüentler de çeşitlidir ve sınırlayıcı olmamak üzere, aşağıdakilerin arasından seçilir: sıfır ile aromatik halka sistemindeki toplam açık değerlik sayısı arasında değişen bir sayıda olmak üzere, halojen, OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halojen, -SiR'R''R''', OC(O)R', -C(O)R', CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', NR' C(O)NR''R''',
- 10 -NR''C(O)R', NR-C(NR'R''R''')=NR''', NR C(NR'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)R', -S(O)NR'R'', NRSO₂R', -CN ve -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, floro(C1-C4)alkoksi, ve floro(C1-C4)alkil; ve burada R', R'', R''' ve R'''' bağımsız olarak hidrojen, alkil, heteroalkil, aril ve heteroaril arasından seçilir. Örneğin, bu açıklamanın bir bileşiği birden çok R grubu içerdiğinde, R gruplarının her biri, bu gruplardan birden fazlası mevcut olduğunda her bir
- 15 R', R'', R''' ve R'''' grubunda olduğu gibi bağımsız olarak seçilir.

- "Nükleik asit" terimi, deoksiribonükleotitleri, deoksiribonükleozitleri, ribonükleozitleri veya ribonükleotitleri ve bunların, tek veya çift zincirli formdaki polimerlerini ifade eder. Spesifik olarak sınırlandırılmadıkça, bu terim, referans nükleik asitle benzer bağlanma özelliklerine sahip olan ve doğal olarak meydana gelen nükleotitlerle benzer bir şekilde
- 20 metabolize olan, doğal nükleotitlerin bilinen analoglarını içeren nükleik asitleri kapsar. Spesifik olarak başka türlü sınırlandırılmadıkça, bu terim ayrıca, antisens teknolojisinde (fosforotiyoatlar, fosforoamidatlar ve benzerleri) kullanılan DNA'nın analogları olan PNA (peptidonükleik asit) içeren oligonükleotit analoglarını ifade eder. Başka türlü belirtilmedikçe, belirli bir nükleik asit dizisi ayrıca, açıkça belirtilen dizinin yanı sıra,
- 25 konservatif olarak modifiye edilmiş varyantları (sınırlayıcı olmamak üzere, dejenere kodon sübstitüsyonları dahil) ve tamamlayıcı dizileri de ima yoluyla kapsar. Spesifik olarak, dejenere kodon sübstitüsyonları, seçilen bir veya daha çok kodonun (veya tüm kodonların) üçüncü pozisyonunun karma bazlı kalıntılar ve/veya deoksiinozin kalıntılarıyla sübstitüe edildiği dizilerin oluşturulması yoluyla gerçekleştirilebilir (Batzer ve diğerleri, Nucleic
- 30 Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka ve diğerleri, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini ve diğerleri, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

Sübstitüent gruplarının, soldan sağa doğru yazılan geleneksel kimyasal formülleriyle belirtildiği yerlerde, bunlar, yapının sağdan sola doğru yazılmasından kaynaklanan

kimyasal açıdan özdeş sübstitüentleri eşit biçimde kapsamaktadır (örneğin CH₂O yapısı, -OCH₂ yapısına eşdeğerdir).

"Sübstitüentler" terimi, "engelleyici olmayan sübstitüentleri" içerir, ancak onlarla sınırlı değildir. "Engelleyici olmayan sübstitüentler", stabil bileşikler sağlayan gruplardır. Uygun engelleyici olmayan sübstitüentler veya radikaller, halo, C₁-C₁₀ alkil, C₂-C₁₀ alkenil, C₂-C₁₀ alkinil, C₁-C₁₀ alkoksi, C₁-C₁₂ aralkil, C₁-C₁₂ alkaril, C₃-C₁₂ sikloalkil, C₃-C₁₂ sikloalkenil, fenil, sübstitüe edilmiş fenil, tolüoil, ksilenil, bifenil, C₂-C₁₂ alkoksialkil, C₂-C₁₂ alkoksiaril, C₇-C₁₂ ariloksialkil, C₇-C₁₂ oksiaril, C₁-C₆ alkilsülfinil, C₁-C₁₀ alkilsülfonil, m'nin 1 ila 8 olduğu --(CH₂)_m --O--(C₁-C₁₀ alkil), aril, sübstitüe edilmiş aril, sübstitüe edilmiş alkoksi, floroalkil, heterosiklik radikal, sübstitüe edilmiş heterosiklik radikal, nitroalkil, --NO₂, --CN, --NRC(O)--(C₁-C₁₀ alkil), --C(O)--(C₁-C₁₀ alkil), C₂-C₁₀ alkil tiyoalkil, --C(O)O--(C₁-C₁₀ alkil), --OH, --SO₂, =S, --COOH, --NR₂, karbonil, --C(O)--(C₁-C₁₀ alkil)-CF₃, --C(O)-CF₃, --C(O)NR₂, --(C₁-C₁₀ aril)-S--(C₆-C₁₀ aril), --C(O)--(C₁-C₁₀ aril), m'nin 1 ila 8 olduğu --(CH₂)_m --O--(--(CH₂)_m --O--(C₁-C₁₀ alkil), --C(O)NR₂, --C(S)NR₂, --SO₂NR₂, --NRC(O)NR₂, --NRC(S)NR₂, bunların tuzları ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Burada kullanıldığı şekilde her R; H, alkil veya sübstitüe edilmiş alkil, aril veya sübstitüe edilmiş aril, aralkil veya alkarildir.

"Halojen" terimi, flor, klor, iyot ve bromu içerir.

"Alkil" terimi, kendi başına veya bir başka sübstitüentin parçası olarak, başka türlü belirtilmedikçe, tamamen doymuş, tekli veya çoklu doymamış olabilen, düz veya dallanmış zincirli veya siklik hidrokarbon radikali ya da bunların kombinasyonu anlamına gelir ve belirtilen atom sayısına sahip (yani, C₁-C₁₀, bir ila on karbon anlamına gelir) iki ve çok değerlikli radikaller içerebilir. Doymuş hidrokarbon radikallerinin örnekleri, metil, etil, n-propil, izopropil, n-bütil, t-bütil, izobütil, sec-bütil, sikloheksil, (sikloheksil)metil, siklopropilmetil, örneğin n-pentil, n-heksil, n-heptil, n-oktil ve benzerlerinin homologlarını ve izomerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Doymamış bir alkil grubu, bir veya daha çok çift bağa veya üçlü bağa sahip bir gruptur. Doymamış alkil gruplarının örnekleri, vinil, 2-propenil, krotıl, 2-izopentenil, 2-(bütadienil), 2,4-pentadienil, 3-(1,4-pentadienil), etinil, 1- ve 3-propinil, 3-bütinil ve daha yüksek homologları ve izomerleri içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. "Alkil" teriminin, başka türlü belirtilmedikçe, "heteroalkil" gibi, alkilin aşağıda daha detaylı olarak tanımlanan türevlerini de içermesi amaçlanmıştır. Hidrokarbon gruplarıyla sınırlandırılan alkil grupları, "homoalkil" olarak adlandırılır.

"Alkilen" terimi, kendi başına veya bir başka sübstitüentin parçası olarak, sınırlayıcı olmamak üzere, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ yapılarıyla örneklendirildiği gibi, bir alkandan türetilmiş iki değerlikli bir radikal anlamına gelir ve ayrıca aşağıda "heteroalkilen" olarak açıklanan grupları da içerir. Tipik olarak bir alkil (veya alkilen) grubu, 10 veya daha az karbon atomuna sahip olan gruplar, burada açıklanan usullerin ve bileşimlerin özel bir açıklaması olmak üzere, 1 ila 24 karbon atomuna sahip olacaktır. Bir "düşük alkil" veya "düşük alkilen", genellikle sekiz veya daha az sayıda karbon atomuna sahip olan daha kısa bir alkil veya alkilen grubudur.

"Alkoksi", "alkilamino" ve "alkiltiyo" (veya tiyoalkoksi) terimleri geleneksel anlamlarında kullanılmaktadır ve sırasıyla bir oksijen atomu, bir amino grubu veya bir kükürt atomu vasıtasıyla molekülün geri kalanına bağlanan alkil gruplarını ifade eder.

"Heteroalkil" terimi (kendi başına veya bir başka terimle birlikte), başka türlü belirtilmedikçe, belirtilen sayıda karbon atomu ve O, N, Si ve S'den oluşan gruptan seçilmiş en az bir adet heteroatomdan stabil bir düz veya dallanmış zincirli, veya siklik hidrokarbon radikali veya bunların kombinasyonları anlamına gelir ve burada azot ve kükürt atomları, isteğe bağlı olarak oksitlenebilir ve azot heteroatomu isteğe bağlı olarak kuaternize edilebilir. Heteroatom(lar) O, N ve S ve Si, heteroalkil grubunun herhangi bir iç pozisyonuna ya da alkil grubunun, molekülün geri kalanına eklendiği pozisyona yerleştirilebilir. Örnekler, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ ve $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 'ü içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. En çok iki heteroatom, örneğin $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ ve $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ gibi ardışık olabilir. Benzer şekilde, "heteroalkilen" terimi (kendi başına veya bir başka sübstitüentin parçası olarak), sınırlayıcı olmamak üzere, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ile örneklendirildiği gibi, heteroalkilden türetilmiş iki değerlikli bir radikal anlamına gelir. Heteroalkilen gruplarında, aynı veya farklı heteroatomlar ayrıca, zincir terminuslarından birini veya her ikisini kaplayabilir (sınırlayıcı olmamak üzere, alkilenoksi, alkilendioksi, alkilenamino, alkilendiamino, aminooksialkilen ve benzerleri dahil). Yine ayrıca, alkilen ve heteroalkilen bağlama gruplarında, bağlama gruplarının yönelimi, bağlama gruplarının formülünün yazıldığı yöne göre belirtilmez. Örneğin, $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ formülü hem $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$, hem $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2$ 'yi temsil eder.

"Sikloalkil" ve "heterosikloalkil" terimleri (kendi başlarına veya diğer terimlerle birlikte), başka türlü belirtilmedikçe, sırasıyla "alkil" ve "heteroalkil" in siklik versiyonlarını temsil

eder. Bu nedenle, bir sikloalkil veya heterosikloalkil, doymuş, kısmen doymamış ve tamamen doymamış halka bağlantılarını içerir. Ek olarak, heterosikloalkil için, bir heteroatom, heterosikl'in, molekülün geri kalanına bağlandığı pozisyonu kaplayabilir. Sikloalkilin örnekleri, siklopentil, sikloheksil, 1-sikloheksenil, 3-sikloheksenil, sikloheptil ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Heterosikloalkilin örnekleri, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridil), 1-piperidinil, 2-piperidinil, 3-piperidinil, 4-morfolinil, 3-morfolinil, tetrahidrofüran-2-il, tetrahidrofüran-3-il, tetrahidrotiyen-2-il, tetrahidrotiyen-3-il, 1-piperazinil, 2-piperazinil ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. İlave olarak bu terim, bisiklik ve trisiklik halka yapılarını da kapsar. Benzer şekilde, "heterosikloalkilen" terimi (kendi başına veya bir başka sübstitüentin parçası olarak), heterosikloalkilden türetilmiş iki değerlikli bir radikal anlamına gelir; "sikloalkilen" terimi de (kendi başına veya bir başka sübstitüentin parçası olarak), sikloalkilden türetilmiş iki değerlikli bir radikal anlamına gelir.

"Amino asit" terimi, doğal olarak meydana gelen ve doğal olmayan yolla meydana gelen amino asitlerin yanı sıra, doğal olarak meydana gelen amino asitlere benzer bir şekilde işlev gören amino asit analoglarını ve amino asit mimetiklerini ifade eder. Doğal olarak kodlanan amino asitler, 20 genel amino asit (alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glütamin, glütamik asit, glisin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin ve valin) ve pirolizin ve selenosisteindir. Amino asit analogları, doğal olarak meydana gelen bir amino asitle aynı temel kimyasal yapıya sahip bileşikler (yani, bir hidrojene, bir karboksil grubuna, bir amino grubuna veya homoserin, norlösin, metiyonin sülfoksit, metiyonin metil sülfonyum gibi bir R grubuna bağlı bir α karbon) ifade eder. Bu tip analoglar, modifiye edilmiş R gruplarına (norlösin gibi) veya modifiye edilmiş peptit omurgalarına sahiptir, ancak doğal olarak meydana gelen bir amino asitle aynı temel kimyasal yapıyı muhafaza eder. Bir amino aside yapılan atıf, örneğin doğal olarak meydana gelen proteojenik L-amino asitleri; D-amino asitleri; amino asit varyantları ve türevleri gibi kimyasal olarak modifiye edilmiş amino asitleri; α -alanin, ornitin ve benzerleri gibi doğal olarak meydana gelen proteojenik olmayan amino asitleri; ve teknikte amino asitler için karakteristik olduğu bilinen özelliklere sahip, kimyasal olarak sentezlenmiş bileşikler içerir. Doğal olmayan yolla meydana gelen amino asitlerin örnekleri, α -metil amino asitler (örneğin, α -metil alanin), D-amino asitler, histidin benzeri amino asitler (örneğin, 2-amino-histidin, α -hidroksi-histidin, homohistidin, α -florometil-histidin ve α -metil-histidin), yan zincirde fazladan bir metilene sahip amino asitler ("homo"

amino asitler), ve yan zincirde bir karboksilik asit fonksiyonel grubunun bir sülfonik asit grubuyla değiştirildiği amino asitleri (örneğin, sisteik asit) içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Amino asitler burada genel olarak bilinen üç harfli sembolleriyle, ya da IUPAC-IUB
5 Biyokimya Nomenklatür Komisyonu tarafından önerilen tek harfli sembolleriyle ifade edilebilir. Nükleotitler, benzer şekilde, genel olarak kabul edilen tek harfli kodlarıyla ifade edilebilir.

"Konservatif olarak modifiye edilmiş varyantlar", hem amino asit, hem nükleik asit dizileri için geçerlidir. Belirli nükleik asit dizileri açısından, "konservatif olarak modifiye edilmiş varyantlar", özdeş veya esas olarak özdeş amino asit dizilerini kodlayan nükleik asitleri, ya
10 da nükleik asidin, bir amino asit dizisini kodlamadığı yerlerde, esas olarak özdeş dizileri ifade eder. Genetik kodun yozlaşmasından dolayı, fonksiyonel açıdan özdeş olan çok sayıda nükleik asit, belirtilen herhangi bir proteini kodlar. Örneğin, GCA, GCC, GCG ve GCU kodonlarının tümü, amino asit alanini kodlar. Bu nedenle, bir alaninin bir kodonla
15 belirtildiği her konumda, kodon, kodlanmış polipeptit değiştirilmeden, tanımlanan müteakıl kodonlardan herhangi biriyle değiştirilebilir. Bu tip nükleik asit varyasyonları, konservatif olarak modifiye edilmiş varyasyonların bir türü olan "sessiz varyasyonlar"dır. Burada, bir polipeptiti kodlayan her nükleik asit dizisi, aynı zamanda, nükleik asidin her muhtemel sessiz varyasyonunu da tanımlar. Teknikte normal deneyim sahibi kişiler, bir
20 nükleik asitteki her kodonun (Metiyonin için normal olarak tek kodon olan AUG ve triptofan için normal olarak tek kodon olan TGG hariç), fonksiyonel açıdan özdeş bir molekül sağlamak için modifiye edilebildiğini kabul edecektir. Buna göre, bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asidin her sessiz varyasyonu, tanımlanan her dizinin içeriğinde mevcuttur.

Amino asit dizileriyle ilgili olarak, teknikte normal deneyim sahibi kişiler, kodlanmış dizide tek bir amino asidi veya amino asitlerin küçük bir yüzdesini değiştiren, ekleyen veya çıkaran bir nükleik asit, peptit, polipeptit veya protein dizisinde yapılan tek tek
25 sübstitüsyon, çıkarma veya katmanın bir "konservatif olarak modifiye edilmiş varyant" olduğunu ve burada söz konusu değişikliğin, bir amino asidin çıkarılmasına, bir amino asidin katılmasına veya bir amino asidin kimyasal açıdan benzer bir amino asitle
30 sübstitüsyonuna yol açtığını kabul edecektir. Fonksiyonel olarak benzer amino asitler sağlayan konservatif sübstitüsyon tabloları, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Bu tip konservatif olarak modifiye edilmiş varyantlar, bu buluşa ilave

niteliktedir ve buluşun polimorfik varyantlarını, türler arası homologlarını ve alellerini dışlamaz.

Fonksiyonel olarak benzer amino asitler sağlayan konservatif süstitüsyon tabloları, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Aşağıdaki sekiz grubun her biri,

5 bir diğeri için konservatif süstitüsyonlar olan amino asitler içerir:

1) Alanin (A), Glisin (G);

2) Aspartik asit (D), Glütamik asit (E);

3) Asparajin (N), Glütamin (Q);

4) Arjinin (R), Lizin (K);

10 5) İzolösün (I), Lösin (L), Metiyonin (M), Valin (V);

6) Fenilalanin (F), Tirosin (Y), Triptofan (W);

7) Serin (S), Treonin (T); ve

8) Sistein (C), Metiyonin (M)

(bakınız, örneğin, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman
15 & Co.; 2. Baskı (Aralık 1993)

İki veya daha çok nükleik asit veya polipeptit dizisi bağlamında "özdeş" veya yüzde "özdeşlik" terimleri, aynı olan iki veya daha çok diziyi veya alt diziyi ifade eder. Diziler, bir karşılaştırma penceresi, ya da aşağıdaki dizi karşılaştırma algoritmasından biri (veya teknikte normal deneyim sahibi kişilerce kullanılabilen diğere algoritmalar) kullanılarak
20 veya manüel hizalama ve görsel denetim yoluyla ölçüldüğü şekilde belirlenmiş rejyona göre maksimum tekabül etme için karşılaştırıldıklarında ve hizalandıklarında, aynı amino asit kalıntısı veya nükleotit yüzdesine sahip olmaları halinde "esas itibariyle özdeş"tir (yani, belirlenmiş rejyona göre yaklaşık %60 özdeşlik, yaklaşık %65, yaklaşık %70, yaklaşık %75, yaklaşık %80, yaklaşık %85, yaklaşık %90 veya yaklaşık %95 özdeşlik). Bu
25 tanım ayrıca, bir test dizisinin komplemanını da ifade eder. Özdeşlik, en azından yaklaşık 50 amino asit veya nükleotit uzunluğunda bir rejyon boyunca, veya 75 ila 100 amino asit veya nükleotit uzunluğunda bir rejyon boyunca, ya da belirtilmediği yerlerde, bir polinükleotit veya polipeptitin tüm dizisi boyunca mevcut olabilir. İnsan dışındaki türlerden homologlar dahil olmak üzere, mevcut açıklamanın bir polipeptitini kodlayan bir
30 polinükleotit, açıklamanın bir polinükleotit dizisine veya onun bir fragmanına sahip bir

etiketli proba, sıkı hibridizasyon koşulları altında bir kitaplığı tarama, ve söz konusu polinükleotit dizisini içeren tam uzunlukta cDNA ve genomik klonları izole etme aşamalarını içeren bir işlemle elde edilebilir. Bu tip hibridizasyon teknikleri deneyimli uzmanlarca iyi bilinmektedir.

- 5 Dizi karşılaştırması için, tipik olarak bir adet dizi, test dizilerinin karşılaştırıldığı bir referans dizisi olarak görev yapar. Bir dizi karşılaştırma algoritması kullanılırken, test ve referans dizileri bir bilgisayara girilir, gerekirse alt dizi koordinatları belirtilir ve dizi algoritma program parametreleri belirtilir. Varsayılan program parametreleri kullanılabilir veya alternatif parametreler belirtilebilir. Daha sonra dizi karşılaştırma algoritması,
- 10 program parametrelerini temel alarak, referans diziyeye göre test dizileri için yüzde dizi özdeşliklerini hesaplar.

- Burada kullanıldığı şekilde bir "karşılaştırma penceresi", 20 ila 600, genellikle yaklaşık 50 ila yaklaşık 200, daha genel olarak yaklaşık 100 ila yaklaşık 150'den oluşan gruptan seçilmiş herhangi bir sayıda bitişik pozisyondan oluşan bir segmente referansı içermekte
- 15 olup, burada bir dizi, iki dizinin optimum şekilde hizalanmasından sonra aynı sayıda bitişik pozisyondan oluşan bir referans dizisi ile karşılaştırılabilir. Karşılaştırma için dizileri hizalama usulleri, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Karşılaştırma için dizilerin optimum hizalanması, Smith ve Waterman'ın ((1970) Adv. Appl. Math. 2:482c) lokal homoloji algoritmasını, Needleman ve Wunsch'un ((1970) J. Mol. Biol.
 - 20 48:443) homoloji hizalama algoritmasını, Pearson ve Lipman'ın ((1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444) benzerlik arama usulünü, bu algoritmaların bilgisayarlı uygulamalarını (GAP, BESTFIT, FASTA ve TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), veya manüel hizalama ve görsel denetimi (bakınız, örneğin, Ausubel ve diğerleri, Current Protocols in Molecular Biology
 - 25 (1995 eki)) içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan yollarla yürütülebilir.

- Yüzde dizi özdeşliğini ve dizi benzerliğini belirlemek için uygun bir algoritmanın bir örneği, sırasıyla Altschul ve diğerleri (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, ve Altschul ve diğerleri (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 kapsamında açıklanan BLAST ve BLAST 2.0 algoritmalarıdır. BLAST analizlerini gerçekleştirmek için yazılım, World Wide Web'de
- 30 ncbi.nlm.nih.gov adresinde bulunan National Center for Biotechnology Information'dan halka açık olarak mevcuttur. BLAST algoritma parametreleri W, T ve X, hizalamanın hassasiyetini ve hızını belirler. BLASTN programı (nükleotit dizileri için), varsayılanlar olarak 11 kelime uzunluğu (W), bir tahmin (E) olarak 10, M=5, N=-4 ve her iki zincirin bir

karşılaştırmalarını kullanır. Amino asit dizileri için, BLASTP programı, varsayılanlar olarak 3 kelime uzunluğu ve tahmin (E) olarak 10, ve BLOSUM62 puanlama matrisi (bakınız, Henikoff ve Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) hizalamalar (B) 50, tahmin (E) olarak 10, M=5, N=-4 ve her iki zincirin bir karşılaştırmalarını kullanır. BLAST algoritması tipik olarak "düşük komplekslik" filtresi kapalı halde yürütülür.

BLAST algoritması ayrıca iki dizi arasındaki benzerliğin istatistiksel bir analizini de gerçekleştirir (bakınız, örneğin, Karlin ve Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). BLAST algoritmasıyla sağlanan bir benzerlik ölçüsü, iki nükleotit veya amino asit dizisi arasında tesadüfen bir eşleşmenin gerçekleşme ihtimali için bir gösterge sağlayan en küçük toplam ihtimalidir (P(N)). Örneğin, test nükleik asidi ile referans nükleik asidinin bir karşılaştırmada en küçük toplam ihtimali yaklaşık 0.2'den düşük, veya yaklaşık 0.01'den düşük, veya yaklaşık 0.001'den düşük olduğunda, bir nükleik asidin bir referans diziye benzer olduğu kabul edilir.

"Seçici olarak (veya spesifik olarak) hibritleşir" ifadesi, bir molekülün, söz konusu dizi kompleks bir karışım (sınırlayıcı olmamak üzere, toplam hücrel veya kitaplık DNA veya RNA dahil) içinde mevcut olduğunda, sıkı hibridizasyon koşulları altında sadece belirli bir nükleotit dizisine bağlandığı, duplekslendiği veya hibritleştiği anlamına gelir.

"Sıkı hibridizasyon koşulları" ifadesi, DNA, RNA, PNA dizilerinin veya diğer nükleik asit mimiklerinin veya bunların kombinasyonlarının, teknikte bilindiği gibi, düşük iyonik güç ve yüksek sıcaklık koşulları altında hibridizasyonu anlamına gelir. Tipik olarak, sıkı koşullar altında, bir prob, nükleik asidin bir kompleks karışımında (sınırlayıcı olmamak üzere, toplam hücrel veya kitaplık DNA veya RNA dahil) hedef alt dizisine hibritleşir, ancak kompleks karışımındaki diğer dizilere hibritleşmez. Sıkı koşullar diziye bağlıdır ve farklı durumlarda farklı olacaktır. Daha uzun diziler, spesifik olarak daha yüksek sıcaklıklarda hibritleşir. Nükleik asitlerin hibridizasyonu ile ilgili kapsamlı bir kılavuz, Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993) kapsamında bulunmaktadır. Genel olarak sıkı koşullar, tanımlanmış bir iyonik güç ve pH'ta spesifik dizi için termal erime derecesinin (T_m) yaklaşık 5°C ila 10°C altında olacak şekilde seçilir. T_m , hedefi tamamlayıcı problemlerin %50'sinin hedef diziye dengede (hedef diziler fazla miktarda mevcut olduğundan, T_m 'de problemlerin %50'si dengede tutulur) hibritleştiği sıcaklıktır (tanımlanmış iyonik güç, pH ve nükleik konsantrasyon altında). Sıkı koşullar, tuz konsantrasyonunun pH 7.0 ila 8.3'te yaklaşık 1.0 M'den düşük

sodyum iyonu, tipik olarak yaklaşık 0.01 ila 1.0 M sodyum iyonu konsantrasyonu (veya diğer tuzlar) olduğu ve sıcaklığın, kısa problar için (sınırlayıcı olmamak üzere, 10 ila 50 nükleotit dahil) en az yaklaşık 30°C, uzun problar için (sınırlayıcı olmamak üzere, 50 nükleotit üstü dahil) en az yaklaşık 60°C olduğu koşullar olabilir. Sıkı koşullar, formamid gibi destabilize edici maddelerin eklenmesiyle de sağlanabilir. Seçici veya spesifik hibridizasyonda, pozitif bir sinyal, arka planın en az iki katı, isteğe bağlı olarak arka plan hibridizasyonun 10 katı olabilir. Örnek sıkı hibridizasyon koşulları aşağıdaki gibi olabilir: 65°C'de 0.2X SSC, ve %0.1 SDS'de yıkama ile, 42°C'de inkübe edilerek %50 formamid, 5X SSC ve %1 SDS, veya 65°C'de inkübe edilerek 5X SSC, %1 SDS. Bu tip yıkamalar 5, 10 15, 30, 60, 120 dakika veya daha uzun süre boyunca gerçekleştirilebilir.

Burada kullanıldığı şekilde "ökaryot" terimi, hayvanlar (sınırlayıcı olmamak üzere, memeliler, böcekler, sürüngenler, kuşlar vs. dahil), kirpikliler, bitkiler (sınırlayıcı olmamak üzere, tek çenekliler, iki çenekliler, yosunlar vs. dahil), mantarlar, mayalar, kamçılılar, mikrosporidia, protistler ve benzerleri gibi Ökarya filogenetik bölgesine ait organizmaları ifade eder.

Burada kullanıldığı şekilde "ökaryot olmayan" terimi, ökaryotik olmayan organizmaları ifade eder. Örneğin, ökaryotik olmayan bir organizma, Öbakteriler (sınırlayıcı olmamak üzere, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* vs. dahil) filogenetik bölgesine, ya da Archaea (sınırlayıcı olmamak üzere, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium* türü NRC-1 gibi *Halobacterium*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix* vs. dahil) filogenetik bölgesine ait olabilir.

Burada kullanılan şekilde "denek" terimi, tedavi, gözlem veya deneyin konusu olan bir hayvanı, bazı düzenlemelerde bir memeliyi, ve diğer düzenlemelerde bir insanı ifade eder. Bir hayvan, bir refakatçi hayvan (örneğin, köpek, kedi ve benzerleri), çiftlik hayvanı (örneğin, sığır, koyun, at ve benzerleri) veya bir laboratuvar hayvanı (örneğin, sıçan, fare, kobay ve benzerleri) olabilir.

Burada kullanıldığı şekilde "etkin miktar" terimi, verilen modifiye edilmiş doğal olmayan amino asit polipeptitinin, tedavi edilmekte olan hastalık, rahatsızlık veya bozukluğun bir veya daha çok semptomunu bir ölçüde giderecek olan miktarını ifade eder. Burada açıklanan modifiye edilmiş doğal olmayan amino asit polipeptiti içeren bileşimler, profilaktik, arttırıcı ve/veya terapötik tedaviler için verilebilir.

"Arttırma" veya "arttırıcı" terimleri, arzu edilen bir etkinin gücünü veya süresini arttırmak veya uzatmak anlamına gelmektedir. Bu nedenle, terapötik maddelerin etkisini arttırmak açısından "arttırıcı" terimi, bir sistemdeki diğer terapötik maddelerin etkisini (güç veya süre olarak) arttırma veya uzatma kabiliyetini ifade eder. Burada kullanıldığı şekilde

5 "arttırıcı-etkin miktar", arzu edilen bir sistemdeki bir diğer terapötik maddenin etkisini arttırmak için yeterli bir miktarı ifade eder. Bir hastada kullanıldığında, bu kullanım için etkin miktarlar, hastalık, bozukluk veya rahatsızlığın şiddetine ve seyrine, önceki terapiye, hastanın sağlık durumuna ve ilaçlara tepkisine, ve tedaviyi yürüten hekimin kararına bağlı olacaktır.

- 10 Burada kullanıldığı şekilde "pozitif seçim" veya "tarama işareti", mevcut olduğunda (örneğin eksprese edildiğinde, aktif hale getirildiğinde vs.), pozitif seçim işaretine sahip bir hücrenin, pozitif seçim işaretine sahip olmayanlar arasından tanımlanmasına yol açan bir işareti ifade eder.

- 15 Burada kullanıldığı şekilde "negatif seçim" veya "tarama işareti", mevcut olduğunda (örneğin eksprese edildiğinde, aktif hale getirildiğinde vs.), arzu edilen bir özelliğe sahip olmayan bir hücrenin (örneğin, arzu edilen özelliğe sahip bir hücreye kıyasla) tanımlanmasına imkan veren bir işareti ifade eder.

- Burada kullanıldığı şekilde "haberci" terimi, ilgilenilen bir sistemin hedef bileşenlerini seçmek için kullanılabilen bir bileşeni ifade eder. Örneğin, bir haberci, antibiyotik direnci
- 20 veya hassasiyeti kazandıran bir protein, örneğin bir enzim (sınırlayıcı olmamak üzere, β -laktamaz, kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) ve benzerleri dahil), bir floresan tarama işareti (sınırlayıcı olmamak üzere, yeşil floresan proteini (örneğin, GFP), YFP, EGFP, RFP dahil), bir luminesan işaret (sınırlayıcı olmamak üzere, bir ateşböceği lusiferaz proteini dahil), afinite bazlı bir tarama işareti, ya da lacZ, β -gal/lacZ (β -galaktosidaz), ADH (alkol
- 25 dehidrojenaz), his3, ura3, leu2, lys2 veya benzerleri gibi pozitif veya negatif seçilebilir işaret genlerini içerebilir.

- Burada kullanıldığı şekilde "ökaryot" terimi, hayvanlar (sınırlayıcı olmamak üzere, memeliler, böcekler, sürüngenler, kuşlar vs. dahil), kirpikliler, bitkiler (sınırlayıcı olmamak üzere, tek çenekliler, iki çenekliler, yosunlar vs. dahil), mantarlar, mayalar, kamçılılar,
- 30 mikrosporidia, protistler ve benzerleri gibi Ökarya filogenetik bölgesine ait organizmaları ifade eder.

Burada kullanıldığı şekilde "ökaryot olmayan" terimi, ökaryotik olmayan organizmaları ifade eder. Örneğin, ökaryotik olmayan bir organizma, Öbakteriler (sınırlayıcı olmamak üzere, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* vs. dahil) filogenetik bölgesine, ya da Archaea (örneğin, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium* türü NRC-1 gibi *Halobacterium*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix* vs. dahil) filogenetik bölgesine ait olabilir.

Aşağıdaki sınırlayıcı olmayan viral zarf proteini örnekleri de dahildir: filovirüsler (Ebola virüsü gibi), ortomiksovirüsler (grip virüsü gibi), VSV-G, alfa virüsler (Semliki orman virüsü ve Sindbis virüsü gibi), arena virüsleri (lenfositik koryomenenjit virüsü gibi), flavivirüsler (keneden bulaşan ensefalit virüsü ve Dengue virüsü gibi), rabdovirüsler (veziküler stomatit virüsü ve kuduz virüsü gibi), Moloney lösemi virüsü, HSV, VZV, Kabakulak virüsü, Rinovirüsler, Kızamık, Kızamıkçık, Arbovirüs, Enterovirüsler (Çocuk felci, Cocksackie, Echovirüsler gibi), Poliovirüs, Cocksackie B, A ve Ekovirüs, Rinovirüsler, Hepatit virüsleri, Norwalk virüsü, Astrovirüsler, Togavirüs, Alfavirüsler, Pestivirüsler, Koronavirüs, Parainfluenza, Kabakulak virüsü, Kızamık virüsü, Solunum Sinsitiyal Virüsü (RSV), Bunyaviridae, Reoviridae, Reovirüsler, Rotavirüsler, HTLV, Polyoma virüsleri, Papilloma virüsleri, Adenovirüsler, Parvovirüsler, EBV, CMV, Varicella Zoster virüsü, herpes virüsleri ve Poks virüslerinden zarf proteinleri.

Konservatif varyant: "Konservatif varyant" terimi, fonksiyonel olarak, konservatif varyantın dayandığı bileşen, örneğin bir O-tRNA veya O-RS gibi görev yapan, ancak dizide varyasyonlara sahip olan bir translasyon bileşenini, örneğin bir konservatif varyant O-tRNA veya bir konservatif varyant O-RS'yi ifade eder. Örneğin, O-tRNA ve konservatif varyant O-tRNA aynı diziye sahip olmadıkları halde, bir O-RS, tamamlayıcı bir O-tRNA'yı veya bir konservatif varyant O-tRNA'yı seçilmiş bir amino asitle, örneğin doğadışı bir amino asitle aminoasitler. Benzer şekilde, O-RS ve konservatif varyant O-RS aynı diziye sahip olmadıkları halde, bir tRNA, tamamlayıcı bir O-RS veya bir konservatif varyant O-RS tarafından, seçilmiş bir amino asitle, örneğin doğadışı bir amino asitle aminoasitlenir.

Konservatif varyant, konservatif varyantın mütakabil O-tRNA veya O-RS için tamamlayıcı olması koşuluyla, dizide örneğin bir varyasyona, iki varyasyona, üç varyasyona, dört varyasyona ya da beş veya daha çok varyasyona sahip olabilir.

Seçim veya tarama maddesi: Burada kullanıldığı şekilde "seçim veya tarama maddesi" terimi, mevcut olduğunda, bir popülasyondan belirli bileşenlerin bir seçimine/taranmasına imkan veren bir maddeyi ifade eder. Örneğin, bir seçim veya tarama maddesi, örneğin bir besin, bir antibiyotik, bir ışık dalga boyu, bir antikör, eksprese edilen bir polinükleotit veya benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Seçim maddesi, örneğin konsantrasyon, yoğunluk ve benzerlerine göre değişebilir.

"Verimli bir şekilde tanınmayan" terimi, bir adet organizmadan bir RS'nin O-tRNA'yı aminoasillendiği bir verimliliği (örneğin, yaklaşık %10'dan az, yaklaşık %5'ten az veya yaklaşık %1'den az) ifade eder.

10 DETAYLI AÇIKLAMA

Şimdiye kadar, aşılar, ölü veya zayıflatılmış organizmalarla üretilenlerle sınırlı olmuştur. Mikroorganizmanın ısı, UV, formalaldehit işlemiyle öldürülmesi, azalan doğal epitoplara yol açar; zayıflatılmış virüsler ise, özellikle genç hastalar, yaşlı hastalar, yetersiz immün sistemlerine sahip olanlar için bir risk oluşturacak şekilde, tipik olarak son derece düşük, ancak sıfır olmayan replikasyona neden olan gen çıkarma ve tepesini kesme yoluyla üretilir.

Bir düzenlemede mevcut buluş, modifiye edilmiş tam organizma aşılar sağlar. Bir başka düzenlemede mevcut buluş, bir veya daha çok doğal olmayan amino asitte replikasyona bağımlı genetik olarak modifiye edilmiş tam organizma aşıları sağlamaktadır. Mevcut açıklama, adjuvanlarla veya adjuvanlar olmadan kullanılabilen, doğal mikroorganizmaların dahil edildiği aşılar sağlamaktadır. Bunlar ayrıca oldukça immünojenik olan yüksek yoğunlukta doğal epitoplar sağlayabilir ve hümmoral ve T hücre aracılı tepkileri tetikler, böylece daha etkin bir aşı sağlar. Mevcut açıklama, bir veya daha çok doğal olmayan, doğadışı veya doğal olmayan bir şekilde kodlanmış amino asidi, virüs veya bakteride bir veya daha çok bölgede dahil eden aşılar sağlar. Mevcut açıklamanın bazı düzenlemelerinde, doğal olmayan bir şekilde kodlanmış amino asit, mikroorganizmanın replikasyon için gereken bir parçasında dahil edilir, böylece zayıflatılmış virüslerle ilişkili riskler ortadan kaldırılır ve virüsü/bakteriyi öldürme ihtiyacı ortadan kaldırılır. Doğal olmayan bir şekilde kodlanmış amino asidin/asitlerin dahil edildiği aşı, yapısal olarak doğal mikroorganizmaya son derece yakın, ancak replikasyon kabiliyeti olmayan veya doğal bir ortamda ancak sınırlı replikasyon kabiliyeti olan bir mikroorganizma sağlar. Mikroorganizma replikasyonunun mutlak denetimleri, stop kodonu baskılaması kullanarak zorunlu gen ekspresyonunu (fonksiyon) denetlemek için, amino asitlerin aşağıdaki

açıklanan bölgeye özgü şekilde dahil edilmesi kullanılarak gerçekleştirilir. Virüslerde, bir konakçı üretimi hücre türü, gelişme için gereken doğadışı bir amino asidi bölgeye özgü olarak dahil eder. Bakterilerde, genom, bir veya daha çok sayıda bölgeye özgü olarak dahil edilmiş amino asit içerecek şekilde tasarlanır.

- 5 Kontrol için zorunlu gen fonksiyonu, genetik ve yapısal fonksiyonel seviyelerde gerçekleştirilebilir. Örneğin, Tablo 2 Genetik seviyede, tam uzunlukta zorunlu gen, doğal olmayan yolla dahil edilmiş amino asidin mevcudiyetinde eksprese edilir. Yapısal fonksiyonel seviyede, zorunlu gen, doğadışı amino asidin sadece spesifik bir bölgede mevcudiyetinde fonksiyonel olarak şekilde tasarlanır. Bu bölgede herhangi bir doğal amino
- 10 asidin dahil edilmesi, onun doğal fonksiyonunun yok edilmesine yol açar. Doğadışı amino asidi/asitleri seçme serbestliği, teknikte deneyimli bir kişinin, arzu edilen aşının immünojenikliğini ve çok fazla veya aşırı denetimli replikasyonun serbestliğini düzenlemesini sağlamakta olup, burada geleneksel olarak, replikasyonun azaltılması ile üretim arasında denge kurulması gerekli olmuştur, ve doğal olmayan bir amino asidin
- 15 bölgeye özgü olarak dahil edilmesi, doğadışı amino asit mevcut olmadığında sıfır replikasyon kabiliyetine sahip bir aşı için geliştirme araçları sağlar.

Bu teknolojinin kullanılması için aşılarda geliştirilebildiği bakteriler ve virüsler, bilinen virüsleri içerir. Bu, sınırlayıcı olmayan örneklerde, insan rinovirüsler (HRV), adenovirüs, coxsackie virüsü, grip, parainfluenza, solunum sinsityal virüsü (RSV), Epstein-Barr Virüsü

20 (EBV) ve sitomegalovirüs (CMV) gibi üst solunum yolunu etkileyen virüsleri; rotavirüs, Norwalk ajanı, hepatit A (HAV), poliovirüs ve diğer pikorna virüsleri gibi mide-bağırsak (GI) kanalını etkileyen virüsleri; sınırlayıcı olmamak üzere, insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV), insan papilloma virüsü (HPV), herpes simpleks virüsü (HSV) 1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7 ve HHV-8'i içeren cinsel yolla bulaşan virüsleri;

25 CMV, hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsünü (HCV) içerir. Bakterilerin sınırlayıcı olmayan örnekleri, Staphylococcus, Streptococcus, Mycobacterium (örneğin, *Mycobacterium avium*, ve *Mycobacterium avium* alt türü *paratuberculosis*), Enterococcus, Corynebacterium, Borrelia, Bacillus, Chlamydia, Mycoplasma ve benzerleri dahil olmak üzere, hem gram pozitif, hem gram negatif bakterileri içerir.

- 30 Bir veya daha çok seçilmiş amino asit, örneğin bir doğadışı amino asit içeren proteinlerin yapımı için uygun translasyon sistemleri, "METHODS AND COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF ORTHOGONAL tRNA-AMINOACYL tRNA SYNTHETASE PAIRS" başlıklı A.B.D. patent başvuruları 10/126,931, ve "IN VIVO INCORPORATION

- OF UNNATURAL AMINO ACIDS" başlıklı 10/126,927'de açıklanmaktadır. Ayrıca bakınız, "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE" başlıklı USSN 10/825,867. Bu tip translasyon sistemleri genel olarak bir ortogonal tRNA (O-tRNA), bir ortogonal aminoasıl tRNA sentetaz (O-RS), ve seçilmiş bir amino asit, örneğin doğadışı bir amino asit içeren hücreleri kapsamakta olup, burada O-RS, seçilmiş amino asitle O-tRNA'yı aminoasiller. Burada açıklanan bir ortogonal çift, bir O-tRNA, örneğin bir baskılayıcı tRNA, bir çerçeve kayması tRNA veya benzeri ile bir O-RS'den oluşur. O-tRNA, bir birinci selektör kodonu tanır ve bir selektör kodona tepki olarak aynı türden bir sentetaz mevcudiyetinde baskılama aktivitesine sahiptir. Hücre, seçilmiş amino asidi büyüyen bir polipeptit zincirine dahil etmek için bileşenleri kullanır. Örneğin, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan bir polinükleotiti içeren bir nükleik asit de mevcut olabilir; burada polinükleotit, O-tRNA tarafından tanınan bir selektör kodon içerir. Translasyon sistemi bir *in vitro* sistem de olabilir. Burada açıklanan tRNA molekülleri, translasyonda ribozomları kullanan sistemler dahil olmak üzere, herhangi bir translasyon sisteminde yararlıdır.
- 15 Translasyon sistemi hücresiz (*in-vitro*) bir translasyon sistemi de olabilir. Bir şablon olarak mRNA (*in-vitro* translasyon) veya bir şablon olarak DNA (birleşik *in-vitro* kopyalama ve translasyon) içeren bu sistemlerde, *in vitro* sentez, ribozomlar tarafından yönlendirilir. Hücresiz protein ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesi için önemli çalışmalar yürütülmüştür. Bakınız, örneğin Kim, D.M. ve J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. ve J.R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M. ve J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M. ve J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); ve Patnaik, R. ve J.R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); A.B.D. Patenti No. 6,337,191; A.B.D. Patent Yayını No. 2002/0081660; WO 00/55353; WO 90/05785.
- 25 Uygulanabilen bir diğer yaklaşım, mRNA-peptit füzyon tekniğini içerir. Bakınız, örneğin, R. Roberts ve J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 94:12297-12302 (1997); A. Frankel ve diğerleri, *Chemistry & Biology* 10:1043-1050 (2003). Bu yaklaşımda, puromisine bağlanmış bir mRNA şablonu, ribozomdaki bir peptite çevrilir. Bir veya daha çok tRNA molekülünün modifiye edilmiş olması halinde, doğal olmayan amino asitler, peptite de dahil edilebilir. Son mRNA kodonunun okunmasından sonra, puromisin, peptitin C-terminusunu yakalar. Bir *in vitro* deneyde, ortaya çıkan mRNA-peptit konjugatının ilginç özelliklere sahip olduğu tespit edilirse, özdeşliği, mRNA dizisinden kolayca ortaya çıkarılabilir. Bu şekilde, arzu edilen özelliklere sahip polipeptitlerin tanımlanması için, bir

veya daha çok sayıda doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asit içeren polipeptitlerden oluşan kitaplıklar taranabilir. Daha yakın zamanlarda, saflaştırılmış bileşenlerle, doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asitlerle sübstitüe edilen peptitlerin sentezine izin veren in vitro ribozom translasyonları rapor edilmiştir. Bakınız, örneğin A. Forster ve diğerleri, 5 Proc. Natl Acad. Sci. (USA) 100:6353 (2003).

Doğal olmayan bir amino asidin, bir zorunlu gen ürününe dahil edildiği bir hücre (örneğin, bir bakteri) açıklanmaktadır. Mevcut buluşta, bir hücre, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir bakteri, doğal olmayan bir amino 10 asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Ayrıca, doğal olmayan bir amino asidin, bir zorunlu gen ürününe dahil edildiği bir virüs açıklanmaktadır. Bu açıklamanın diğer düzenlemelerinde, bir virüs, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir 15 mycobacterium avium alt türü paratuberculosis hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir menenjit hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir kuduz hücresi, doğal 20 olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir yosun hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir virüs hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe 25 dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir bakteri hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir mantar hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Ayrıca, doğal olmayan bir amino asidin, zorunlu bir gen ürününe dahil edildiği mycobacterium avium alt türü paratuberculosis, menenjit, kuduz, yosun, virüs, bakteri ve 30 mantar hücreleri açıklanmaktadır.

Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir polio hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Mevcut buluşun diğer düzenlemelerinde, bir *E. coli* hücresi, doğal olmayan bir amino asidi, replikasyon için gereken bir gen ürününe dahil etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Ayrıca, doğal olmayan bir amino asidin, bir zorunlu gen ürününe dahil edildiği polio, *E. coli* ve mycobacterium hücreleri açıklanmaktadır.

Belirli düzenlemelerde, mevcut buluşun genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan amino aside bağımlı hücreleri, bir aşı üretmek için kullanılabilir. Mevcut buluşun genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan amino aside bağımlı hücrelerinin, bir aşı olarak uygulanabilen antikolar üretmek için kullanılabildiği de açıklanmaktadır. Belirli düzenlemelerde, mevcut buluşun genetik olarak modifiye edilmiş, doğal olmayan amino aside bağımlı hücreleri, bir inokülasyonda kullanılabilir.

Belirli düzenlemelerde, mevcut açıklamanın tRNA'sını içeren bir *E. coli* hücresi, bu tip bir translyasyon sistemini içermektedir. Örneğin, mevcut buluşun *E. coli* hücresi, O-tRNA'nın, bir selektör kodona tepki olarak aynı türden bir sentetaz mevcudiyetinde baskılama aktivitesi içerdiği bir ortogonal tRNA (O-tRNA); bir ortogonal aminoaçil-tRNA sentetaz (O-RS); seçilmiş bir amino asit; ve polinükleotitin, O-tRNA tarafından tanınan bir selektör kodon içerdiği, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan bir polinükleotit içeren bir nükleik asidi kapsar.

Birden çok seçilmiş amino asidin dahil edilmesine izin veren bir hücrede birden çok O-tRNA/O-RS çifti de kullanılabilir. Belirli düzenlemelerde, hücre ayrıca, ilave bir farklı O-tRNA/O-RS çifti ve ikinci bir seçilmiş amino asit içerebilmekte olup, burada O-tRNA, ikinci bir selektör kodonu tanıır; O-RS ise tercihen, ikinci seçilmiş amino asitle O-tRNA'yı aminoaçiller. Örneğin, bir hücre ayrıca, örneğin, *Methanococcus jannaschii*'nin tirozil-tRNA sentetazından türetilmiş bir amber baskılayıcı tRNA-aminoaçil tRNA sentetaz çifti içerebilir.

O-tRNA ve/veya O-RS, doğal olarak meydana gelebilir ya da örneğin, çeşitli organizmalardan tRNA'ların kitaplıklarını ve/veya RS'lerin kitaplıklarını oluşturan, doğal olarak meydana gelen bir tRNA ve/veya RS'nin mutasyonu yoluyla türetilir. Örneğin, bir ortogonal tRNA/aminoaçil-tRNA sentetaz çifti üretmek için bir strateji, konakçı hücreye, örneğin, konakçı hücre dışındaki bir kaynaktan veya birden çok kaynaktan bir

heterojen tRNA/sentetaz çifti alınmasıdır. Heterolog sentetaz adayının özellikleri, örneğin, herhangi bir konakçı hücre tRNA'sını yüklememeyi, heterolog tRNA adayının özellikleri ise, örneğin, herhangi bir konakçı hücre sentetazı tarafından aminoasillenmemeyi içerir. İlave olarak, heterolog tRNA, tüm konakçı hücre sentetazlarına ortogonaldır.

- 5 Bir ortogonal çift oluşturmak için ikinci bir strateji, bir O-tRNA veya O-RS taramak ve/veya seçmek için mutant kitaplıkların oluşturulmasını kapsar. Bu stratejiler birleştirilebilir.

Çeşitli düzenlemelerde, O-tRNA ve O-RS, en az bir adet organizmadan türetilir. Bir başka düzenlemede, O-tRNA, bir birinci organizmadan, doğal olarak meydana gelen veya
10 mutasyona uğratılmış doğal olarak meydana gelen bir tRNA'dan türetilir; O-RS ise ikinci bir organizmadan, doğal olarak meydana gelen veya mutasyona uğratılmış doğal olarak meydana gelen RS'den türetilir. Bir düzenlemede, birinci ve ikinci organizmalar farklıdır. Örneğin, bir ortogonal çift, *Methanobacterium thermoautotrophicum*'dan türetilmiş bir tRNA sentetaz ve bir arke tRNA'sından (örneğin, *Halobacterium sp. NRC-1*'den) türetilmiş
15 bir tRNA içerebilir. Alternatif olarak, birinci ve ikinci organizmalar aynı olabilir. İlave bilgiler için "Kaynaklar ve Konakçı Organizmalar" başlıklı bölüme bakınız.

Mevcut buluşun belirli düzenlemelerinde, mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sı, DİZİ ID NO.: 1, 2 veya 3'te ortaya konduğu gibi bir polinükleotit dizisi, ya da onun bir tamamlayıcı polinükleotit dizisi, ya da onun konservatif bir varyasyonunu içerir veya onun tarafından
20 kodlanır. Ayrıca buradaki "Nükleik Asit ve Polipeptit Dizi ve Varyantları" başlıklı bölüme bakınız.

Ortogonal tRNA (O-tRNA)

Bir ortogonal tRNA (O-tRNA), seçilmiş bir amino asidin, örneğin in vivo veya in vitro olarak, O-tRNA tarafından tanınan bir selektör kodon içeren bir polinükleotit tarafından
25 kodlanan bir proteine dahil edilmesine aracılık eder. Mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sı, kimyasal veya enzimatik aminoasılasyon dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, herhangi bir usul veya teknikle, arzu edilen bir amino asitle aminoasillenebilir. Mevcut açıklamanın aminoasillenmiş O-tRNA'sı doğrudan bir translasyon sistemine ilave edilebilir. Mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sı, in vitro veya in vivo olarak, bir RS
30 tarafından seçilmiş bir amino asitle aminoasillenebilir. Ayrıca, RS, bir O-RS olabilir. Mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sı, doğrudan ya da bir O-tRNA veya onun bir bölümünü kodlayan bir polinükleotit sağlama yoluyla translasyon sistemine (örneğin, in vitro

translasyon bileşenleri, veya bir hücre) sağlanabilir. Örneğin, bir O-tRNA veya bir bölümü, DİZİ ID NO.: 1, 2, 3'te ortaya konduğu gibi bir polinükleotit dizisi veya onun bir tamamlayıcı polinükleotit dizisi veya onun bir konservatif varyasyonu ile kodlanır.

- 5 Mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sı, bir selektör kodona tepki olarak aynı türden bir sentetaz mevcudiyetinde baskılama aktivitesi içerir. Baskılama aktivitesi, teknikte bilinen çeşitli deneylerden herhangi biriyle belirlenebilir. Örneğin, bir β -galaktosidaz haberci deneyi kullanılabilir. Promoter kontrolü altında *lacZ* geni eksprese eden bir plazmitin bir türeği kullanılmakta olup, örneğin burada *lacZ*'nin VVLQRRDWEN peptidinin Leu-25'i, bir selektör kodonla (örneğin, TAG, TGA, AGGA vs. kodonları) ya da tirozin, serin, lösin
- 10 vs. için sens kodonlarıyla (bir kontrol olarak) değiştirilir. Türetilmiş *lacZ* plazmiti, mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sını içeren plazmitle birlikte, uygun bir organizmadan (örneğin, ortogonal bileşenlerin kullanılabildiği bir organizmadan) hücrelere dahil edilir. Aynı türden bir sentetaz da dahil edilebilir (eksprese edildiğinde aynı türden sentetazı kodlayan bir polipeptit veya bir polinükleotit olarak). Hücreler, ortam içinde arzu edilen yoğunluğa
- 15 kadar, örneğin yaklaşık 0.5 seviyesinde OD₆₀₀'e kadar büyütülür ve örneğin BetaFluor™ β -Galaktosidaz Deney Kiti (Novagen) kullanılarak β -galaktosidaz deneyleri yürütülür. Yüzde baskılama, karşılaştırılabilir bir kontrole, örneğin türetilmiş *lacZ* yapısından gözlenen değere kıyasla bir numune için aktivitenin yüzdesi olarak hesaplanmakta olup, burada yapı, bir selektör kodon yerine arzu edilen pozisyonda mükabil bir sens kodonuna sahiptir.
- 20 tRNA molekülünde, Timin (T), Urasil (U) ile değiştirilir. Ayrıca, bazlarda ilave modifikasyonlar mevcut olabilir. Ayrıca O-tRNA'nın konservatif varyasyonları açıklanmaktadır. Örneğin, O-tRNA'nın konservatif varyasyonları, O-tRNA gibi fonksiyon gerçekleştiren moleülleri içerir ve tRNA L şekilli yapıyı muhafaza eder, ancak aynı diziye sahip değildir (ve vahşi tip tRNA moleüllerinden farklıdır). Ayrıca buradaki "Nükleik
- 25 Asit ve Polipeptit Dizi ve Varyantları" başlıklı bölüme bakınız.

- Bir O-tRNA içeren bileşim ayrıca, bir ortogonal aminoasil-tRNA sentetaz (O-RS) içerebilmekte olup, burada O-RS, tercihen, O-tRNA'yı seçilmiş bir amino asitle (örneğin, doğadışı bir amino asitle) aminoasiller. Belirli düzenlemelerde, bir O-tRNA içeren bir bileşim ayrıca bir translasyon sistemi (örneğin, bir in vitro veya bir in vivo translasyon
- 30 sistemi) içerebilir. Hücrede veya diğer translasyon sisteminde, polinükleotitin, O-tRNA tarafından tanınan bir veya daha çok selektör kodon ya da bunlardan bir veya daha fazlasının bir kombinasyonunu içerdiği, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan bir

polinükleotiti içeren bir nükleik asit de mevcut olabilir. Ayrıca buradaki "Ortogonal Aminoasıl-tRNA Sentetazlar (O-RS)" başlıklı bölüme bakınız.

Burada ayrıca bir ortogonal tRNA (O-tRNA), örneğin bir O-tRNA üretmek için usuller de açıklanmaktadır. Bu usulle üretilen bir tRNA, örneğin bir O-tRNA da mevcut açıklamanın bir özelliğidir.

Bir ortogonal tRNA üretme usulleri, bir selektör kodonun (örneğin, bir amber kodon, bir opal kodon, dört bazlı bir kodon vs.) tanınmasına imkan vermek için her bir tRNA havuzunun antikodon ilmeğini mutasyona uğratma ve böylece çok sayıda potansiyel O-tRNA sağlama; ve ikincil yapıdaki kanonik olmayan baz çiftlerini tanımlamak için çok sayıda potansiyel O-tRNA'nın bir üyesinin ikincil yapısını analiz etme, ve isteğe bağlı olarak kanonik olmayan baz çiftlerini mutasyona uğratmayı (örneğin, kanonik olmayan baz çiftleri, kanonik baz çiftleri yönünde mutasyona uğratılır) içerir. Kanonik olmayan baz çiftleri, ikincil yapının kök rejyonunda yer alabilir. Bir O-tRNA, arzu edilen bir RS'ye yönelik afinitesini korurken, başlangıç malzemesine (örneğin, çok sayıda tRNA dizisi) kıyasla, bir veya daha çok karakteristik veya aktivitenin, arzu edilen bir organizma için ortogonalitedeki gelişme gibi bir gelişmesine sahip olabilir.

Alternatif olarak, O-tRNA'lar, translasyonu etkileyen veya translasyon mekanizmasının bileşenleri olan bir veya daha çok molekülle etkileşimini veya bunlara bağlanma afinitesini modüle etmek için, bilinen bir tRNA'nın mutasyona uğratılması yoluyla geliştirilebilir. Bu tip bileşenler, uzama faktörlerini içerir, ancak onlarla sınırlı değildir. Bakteri uzama faktörü EF-Tu, protein sentezindeki uzama aşamasında temel bir rol oynar. tRNA'nın tRNA sentetazıyla aminoasılasyonunun ardından, EF-Tu, aminoasıllanmış tRNA'yı bağlar ve onu, ribozomun A bölgesine getirir. Yüklənmiş amino asit ile tRNA arasındaki ester bağı, EF-Tu ile aminoasıllanmış tRNA arasındaki bağlanmadan kaynaklanan spontan hidrolizden korunur. Stortchevoi ve arkadaşları, TΨC kökündeki *E. coli* başlatıcı tRNA^{fMet} U50:G64 wobble baz çiftinin mutantlarını araştırdı, çünkü bu baz çiftinin, muhtemelen EF-Tu.GTP ile aminoasıllanmış tRNA arasındaki zayıflatılmış bir etkileşimden dolayı, tRNA'nın uzamadaki aktivitesini bloke eden ikincil bir negatif determinant olduğu tespit edilmişti (JBC 2003 278(20):17672-17679). Ayrıca, LaRiviere ve diğerleri, Science'da (5 Ekim 2001;294(5540):165-8), amino asit ve tRNA cisminin, EF-Tu'ya genel bağlayıcı afiniteye termodinamik katkılarını açıkladılar. tRNA cismi ve amino asidin katkılarının birbirinden bağımsız olduğu ve tRNA'lar doğru olarak açillendiğinde birbirlerini dengelediklerini belirttiler. EF-Tu.GTP ile, doğadışı amino asitle aminoasıllanmış tRNA

arasındaki etkileşimde değişiklikler, tRNA'nın, ribozomun A bölgesine yüklenme verimliliğini etkileyebilir. tRNA ile, translasyon mekanizmasının EF-Tu gibi diğer bileşenleri arasındaki komplekslerin kristal yapılarının analiz edilmesiyle de potansiyel mutasyon bölgeleri tespit edilebilir. Örneğin, Nissen ve diğerleri, EF-Tu.GTP'nin, doğrudan maya fenilalanil-transfer RNA'nın (Phe-tRNA) TΨC kökünün fosfat omurgasına bağlandığını belirttiler (Science 1995 270(5241):1464-1472).

Usuller, isteğe bağlı olarak, bir O-tRNA, O-RS ve/veya bunların çiftlerinin, spesifik bir organizma için ortogonal oldukları görülen potansiyel adaylarını belirlemek üzere, tRNA'ların dizilerinin ve/veya aminoasit-tRNA sentetazlarının homolojilerinin analiz edilmesini içerir. Analiz için, teknikte bilinen ve burada açıklanan bilgisayar programları kullanılabilir. Bir prokaryotik organizmada kullanım için potansiyel ortogonal translasyon bileşenlerini seçmek üzere, prokaryotik organizmalara olağandışı homoloji göstermeyen bir sentetaz ve/veya bir tRNA seçilir.

Bir konsensus stratejisi ile bir tRNA havuzu da üretilebilir. Örneğin, tRNA havuzu, çok sayıda tRNA dizisini hizalama; bir konsensus dizisi belirleme; ve konsensus dizisinin bir bölümünü, çoğunu veya tamamını kullanarak bir tRNA kitaplığı oluşturma yoluyla üretilir. Örneğin bir konsensus dizisi, bir bilgisayar programı (örneğin, GCG programı *pileup*) ile derlenebilir. İsteğe bağlı olarak, programla belirlenen dejenere pozisyonlar, bu pozisyonlardaki en sık baz olacak şekilde değiştirilir. Bir kitaplık, bu alanda bilinen tekniklerle, konsensus dizisi kullanılarak sentezlenir. Örneğin, konsensus dizisine dayanan kitaplığı sağlamak için, tRNA geninin her bölgesinin %90 konsensus dizisi ile %10 diğer 3 bazın bir karışımından oluşan katkılı bir karışım olarak sentezlenebildiği oligonükleotitlerin örtüşme uzantısı kullanılabilir. Örneğin, %75 konsensus dizisi ve %25 diğer 3 bazın bir karışımı, %80 konsensus dizisi ve %20 diğer 3 bazın bir karışımı, %95 konsensus dizisi ve %5 diğer 3 bazın bir karışımı ve benzerleri gibi başka karışımlar da kullanılabilir.

Mutant tRNA'ların kitaplıkları, bu alanda bilinen çeşitli mutajenez teknikleri kullanılarak oluşturulabilir. Örneğin, mutant tRNA'lar, bölgeye özgü mutasyonlar, rasgele nokta mutasyonlar, homolog rekombinasyon, DNA karıştırma veya diğer tekrarlamalı mutajenez usulleri, kimerik yapı veya bunların herhangi bir kombinasyonu ile oluşturulabilir.

Bir tRNA'nın arzu edilen bir ilmeğinde veya rejyonunda, örneğin bir antikodon ilmeği, akseptör kökü, D kolu veya ilmeği, değişken ilmek, TΨC kolu veya ilmeği, tRNA molekülünün diğer rejyonları veya bunların bir kombinasyonunda spesifik bir

pozisyonda/pozisyonlarda, örneğin konservatif olmayan bir pozisyonda/pozisyonlarda, veya konservatif bir pozisyonda/pozisyonlarda, rasgele bir pozisyonda/pozisyonlarda ya da bunların bir kombinasyonunda ilave mutasyonlar eklenebilir. Mutasyonlar, kök rejyonundaki eşleşen baz çiftlerini içerebilir.

- 5 Tipik olarak bir O-tRNA, hücrelerin çok sayıda potansiyel O-tRNA'nın bir üyesini içerdiği bir birinci türden hücre popülasyonunu negatif seçime tabi tutma yoluyla elde edilir. Negatif seçim, çok sayıda potansiyel O-tRNA'nın, hücrelere endojen olan bir aminoasıl-tRNA sentetazı (RS) ile aminoasılillenmiş bir üyesini içeren hücreleri ortadan kaldırır. Bu, birinci türden hücreye ortogonal tRNA'ların bir havuzunu sağlar.
- 10 Negatif seçimin belirli düzenlemelerinde, bir negatif seçim işaretini (örneğin, antibiyotik direnci kazandıran bir enzim, örneğin β -laktamaz, saptanabilir bir ürün sağlayan bir enzim, örneğin β -galaktosidaz, kloramfenikol asetiltransferaz (CAT), örneğin zorunlu olmayan bir pozisyonda barnaz gibi toksik bir ürün vs.) kodlayan polinükleotide bir selektör kodon dahil edilir. Tarama/seçim, hücre popülasyonunun bir seçim maddesinin (örneğin,
- 15 ampisilin gibi bir antibiyotik) mevcudiyetinde büyütülmesi yoluyla yapılabilir. Bir düzenlemede, seçim maddesinin konsantrasyonu değişkendir.

- Örneğin, baskılayıcı tRNA'nın aktivitesini ölçmek için, selektör kodonun *in vivo* baskılanmasına dayanan bir seçim sistemi, örneğin β -laktamaz (*bla*) için bir gen gibi bir negatif seçim işaretini kodlayan bir polinükleotide katılan nonsens veya çerçeve kayması
- 20 mutasyonları kullanılır. Örneğin, belirli bir pozisyonda, örneğin TAG, AGGA ve TGA ile polinükleotit varyantları, örneğin *bla* varyantları oluşturulur. Hücreler (örneğin bakteriler) bu polinükleotitlerle dönüştürülür. Endojen *E. coli* sentetazları ile verimli şekilde yüklenemeyen bir ortogonal tRNA durumunda, antibiyotik direnci (örneğin ampisilin direnci), yaklaşık olarak plazmit olmadan dönüştürülmüş bir bakteriye direnç kadar, veya
 - 25 bundan daha az olmalıdır. tRNA ortogonal değilse, veya sistemde, tRNA'yı yükleme kabiliyetine sahip bir heterolog sentetaz birlikte eksprese edilirse, daha yüksek bir seviyede antibiyotik (örneğin ampisilin) direnci gözlenir. Plazmitler olmadan dönüştürülen hücrelere yaklaşık olarak eşit antibiyotik konsantrasyonları ile LB agar plakalarında büyüemeyen hücreler, örneğin bakteriler seçilir.

- 30 Toksik bir ürün (örneğin ribonükleaz barnaz) durumunda, çok sayıda potansiyel tRNA'nın bir üyesi, endojen konakçı, örneğin *Escherichia coli* sentetazları tarafından aminoasılillendiğinde (yani, konakçıya, örneğin *Escherichia coli* sentetazlarına ortogonal olmadığında), selektör kodon baskılanır ve üretilen toksik polinükleotit ürünü hücre

ölümüne yol açar. Ortogonal tRNA veya fonksiyonel olmayan tRNA barındıran hücreler hayatta kalır.

Bir düzenlemede, arzu edilen bir organizmaya ortogonal tRNA'ların havuzu, daha sonra, bir selektör kodunun, örneğin bir β -laktamaz geni gibi bir ilaç direnç geni tarafından kodlanan bir pozitif seçim işaretine yerleştirildiği bir pozitif seçime tabi tutulur. Pozitif seçim, tRNA havuzunun bir üyesini kodlayan veya içeren bir polinükleotit, bir pozitif seçim işaretini kodlayan bir polinükleotit ve aynı türden RS'yi kodlayan bir polinükleotit içeren hücre üzerinde gerçekleştirilir. Bu polinükleotitler hücrede eksprese edilir ve bu hücre, bir seçim maddesi, örneğin ampisilin mevcudiyetinde büyütülür. tRNA'lar daha sonra birlikte eksprese edilen aynı türden sentetaz tarafından aminoasillenme ve bu selektör kodona tepki olarak bir amino asit ekleme kabiliyetlerine göre seçilir. Tipik olarak bu hücreler, fonksiyonel olmayan tRNA'ları veya ilgilenilen sentetaz tarafından verimli şekilde tanınamayan tRNA'ları barındıran hücrelere kıyasla, baskılama verimliliğinde bir gelişme gösterir. Fonksiyonel olmayan veya ilgilenilen sentetaz tarafından verimli şekilde tanınmayan tRNA'ları barındıran hücreler, antibiyotiğe karşı duyarlıdır. Bu nedenle, (i) endojen konakçı, örneğin *Escherichia coli* sentetazlar için sübstratlar olmayan; (ii) ilgilenilen sentetaz tarafından aminoasillenebilen; ve (iii) translasyonda fonksiyonel olan tRNA'lar hayatta kalır.

Yukarıda açıklanan usullerde, seçimin (örneğin pozitif seçim, negatif seçim veya hem pozitif hem negatif seçim) sıklığı isteğe bağlı olarak değiştirilebilir. Örneğin, barnazın son derece toksik bir protein olması nedeniyle, negatif seçimin sıklığı, barnaz genine farklı sayıda selektör kodonlar eklenerek ve/veya indüklenebilir bir promoter kullanılarak denetlenebilir. Bir başka örnekte, seçim veya tarama maddesinin (örneğin, ampisilin) konsantrasyonu değiştirilir. Bir özellikte, arzu edilen aktivitenin ilk turlar sırasında düşük olabilmesi nedeniyle sıklık değiştirilir. Bu nedenle, seçimin ilk turlarında daha az sıkı seçim kriterleri uygulanırken, sonraki turlarda daha sıkı seçim kriterleri uygulanır. Belirli düzenlemelerde, negatif seçim, pozitif seçim veya hem pozitif hem negatif seçim, birden çok kez tekrarlanabilir. Birden çok farklı negatif seçim işareti, pozitif seçim işareti veya hem negatif hem pozitif seçim işareti kullanılabilir. Belirli düzenlemelerde, pozitif ve negatif seçim işareti aynı olabilir.

Açıklamada ortogonal translasyon bileşenlerinin (örneğin bir O-tRNA, bir O-RS, ve bir O-tRNA/O-RS çifti) üretilmesi için başka seçim/tarama türleri de kullanılabilir. Örneğin, negatif seçim işareti, pozitif seçim işareti veya hem pozitif hem negatif seçim işareti,

floresan ışığı yayan veya uygun bir reaktan mevcudiyetinde bir luminesan reaksiyonu katalizleyen bir işaret içerebilir. Bir başka düzenlemede, işaretin bir ürünü, floresans aktif hücre sıralaması (FACS) veya luminesans ile saptanır. İsteğe bağlı olarak, işaret, afinite bazlı bir tarama işaretini içerir. Bakınız, Francisco, J. A. ve diğerleri, (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface. Proc Natl Acad Sci U S A. 90:10444-8.

Bir rekombinant ortogonal tRNA üretilmesi için ilave usuller, örneğin "Methods and Compositions for the Production of Orthogonal tRNA-Aminoacyl tRNA Synthetase Pairs" başlıklı A.B.D. patent başvurusu 10/126,931 ve "In vivo Incorporation of Unnatural Amino Acids" başlıklı 10/126,127 ile "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE" başlıklı USSN 10/825,867'de bulunabilir. Bakınız ayrıca, Forster ve diğerleri, (2003) Programming peptidomimetic synthetases by translating genetic codes designed de novo. PNAS 100(11):6353-6357; ve Feng ve diğerleri, (2003), Expanding tRNA recognition of a tRNA synthetase by a single amino acid change, PNAS 100(10): 5676-5681.

Mevcut açıklamanın bir tRNA'sı, kimyasal veya enzimatik aminoaçilasyon dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, herhangi bir usul veya teknikle, arzu edilen bir amino asitle aminoaçillenebilir.

Aminoaçilasyon, aminoaçil tRNA sentetazlar, veya ribozimler dahil, ancak bununla sınırlı olmamak üzere, diğer enzimatik moleküller tarafından gerçekleştirilebilir. "Ribozim" terimi, "katalitik RNA" ile birbirinin yerine kullanılabilir. Cech ve çalışma arkadaşları (Cech, 1987, Science, 236:1532-1539; McCorkle ve diğerleri, 1987, Concepts Biochem. 64:221-226), katalizörler olarak görev yapabilen, doğal olarak meydana gelen RNA'ların (ribozimler) mevcudiyetini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte bu doğal RNA katalizörlerinin, sadece, bölünme ve bağlanma için ribonükleik asit substratları etkilediğinin gösterilmiş olmasına rağmen, ribozimlerin yapay evriminin yakın zamanlardaki gelişimi, kataliz repertuarını, çeşitli kimyasal reaksiyonları kapsayacak şekilde genişletmiştir. Çalışmalarda, aminoaçil-RNA bağlarını kendi (2')3'-terminuslarında katalizleyebilen RNA molekülleri (Illangakekare ve diğerleri, 1995 Science 267:643-647) ve bir amino asidi bir RNA molekülünden bir diğerine aktarabilen bir RNA molekülü (Lohse ve diğerleri, 1996, Nature 381:442-444) tanımlanmıştır.

A.B.D. Patent Başvurusu Yayını 2003/0228593'te ribozimlerin yapımı için usuller ve bunların, doğal şekilde kodlanmış ve doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asitlerle tRNA'ların aminoaçilasyonunda kullanımı açıklanmaktadır. Ribozimler dahil, ancak

bunlarla sınırlı olmamak üzere, tRNA'ları aminoasitleyebilen enzimatik moleküllerin sübstratla sabitleştirilmiş formları, aminoasillenmiş ürünlerin verimli afinite saflaştırmasına imkan verebilir. Uygun sübstratların örnekleri, agaroz, sefaroze ve manyetik boncukları kapsar. Aminoasılasyon için ribozimin sübstratla sabitleştirilmiş formlarının

5 üretimi ve kullanımı, Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084 ve A.B.D. Patent Başvurusu Yayını 2003/0228593'te açıklanmaktadır.

Kimyasal aminoasılasyon usulleri, Hecht ve çalışma arkadaşları (Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol.

10 Chem. 1978, 253, 4517) ve Schultz, Chamberlin, Dougherty ve diğerleri (Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al.

15 Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. ve diğerleri, Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. ve diğerleri, J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hohsaka, T. ve diğerleri, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34) tarafından, aminoasılasyonda sentetazlarının kullanımını önlemek için ortaya konanları kapsar, ancak bunlarla sınırlı

20 değildir. Açıklamanın tRNA moleküllerini aminoasillemek için bu usuller veya başka kimyasal aminoasılasyon usulleri kullanılabilir.

In vitro olarak sentezlenen proteinlere bazı biyofiziksel problemler eklemek için, kimyasal olarak modifiye edilmiş aminoasıl-tRNA'lerden yararlanılan biyosentetik usuller kullanılmıştır. Aşağıdaki yayınlara ve içerdikleri referanslara bakınız: Brunner, J. New

25 Photolabeling and crosslinking methods, Annu. Rev Biochem, 62:483-514 (1993); ve, Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, Proc. Natl. Acad. Sci, 83(22):8604-8608 (1986).

Daha önceden, doğadışı amino asitlerin, arzu edilen bir amber nonsens mutasyonunu

30 içeren bir genle programlanmış protein sentezi reaksiyonlarına kimyasal olarak aminoasillenmiş baskılayıcı tRNA'ların eklenmesi yoluyla, bölgeye özgü olarak proteinlere dahil edilebildiği gösterilmiştir. Bu yaklaşımlar kullanılarak, yirmi genel amino asitten bazıları, belirli bir amino asit için oksotrofik olan suşlar kullanma yoluyla, yakın yapısal

homologlarla süstitüe edilebilir (örneğin, fenilalanin yerine florofenilalanin). Bakınız, örneğin, Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak ve diğerleri, *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G.,
 5 Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa ve diğerleri, *FASEB J.* 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, Cilt 202, 301-336 (1992); ve, Mendel, D.,
 10 Cornish, V.W. ve Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995).

Örneğin, stop kodonu UAG'yi tanıyan bir baskılayıcı tRNA hazırlandı ve doğadışı bir amino asitle kimyasal olarak aminoaçıllendi. Protein genindeki ilgilenilen bölgede, stop kodonu TAG'yi dahil etmek için geleneksel bölgeye yönelik mutajenez kullanıldı. Bakınız,
 15 örneğin, Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 16(3):791-802 (1988). Açılennmiş baskılayıcı tRNA ve mutant gen bir in vitro kopyalama/translasyon sisteminde birleştirildiğinde, belirtilen pozisyonda o amino asidi içeren bir protein sağlayan UAG kodonuna tepki olarak, doğadışı amino asit dahil edildi. [³H]-Phe kullanılan deneyler ve α-
 20 hidroksi asitlerle yapılan deneyler, UAG kodonuyla belirtilen pozisyonda sadece arzu edilen amino asidin dahil edildiğini ve bu amino asidin, proteindeki herhangi bir başka bölgede dahil edilmediğini ortaya koydu. Bakınız, örneğin, Noren ve diğerleri, yukarıda; Kobayashi ve diğerleri, (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432; ve, Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into
 25 proteins, *Science*, 255(5041):197-200 (1992).

Katalitik RNA oluşturma usulleri, rasgele ribozim dizilerinin ayrı havuzlarını oluşturma, havuzlarda yönlendirilmiş gelişme gerçekleştirme, arzu edilen aminoaçılasyon aktivitesi için havuzları tarama, ve arzu edilen aminoaçılasyon aktivitesini gösteren ribozimlerin dizilerini seçmeyi kapsayabilir.

30 Ribozimler, bir GGU motifi ve U yönünden zengin bir rejyon gibi, açılasyon aktivitesini kolaylaştıran motifler ve/veya rejyonlar içerebilir. Örneğin, U yönünden zengin rejyonların, bir amino asit süstratının tanınmasını kolaylaştırabildiği ve bir GGU motifinin, bir tRNA'nın 3' terminuslarıyla baz çiftleri oluşturabildiği bildirilmiştir. GGU

motifi ve U yönünden zengin rejyon, bir arada, aynı zamanda hem amino asidin hem tRNA'nın eşzamanlı olarak tanınmasını kolaylaştırır ve böylece, tRNA'nın 3' terminusunun aminoaçıllasyonunu kolaylaştırır.

Ribozimler, tRNA^{Asn}_{CCCG} ile eşlenik, kısmen rasgele bir r24mini kullanılarak *in vitro* seçim, ardından da aktif klonlarda bulunan bir konsensus dizisinin sistematik mühendisliği yoluyla oluşturulabilir. Bu usulle elde edilen örnek bir ribozim, "Fx3 ribozim" olarak adlandırılmakta ve A.B.D. Yayın Başvurusu No. 2003/0228593'te açıklanmakta olup, aynı türden doğal olmayan amino asitlerle yüklenmiş çeşitli aminoaçıl-tRNA'ların sentezi için kullanışlı bir katalizör olarak görev yapar.

Aminoaçıllanmış tRNA'ların verimli afinite saflaştırmasına imkan vermek için bir sübstrat üzerinde sabitleme kullanılabilir. Uygun sübstratların örnekleri, agaroz, sefaroze ve manyetik boncukları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Ribozimler, RNA'nın kimyasal yapısından yararlanılarak reçineler üzerinde sabitlenebilir; örneğin RNA'nın ribozundaki 3'-cis-diol, RNA'nın reçinenin üzerinde sabitlenmesini kolaylaştırmak için mütakabil dialdehiti sağlamak üzere periodat ile oksitlenebilir. İndirgeyici aminasyonun, reçine ile ribozim arasındaki etkileşimi geri döndürülemez bir bağlantı haline getirdiği ekonomik hidrazit reçinelerini içeren çeşitli reçine türleri kullanılabilir. Aminoaçıl-tRNA'ların sentezi, bu sütun üstü aminoaçıllasyon tekniğiyle önemli ölçüde kolaylaştırılabilir. Kourouklis ve diğerleri (Methods 2005; 36:239-4) sütun bazlı bir aminoaçıllasyon sistemini açıklamaktadır.

Aminoaçıllanmış tRNA'ların izolasyonu çeşitli yollarla gerçekleştirilebilir. Uygun bir usul, aminoaçıllanmış tRNA'ların, 10 mM EDTA içeren bir sodyum asetat solüsyonu gibi bir tampon, 50 mM N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-(3-propansülfonik asit), 12.5 mM KCl, pH 7.0, 10 mM EDTA içeren bir tampon, veya basit şekilde bir EDTA tamponlu su (pH 7.0) ile bir sütundan elüte edilmesidir.

tRNA'nın aminoaçıllendiği amino asidi, translasyon reaksiyonu ile yapılmış bir polipeptitte seçilen bir pozisyona dahil etmek için, mevcut açıklamanın aminoaçıllanmış tRNA'ları, translasyon reaksiyonlarına eklenebilir. Mevcut açıklamanın aminoaçıllanmış tRNA'larının kullanılabildiği translasyon sistemlerinin örnekleri, hücre lizatlarını içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Hücre lizatları, bir polipeptitin bir giriş mRNA'sından *in vitro* translasyonu için gereken reaksiyon bileşenlerini sağlar. Bu tip reaksiyon bileşenlerinin örnekleri, ribozomal proteinler, rRNA, amino asitler, tRNA'lar, GTP, ATP, translasyon başlatma ve uzama faktörleri ve translasyonla ilişkili ilave faktörleri içerir, ancak bunlarla sınırlı

değildir. İlave olarak, translasyon sistemleri, kesikli translasyonlar veya bölmelere ayrılmış translasyon olabilir. Kesikli translasyon sistemleri, reaksiyon bileşenlerini tek bir bölmede bir araya getirirken, bölmelere ayrılmış translasyon sistemleri, translasyon reaksiyonu bileşenlerini, translasyon verimliliğini engelleyecek şekilde reaksiyon ürünlerinden ayırır.

5 Bu tip translasyon sistemleri ticari olarak temin edilebilir.

Ayrıca, birleştirilmiş bir kopyalama/translasyon sistemi kullanılabilir. Birleştirilmiş kopyalama/translasyon sistemleri, bir giriş DNA'sının mütakabil bir mRNA'ya kopyalanmasına imkan verir; bu da reaksiyon bileşenleri tarafından translasyona uğratılır. Ticari olarak temin edilebilen bir birleştirilmiş kopyalama/translasyonun bir örneği, Rapid

10 Translation System'dir (RTS, Roche Inc.). Bu sistem, ribozomlar ve translasyon faktörleri gibi translasyonel bileşenlerin sağlanması için E. coli lizati içeren bir karışımı kapsar. İlave olarak, translasyonda kullanılmak üzere giriş DNA'sının bir mRNA şablonuna kopyalanması için bir RNA polimeraz dahil edilir. RTS, bir kaynak/atık bölmesi ve bir kopyalama/translasyon bölmesi dahil olmak üzere, reaksiyon bölmelerinin arasına konan

15 bir membran vasıtasıyla reaksiyon bileşenlerinin bölmelere ayrılmasından yararlanabilir.

tRNA'nın aminoasılasyonu, sınırlayıcı olmamak üzere, transferazlar, polimerazlar, katalitik antikorlar, çok fonksiyonlu proteinler ve benzerlerini içeren diğer maddelerle gerçekleştirilebilir.

Ortogonal Aminoasıl-tRNA Sentetazlar (O-RS)

20 Bir O-RS, tercihen, mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sını, in vitro veya in vivo olarak seçilmiş bir amino asitle aminoasiller. Mevcut açıklamanın bir O-RS'si, bir O-RS içeren bir polipeptit tarafından ve/veya bir O-RS veya onun bir bölümünü kodlayan bir polinükleotit tarafından translasyon sistemine (örneğin, in vitro translasyon bileşenleri, veya bir hücre) sağlanabilir. Bir O-RS veya onun bir bölümü, bir polinükleotit dizisi veya

25 onun bir tamamlayıcı polinükleotit dizisi veya onun bir konservatif varyasyonu ile kodlanır. Mevcut açıklamanın bir O-tRNA'sı, burada açıklananlar dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, çeşitli farklı O-RS molekülleri tarafından aminoasillenebilir.

Bir O-tRNA (örneğin bir O-tRNA) ile kullanıma yönelik bir ortogonal aminoasıl-tRNA sentetazın (O-RS), örneğin bir O-RS'nin tanımlanması için usuller de açıklanmaktadır.

30 Örneğin bir usul, bir birinci türden hücre popülasyonunun pozitif seçime tabi tutulmasını içermekte olup, burada hücrelerin her biri aşağıdakileri kapsar: 1) çok sayıda aminoasıl-tRNA sentetazın (RS) bir üyesi, burada çok sayıda RS, mutant RS'leri, birinci tür dışındaki

bir türden türetilmiş RS'leri ve hem mutant RS'leri hem birinci tür dışındaki bir türden türetilmiş RS'leri içerir; 2) ikinci bir türden ortogonal tRNA (O-tRNA); ve 3) bir pozitif seçim işaretini kodlayan ve en az bir adet selektör kodon içeren bir polinükleotit. Çok sayıda RS'nin eksik olduğu veya daha az miktarda üyesini içeren hücrelere kıyasla, baskılama verimliliğinde bir gelişme gösterenler için hücreler seçilir veya taranır. Baskılama verimliliğinde bir gelişmeye sahip hücreler, O-tRNA'yı aminoaçılleyen bir aktif RS içerir. Birinci türden bir birinci tRNA kümesinin aktif RS'si ile bir aminoaçılasyon (in vitro veya in vivo) seviyesi, ikinci türden bir ikinci tRNA kümesinin aktif RS'si ile aminoaçılasyon (in vitro veya in vivo) seviyesiyle karşılaştırılır. Aminoaçılasyonun seviyesi, saptanabilir bir madde (örneğin, etiketlenmiş bir amino asit veya doğadışı amino asit) ile belirlenebilir. İkinci tRNA kümesini, birinci tRNA kümesine kıyasla daha verimli biçimde aminoaçılleyen aktif RS seçilir ve böylece, O-tRNA ile kullanım için ortogonal aminoaçıl-tRNA sentetaz sağlanır.

Aminoaçılasyonu belirlemek için herhangi bir sayıda deney kullanılabilir. Bu deneyler in vitro veya in vivo olarak gerçekleştirilebilir. Örneğin, in vitro aminoaçılasyon deneyleri, örneğin Hoben, P. ve Soll, D. (1985) *Methods Enzymol.* 113:55-59'da ve A.B.D. Patent Başvurusu Yayın No. 2003/0228593'te açıklanmaktadır. Aminoaçılasyon ayrıca, ortogonal translasyon bileşenleriyle birlikte bir haberci kullanma ve bir protein kodlayan en az bir adet selektör kodon içeren bir polinükleotit eksprese eden bir hücrede haberciyi saptama yoluyla da belirlenebilir. Bakınız ayrıca, "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS" başlıklı A.B.D patent başvurusu 10/126,927, ve "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE" başlıklı USSN 10/825,867.

Tanımlanmış bir O-RS, sadece arzu edilen bir doğadışı amino asidin O-tRNA'ya yükleneceği, ancak 20 genel amino asitten hiçbirinin O-tRNA'ya yüklenmeyeceği şekilde, sentetazın sübstrat spesifikliğini değiştirmek için ayrıca manipüle edilebilir. Doğadışı bir amino asit için bir sübstrat spesifikliğine sahip bir ortogonal aminoaçıl tRNA sentetaz oluşturma usulleri, örneğin sentetazdaki aktif bölgede, sentetazdaki düzenleme mekanizması bölgesinde, sentetazların farklı bölgelerini birleştirme yoluyla farklı bölgelerde veya benzer yollarla sentetazı mutasyona uğratma ve bir seçim işlemi uygulamayı içerir. Bir pozitif seçim ve ardından bir negatif seçimin kombinasyonuna dayanan bir strateji kullanılır. Pozitif seçimde, bir pozitif işaretin zorunlu olmayan bir pozisyonunda/pozisyonlarında katılan selektör kodonun baskılanması, hücrelerin pozitif seçim baskısı altında hayatta kalmasına imkan verir. Bu şekilde, hem doğal hem doğadışı

amino asitlerin mevcudiyetinde, hayatta kalanlar, ortogonal baskılayıcı tRNA'yı doğal veya doğadışı bir amino asitle yükleyen aktif sentetazları kodlar. Negatif seçimde, bir negatif işaretin zorunlu olmayan bir pozisyonunda/pozisyonlarında katılan bir selektör kodonun baskılanması, doğal amino asit spesifikliklerine sahip sentetazları kaldırır. Negatif ve

5 pozitif seçimin hayatta kalanları, ortogonal baskılayıcı tRNA'yı sadece doğadışı amino asitlerle aminoasılleyen (yükleyen) sentetazları kodlar. Bu sentetazlar daha sonra ilave mutajeneze, örneğin DNA karıştırma veya diğer tekrarlamalı mutajenez usullerine tabi tutulabilir.

Mutant O-RS'lerin kitaplığı, bu alanda bilinen çeşitli mutajenez teknikleri kullanılarak oluşturulabilir. Örneğin, mutant RS'ler, bölgeye özgü mutasyonlar, rasgele nokta mutasyonlar, homolog rekombinasyon, DNA karıştırma veya diğer tekrarlamalı mutajenez usulleri, kimerik yapı veya bunların herhangi bir kombinasyonu ile oluşturulabilir. Örneğin, bir mutant RS kitaplığı, iki veya daha çok sayıda başka (örneğin daha küçük, daha az çeşitli) "alt kitaplık"tan üretilebilir. Doğal çeşitlilik içeren kitaplıklar gibi, çeşitli

15 organizmalardan (örneğin, öbakteriler veya arkebakteriler gibi mikroorganizmalar) tRNA sentetazların kitaplıklarının (bakınız örneğin, A.B.D. Patenti No. 6,238,884, Short ve diğerleri; A.B.D. Patenti No. 5,756,316, Schallenberger ve diğerleri; A.B.D. Patenti No. 5,783,431, Petersen ve diğerleri; A.B.D. Patenti No. 5,824,485, Thompson ve diğerleri; A.B.D. Patenti No. 5,958,672, Short ve diğerleri) isteğe bağlı olarak oluşturulduğu ve

20 ortogonal çiftler için tarandığı belirtilmelidir.

Sentetazlar pozitif ve negatif seçim/tarama stratejisine tabi tutulduğunda, bu sentetazlar daha sonra ilave mutajeneze tabi tutulabilir. Örneğin, O-RS'yi kodlayan bir nükleik asit izole edilebilir; nükleik asitten, mutasyona uğratılmış (örneğin, rasgele mutajenez, bölgeye yönelik mutajenez, rekombinasyon veya bunların herhangi bir kombinasyonu yoluyla) O-

25 RS'leri kodlayan bir polinükleotit kümesi oluşturulabilir; ve bu ayrı ayrı aşamalar veya bu aşamaların bir kombinasyonu, doğadışı amino asitle O-tRNA'yı tercihen aminoasılleyen mutasyona uğratılmış bir O-RS elde edilene kadar tekrarlanabilir. Mevcut buluşun bir özelliğinde, bu aşamalar birden çok kere, örneğin en az iki kere gerçekleştirilebilir.

O-tRNA, O-RS veya bunların çiftlerinin üretilmesi için, mevcut açıklamanın usullerinde

30 ilave seçim/tarama sıklığı seviyeleri de kullanılabilir. Seçim veya tarama sıklığı, bir O-RS üretme usulünün bir veya her iki aşamasında değiştirilebilir. Bu, örneğin, kullanılan seçim/tarama maddesinin miktarını değiştirme ve benzerlerini içerebilir. İlave pozitif ve/veya negatif seçim turları da gerçekleştirilebilir. Seçme veya tarama ayrıca, örneğin

amino asit geçirgenliğinde bir değişiklik, translasyon verimliliğinde bir değişiklik, translasyon sadakatinde bir değişik ve benzerlerini içeren bir veya daha çok pozitif veya negatif seçim veya taramayı da kapsayabilir. Tipik olarak, bir veya daha çok değişiklik, protein üretmek için bir ortogonal tRNA-tRNA sentetaz çiftinin kullanıldığı bir organizmada bir veya daha çok gendeki bir mutasyona dayanır.

Mevcut açıklamada örneğin O-RS, O-tRNA ve O-tRNA/O-RS çifti için başka seçim türleri kullanılabilir. Pozitif seçim işareti, sınırlayıcı olmamak üzere, büyüme için bir besin takviyesi sağlayan bir ürün içeren çeşitli moleküllerden herhangi biri olabilir ve seçim, besin takviyesi içermeyen bir ortamda gerçekleştirilir. Pozitif seçim işaretlerini kodlayan polinükleotitlerin örnekleri, bir hücrenin amino asit oksotrofisini tamamlamaya dayanan bir haberci gen, bir his3 geni (örneğin his3 geninin, 3-aminotriazol (3-AT) sağlanarak saptanan bir imidazol gliserol fosfat dehidratazı kodladığı yerlerde), ura3 geni, leu2 geni, lys2 geni, lacZ geni, adh geni ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bakınız, örneğin, G. M. Kishore, & D. M. Shah, (1988), Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides, Annual Review of Biochemistry 57:627-663. Bir düzenlemede, lacZ üretimi orto-nitrofenil-β-D-galaktopiranosid (ONPG) hidroliziyle saptanır. Bakınız, örneğin, I. G. Serebriiskii ve E. A. Golemis, (2000), Uses of lacZ to study gene function: evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system, Analytical Biochemistry 285:1-15. İlave pozitif seçim işaretleri, örneğin lusiferaz, yeşil floresan proteini (GFP), YFP, EGFP, RFP, bir antibiyotik direnç geninin ürünü (örneğin, kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)), bir kopyalamayı düzenleyici protein (örneğin, GAL4) ve benzerlerini içerir. İsteğe bağlı olarak, bir pozitif seçim işaretini kodlayan bir polinükleotit, bir selektör kodon içerir.

Pozitif seçim işaretini kodlayan bir polinükleotit, bir tepki elemanına çalışabilir durumda bağlanabilir. Tepki elemanından kopyalamayı düzenleyen bir kopyalamayı düzenleyici proteini kodlayan ve en az bir adet selektör kodon içeren ilave bir polinükleotit de mevcut olabilir. Doğadışı amino asidin, doğadışı amino asitle aminoaçillenmiş O-tRNA tarafından kopyalamayı düzenleyici proteine dahil edilmesi, pozitif seçim işaretini kodlayan polinükleotitin (örneğin, haberci gen) kopyalanmasına yol açar. İsteğe bağlı olarak, selektör kodon, kopyalamayı düzenleyici proteinin bir DNA bağlayıcı bölgesini kodlayan bir polinükleotitin bir bölümünün içinde veya esas itibarıyla onun yakınında yer alır.

Negatif seçim işaretini kodlayan bir polinükleotit ayrıca, kopyalamayı düzenleyici proteinin kopyalamaya aracılık ettiği bir tepki elemanına çalışır durumda bağlanabilir.

- Bakınız, örneğin, A. J. DeMaggio ve diğerleri, (2000), The yeast split-hybrid system, *Method Enzymol.* 328:128-137; H. M. Shih ve diğerleri, (1996), A positive genetic selection for disrupting protein-protein interactions: identification of CREB mutations that prevent association with the coactivator CBP, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:13896-13901; M. Vidal ve diğerleri, (1996), Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10321-10326; ve M. Vidal ve diğerleri, (1996), Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions (*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:10315-10320). Doğal bir amino asidin, doğal bir amino asitle aminoasillenmiş O-tRNA tarafından kopyalamayı düzenleyici proteine dahil edilmesi, negatif seçim işaretinin kopyalanmasına yol açar. İsteğe bağlı olarak, negatif seçim işareti bir selektör kodon içerir. Bu açıklamanın pozitif seçim işareti ve/veya negatif seçim işareti, her biri veya her ikisi en az iki farklı selektör kodon veya aynı selektör kodondan en az iki adet içerebilen en az iki selektör kodon içerebilir.
- 15 Kopyalamayı düzenleyici protein, bir nükleik asit dizisine (örneğin, bir tepki elemanı) bağlanan (doğrudan veya dolaylı olarak) ve tepki elemanına çalışabilir durumda bağlı olan bir dizinin kopyalanmasını düzenleyen bir moleküldür. Bir kopyalamayı düzenleyici protein, bir kopyalama aktivatör proteini (örneğin, GAL4, nükleer hormon reseptörleri, AP1, CREB, LEF/tcf familyası üyeleri, SMAD'ler, VP16, SP1 vs.), bir kopyalamayı baskılayıcı protein (örneğin, nükleer hormon reseptörleri, Groucho/tle familyası, Engrailed familyası vs.), veya ortama bağlı olarak her iki aktiviteye sahip olabilen bir protein (örneğin, LEF/tcf, homobox proteinleri vs.) olabilir. Bir tepki elemanı, tipik olarak, kopyalamayı düzenleyici protein tarafından tanınan bir nükleik asit dizisi ya da kopyalamayı düzenleyici proteinle uyum içinde hareket eden ilave bir maddedir.
- 25 Bir kopyalamayı düzenleyici proteinin bir başka örneği, kopyalama aktivatör proteini GAL4'tür. Bakınız, örneğin, A. Laughon ve diğerleri, (1984), Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene, *Molecular & Cellular Biology* 4:268-275; A. Laughon ve R. F. Gesteland, (1984), Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene, *Molecular & Cellular Biology* 4:260-267; L. Keegan ve diğerleri, (1986), Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein, *Science* 231:699-704; ve, M. Ptashne, (1988), How eukaryotic transcriptional activators work, *Nature* 335:683-689. Bu 881 amino asitli proteinin N-terminal 147 amino asidi, DNA dizisini spesifik olarak bağlayan bir DNA
- 30

bağlayıcı bölge (DBD) oluşturur. Bakınız, örneğin, M. Carey ve diğerleri, (1989), An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer, J. Mol. Biol. 209:423-432; ve, E. Giniger ve diğerleri, (1985), Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast, Cell 40:767-774. DBD, araya giren bir protein dizisiyle, DNA'ya

5 bağlandığında kopyalamayı aktif hale getirebilen bir C-terminal 113 amino asit aktivasyon bölgesine (AD) bağlanır. Bakınız, örneğin, J. Ma ve M. Ptashne, (1987), Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments, Cell 48:847-853; ve, J. Ma ve M. Ptashne, (1987), The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80, Cell 50:137-142. Amber kodonların, örneğin hem GAL4'ün N-terminal DBD'sini hem de

10 C-terminal AD'sini içeren tek bir polipeptitin N-terminal DBD'si yönünde yerleştirilmesiyle, O-tRNA/O-RS çifti tarafından amber baskılaması, GAL4 tarafından kopyalama aktivasyonuna bağlanabilir. Genle hem pozitif hem negatif seçimler gerçekleştirmek için GAL4 aktif haberci genleri kullanılabilir.

Negatif seçim için kullanılan ortam, negatif seçim işareti tarafından saptanabilir bir

15 maddeye dönüştürülen bir seçim veya tarama maddesi içerebilir. Burada açıklandığı gibi saptanabilir madde, toksik bir madde olabilir. Bir negatif seçim işaretini kodlayan bir polinükleotit, örneğin bir ura3 geni olabilir. Örneğin, URA3 habercisi, GAL4 DNA bağlayıcı bölgelerini içeren bir promoterin denetimi altında yerleştirilebilir. Negatif seçim işareti, örneğin selektör kodonlarla GAL4'ü kodlayan bir polinükleotitin translasyonu

20 yoluyla üretildiğinde, GAL4, URA3'ün kopyalanmasını aktif hale getirir. Negatif seçim, ura3 geninin gen ürünü tarafından saptanabilir maddeye (örneğin, hücreyi öldüren toksik bir madde) dönüştürülen 5-floro orotik asit (5-FOA) içeren bir ortamda gerçekleştirilir. Bakınız, örneğin, J. D. Boeke ve diğerleri, (1984), A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance, Molecular & General Genetics 197:345-346); M. Vidal ve diğerleri, (1996), Genetic

25 characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:10321-10326; ve, M. Vidal ve diğerleri, (1996), Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:10315-

30 10320.

Pozitif seçim işareti gibi, negatif seçim işareti de çeşitli moleküllerden herhangi biri olabilir. Pozitif seçim işareti ve/veya negatif seçim işareti, floresan ışığı yayan ve uygun bir reaktanın mevcudiyetinde bir luminesan reaksiyonu katalizleyen bir polipeptit olabilir.

Örneğin, negatif seçim işaretleri, örneğin lusiferaz, yeşil floresan proteini (GFP), YFP, EGFP, RFP, bir antibiyotik direnç geninin ürünü (örneğin, kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)), bir lacZ geninin ürünü, bir kopyalamayı düzenleyici protein ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Pozitif seçim işareti ve/veya negatif seçim işareti, floresans aktif hücre sıralaması (FACS) veya luminesans ile saptanabilir. Pozitif seçim işareti ve/veya negatif seçim işareti, afinite bazlı bir tarama işaretini içerebilir. Aynı polinükleotit hem pozitif seçim işaretini, hem negatif seçim işaretini kodlayabilir. Örneğin, pozitif seçim aşaması, negatif seçim aşaması ve hem pozitif hem negatif seçim aşamaları bir habercinin kullanılmasını içerebilir; burada haberci, floresans aktif hücre sıralaması (FACS) ile saptanır. Örneğin, ilk olarak bir pozitif seçim işaretiyle, örneğin kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) geniyle bir pozitif seçim yapılabilir (burada CAT geni, CAT geninin içinde bir selektör kodon, örneğin bir amber stop kodonu içerir); ardından da bir negatif işaret, örneğin T7 RNA polimeraz geni içindeki pozisyonlarda bir selektör kodonu/kodonları (örneğin iki veya daha çok) baskılama kabiliyetinin olmamasına dayanan bir negatif seçim taraması gerçekleştirilir. Pozitif seçim işareti ve negatif seçim işareti aynı vektörde (örneğin, plazmit) bulunabilir. Negatif işaretin ekspresyonu, habercinin, örneğin yeşil floresan proteininin (GFP) ekspresyonunu harekete geçirir. Seçim ve taramanın sıklığı değişebilir; örneğin habercinin floresans için ihtiyaç duyduğu ışığın şiddeti değişebilir. FACS ile taranan bir pozitif seçim işareti olarak bir haberciyle bir pozitif seçim yapılabilir; ardından da bir negatif işaret, örneğin barnaz geni içindeki pozisyonlarda bir selektör kodonu/kodonları (örneğin iki veya daha çok) baskılama kabiliyetinin olmamasına dayanan bir negatif seçim taraması gerçekleştirilir.

İsteğe bağlı olarak, haberci, bir hücre yüzeyinde, örneğin bir faj görüntülemesinde veya benzerinde gösterilir. Hücre yüzeyi görüntülemesi, örneğin OmpA bazlı hücre yüzeyi görüntüleme sistemi, Escherichia coli hücresinin yüzeyinde belirli bir epitopun, örneğin bir dış membran porin OmpA'ya kaynaştırılmış bir poliovirüs C3 peptitinin ekspresyonuna dayanır. Bu epitop, sadece protein mesajında bir selektör kodon, translasyon sırasında baskılandığında hücre yüzeyinde görüntülenir. Görüntülenen peptit daha sonra, kitaplıktaki mutant aminoasıl-tRNA sentetazlardan biri tarafından tanınan amino asidi içerir, ve mükemmel sentetaz genini içeren hücre, spesifik doğadışı amino asitleri içeren peptidlere karşı çoğaltılan antikorlarla izole edilebilir. OmpA bazlı hücre yüzeyi görüntüleme sistemi, Georgiou ve diğerleri tarafından faj görüntülemeye bir alternatif olarak geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Bakınız, Francisco, J. A., Campbell, R., Iverson, B. L. ve Georgiou, G.

Production and fluorescence-activated cell sorting of Escherichia coli expressing a functional antibody fragment on the external surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10444-8 (1993).

Mevcut açıklamanın diğer düzenlemeleri, in vitro olarak bir veya daha çok seçim aşamasının yürütülmesini içerir. Seçilen bileşen (örneğin sentetaz ve/veya tRNA) daha sonra doğadışı bir amino asidin in vitro olarak dahil edilmesinde kullanılmak üzere bir hücreye eklenebilir.

O-RS üretme ve sentetazın sübstrat spesifikliğini değiştirme ile ilgili diğer detaylar, "Methods and Compositions for the Production of Orthogonal tRNA-Aminoacyl tRNA Synthetase Pairs" başlıklı A.B.D. patent başvurusu 10/126,931; ve "EXPANDING THE EUKARYOTIC GENETIC CODE" başlıklı USSN 10/825,867'de bulunabilir. O-RS üretme konusundaki ilave detaylar, Hamano-Takaku ve diğerleri (2000) A mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine, Journal of Biological Chemistry, 275(51):40324-40328; Kiga ve diğerleri (2002), An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system, PNAS 99(15): 9715-9723; ve, Francklyn ve diğerleri (2002), Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation; RNA, 8:1363-1372 kapsamında bulunabilir.

KAYNAK VE KONAKÇI ORGANİZMALAR

Mevcut buluşun translasyonel bileşenleri tipik olarak ökaryotik olmayan organizmalardan türetilir. Örneğin, ortogonal O-tRNA ökaryotik olmayan bir organizmadan, örneğin *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium* türü *NRC-1* gibi *Halobacterium*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix* veya benzerleri gibi bir arkebakteri, ya da *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* veya benzeri gibi bir öbakteriden türetililebilirken, ortogonal O-RS, ökaryotik olmayan bir organizmadan, örneğin *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium* türü *NRC-1* gibi *Halobacterium*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix* veya benzerleri, ya da *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* veya benzeri gibi bir öbakteriden türetililebilir. Bir düzenlemede, bitkiler, yosunlar, protistler, mantarlar, mayalar, hayvanlar (örneğin

memeliler, böcekler, artropodlar) veya benzerlerini içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan ökaryotik kaynaklar da kullanılabilir.

Bir O-tRNA/O-RS çiftinin ayrı ayrı bileşenleri aynı organizmadan veya farklı organizmalardan türetilir. Bir düzenlemede, O-tRNA/O-RS çifti aynı organizmadandır.

- 5 Alternatif olarak, O-tRNA/O-RS çiftinin O-tRNA ve O-RS'si farklı organizmalardandır. Örneğin, O-tRNA, örneğin bir *Halobacterium sp NRC-1*'den türetilir, O-RS ise örneğin bir *Methanobacterium thermoautotrophicum*'dan türetilir.

- O-tRNA, O-RS veya O-tRNA/O-RS çifti, seçilen bir amino asidi (örneğin doğası bir amino asit) içeren bir polipeptit üretmek üzere, in vivo veya in vitro olarak seçilebilir veya 10 taranabilir ve/veya bir hücrede, örneğin ökaryotik olmayan bir hücrede (*E. coli* hücresi gibi) veya bir ökaryotik hücrede kullanılabilir. Ökaryotik olmayan bir hücre, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Haloferax volcanii* ve *Halobacterium* türü *NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus* gibi *Halobacterium*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuropyrum pernix* veya benzerlerini içeren, ancak 15 bunlarla sınırlı olmayan Arke filogenetik bölgesi gibi çeşitli kaynaklardan olabilir, ya da Öbakteri filogenetik bölgesi (sınırlayıcı olmamak üzere, *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* vs. dahil) veya benzerlerine ait olabilir. Bir ökaryotik hücre; bir bitki (örneğin, tek çenekliler veya iki çenekliler gibi kompleks bitki), bir yosun, 20 bir protist, bir mantar, bir maya (sınırlayıcı olmamak üzere, *Saccharomyces cerevisiae* dahil), bir hayvan (sınırlayıcı olmamak üzere, bir memeli, bir böcek, bir artropod vs. dahil) veya benzerlerini içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli kaynaklardan olabilir. Mevcut buluşun translasyonel bileşenlerine sahip hücrelerin bileşimleri de mevcut buluşun bir özelliğidir. Bir başka türde kullanılmak üzere, bir türde O-tRNA ve/veya O-RS 25 taraması için, ayrıca "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" başlıklı USSN 10/825,867'ye bakınız.

- Bir konakçı hücrede, seçilmiş bir amino aside sahip olan ilgilenilen bir polipeptiti eksprese etmek için, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan polinükleotitler, kopyalamayı yönlendirmek için bir promoter, bir kopyalama/translasyon terminatörü, ve bir proteini kodlayan bir 30 nükleik asit için olması durumunda, translasyonu başlatmak için bir ribozom bağlayıcı bölge içeren bir ekspresyon vektörüne alt klonlanabilir. Uygun bakteri promoterleri teknikte iyi bilinir ve örneğin Sambrook ve diğerleri, ve Ausubel ve diğerlerinde açıklanmaktadır.

İlgilenilen bir polipeptitin eksprese edilmesi için bakteriyel ekspresyon sistemleri, sınırlayıcı olmamak üzere, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Salmonella*'da mevcuttur (Palva ve diğerleri, Gene 22:229-235 (1983); Mosbach ve diğerleri, Nature 302:543-545 (1983)). Bu tip ekspresyon sistemleri için kitler, ticari olarak temin edilebilir. Memeli hücreleri, maya ve böcek hücreleri için ökaryotik ekspresyon sistemleri teknikte iyi bilinir ve ayrıca ticari olarak temin edilebilir.

Mevcut açıklamanın bir tRNA ve/veya RS'si ve/veya ilgilenilen bir polipeptit kullanılabilir ve örneğin maya, böcek hücreleri, memeli hücreleri ve bakterileri içeren çok sayıda uygun ekspresyon sisteminde eksprese edilebilir. Aşağıda, örnek ekspresyon sistemlerinin bir açıklaması sağlanmaktadır.

Maya Burada kullanıldığı şekilde "maya" terimi, ilgilenilen bir polipeptiti eksprese etme kabiliyetine sahip çeşitli mayalardan herhangi birini kapsar. Bu tip mayalar, askosporojen mayaları (*Endomycetales*), basidiosporojen mayaları ve Fungi imperfecti (*Blastomycetes*) grubuna ait mayaları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Askosporojen mayalar, *Spermophthoraceae* ve *Saccharomycetaceae* olmak üzere iki familyaya ayrılır. İkincisi, *Schizasaccharomycoideae* (örneğin, *Schizosaccharomyces* cinsi), *Nadsonioideae*, *Lipomycoideae* ve *Saccharomycoideae* (örneğin, *Pichia*, *Kluyveromyces* ve *Saccharomyces* cinsleri) olmak üzere dört alt familyadan oluşur. Basidiosporojen mayalar, *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium* ve *Filobasidiella* cinslerini içerir. Fungi Imperfecti (*Blastomycetes*) grubuna ait mayalar, *Sporobolomycetaceae* (örneğin *Sporobolomyces* ve *Bullera* cinsleri) ve *Cryptococcaceae* (örneğin *Candida* cinsi) olmak üzere iki familyaya ayrılır.

Mevcut buluşla kullanım için özellikle ilgi çekenler, *P. pastoris*, *P. guillerimondii*, *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. diastaticus*, *S. douglasii*, *S. kluyveri*, *S. norbensis*, *S. oviformis*, *K. lactis*, *K. fragilis*, *C. albicans*, *C. maltosa*, ve *H. polymorpha* dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* ve *Candida* cinslerinin içindeki türlerdir. Maya, genellikle Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) ve American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA) dahil, ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli kaynaklardan temin edilebilir.

"Maya konakçısı" veya "maya konakçı hücresi" terimi, rekombinant vektörler veya diğer transfer DNA için bir alıcı olarak kullanılabilen veya kullanılmış olan mayayı kapsar. Bu terim, orijinal maya konakçı hücresinin, rekombinant vektörleri veya diğer transfer DNA'yı almış soyunu içerir. Tek bir ana hücrenin soyunun, rastlantısal veya kasıtlı mutasyondan dolayı, morfolojik açıdan ya da genomik veya toplam DNA komplemanı açısından orijinal ana hücreyle mutlaka tamamen özdeş olmayabileceği anlaşılmaktadır. Ana hücrenin, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan bir nükleotit dizisinin mevcudiyeti gibi, ilgili bir özellikle karakterize edilmek için ana hücreye yeterince benzeyen soylar, bu tanımlama ile kast edilen soylara dahil edilmektedir.

- 10 Birçok maya konakçısına transformasyon için, ekstrakromozomal replikonları veya birleştirici vektörleri içeren ekspresyon ve transformasyon vektörleri geliştirilmiştir. Örneğin, *S. cerevisiae* (Sikorski ve diğerleri, GENETICS (1989) 122:19; Ito ve diğerleri, J. BACTERIOL. (1983) 153:163; Hinnen ve diğerleri, PROC. NATAL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929); *C. albicans* (Kurtz ve diğerleri, MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142); *C. maltosa* (Kunze ve diğerleri, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *H. polymorpha* (Gleeson ve diğerleri, J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459; Roggenkamp ve diğerleri, MOL. GENETICS AND GENOMICS (1986) 202:302); *K. fragilis* (Das ve diğerleri, J. BACTERIOL. (1984) 158:1165); *K. lactis* (De Louvencourt ve diğerleri, J. BACTERIOL. (1983) 154:737; Van den Berg ve diğerleri, BIOTECHNOLOGY (NY) (1990) 8:135); *P. guillermondii* (Kunze ve diğerleri, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141); *P. pastoris* (A.B.D. Patentleri No. 5,324,639; 4,929,555; ve 4,837,148; Cregg ve diğerleri, MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376); *Schizosaccharomyces pombe* (Beach ve diğerleri, NATURE (1982) 300:706); ve *Y. lipolytica*; *A. nidulans* (Ballance ve diğerleri, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89; Tilburn ve diğerleri, GENE (1983) 26:205-221; ve Yelton ve diğerleri, PROC. NATAL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74); *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475-479); *T. reesia* (EP 0 244 234); ve örneğin *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* gibi ipliksi mantarlar (WO 91/00357) için ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir.

- 30 Maya vektörleri için kontrol dizileri, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmekte ve alkol dehidrojenaz (ADH) (EP 0 284 044); enolaz; glükokinaz; glükoz-6-fosfat izomeraz; gliseraldehit-3-fosfat-dehidrojenaz (GAP veya GAPDH); heksokinaz; fosfofrüktokinaz; 3-fosfoglisarat mutaz; ve piruvat kinaz (PyK) (EP 0 329 203) gibi genlerden promoter rejyonları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Asit fosfotazı kodlayan

maya PHO5 geni de yararlı promoter dizileri sağlayabilir (Miyano-hara ve diğ-erleri, PROC. NATAL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1). Maya konakçılarıyla kullanım için uygun diğ-er promoter diziler, 3-fosfoglis-er-az kinaz için promoterleri (Hitzeman ve diğ-erleri, J. BIOL. CHEM. (1980) 255:12073); ve piruvat dekarboksilaz, triozfosfat izomeraz ve fosfoglüko-
 5 izomeraz gibi diğ-er glikolitik enzimleri içerebilir (Holland ve diğ-erleri, BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900; Hess ve diğ-erleri, J. ADV. ENZYME REG. (1969) 7:149). Büyüme koşullarıyla denetlenen ilave kopyalama avantajına sahip indüklen-ebilir maya promoterleri, alkol dehidrojenaz 2 için promoter rejyonları; izositokrom C; asit fosfataz; metalotiyonein; gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz; azot metabolizmasıyla ilişkili yıkım
 10 enzimleri; ve maltoz ve galaktoz kullanımından sorumlu enzimleri içerebilir. Maya ekspresyonunda kullanıma uygun vektörler ve promoterler EP 0 073 657'de daha detaylı olarak anlatılmaktadır.

Maya geliştiriciler de maya promoterleriyle birlikte kullanılabilir. İlave olarak, sentetik promoterler de maya promoterleri olarak işlev görebilir. Örneğ-in, bir maya promoterinin
 15 akış yukarı yöndeki aktivatör dizileri (UAS), bir başka maya promoterinin kopyalama aktivasyon rejyonu-yla birleştirilerek, sentetik hibrit bir promoter oluşturulabilir. Bu tip hibrit promoterlerin örnekleri, GAP kopyalama aktivasyon rejyonuna bağı-ADH düzenleyici diziyi içerir. Bakınız, A.B.D. Patentleri No. 4,880,734 ve 4,876,197). Diğ-er hibrit promoter örnekleri, GAP veya PyK gibi bir glikolitik enzim geninin kopyalama
 20 aktivasyon rejyonu-yla birlikte, ADH2, GAL4, GAL10 veya PHO5 genlerinin düzenleyici dizilerini içeren promoterleri kapsar. Bakınız, EP 0 164 556. Ayrıca, bir maya promoteri, maya RNA polimerazı bağlama ve kopyalamayı başlatma kabiliyetine sahip olan, doğ-al olarak meydana gelen maya dışı kökenli promoterleri içerebilir.

Maya ekspresyon vektörlerinin bir kısmını içerebilen diğ-er kontrol elemanları, örneğ-in
 25 GAPDH veya enolaz genlerinden terminatörleri i içerir (Holland ve diğ-erleri, J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385). İlave olarak, 2µ plazmit kökenli replikasyon kaynağı, maya için uygundur. Mayalarda kullanılmak üzere uygun bir seçim geni, maya plazmitinde mevcut olan *trp1* genidir. Bakınız, Tschumper ve diğ-erleri, GENE (1980) 10:157; Kingsman ve diğ-erleri, GENE (1979) 7:141. *trp1* geni, mayanın, triptofanda büyüme kabiliyetine sahip
 30 olmayan bir mutant suş için bir seçim işareti sağlar. Benzer şekilde, *Leu2* eksikliği olan maya suşları (ATCC 20,622 veya 38,626), *Leu2* geni taşıyan bilinen plazmitlerle tamamlanır.

Ekzojen DNA'yı maya konakçılara yerleştirme usulleri, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinir ve tipik olarak, sınırlayıcı olmamak üzere, siferoplatların ya da alkali katyonlarıyla işlem gören bozulmamış maya konakçı hücrelerinin transformasyonunu içerir. Örneğin, mayanın transformasyonu, Hsiao ve diğerleri, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 ve Van Solingen ve diğerleri, J. BACT. (1977) 130:946 kapsamında açıklanan usule göre yürütülebilir. Bununla birlikte, nükleer enjeksiyon, elektroporasyon veya protoplast füzyonu gibi, DNA'nın hücrelere katılması için diğer usuller de, genel olarak SAMBROOK VE DİĞERLERİ, MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001) kapsamında açıklandığı gibi kullanılabilir. Maya konakçı hücreleri daha sonra, bu alanda normal deneyim sahibi kişilerde bilinen standart teknikler kullanılarak kültürlenebilir.

Maya konakçı hücrelerinde heterolog proteinlerin eksprese edilmesi için diğer usuller, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Bakınız, genel olarak A.B.D. Patent Yayını No. 20020055169, A.B.D. Patentleri No. 6,361,969; 6,312,923; 6,183,985; 6,083,723; 6,017,731; 5,674,706; 5,629,203; 5,602,034; ve 5,089,398; A.B.D. Tekrar Gözden Geçirilmiş Patentler No. RE37,343 ve RE35,749; PCT Yayınlanmış Patent Başvuruları WO 99/07862; WO 98/37208; ve WO 98/26080; Avrupa Patent Başvuruları EP 0 946 736; EP 0 732 403; EP 0 480 480; WO 90/10277; EP 0 340 986; EP 0 329 203; EP 0 324 274; ve EP 0 164 556. Bakınız ayrıca, Gellissen ve diğerleri, ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93; Romanos ve diğerleri, YEAST (1992) 8(6):423-488; Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7.

Maya konakçı suşları, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinen standart kesikli beslemeli fermantasyon usulleri kullanılarak, amplifikasyon aşaması sırasında fermantörlerde büyütülebilir. Fermantasyon usulleri, belirli bir maya konakçısının karbon kullanım yolundaki veya ekspresyon kontrol modundaki farklılıkları hesaba katacak şekilde uyarlanabilir. Örneğin, bir *Saccharomyces* maya konakçısının fermantasyonu, tek bir glükoz beslemesi, kompleks azot kaynağı (örneğin, kazein hidrolizatlar) ve birden çok vitamin desteği gerektirebilir. Bunun aksine olarak, metilotrofik maya *P. pastoris*, optimum büyüme ve ekspresyon için gliserol, metanol ve iz mineral beslemeleri, ancak sadece basit amonyum (azot) tuzları gerektirebilir. Bakınız, örneğin, A.B.D. Patenti No. 5,324,639; Elliott ve diğerleri, J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95; ve Fieschko ve diğerleri, BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113.

Bununla birlikte, bu tip fermantasyon usulleri, kullanılan maya konakçı suşundan bağımsız olarak belirli ortak özelliklere sahip olabilir. Örneğin, maksimum büyümeye imkan vermek için, amplifikasyon sırasında fermantöre büyümeyi sınırlayıcı bir besin, tipik olarak karbon ilave edilebilir. Ek olarak, fermantasyon usullerinde genel olarak, yeterli miktarlarda karbon, azot, bazal tuzları, fosfor ve diğer az miktardaki nütrientleri (vitaminler, iz mineraller ve tuzlar vs.) içerecek şekilde tasarlanmış bir fermantasyon ortamı kullanılır. *Pichia* ile kullanım için uygun fermantasyon ortamlarının örnekleri, A.B.D. Patentleri No. 5,324,639 ve 5,231,178'de açıklanmaktadır.

Bakulovirüs-Enfekte Böcek Hücreleri "Böcek konakçısı" veya "böcek konakçı hücresi"

terimi, rekombinant vektörler veya diğer transfer DNA için bir alıcı olarak kullanılabilen veya kullanılmış bir böceği ifade eder. Bu terim, orijinal böcek konakçı hücresinin transfekte edilmiş soyunu kapsar. Tek bir ana hücrenin soyunun, rastlantısal veya kasıtlı mutasyondan dolayı, morfolojik açıdan ya da genomik veya toplam DNA komplemanı açısından orijinal ana hücreyle mutlaka tamamen özdeş olmayabileceği anlaşılmaktadır. Ana hücrenin, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan bir nükleotit dizisinin mevcudiyeti gibi, ilgili bir özelliklerle karakterize edilmek için ana hücreye yeterince benzeyen soylar, bu tanımlama ile kast edilen soylara dahil edilmektedir.

İlgilenilen bir polipeptitin ekspresyonu için uygun böcek hücrelerinin seçimi, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. *Aedes aegypti*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, ve *Trichoplusia ni* dahil olmak üzere, çeşitli böcek türleri teknikte iyi bilinir ve ticari olarak temin edilebilir. Ekspresyon için böcek konakçılarının seçiminde, uygun konakçılar, diğerlerinin yanı sıra iyi salgılama kapasitesi, düşük proteolitik aktivite ve genel dayanıklılığa sahip olduğu gösterilenleri içerebilir. Böcekler, genellikle Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) ve American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA) dahil, ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli kaynaklardan temin edilebilir.

Genel olarak, bakulovirüs-enfekte bir böcek ekspresyon sisteminin bileşenleri, hem bakulovirüs genomunun bir fragmanını, hem de eksprese edilecek heterolog genin eklenmesi için uygun bir restriksiyon bölgesini içeren bir transfer vektörü, genellikle bir bakteri plazmiti; transfer vektöründe bakulovirüse özgü fragmana homolog dizilere sahip vahşi tür bir bakulovirüs (bu, heterolog genin bakulovirüs genomuna homolog rekombinasyonuna imkan verir); ve uygun böcek konakçı hücrelerini ve büyüme ortamını

kapsar. Vektörlerin yapımında, hücrelerin transfekte edilmesinde, plakların toplanmasında, kültürde hücrelerin büyütülmesi ve benzerlerinde kullanılan malzemeler, usuller ve teknikler, bu alanda bilinmektedir ve bu tekniklerin açıklandığı kılavuzlar mevcuttur.

Heterolog genin transfer vektörüne eklenmesinden sonra, vektör ve vahşi tür viral genom, vektör ve viral genomun tekrar bir araya geldiği bir böcek konakçı hücrelerine transfekte edilir. Paketlenen rekombinant virüs eksprese edilir, rekombinant plaklar tanımlanır ve saflaştırılır. Bakulovirüs/böcek hücresi ekspresyon sistemleri için malzemeler ve usuller, örneğin Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) firmasından bir kit formunda, ticari olarak temin edilebilir. Bu teknikler, bu alanda normal deneyim sahibi kişilerce genel olarak bilinmekte ve SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987) kapsamında tam olarak açıklanmaktadır. Bakınız ayrıca, RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL VE DİĞERLERİ, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING VE POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); ve O'REILLY VE DİĞERLERİ, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Gerçekten de, bakulovirüs/böcek hücresi ekspresyon sistemleri kullanılarak çeşitli heterolog proteinlerin üretilmesi, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Bakınız örneğin, A.B.D. Patentleri No. 6,368,825; 6,342,216; 6,338,846; 6,261,805; 6,245,528; 6,225,060; 6,183,987; 6,168,932; 6,126,944; 6,096,304; 6,013,433; 5,965,393; 5,939,285; 5,891,676; 5,871,986; 5,861,279; 5,858,368; 5,843,733; 5,762,939; 5,753,220; 5,605,827; 5,583,023; 5,571,709; 5,516,657; 5,290,686; WO 02/06305; WO 01/90390; WO 01/27301; WO 01/05956; WO 00/55345; WO 00/20032; WO 99/51721; WO 99/45130; WO 99/31257; WO 99/10515; WO 99/09193; WO 97/26332; WO 96/29400; WO 96/25496; WO 96/06161; WO 95/20672; WO 93/03173; WO 92/16619; WO 92/02628; WO 92/01801; WO 90/14428; WO 90/10078; WO 90/02566; WO 90/02186; WO 90/01556; WO 89/01038; WO 89/01037; WO 88/07082.

Bakulovirüs/böcek hücresi ekspresyon sistemlerinde yararlı olan vektörler teknikte bilinir ve örneğin, yardımcıdan bağımsız bir viral ekspresyon vektörü olan bakulovirüs *Autographacalifornica* nükleer polihedrozis virüsünden (AcNPV) türetilmiş böcek ekspresyon ve transfer vektörlerini içerir. Bu sistemden türetilen viral ekspresyon vektörleri, genellikle heterolog genlerin ekspresyonunu yönlendirmek için güçlü polihedrin

gen promoterini kullanılır. Bakınız genel olarak, O'Reilly VE DİĞERLERİ, BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992).

Yabancı genin bakulovirüs genomuna eklenmesinden önce, bir promoter, lider (istenirse), ilgilenilen kodlama dizisi ve kopyalamayı sona erdirmeye dizisini içeren yukarıda açıklanan bileşenler, tipik olarak bir ara transplasman yapısı (transfer vektörü) halinde bir araya getirilir. Ara transplasman yapıları, çoğu zaman bakteriler gibi bir konakçıda sürekli bakım yapabilen bir ekstrakromozomal eleman (örneğin plazmitler) gibi bir replikon içinde muhafaza edilir. Replikon, klonlama ve büyütme için uygun bir konakçıda muhafaza edilmesine imkan veren bir replikasyon sistemine sahip olur. Daha spesifik olarak, plazmit, polihedrin poliadenilasyon sinyali (Miller, ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177) ve bir prokaryotik ampisilin direnç (*amp*) geni ve *E. coli*'nin seçilmesi ve çoğaltılması için replikasyon kaynağını içerebilir.

Yabancı genleri AcNPV'ye yerleştirmek için yaygın olarak kullanılan bir transfer vektörü, pAc373'tür. Örneğin, ATG'den ATT'ye kadar polihedrin başlangıç kodonunu değiştiren ve ATT'den 32 baz çifti akış aşağı yönde bir BamHI klonlama bölgesi ekleyen pVL985 dahil olmak üzere, teknikte deneyim sahibi kişilerce bilinen birçok başka vektör de tasarlanmıştır. Bakınız, Luckow ve Summers, VIROLOGY 170:31 (1989). Diğer ticari olarak temin edilebilen vektörler, örneğin PBlueBac4.5/V5-His; pBlueBacHis2; pMelBac; pBlueBac4.5'i (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) içerir.

Heterolog genin eklenmesinden sonra, transfer vektörü ve vahşi tip bakuloviral genom, bir böcek hücresi konakçısına birlikte transfeğe edilir. Heterolog DNA'nın bakulovirüs virüsünde istenen bölgeye eklenmesi için usuller teknikte bilinmektedir. Bakınız, SUMMERS VE SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith ve diğerleri, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow ve Summers, VIROLOGY (1989) 170:31. Örneğin, ekleme, homolog çift çapraz geçiş rekombinasyonu ile, polihedrin geni gibi bir gene yapılabilir; ekleme, arzu edilen bakulovirüs geninde, tasarlanmış bir restriksiyon enzim bölgesine de yapılabilir. Bakınız, Miller ve diğerleri, BIOESSAYS (1989) 11(4):91.

Transfeksiyon, elektroporasyonla gerçekleştirilebilir. Bakınız, TROTTER VE WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Mann ve King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501. Alternatif olarak, böcek hücrelerini rekombinant ekspresyon vektörü ve bakulovirüsle transfeğe etmek için lipozomlar kullanılabilir. Bakınız, örneğin, Liebman ve diğerleri, BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36; Graves ve diğerleri, BIOCHEMISTRY

- (1998) 37:6050; Nomura ve diğerleri, J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22):13570; Schmidt ve diğerleri, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323; Siffert ve diğerleri, NATURE GENETICS (1998) 18:45; TILKINS VE DİĞERLERİ, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998); Cai ve diğerleri, 5 PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263; Dolphin ve diğerleri, NATURE GENETICS (1997) 17:491; Kost ve diğerleri, GENE (1997) 190:139; Jakobsson ve diğerleri, J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203; Rowles ve diğerleri, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37):22376; Reverey ve diğerleri, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39):23607-10; Stanley ve diğerleri, J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121; Sisk ve diğerleri, J. VIROL. 10 (1994) 68(2):766; ve Peng ve diğerleri, BIOTECHNIQUES (1993) 14(2):274. Ticari olarak temin edilebilen lipozomlar, örneğin Cellfectin® ve Lipofectin® (Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA) ürünlerini içerir. Ayrıca, kalsiyum fosfat transfeksiyonu kullanılabilir. Bakınız, TROTTER VE WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995); Kitts, NAR (1990) 18(19):5667; ve Mann ve King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501.
- 15 Bakulovirus ekspresyon vektörleri genellikle bir bakulovirüs promoteri içerir. Bir bakulovirüs promoteri, bir bakulovirüs RNA polimerazını bağlayabilen ve bir kodlama dizisinin (örneğin, yapısal gen) mRNA'ya akış aşağı yönde (3') kopyalanmasını başlatabilen herhangi bir DNA dizisidir. Bir promoter, genellikle kodlama dizisinin 5' ucunun yakınına yerleştirilen bir kopyalamayı başlatma rejyonuna sahip olur. Bu 20 kopyalamayı başlatma rejyonu tipik olarak bir RNA polimeraz bağlayıcı bölgeyi ve bir kopyalamayı başlatma bölgesini içerir. Bir bakulovirüs promoteri, mevcut olması halinde genelde yapısal genin uzağında olan, arttırıcı denem ikinci bir bölgeye de sahip olabilir. Ayrıca ekspresyon, düzenlenmiş veya yapısal olabilir.
- 25 Enfeksiyon çevriminin geç zamanlarında bol miktarda kopyalanan yapısal genler, özellikle kullanışlı promoter dizileri sağlar. Örnekler, viral polihedron proteinini kodlayan genden (FRIESEN VE DİĞERLERİ, The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986); EP 0 127 839 ve 0 155 476) ve p10 proteinini kodlayan genden (Vlak ve diğerleri, J. GEN. VIROL. (1988) 69:765) türetilen dizileri içerir.
- 30 Yeni oluşturulan bakulovirüs ekspresyon vektörü, bir enfeksiyon rekombinant bakulovirüs içinde paketlenir ve daha sonra büyüyen plaklar, bu alanda normal deneyim sahibi kişilerce bilinen tekniklerle saflaştırılabilir. Bakınız, Miller ve diğerleri, BIOESSAYS (1989)

11(4):91; SUMMERS VE SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987).

Rekombinant bakulovirüs ekspresyon vektörleri, bazı böcek hücrelerine enfeksiyon için geliştirilmiştir. Örneğin, diğerlerinin yanı sıra *Aedes aegypti* (ATCC No. CCL-125),
 5 *Bombyx mori* (ATCC No. CRL-8910), *Drosophila melanogaster* (ATCC No. 1963), *Spodoptera frugiperda* ve *Trichoplusia ni* için rekombinant bakulovirüsler geliştirilmiştir. Bakınız, Wright, NATURE (1986) 321:718; Carbonell ve diğerleri, J. VIROL. (1985) 56:153; Smith ve diğerleri, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156. Genel olarak bakınız, Fraser ve diğerleri, IN VITRO CELL. DEV. BIOL. (1989) 25:225. Daha spesifik olarak,
 10 bakulovirüs ekspresyon vektörü sistemleri için yaygın şekilde kullanılan hücre türleri, Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (ATCC No. CRL-1711), Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp., Kat. No. 11497-013 (Carlsbad, CA)), Tri-368 (*Trichoplusia ni*) ve High-Five™ BTI-TN-5B1-4'ü (*Trichoplusia ni*) içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir.

Hücreler ve kültür ortamları, bir bakulovirüs/ekspresyon sisteminde heterolog
 15 polipeptitlerin doğrudan ve füzyon ekspresyonu için ticari olarak temin edilebilir; ve hücre kültürü teknolojisi bu alanda normal deneyim sahibi kişilerce genelde bilinmektedir.

E. Coli, *Pseudomonas türü*, ve diğer Prokaryotlar Bakteriyel ekspresyon teknikleri, bu alanda normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Bakteriyel konakçılarda kullanım için çok çeşitli vektörler mevcuttur. Vektörler, tek kopyalı ya da düşük veya yüksek çok
 20 kopyalı vektörler olabilir. Vektörler, klonlamaya ve/veya ekspresyona hizmet edebilir. Vektörlerle ilgili geniş literatür, birçok vektörün ticari olarak temin edilebilirliği, hatta vektörleri ve bunların restriksiyon haritalarını ve karakteristiklerini açıklayan kılavuzlar dikkate alındığında, burada kapsamlı bir açıklama gerekmemektedir. İyi bilindiği gibi, vektörler normal olarak seçime imkan veren işaretleri kapsamakta olup, bu işaretler,
 25 sitotoksik madde direnci, prototropi veya immünite sağlayabilir. Sıklıkla, farklı karakteristikler sağlayan çok sayıda işaret mevcuttur.

Bir bakteri promoteri, bakteri RNA polimerazını bağlama ve bir kodlama dizisinin (örneğin yapısal gen) mRNA'ya akış aşağı yönünde (3') kopyalanmasını başlatma kabiliyetine sahip herhangi bir DNA dizisidir. Bir promoter, genellikle kodlama dizisinin 5'
 30 ucunun yakınına yerleştirilen bir kopyalamayı başlatma rejyonuna sahip olur. Bu kopyalamayı başlatma rejyonu tipik olarak bir RNA polimeraz bağlayıcı bölgeyi ve bir kopyalamayı başlatma bölgesini içerir. Bir bakteri promoteri, RNA sentezinin başladığı bitişik bir RNA polimeraz bağlayıcı bölgesiyle çakışabilen, operatör adı verilen ikinci bir

bölgeye de sahip olabilir. Bir gen baskılayıcı proteininin operatörü bağlayarak belirli bir genin kopyalanmasını engelleyebilmesi nedeniyle, operatör, negatif düzenlenmiş (indüklenebilir) kopyalamaya izin verir. Operatör gibi, negatif düzenleyici elemanlar mevcut olmadığında yapısal ekspresyon gerçekleşebilir. Ek olarak, pozitif düzenleme, mevcut olması halinde genellikle RNA polimeraz bağlama dizisinin yakınında (5') bulunan bir gen aktivatör protein bağlama dizisiyle gerçekleştirilebilir. Gen aktivatör proteininin bir örneği, *Escherichia coli*'de (*E. coli*) lac operon'un kopyalanmasını başlatmaya yardımcı olan katabolit aktivatör proteinidir (CAP) [Raibaud ve diğerleri, ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173]. Bu nedenle, düzenlenmiş ekspresyon pozitif veya negatif olabilir ve kopyalamayı arttırabilir veya azaltabilir.

Metabolik yol enzimlerini kodlayan diziler, özellikle kullanışlı promoter dizileri sağlar. Örnekler, galaktoz, laktoz (*lac*) [Chang ve diğerleri, NATURE (1977) 198:1056] ve maltoz gibi şeker metabolize eden enzimlerden türetilen promoter dizilerini içerir. İlave örnekler, triptofan (*trp*) gibi biyosentetik enzimlerden türetilen promoter dizilerini içerir [Goeddel ve diğerleri, Nuc. ACIDS RES. (1980) 8:4057; Yelverton ve diğerleri, NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731; A.B.D. Pat. No. 4,738,921; EP Yayınları No. 036 776 ve 121 775]. β -galaktosidaz (*bla*) promoter sistemi [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." Interferon 3 (Ed. I. Gresser)], bakteriyofaj lambda PL [Shimatake ve diğerleri, NATURE (1981) 292:128] ve T5 [A.B.D. Pat. No. 4,689,406] promoter sistemleri de yararlı promoter dizileri sağlamaktadır. İlgilenilen polipeptiti yüksek seviyelerde indüklemek için T7 promoteri gibi güçlü promoterler kullanılabilir. Bu tip vektörlerin örnekleri teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinir ve Novagen'den pET29 serisini ve WO99/05297'de açıklanan pPOP vektörlerini içerir. Bu tip ekspresyon sistemleri, konakçı hücre yaşama kabiliyetinden veya büyüme parametrelerinden ödün vermeden, konakçıda yüksek seviyelerde polipeptit üretir. pET19 (Novagen), teknikte bilinen bir diğer vektördür.

Ayrıca, doğada meydana gelmeyen sentetik promoterler de bakteri promoterleri olarak işlev görür. Örneğin, bir bakteri veya bakteriyofaj promoterinin kopyalama aktivasyon dizilerinin başka bir bakteri veya bakteriyofaj promoterinin operon dizileriyle birleştirilmesiyle sentetik hibrit bir promoter oluşturulabilir [A.B.D. Pat. No. 4,551,433]. Örneğin, tac promoteri, lac represörüyle düzenlenen, *trp* promoteri ve lac operon dizilerinden meydana gelen hibrit bir *trp*-lac promoteridir [Amann ve diğerleri, GENE (1983) 25:167; de Boer ve diğerleri, PROC. NATAL. ACAD. SCI. (1983) 80:21]. Ayrıca,

bir bakteri promoteri, bakteri RNA polimerazını bağlama ve kopyalamayı başlatma kabiliyetine sahip olan, doğal olarak meydana gelen bakteri dışı kökenli promoterleri içerebilir. Doğal olarak meydana gelen bakteri dışı kökenli bir promoter, prokaryotlarda bazı genlerin yüksek seviyede ekspresyonunu üretmek için uyumlu bir RNA polimerazı ile de birleştirilebilir. Bakteriyofaj T7 RNA polimeraz/promoter sistemi, birleştirilmiş promoter sisteminin bir örneğidir [Studier ve diğerleri, J. MOL. BIOL. (1986) 189:113; Tabor ve diğerleri, Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]. Ayrıca, bir hibrit promoter; bir bakteriyofaj promoteri ve bir *E. coli* operatör rejyonundan da oluşabilir (EP Yayını No. 267 851).

- 10 Prokaryotlarda yabancı genlerin ekspresyonu için, fonksiyonel durumdaki bir promoter dizisine ek olarak, verimli bir ribozom bağlayıcı bölge de yararlıdır. *E. coli*'de, ribozom bağlayıcı bölge Shine-Dalgarno (SD) dizisi olarak adlandırılır ve bir başlatma kodonu (ATG) ile, başlatma kodonunun 3-11 nükleotit akış yukarı yönünde bulunan 3-9 nükleotit uzunluğunda bir dizi içerir [Shineve diğerleri, NATURE (1975) 254:34]. SD dizisinin, SD
- 15 dizisi ile 3' arasındaki bazların ve *E. coli* 16S rRNA'nın eşleştirilmesi yoluyla mRNA'nın ribozoma bağlanmasını desteklediği düşünülmektedir [Steitz ve diğerleri, "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)]. Zayıf ribozom bağlayıcı bölgeye sahip ökaryotik genleri ve prokaryotik genleri eksprese etmek için [Sambrook ve diğerleri,
- 20 "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989].

- "Bakteri konakçısı" veya "bakteri konakçı hücresi" terimi, rekombinant vektörler veya diğer transfer DNA için bir alıcı olarak kullanılabilen veya kullanılmış bir bakteriyi ifade eder. Bu terim, orijinal bakteri konakçı hücresinin transfekte edilmiş soyunu kapsar. Tek
- 25 bir ana hücrenin soyunun, rastlantısal veya kasıtlı mutasyondan dolayı, morfolojik açıdan ya da genomik veya toplam DNA komplemanı açısından orijinal ana hücreyle mutlaka tamamen özdeş olmayabileceği anlaşılmaktadır. Ana hücrenin, ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan bir nükleotit dizisinin mevcudiyeti gibi, ilgili bir özelliklerle karakterize edilmek için ana hücreye yeterince benzeyen soylar, bu tanımlama ile kast edilen soylara dahil
 - 30 edilmektedir.

Polipeptitlerin ekspresyonu için uygun konakçı bakterilerin seçimi, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Ekspresyon için bakteri konakçılarının seçiminde, uygun konakçılar, diğerlerinin yanı sıra iyi inklüzyon cisimciği oluşturma kapasitesi, düşük

proteolitik aktivite ve genel dayanıklılığa sahip olduğu gösterilen konakçıları içerebilir. Bakteri konakçıları, genellikle Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA) ve American Type Culture Collection ("ATCC") (Manassas, VA) dahil, ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli

5 kaynaklardan temin edilebilir. Endüstriyel/farmasötik fermantasyonda genellikle K suşlarından türetilmiş bakteriler (örneğin W3110) veya B suşlarından türetilmiş bakteriler (örneğin BL21) kullanılır. Bu suşlar, büyüme parametrelerinin son derece iyi bilinmesi ve dayanıklı olması nedeniyle özellikle kullanışlıdır. İlave olarak bu suşlar patojenik değildir; bu da güvenlik ve çevresel nedenlerle ticari açıdan önemlidir. Uygun *E. coli* konakçılarının

10 diğer örnekleri, BL21, DH10B suşlarını veya bunların türevlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Mevcut açıklamanın usullerinin bir başka düzenlemesinde, *E. coli* konakçısı, OMP- ve LON-'yi içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan bir proteaz minus suşudur. Konakçı hücre suşu, sınırlayıcı olmamak üzere, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas putida* dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak

15 üzere, bir *Pseudomona* türü olabilir. *Pseudomonas fluorescens* biovar 1'in, (MB101 olarak bilinen suş), rekombinant üretim için yararlı olduğu bilinir ve terapötik protein üretim işlemleri için temin edilebilir. Bir *Pseudomonas* ekspresyon sisteminin örnekleri, bir konakçı suşu olarak The Dow Chemical Company'den temin edilebilen sistemi içerir (Midland, MI; World Wide Web'de dow.com adresinde bulunabilir). A.B.D. Patentleri No.

20 4,755,465 ve 4,859,600'de, hGH üretimi için bir konakçı hücre olarak *Pseudomonas* suşlarının kullanımı açıklanmaktadır.

Bir rekombinant konakçı hücre suşunun oluşturulmasından sonra (yani, ekspresyon yapısı konakçı hücreye eklenmiştir ve düzgün ekspresyon yapısına sahip konakçı hücreler izole edilir), rekombinant konakçı hücre suşu, ilgilenilen polipeptitin üretimi için uygun koşullar

25 altında kültürlenir. Teknikte deneyimli kişilerce açıkça görüleceği gibi, rekombinant konakçı hücre suşunu kültürleme usulü, kullanılan ekspresyon yapısının niteliğine ve konakçı hücrenin özdeşliğine bağlı olacaktır. Rekombinant konakçı suşlar, normal olarak teknikte iyi bilinen usuller kullanılarak kültürlenir. Rekombinant konakçı hücreler tipik olarak sindirilebilir karbon, azot ve inorganik tuz kaynakları içeren, ve isteğe bağlı olarak

30 vitaminler, amino asitler, büyüme faktörleri ve teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinen başka proteinli kültür destekleri içeren sıvı ortam içinde kültürlenir. Konakçı hücrelerin kültürlenmesi için sıvı ortamlar, isteğe bağlı olarak, arzu edilmeyen mikroorganizmaların gelişmesini önlemek için antibiyotikler veya anti-fungallar, ve/veya

ekspresyon vektörünü içeren konakçı hücreleri seçmek için antibiyotikleri içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan bileşikler içerebilir.

Hedef nükleik asitlerin hücrelere eklenmesi için iyi bilinen çeşitli usuller mevcut olup, bu buluşta bunların herhangi biri kullanılabilir. Bunlar, alıcı hücrelerin DNA içeren bakteri protoplastlarıyla füzyonu, elektroporasyon, projektıl bombardıman ve viral vektörlerle enfeksiyon (aşağıda ayrıca açıklanacaktır) ve benzerlerini içerir. Bakteri hücreleri, bu buluşun DNA yapılarını içeren plazmitlerin sayısını büyötmek için kullanılabilir. Bakteriler log fazına kadar büyütölür ve bakterilerin içindeki plazmitler, teknikte bilinen çeşitli usullerle izole edilebilir (bakınız, örneğın, Sambrook). İlave olarak, bakterilerden plazmitlerin saflaştırılmasına yönelik kitler ticari olarak temin edilebilir (bakınız, örneğın, ikisi de Pharmacia Biotech'ten olmak üzere, EasyPrep™, FlexiPrep™; Stratagene'den StrataClean™; ve Qiagen'den QIAprep™). İzole edilmiş ve saflaştırılmış plazmitler daha sonra diğır plazmitleri üretmek için ayrıca manipölle edilir, hücreleri transfekte etmek için kullanılır veya organizmaları enfekte etmek için ilgili vektörlere eklenir. Tipik vektörler, kopyalama ve translasyon terminatörleri, kopyalama ve translasyonu başlatma dizileri, ve belirli hedef nükleik asidin ekspresyonunun düzenlenmesi için yararlı promoterler içerir. Vektörler isteğre bağılı olarak en az bir adet bağımsız terminatör dizi, ökaryotlarda veya prokaryotlarda veya her ikisinde kasetin replikasyonuna imkan veren diziler (sınırlayıcı olmamak üzere, mekik vektörleri dahil) ve hem prokaryotik hem ökaryotik sistemler için seçim işaretleri içeren jenerik ekspresyon kasetleri içerir. Vektörler, prokaryotlarda, ökaryotlarda veya her ikisinde replikasyon ve entegrasyon için uygundur. Bakınız, Gillam ve Smith, Gene 8:81 (1979); Roberts ve diğırleri, Nature, 328:731 (1987); Schneider, E. ve diğırleri, Protein Expr. Purif. 6(1):10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (tümü yukarıda). Klonlamada yararlı bakterilerin ve bakteriyofajların bir katalogu, örneğın ATCC tarafından sağlanmaktadır (örneğın, ATCC tarafından yayınlanan The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna ve diğırleri (editörler)). Dizilim, klonlama ve moleköler biyolojinin diğır yönleriyle ilgili ilave temel prosedürler ve temel teorik değırlendirmeler, ayrıca Watson ve diğırleri (1992) Recombinant DNA (İkinci Baskı, Scientific American Books, NY) kapsamında bulunmaktadır. İlave olarak, esas itibarıyla herhangi bir nükleik asit (ve standart veya standart dışı olmak üzere, hemen hemen her türlü etiketli nükleik asit), Midland Certified Reagent Company (Midland, TX; World Wide Web'de mcrc.com adresinde bulunabilir), The Great American Gene Company (Ramona, CA; World Wide Web'de genco.com adresinde bulunabilir), ExpressGen Inc.

(Chicago, IL; World Wide Web'de expressgen.com adresinde bulunabilir), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) ve birçok diğeri gibi çeşitli ticari kaynakların herhangi birinden özel veya standart olarak sipariş edilebilir.

Rekombinant konakçı hücreler, kesikli veya sürekli formatlarda olmak üzere, hücre hasadı (ilgilenilen polipeptitin hücre içinde birikmesi durumunda) ya da kültür üstte yüzen kısmının hasadı ile, kesikli veya sürekli formatlarda kültürlenebilir. Prokaryotik konakçı hücrelerde üretim için kesikli kültür ve hücre hasadı tercih edilir.

SELEKTÖR KODONLAR

Mevcut açıklamanın selektör kodonları, protein biyosentetik mekanizmasının genetik kodon çerçevesini genişletmektedir. Örneğin, bir selektör kodon, örneğin benzersiz bir üç bazlı kodon; bir amber kodon (UAG), bir okra kodon veya bir opal kodon (UGA) dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir stop kodonu gibi bir nonsens kodon; bir doğa dışı kodon, dört (veya daha çok) bazlı bir kodon, bir nadir kodon veya benzerlerini içerir. Arzu edilen bir gene veya polinükleotide birkaç adet, örneğin bir veya daha çok, iki veya daha çok, üç veya daha çok vs. sayıda selektör kodon eklenebilir.

Bu açıklamanın selektör kodonları, protein biyosentetik mekanizmasının genetik kodon çerçevesini genişletmektedir. Örneğin, bir selektör kodon, benzersiz bir üç bazlı kodon; bir amber kodon (UAG), bir okra kodon veya bir opal kodon (UGA) dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir stop kodonu gibi bir nonsens kodon; bir doğa dışı kodon, dört veya daha çok bazlı bir kodon, bir nadir kodon veya benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Mevcut buluşun kullanıldığı genetik olarak modifiye edilmiş tam organizmaların (MAP ve *E. coli*) sınırlayıcı olmayan örnekleri olarak, antijeni veya tam organizmayı kodlayan tek bir polinükleotide, bir veya üstü, iki veya üstü, üç veya üstü, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya üstü dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, arzu edilen bir gene veya polinükleotide eklenebilen selektör kodonların sayısında büyük bir çeşitliliğin mevcut olduğu, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce kolayca görülecektir.

Bir düzenlemede, usuller, seçilen bir amino asidin, örneğin doğa dışı bir amino asidin in vivo olarak dahil edilmesi için bir stop kodonu olan bir selektör kodonun kullanımını kapsar. Örneğin, stop kodonunu tanıyan ve O-RS tarafından, seçilmiş bir amino asitle aminoasillen bir O-tRNA üretilir. Bu O-tRNA, doğal olarak meydana gelen konakçının aminoasıl-tRNA sentetazları tarafından tanınmaz. İlgilenilen bir polipeptitteki ilgilenilen bölgede stop kodonunu dahil etmek için geleneksel bölgeye yönelik mutajenez

kullanılabilir. Bakınız, örneğin, Sayers, J.R. ve diğerleri (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 16:791-802. O-RS, O-tRNA ve ilgilenilen bir polipeptiti kodlayan nükleik asit, örneğin in vivo olarak birleştirildiğinde, seçilen amino asit, belirtilen pozisyonda seçilen amino asidi, 5 örneğin bir doğadışı amino asidi içeren bir polipeptit sağlamak üzere, stop kodonuna tepki olarak dahil edilir. Mevcut açıklamanın bir düzenlemesinde, bir selektör kodon olarak kullanılan bir stop kodonu, bir amber kodon (UAG) ve/veya bir opal kodondur (UGA). Örneğin, bir amber kodonu tanıyan bir O-tRNA için örnek olarak bakınız, DİZİ ID NO.: 6, ve bir opal kodonu tanıyan bir O-tRNA için örnek olarak bakınız, DİZİ ID NO.: 7. UAG 10 ve UGA'nın her ikisinin de bir selektör kodon olarak kullanıldığı bir genetik kod, 22 amino asidi kodlayabilirken, en bol terminasyon sinyali olan okre nonsens kodonunu (UAA) muhafaza eder.

Seçilen amino asitlerin, örneğin doğadışı amino asitlerin in vivo olarak dahil edilmesi, konakçı hücrede önemli bir bozulma olmadan yapılabilir. Örneğin, *Escherichia coli* gibi 15 ökaryotik olmayan hücrelerde, UAG kodonunun baskılama verimliliğinin O-tRNA (örneğin, amber baskılayıcı tRNA) ile salım faktörü 1 (UAG kodonuna bağlanır ve büyüyen peptitin ribozomdan salınmasını başlatır) arasındaki rekabete bağlı olmasından dolayı, baskılama verimliliği, örneğin O-tRNA'nın, örneğin baskılayıcı tRNA'nın ekspresyon seviyesini artırma veya RF1 eksikli bir suş kullanma yoluyla modüle 20 edilebilir. Ökaryotik hücrelerde, UAG kodonunun baskılama verimliliğinin O-tRNA (örneğin, amber baskılayıcı tRNA) ile bir ökaryotik salım faktörü (örneğin, eRF) (bir stop kodonuna bağlanır ve büyüyen peptitin ribozomdan salınmasını başlatır) arasındaki rekabete bağlı olmasından dolayı, baskılama verimliliği, örneğin O-tRNA'nın, örneğin baskılayıcı tRNA'nın ekspresyon seviyesini artırma yoluyla modüle edilebilir.

25 Doğadışı amino asitler, nadir kodonlarla da kodlanabilir. Örneğin, bir in vitro protein sentez reaksiyonunda arjinin konsantrasyonu azaldığında, nadir arjinin kodonunun (AGG), alaninle açillenmiş bir sentetik tRNA tarafından Ala'nın eklenmesinde etkin olduğu kanıtlanmıştır. Bakınız, örneğin, Ma ve diğerleri, *Biochemistry*, 32:7939 (1993). Bu durumda sentetik tRNA, *Escherichia coli*'de az miktarda bir tür olarak mevcut olan, doğal 30 olarak meydana gelen tRNA^{Arg} ile rekabet eder. Bazı organizmalar tüm üçlü kodonları kullanmaz. Amino asitlerin bir in vitro kopyalama/translasyon ekstraktına yerleştirilmesi için, *Micrococcus luteus*'daki atanmamış bir klon kullanılmıştır. Bakınız, örneğin, Kowal

ve Oliver, Nucl. Acid. Res., 25:4685 (1997). Mevcut açıklamanın bileşenleri, bu nadir kodonları in vivo olarak kullanmak için oluşturulabilir.

Selektör kodonlar ayrıca genişletilmiş kodonlar (örneğin, dört, beş, altı veya daha çok bazlı kodonlar gibi, dört veya daha çok bazlı kodonlar) içerebilir. Dört bazlı kodonların örnekleri, AGGA, CUAG, UAGA, CCCU ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Beş bazlı kodonların örnekleri, AGGAC, CCCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bir özellik, çerçeve kayması baskılamasına dayanan genişletilmiş kodonların kullanılmasını içerebilir. Dört veya daha çok bazlı kodonlar, aynı proteine, doğadışı amino asitler dahil, ancak onlarla sınırlı olmamak üzere, örneğin bir veya birden çok seçilmiş amino asit ekleyebilir. Örneğin, antikodon ilmekleriyle, örneğin bir CU(X)_n XXXAA dizisiyle (burada n=1) mutasyona uğratılmış O-tRNA'ların, örneğin özel bir çerçeve kayması baskılayıcı tRNA'nın mevcudiyetinde, dört veya daha çok bazlı kodon, tek bir amino asit olarak okunur. Örneğin, dört bazlı bir kodonu tanıyan O-tRNA'lar için, bakınız PCT/US04/22061'den DİZİ ID NO: 6, 12. Diğer düzenlemelerde antikodon ilmekleri, örneğin en az dört bazlı bir kodonun, en az beş bazlı bir kodonun, veya en az altı veya daha çok bazlı bir kodonun kodunu çözebilir. 256 adet muhtemel dört bazlı kodon mevcut olduğundan, dört veya daha çok bazlı bir kodon kullanılarak, aynı hücrede birden çok doğadışı amino asit kodlanabilir. Bakınız, Anderson ve diğerleri, (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" "Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307: 755-769.

Örneğin, in vitro biyosentetik usuller kullanarak proteinlere doğadışı amino asitler eklemek için dört bazlı kodonlar kullanılmıştır. Bakınız, örneğin, Ma ve diğerleri, (1993) Biochemistry, 32:7939; ve Hohsaka ve diğerleri, (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:34. İki adet kimyasal olarak açılmış çerçeve kayması baskılayıcı tRNA ile in vitro olarak streptavidine aynı anda 2-naftilalanin ve lizinin bir NBD türevini eklemek için CGGG ve AGGU kullanılmıştır. Bakınız, örneğin, Hohsaka ve diğerleri, (1999) J. Am. Chem. Soc., 121:12194. Bir in vivo çalışmada, Moore ve diğerleri, NCUA antikodonları içeren tRNA^{Leu} türevlerinin UAGN kodonlarını (N; U, A, G veya C olabilir) baskılama kabiliyetini incelemiş ve dörtlü UAGA'nın kodunun bir UCUA antikodonuyla, 0 veya -1 çerçevesinde az bir kod çözme ile %13 ila %26 verimlilikle çözülebildiğini tespit

etmişlerdir. Bakınız, Moore ve diğerleri, (2000) J. Mol. Biol., 298:195. Bir düzenlemede, bu buluşta, diğer istenmeyen bölgelerde yanlış anlam okumasını ve çerçeve kayması baskılamasını azaltabilen, nadir kodonlara veya nonsens kodonlara dayanan genişletilmiş kodonlar kullanılabilir.

- 5 Belirtilen bir sistemde, bir selektör kodon ayrıca, doğal üç bazlı kodonlardan birini içerebilmekte olup, burada endojen sistem, doğal bazlı kodonu kullanmaz (veya seyrek olarak kullanır). Örneğin bu, doğal üç bazlı kodonu tanıyan bir tRNA'nın eksik olduğu bir sistemi ve/veya üç bazlı kodonun bir nadir kodon olduğu bir sistemi içerir.

- 10 Selektör kodonlar isteğe bağlı olarak doğadışı baz çiftleri içerir. Bu doğadışı baz çiftleri mevcut genetik alfabeyi daha da genişletir. Fazladan bir baz çifti, üçlü kodonların sayısını 64'ten 125'e çıkarır. Üç bazlı çiftlerin özellikleri, stabil ve seçici baz eşleştirme, bir polimeraz tarafından DNA'ya yüksek doğrulukla etkin enzim katılması, ve yeni oluşan doğadışı baz çiftinin sentezinden sonra etkin sürekli primer genişlemesini içerir. Usuller ve bileşimler için uyarlanabilen doğadışı baz çiftlerinin açıklamaları örneğin Hirao ve
15 diğerleri, (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182'de sunulanları içerir. Bakınız, ayrıca Wu, Y. ve diğerleri, (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630. Diğer ilgili yayınlar aşağıda sıralanmaktadır.

- In vivo kullanımda, doğadışı nükleosit membrandan geçebilir ve mütakabil trifosfatı
20 oluşturmak için fosforillenir. İlave olarak, artan genetik bilgiler stabildir ve hücrel enzimler tarafından tahrip edilmez. Benner ve diğerlerinin daha önceki çalışmalarında, en dikkate değer örneği iso-C:iso-G olan kanonik Watson-Crick çiftlerinden farklı olan hidrojen bağlama desenlerinden yararlanılmıştır. Bakınız, örneğin, Switzer ve diğerleri, (1989) J. Am. Chem. Soc., 111:8322; ve Piccirilli ve diğerleri, (1990) Nature, 343:33;
25 Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602. Bu bazlar genel olarak doğal bazlarla yanlış şekilde eşleşir ve enzimatik olarak çoğalamaz. Kool ve çalışma arkadaşları, bazlar arasındaki hidrofobik sıkıştırma etkileşimlerinin, baz çiftinin oluşumu için hidrojen bağlamanın yerini alabileceğini ortaya koymuşlardır. Bakınız, Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602; ve Guckian ve Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825.
30 Schultz, Romesberg ve çalışma arkadaşları, yukarıdaki tüm gereklilikleri karşılayan bir doğadışı baz çifti geliştirmeye yönelik bir çalışmada bir dizi doğadışı hidrofobik bazı sistematik olarak sentezlemiş ve incelemiştir. Bir PICS:PICS öz çiftinin doğal baz çiftlerinden daha stabil olduğu tespit edilmiş ve Escherichia coli DNA polimeraz I'in (KF)

Klenow fragmanı tarafından verimli biçimde DNA'ya dahil edilebilmiştir. Bakınız, örneğin, McMinn ve diğerleri, (1999) J. Am. Chem. Soc., 121: 11585-6; ve Ogawa ve diğerleri, (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:3274. Bir 3MN:3MN öz çifti, KF tarafından, biyolojik fonksiyon için yeterli verimlilik ve seçicilikle sentezlenebilmektedir. Bakınız, 5 örneğin, Ogawa ve diğerleri, (2000) L Am. Chem. Soc., 122:8803. Bununla birlikte her iki baz da daha fazla replikasyon için bir zincir terminatörü olarak hareket eder. Yakın zamanlarda, PICS öz çiftini çoğaltmak için kullanılabilen bir mutant DNA polimeraz geliştirilmiştir. İlave olarak, bir 7AI öz çifti çoğaltılabilir. Bakınız, örneğin, Tae ve diğerleri, (2001) J. Am. Chem. Soc., 123:7439. Ayrıca, Cu(II) bağlandığında stabil bir çift 10 oluşturan yeni bir metalobaz çifti (Dipic:Py) geliştirilmiştir. Bakınız, Meggers ve diğerleri, (2000) J. Am. Chem. Soc., 122:10714. Genişletilmiş kodonların ve doğadışı kodonların doğal kodonlara doğal olarak ortogonal olmalarından dolayı, mevcut açıklamanın usullerinde, bunlar için ortogonal tRNA'lar oluşturmak üzere bu özellikten yararlanılabilir.

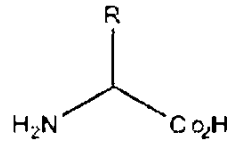
Seçilen bir amino asidi, örneğin bir doğadışı amino asidi arzu edilen bir polipeptite dahil 15 etmek için bir translasyonel baypas sistemi de kullanılabilir. Bir translasyonel baypas sisteminde, büyük bir dizi, bir genin içine eklenir, ancak proteine çevrilmez. Bu dizi, ribozomun dizinin üstünden atlamasına yol açmak ve eklemenin akış aşağı yönünde translasyonu sürdürmek için bir işaret görevi yapan bir yapı içerir.

SEÇİLEN VE DOĞADISI AMİNO ASİTLER

Burada kullanıldığı şekilde, bir "seçilmiş amino asit", herhangi bir arzu edilen, doğal olarak meydana gelen amino asidi veya doğadışı amino asidi ifade eder. Doğal olarak meydana gelen bir amino asit, yirmi adet genetik olarak kodlanmış alfa-amino asitten herhangi birini kapsar: alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glutamin, glutamik asit, glisin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, 25 triptofan, tirozin, valin. Bir düzenlemede, seçilen amino asit, büyüyen bir polipeptit zincirine yüksek doğrulukla, örneğin, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %70'ten fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %75'ten fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %80'den fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %85'ten fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık 30 %90'dan fazla verimlilikle, belirtilen bir selektör kodon için yaklaşık %95'ten fazla verimlilikle, veya belirtilen bir selektör kodonu için yaklaşık %99 veya daha fazla verimlilikle dahil edilir.

Burada kullanıldığı şekilde doğadışı bir amino asit, selenosistein ve/veya pirolizin ile aşağıdaki yirmi adet genetik olarak kodlanmış alfa-amino asit dışındaki herhangi bir amino asit, modifiye edilmiş amino asit veya amino asit analogunu ifade eder: alanin, arjinin, asparajin, aspartik asit, sistein, glutamin, glutamik asit, glisin, histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, triptofan, tirosin, valin. Bir alfa-amino asidin jenerik yapısı Formül I ile gösterilmektedir:

I



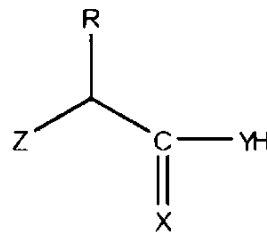
Bir doğadışı amino asit, tipik olarak Formül I'e sahip herhangi bir yapı olup, burada R grubu, yirmi doğal amino asitte kullanılan dışındaki herhangi bir süstitüenttir. Yirmi doğal amino asidin yapıları için, bakınız örneğin, Biochemistry; L. Stryer, 3. Baskı, 1988, Freeman and Company, New York. Mevcut buluşun doğadışı amino asitlerinin, yukarıdaki yirmi alfa-amino asit dışındaki doğal olarak meydana gelen bileşikler olabildiğine dikkat edilmelidir.

Mevcut buluşun doğadışı amino asitlerinin tipik olarak sadece yan zincirin yapısı açısından doğal amino asitlerden farklı olmaları nedeniyle, doğadışı amino asitler, doğal olarak meydana gelen proteinlerde oluştukları şekilde, doğal veya doğadışı dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, diğer amino asitlerle amid bağları oluşturur. Bununla birlikte, doğadışı amino asitler, onları doğal amino asitlerden ayıran yan zincir gruplarına sahiptir. Örneğin, Formül I'deki R, bir alkil-, aril-, açıl-, keto-, azido-, hidroksil-, hidrazin, siyano-, halo-, hidrazit, alkenil, alkinil, eter, tiyol, seleno-, sülfonil-, borat, boronat, fosfo, fosfono, fosfin, heterosiklik, enon, imin, aldehit, ester, tiyoasit, hidroksilamin, amin ve benzerlerini veya bunların herhangi bir kombinasyonunu içerebilir. Diğer doğal olmayan şekilde meydana gelen amino asitler, ışıkla aktif hale getirilebilen bir çapraz bağlayıcı içeren amino asitleri, spin etiketli amino asitleri, floresan amino asitleri, metal bağlayıcı amino asitleri, metal içeren amino asitleri, radyoaktif amino asitleri, yeni fonksiyonel gruplara sahip amino asitleri, diğer moleküllerle eşdeğerli veya eşdeğerli olmayan bir şekilde etkileşime giren amino asitleri, "photocaging" işlemi uygulanmış ve/veya fotoizomerize edilebilir amino asitleri, biyotin veya bir biyotin analogu içeren amino asitleri, şekerle süstitüe edilmiş bir serin gibi glikosilatlanmış amino asitleri, diğer karbonhidratla

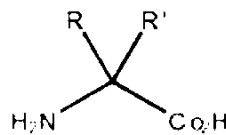
modifiye edilmiş amino asitleri, keto içeren amino asitleri, polietilen glikol veya polieter içeren amino asitleri, ağır atomla sübstütüe edilmiş amino asitleri, kimyasal olarak bölünebilen ve/veya ışıkla bölünebilen amino asitleri, polieterleri veya uzun zincirli hidrokarbonları (sınırlayıcı olmamak üzere, yaklaşık 5'ten fazla veya yaklaşık 10'dan fazla karbon atomu dahil) içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan doğal amino asitlere kıyasla uzatılmış yan zincirlere sahip amino asitleri, karbon bağlantılı şeker içeren amino asitleri, redoks aktif amino asitleri, amino tiyoasit içeren amino asitleri ve bir veya daha çok toksik parça içeren amino asitleri kapsar, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bakınız, ayrıca, A.B.D. Patent Başvurusu Yayınları 2003/0082575 ve 2003/0108885. Doğadışı amino asitler, örneğin bir proteini katı bir desteğe bağlamak için kullanılan, ışıkla aktif hale getirilebilen bir çapraz bağlayıcıya sahip olabilir. Doğadışı amino asitler, amino asit yan zincirine bağlı bir sakarit parçasına sahip olabilir.

İsteğe bağlı olarak doğadışı amino asitler, yeni yan zincirler içeren doğadışı amino asitlere ilave olarak, ayrıca örneğin Formül II ve III'ün yapılarıyla gösterildiği gibi, modifiye edilmiş omurga yapılarına sahip olabilir:

II



III



burada Z, tipik olarak OH, NH₂, SH, NH-R' veya S-R' 'yi kapsar; aynı veya farklı olabilen X ve Y, tipik olarak S veya O'yu kapsar, ve isteğe bağlı olarak aynı veya farklı olabilen R ve R', tipik olarak, yukarıda Formül I'e sahip doğadışı amino asitler için açıklanan R grubuyla aynı bileşen listesi ile hidrojen arasından seçilir. Örneğin, doğadışı amino asitler, Formüller II ve III'te gösterildiği gibi, amino veya karboksil grubunda sübstütüsyonlar içerebilir. Bu tip doğadışı amino asitler, örneğin genel yirmi doğal amino aside tekabül

eden yan zincirlere veya doğadışı yan zincirlere sahip α -hidroksi asitleri, α -tiyoasitleri, α -aminotiyokarboksilatları içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Ayrıca, α -karbondaki sübstitüsyonlar isteğe bağlı olarak D-glutamat, D-alanin, D-metil-O-tirosin, aminobütirik asit ve benzerleri gibi L, D veya α - α -disübstitüe edilmiş amino asitleri içerir. Diğer yapısal alternatifler, prolin analoglarının yanı sıra 3, 4, 6, 7, 8 ve 9 üyeli halka prolin analogları gibi siklik amino asitleri, sübstitüe edilmiş β -alanin gibi β ve γ amino asitleri ve γ -amino bütirik asidi içerir.

Birçok doğadışı amino asit, tirosin, glutamin, fenilalanin ve benzerleri gibi doğal amino asitlere dayanır. Tirosin analogları, para-sübstitüe tirosinleri, orto-sübstitüe tirosinleri ve meta sübstitüe tirosinleri içermekte olup, burada sübstitüe edilmiş tirosin, bir keto grubu (sınırlayıcı olmamak üzere, bir asetil grubu dahil), bir benzoil grubu, bir amino grubu, bir hidrazin, bir hidroksiamin, bir tiyol grubu, bir karboksi grubu, bir izopropil grubu, bir metil grubu, bir C₆ - C₂₀ düz zincirli veya dallanmış hidrokarbon, sübstitüe edilmiş veya sübstitüe edilmemiş bir hidrokarbon, bir O-metil grubu, bir polieter grubu, bir nitro grubu veya benzerlerini kapsar. İlave olarak, birden çok sübstitüe edilmiş aril halkaları da düşünülmektedir. Glutamin analogları, α -hidroksi türevlerini, γ -sübstitüe türevleri, siklik türevleri ve amid sübstitüentli glutamin türevlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Örnek fenilalanin analogları, sınırlayıcı olmamak üzere para-sübstitüe fenilalaninleri, orto-sübstitüe fenilalaninleri ve meta-sübstitüe fenilalaninleri içermekte olup, burada sübstitüent, bir hidroksi grubu, bir metoksi grubu, bir metil grubu, bir alil grubu, bir aldehit, bir azido, bir iyodo, bir bromo, bir keto grubu (sınırlayıcı olmamak üzere, bir asetil grubu dahil) veya benzerlerini kapsar. Doğadışı amino asitlerin spesifik örnekleri, bir p-asetil-L-fenilalanin, bir p-proparjil-fenilalanin, O-metil-L-tirosin, bir L-3-(2-naftil)alanin, bir 3-metil-fenilalanin, bir O-4-alil-L-tirosin, bir 4-propil-L-tirosin, bir tri-O-asetil-GlcNAc β -serin, bir L-Dopa, bir florlu fenilalanin, bir izopropil-L-fenilalanin, bir p-azido-L-fenilalanin, bir p-açıl-L-fenilalanin, bir p-benzoil-L-fenilalanin, bir L-fosfoserin, bir fosfonoserin, bir fosfonotirosin, bir p-iyodo-fenilalanin, bir p-bromofenilalanin, bir p-amino-L-fenilalanin, bir izopropil-L-fenilalanin ve bir p-proparjiloksi-fenilalanin ve benzerlerini içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Çeşitli doğadışı amino asitlerin yapıları için örnekler, örneğin "In vivo incorporation of unnatural amino acids" başlıklı WO 2002/085923'te sağlanmaktadır. İlave metiyonin analogları için, bakınız ayrıca, Kiick ve diğerleri (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24erecin.

Bir polipeptite amino terminusunda eklenen bir doğal olmayan amino asit, yirmi doğal amino asitte kullanılan dışındaki herhangi bir süstitüent olan bir R grubu, ve α -amino asitlerde (bakınız, Formül I) normal olarak mevcut olan NH_2 grubundan farklı 2. bir reaktif gruptan oluşabilir. α -amino asitlerde (bakınız, Formül I) normal olarak mevcut olan COOH grubundan farklı 2. bir reaktif grupla, karboksi terminusunda benzer bir doğal olmayan amino asit eklenebilir.

Bu buluşun doğadışı amino asitleri, yirmi doğal amino asitte mevcut olmayan ilave karakteristikler sağlamak üzere seçilebilir veya tasarlanabilir. Örneğin, doğadışı amino asit, isteğe bağlı olarak, örneğin içine eklendikleri bir proteinin biyolojik özelliklerini modifiye edecek şekilde tasarlanabilir veya seçilebilir. Örneğin bir doğadışı amino asidin bir proteine dahil edilmesiyle aşağıdaki özellikler isteğe bağlı olarak modifiye edilebilir: toksisite, biyolojik dağılım, çözünürlük, stabilite (örneğin termal, hidrolitik, oksidatif, enzimatik degradasyona karşı direnç ve benzerleri), saflaştırma ve işleme kolaylığı, yapısal özellikler, spektroskopik özellikler, kimyasal ve/veya fotokimyasal özellikler, katalitik aktivite, redoks potansiyeli, yarı ömür, diğer moleküllerle reaksiyona girme kabiliyeti (örneğin eşdeğerli veya eşdeğerli olmayan bir şekilde) ve benzerleri.

Çeşitli doğadışı amino asitlerin yapıları, örneğin "In vivo incorporation of unnatural amino acids" başlıklı WO 2002/085923'teki Şekiller 16, 17, 18, 19, 26 ve 29'da sağlanmaktadır. Bu örneklerin hiçbir şekilde mevcut açıklamanın bir tRNA'ya bağlanabilen amino asitlerini sınırlandırması amaçlanmamaktadır.

Bir doğadışı amino asidin bir avantajı, ilave moleküller eklemek için kullanılabilen ilave kimyasal parçalar sunmasıdır. Bu modifikasyonlar ökaryotik veya ökaryotik olmayan bir hücrede in vivo olarak, veya in vitro olarak yapılabilir. Bu nedenle belirli düzenlemelerde posttranslasyonel modifikasyon, doğadışı amino asit vasıtasıyla yapılır. Bir polipeptitteki bir doğadışı amino asit, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce belirli reaktif gruplar için uygun olduğu bilinen kimya metodolojisinden yararlanılarak, polipeptite bir etiket, a boyar madde, bir polimer, suda çözünebilen bir polimer, bir polietilen glikol türevi, bir foto-çapraz bağlayıcı, bir radyonüklid, sitotoksik bir bileşik, bir ilaç, bir afinite etiketi, bir fotoafinite etiketi, reaktif bir bileşik, bir reçine, ikinci bir protein veya polipeptit veya polipeptit analogu, bir antikor veya antikor fragmanı, bir metal şelatörü, bir kofaktör, bir yağ asidi, bir karbonhidrat, bir polinükleotit, bir DNA, bir RNA, bir antisens polinükleotiti, bir sakarit, suda çözünebilen bir dendrimer, bir siklodekstrin, bir inhibitör ribonükleik asit, bir biyomalzeme, bir nanopartikül, bir spin etiketi, bir florofofor, metal içeren bir parça,

radyoaktif bir parça, yeni bir fonksiyonel grup, diğer moleküllerle eşdeğerli veya eşdeğerli olmayan bir şekilde etkileşime giren bir grup, "photocaging" işlemi uygulanmış bir parça, aktinik radyasyonla uyarılabilen bir parça, fotoizomerize edilebilen bir parça, biyotin, bir biyotin türevi, bir biyotin analogu, bir ağır atoma sahip bir parça, kimyasal olarak bölünebilen bir grup, 5 ışıkla bölünebilen bir grup, uzatılmış bir yan zincir, karbon bağlantılı bir şeker, redoks aktif bir madde, bir amino tiyoasit, toksik bir parça, izotopik olarak etiketlenmiş bir parça, bir biyofiziksel prob, bir fosforesan grup, bir kemiluminesan grup, bir elektron yoğun grup, bir manyetik grup, bir interkalasyon grubu, bir kromofor, bir enerji transfer maddesi, biyolojik açıdan aktif bir madde, saptanabilir bir etiket, bir küçük 10 molekül, bir kuantum noktası, bir nanotransmitter, veya yukarıdakilerin herhangi bir kombinasyonu ya da bir birinci reaktif grup içeren en az bir adet doğadışı amino aside reaktif ikinci bir grup içeren herhangi bir arzu edilen bileşik veya madde dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, bir başka molekül eklemek için kullanılabilir.

Örneğin, posttranslasyonel modifikasyon, bir nükleofilik-elektrofilik reaksiyon yoluyla gerçekleştirilebilir. Proteinlerin seçici modifikasyonu için halen kullanılan reaksiyonların çoğu, α -haloketonların histidin veya sistein yan zincirleriyle reaksiyonu dahil, ancak bununla sınırlı olmamak üzere, nükleofilik ve elektrofilik reaksiyon ortakları arasında eşdeğerli bağ oluşumunu kapsar. Bu durumlarda seçicilik, proteindeki nükleofilik kalıntıların sayısı ve erişilebilirliği ile belirlenir. Açıklamanın proteinlerinde, bir doğadışı 20 keto-amino asidin hidrazitler veya aminooksid bileşikleriyle in vitro ve in vivo reaksiyonu gibi diğer daha seçici reaksiyonlar kullanılabilir. Bakınız, örneğin, Cornish ve diğerleri, (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal ve diğerleri, (1997) Science, 276:1125-1128; Wang ve diğerleri, (2001) Science 292:498-500; Chin ve diğerleri, (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin ve diğerleri, (2002) Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024; Wang ve diğerleri, (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang ve diğerleri, (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; ve Chin ve diğerleri, (2003) Science, 301:964-7. Bu, hemen hemen her proteinin, floroforlar, çapraz bağlama maddeleri, sakarid türevleri ve sitotoksik molekülleri içeren birçok reaktifle seçici olarak etiketlenmesine imkan verir. Bakınız ayrıca, "Glycoprotein synthesis" başlıklı A.B.D. Patenti No. 6,927,042. Bir azido 30 amino asitle gerçekleştirilenler dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, posttranslasyonel modifikasyonlar, Staudinger ligasyonu da yapılabilir (sınırlayıcı olmamak üzere, triarilfosfin reaktifleriyle yapılanlar dahil). Bakınız, örneğin, Kiick ve

diğerleri, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24.

Doğadışı Amino Asitlerin Kimyasal Sentezi

- Birçok doğadışı amino asit, örneğin Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, A.B.D.), Novabiochem (EMD Biosciences'in bir bölümü, Darmstadt, Almanya) veya Peptech'ten (Burlington, MA, A.B.D.) ticari olarak temin edilebilir. Ticari olarak temin edilemeyenler, isteğe bağlı olarak burada sağlanan şekilde veya teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinen standart usuller kullanılarak sentezlenir. Organik sentez teknikleri için, bakınız, örneğin, Organic Chemistry, Fessendon ve Fessendon (1982, İkinci Baskı, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry, March (Üçüncü Baskı, 1985, Wiley and Sons, New York); ve Advanced Organic Chemistry, Carey ve Sundberg (Üçüncü Baskı, Kısımlar A ve B, 1990, Plenum Press, New York). Doğadışı amino asitlerin sentezinin açıklandığı ilave yayınlar, örneğin aşağıdakileri içerir: "In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids" başlıklı WO 2002/085923; Matsoukas ve diğerleri, (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F.E. ve Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of γ Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O.M. ve Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. ve diğerleri (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmon, M. ve Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. ve Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. ve Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton ve diğerleri (1987) Synthesis of Novel α -Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D- α -Amino-Adipic Acids, L- α -aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; ve, Subasinghe ve diğerleri (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7. Bakınız ayrıca, "Protein Arrays" başlıklı A.B.D. Patent Yayını No. US 2004/0198637.

Doğadışı amino asitlerin hücresel alımı

Bir hücre tarafından doğadışı amino asit alımı, tipik olarak, örneğin bir proteine dahil edilmek üzere doğadışı amino asitlerin tasarlanması ve seçimi sırasında dikkate alınan bir konudur. Örneğin, α -amino asitlerin yüksek yük yoğunluğu, bu bileşiklerin hücreye nüfuz edebilmesinin pek mümkün olmadığını düşündürmektedir. Doğal amino asitler, protein esaslı taşıma sistemlerinin bir toplamı vasıtasıyla hücrenin içine alınır. Hangi (mevcut olması halinde) doğadışı amino asitlerin hücre tarafından alındığını değerlendiren hızlı bir tarama yapılabilir. Bakınız, örneğin, "Protein Arrays" başlıklı A.B.D. Patent Yayını No. US 2004/0198637'deki toksisite deneyleri, ve Liu, D.R. ve Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96:4780-4785. Alımın, çeşitli deneylerle kolayca analiz edilmesine rağmen, hücresel alım yolları için uygun olan doğadışı amino asitlerin tasarlanmasına yönelik bir alternatif, *in vivo* olarak amino asitler oluşturmak için biyosentetik yollar sağlayacaktır.

Doğadışı Amino Asitlerin Biyosentezi

Amino asitlerin ve diğer bileşiklerin üretimi için hücrelerde halen birçok biyosentetik yol mevcuttur. Belirli bir doğadışı amino asit için doğada (sınırlayıcı olmamak üzere, hücre dahil) bir biyosentez usulü mevcut olmayabildiği halde, bu açıklama, bu tip usulleri sağlamaktadır. Örneğin, doğadışı amino asitler için, konakçı hücrede, yeni enzimler ilave etme veya mevcut konakçı hücre yollarını modifiye etme yoluyla, isteğe bağlı olarak biyosentetik yollar oluşturulur. İlave yeni enzimler, isteğe bağlı olarak doğal bir şekilde meydana gelen enzimler veya yapay olarak geliştirilmiş enzimlerdir. Örneğin, *p*-aminofenilalaninin biyosentezi ("In vivo incorporation of unnatural amino acids" başlıklı WO 2002/085923'teki bir örnekte sunulduğu gibi), başka organizmalardan bilinen enzimlerin bir kombinasyonunun ilave edilmesine dayanır. Bu enzimler için genler, hücrenin, genleri içeren bir plazmitle dönüştürülmesi yoluyla bir hücreye eklenebilir. Bu genler, hücrede eksprese edildiğinde, arzu edilen bileşiği sentezlemek için bir enzimatik yol sağlar. İsteğe bağlı olarak ilave edilen enzim türlerinin örnekleri, aşağıdaki örneklerde belirtilmektedir. İlave enzim dizileri, örneğin Genbank'ta bulunur. Yapay olarak gelişmiş enzimler de aynı biçimde, isteğe bağlı olarak bir hücreye ilave edilir. Bu şekilde, bir hücrenin hücresel mekanizması ve kaynakları, doğadışı amino asitler üretmek için manipüle edilir.

Biyosentetik yollarda kullanım için veya mevcut yolların geliştirilmesi için yeni enzimler üretmeye yönelik çeşitli usuller mevcuttur. Örneğin, Maxygen, Inc. tarafından geliştirildiği

şekilde tekrarlamalı rekombinasyon (World Wide Web'de, maxygen.com adresinde bulunabilir), isteğe bağlı olarak yeni enzimlerin ve yolların geliştirilmesi için kullanılır. Bakınız, örneğin, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391; ve, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751. Benzer şekilde, Genencor tarafından geliştirilen DesignPath™ (World Wide Web'de, genencor.com adresinde bulunabilir), isteğe bağlı olarak metabolik yol mühendisliği için, örneğin bir hücrede O-metil-L-tirosin oluşturmak üzere bir yol tasarlamak için kullanılır. Bu teknoloji, fonksiyonel genomikler ve moleküler evrim ve tasarım vasıtasıyla tanımlananlar dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, yeni genlerin bir kombinasyonu kullanılarak konakçı organizmalardaki mevcut yolları tekrar oluşturur. Diversa Corporation da (World Wide Web'de, diversa.com adresinde bulunabilir), yeni yollar oluşturmaya yönelik olanlar dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, genlerin ve gen yollarının kitaplıklarını hızlı bir şekilde tarama teknolojisini sağlamaktadır.

Tipik olarak, mevcut açıklamanın tasarlanmış bir biyosentetik yoluyla üretilen doğadışı amino asit, etkin protein biyosentezi için yeterli bir konsantrasyonda (örneğin, doğal hücresel miktar), ancak diğer amino asitlerin konsantrasyonunu etkileyecek veya hücresel kaynakları tüketecek bir derecede olmayacak biçimde üretilir. Bu şekilde *in vivo* olarak üretilen tipik konsantrasyonlar, yaklaşık 10 mM ila yaklaşık 0.05 mM'dir. Bir hücrenin, spesifik bir yol için arzu edilen enzimleri üretmek için kullanılan genleri içeren bir plazmitle dönüştürülmesi ve bir doğadışı amino asidin oluşturulması üzerine, hem ribozomal protein sentezi hem de hücre büyümesi için doğadışı amino asidin üretimini daha da optimize etmek üzere, isteğe bağlı olarak *in vivo* seçimler kullanılır.

NÜKLEİK ASİT VE POLİPEPTİT DİZİSİ VE VARYANTLARI

Yukarıda ve aşağıda tarif edildiği gibi, nükleik asit polinükleotit dizileri ve polipeptit amino asit dizileri, örneğin tRNA'lar ve RS'ler, ve örneğin söz konusu dizileri içeren bileşimler ve usuller açıklanmaktadır. Söz konusu dizilerin, örneğin tRNA'ların ve RS'lerin örnekleri burada açıklanmaktadır. Bununla birlikte, teknikte deneyimli kişiler, açıklamanın burada (örneğin, Örnekler) açıklanan dizilerle sınırlı olmadığını kabul edecektir. Deneyimli kişiler, açıklamanın, burada tarif edilen fonksiyonları, örneğin bir O-tRNA veya bir O-RS'nin kodlanmasını içeren birçok ilgili ve ilgisiz dizinin de sağlandığını kabul edecektir.

Bu açıklamada polipeptitler (O-RS'ler) ve polinükleotitler, örneğin, O-tRNA, O-RS'leri veya onların bölümlerini kodlayan polinükleotitler, aminoasıl-tRNA sentetaz klonlarını izole etmek için kullanılan oligonükleotitleri ve benzerleri sağlanmaktadır. Polinükleotitler, bir veya daha çok selektör kodon içeren, ilgilenilen proteinleri veya polipeptitleri kodlayanları kapsar. İlave olarak, polinükleotitler, örneğin, DİZİ ID NO.: 1, 2, 3'ten herhangi birinde ortaya konduğu gibi bir nükleotit dizisi içeren bir polinükleotiti; bunu tamamlayıcı nitelikte veya bunun konservatif bir varyasyonu olan polinükleotiti kapsar. Benzer şekilde, nükleik asidin esas itibarıyla tüm uzunluğu boyunca, oldukça sıkı koşullar altında yukarıda belirtilen bir polinükleotide hibritleşen bir nükleik asit, mevcut açıklamanın bir polinükleotitidir.

Belirli düzenlemelerde, bir vektör (örneğin, bir plazmit, bir kozmit, bir faj, bir bakteri, bir virüs, bir çıplak polinükleotit, bir eşlenik polinükleotid vs.), mevcut açıklamanın bir polinükleotitini içerir. Bir düzenlemede, vektör, bir ekspresyon vektörüdür. Bir başka düzenlemede, ekspresyon vektörü, mevcut açıklamanın bir veya daha çok polinükleotitine çalışabilir durumda bağlı bir promoter içerir. Bir diğer düzenlemede, bir hücre, mevcut açıklamanın bir polinükleotitini içeren bir vektör içerir.

Deneyimli kişiler ayrıca, açıklanan dizilerin birçok varyantının bu buluşa dahil edildiğini de kabul edecektir. Örneğin, açıklanan dizilerin, fonksiyonel açıdan özdeş bir dizi sağlayan konservatif varyantları, buluşa dahil edilmektedir. Varyantların, en az bir adet açıklanan diziye hibritleştiği nükleik asit polinükleotit dizilerinin varyantlarının, buluşa dahil edildiği kabul edilmektedir. Örneğin, standart dizi karşılaştırma teknikleriyle belirlendiği şekilde, burada açıklanan dizilerin benzersiz alt dizileri de bu buluşa dahil edilmektedir.

Konservatif varyasyonlar

Genetik kodun yozlaşmasından dolayı, "sessiz süstitüsyonlar" (yani bir nükleik asit dizisindeki, kodlanmış bir polipeptitte bir değişikliğe neden olmayan süstitüsyonlar), bir amino asidi kodlayan *her* nükleik asit dizisinin örtük bir özelliğidir. Benzer şekilde, bir amino asit dizisindeki oldukça benzer özelliklere sahip farklı amino asitlerle süstitüe edilen bir veya birkaç amino asitte "konservatif amino asit süstitüsyonları", yine, açıklanan bir yapıya oldukça benzer olarak kolayca tanımlanır. Açıklanan her dizinin bu tip konservatif varyasyonları, mevcut açıklamanın bir özelliğidir.

Belirli bir nükleik asit dizisinin "konservatif varyasyonları", özdeş veya esas olarak özdeş amino asit dizilerini kodlayan nükleik asitleri, ya da nükleik asidin bir amino asit dizisini

kodlamadığı yerlerde, esas olarak özdeş dizileri ifade eder. Teknikte deneyimli kişiler, kodlanmış bir dizide tek bir amino asidi veya amino asitlerin küçük bir yüzdesini değiştiren, katan veya çıkaran tek tek sübstitüsyonların, çıkarılmaların veya katılmaların, "konservatif olarak modifiye edilmiş varyasyonlar" veya "konservatif olarak modifiye edilmiş varyantlar" olduğunu kabul edecektir; burada değişiklikler, bir amino asidin çıkarılmasına, bir amino asidin katılmasına veya bir amino asidin, kimyasal olarak benzer bir amino asitle sübstitüe edilmesine yol açar. Bu nedenle, mevcut açıklamanın sıralanan bir polipeptit dizisinin "konservatif varyasyonları", polipeptit dizisinin amino asitlerinin küçük bir yüzdesinin, tipik olarak %5'ten azının, daha tipik olarak %4, %2 veya %1'den azının, aynı konservatif sübstitüsyon grubunun konservatif olarak seçilmiş bir amino asidiyle sübstitüsyonlarını içerir. Bir nükleik asit molekülünün kodlanmış aktivitesini değiştirmeyen dizilerin katılması (fonksiyonel olmayan bir dizinin katılması gibi), temel nükleik asidin konservatif bir varyasyonudur.

Fonksiyonel olarak benzer amino asitler sağlayan konservatif sübstitüsyon tabloları, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Aşağıdaki sekiz grubun her biri, bir diğeri için konservatif sübstitüsyonlar olan amino asitler içerir:

- 1) Alanin (A), Glisin (G);
- 2) Aspartik asit (D), Glütamik asit (E);
- 3) Asparajin (N), Glütamin (Q);
- 4) Arjinin (R), Lizin (K);
- 5) İzölösin (I), Lösin (L), Metiyonin (M), Valin (V);
- 6) Fenilalanin (F), Tirosin (Y), Triptofan (W);
- 7) Serin (S), Treonin (T); ve
- 8) Sistein (C), Metiyonin (M)

(bakınız, örneğin, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2. Baskı (Aralık 1993))

Nükleik Asit Hibridizasyonu

Mevcut açıklamanın nükleik asitlerinin konservatif varyasyonları dahil olmak üzere, mevcut açıklamanın nükleik asitlerini (DİZİ ID NO.: 1- 3 gibi) tanımlamak için karşılaştırmalı hibridizasyon kullanılabilir, ve bu karşılaştırmalı hibridizasyon usulü,

mevcut açıklamanın nükleik asitlerini ayırt etmek için tercih edilen bir usuldür. İlave olarak, yüksek, ultra yüksek ve/veya ultra-ultra yüksek sıklık koşulları altında DİZİ ID NO: 1-3 ile temsil edilen nükleik asitlere hibritlenen hedef nükleik asitler, mevcut açıklamanın bir özelliğidir. Bu tip nükleik asitlerin örnekleri, belirtilen bir nükleik asit dizisiyle karşılaştırıldığında bir veya birkaç sessiz veya konservatif nükleik asit süstitüsyonuna sahip olanları içerir.

Bir test nükleik asidi, proba, mükemmel eşleşen tamamlayıcı hedefe göre en az $\frac{1}{2}$ iyi hibritleştiğinde, yani mükemmel eşleşen probun, eşleşmeyen hedef nükleik asitlerden herhangi birine hibritleşmede gözlenenin en az yaklaşık 5 ila 10 katı yüksek bir sinyal-gürültü oranıyla mükemmel eşleşen tamamlayıcı hedefe bağlandığı koşullar altında, probun hedefe hibridizasyonunun en az $\frac{1}{2}$ 'si kadar yüksek bir sinyal-gürültü oranıyla hibritleştiğinde, test nükleik asidinin bir prob nükleik asidine spesifik olarak hibritleştiği ifade edilir.

Nükleik asitler, tipik olarak solüsyon içinde birleştiklerinde "hibritleşirler". Nükleik asitler, hidrojen bağlama, çözücü dışlama, baz istifleme ve benzerleri gibi çeşitli iyi karakterize edilmiş fiziko-kimyasal güçlerden dolayı hibritleşir. "Sıkı hibridizasyon koşulları" ifadesi, teknikte bilindiği gibi düşük iyonik güç ve yüksek sıcaklık koşulları anlamına gelir. Tipik olarak, sıkı koşullar altında, bir prob, nükleik asidin bir kompleks karışımında (sınırlayıcı olmamak üzere, toplam hücresel veya kitaplık DNA veya RNA dahil) hedef alt dizisine hibritleşir, ancak kompleks karışımındaki diğer dizilere hibritleşmez. Nükleik asitlerin hibridizasyonu için ayrıntılı bir kılavuz, Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Kısım I, Bölüm 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," (Elsevier, New York) ve ayrıca Ausubel ve diğerleri, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995) kapsamında bulunabilir. Hames ve Higgins (1995) *Gene Probes* 1 IRL Press at Oxford University Press, Oxford, İngiltere, (Hames ve Higgins 1) ve Hames ve Higgins (1995) *Gene Probes* 2 IRL Press at Oxford University Press, Oxford, İngiltere (Hames ve Higgins 2), oligonükleotitler dahil olmak üzere, DNA ve RNA'nın sentezi, etiketlenmesi, saptanması ve ölçülmesiyle ilgili detayları sağlamaktadır. Genel olarak sıkı koşullar, tanımlanmış bir iyonik güç ve pH'ta spesifik dizi için termal erime derecesinin (T_m) yaklaşık 5°C ila 10°C altında olacak şekilde seçilir. T_m , hedefi tamamlayıcı problemlerin %50'sinin hedef diziye dengede (hedef diziler fazla miktarda mevcut olduğundan, T_m 'de problemlerin %50'si dengede tutulur) hibritleştiği sıcaklıktır (tanımlanmış iyonik güç, pH ve

nükleik konsantrasyon altında). Sıkı koşullar, tuz konsantrasyonunun pH 7.0 ila 8.3'te yaklaşık 1.0 M'den düşük sodyum iyonu, tipik olarak yaklaşık 0,01 ila 1.0 M sodyum iyonu konsantrasyonu (veya diğer tuzlar) olduğu ve sıcaklığın, kısa problemler için (sınırlayıcı olmamak üzere, 10 ila 50 nükleotit dahil) en az yaklaşık 30°C ve uzun problemler için (sınırlayıcı olmamak üzere, 50 nükleotit üstü dahil) en az yaklaşık 60°C olduğu koşullar olabilir. Sıkı koşullar, formamid gibi destabilize edici maddelerin eklenmesiyle de sağlanabilir. Seçici veya spesifik hibridizasyonda, pozitif bir sinyal, arka planın en az iki katı, isteğe bağlı olarak arka plan hibridizasyonun 10 katı olabilir. Örnek sıkı hibridizasyon koşulları aşağıdaki gibi olabilir: 65°C'de 0.2X SSC, ve %0.1 SDS'de yıkama ile, 42°C'de inkübe edilerek %50 formamid, 5X SSC ve %1 SDS, veya 65°C'de inkübe edilerek 5X SSC, %1 SDS. Bu tip yıkamalar 5, 15, 30, 60, 120 dakika veya daha uzun süre boyunca gerçekleştirilebilir.

Bir Southern veya Northern blot'ta bir filtre üzerinde 100'den fazla tamamlayıcı kalıntıya sahip tamamlayıcı nükleik asitlerin hibridizasyonu için sıkı hibridizasyon koşullarının bir örneği, 42°C'de 1 mg heparin ile %50 formalin olup, hibridizasyon gece boyunca gerçekleştirilir. Sıkı yıkama koşullarının bir örneği, 15 dakika boyunca 65°C'de bir 0.2x SSC yıkamasıdır (SSC tamponuyla ilgili bir açıklama için, bakınız, Sambrook ve diğerleri, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3. Baskı 2001)). Çoğu zaman, arka plan prob sinyalini kaldırmak için yüksek sıklıkta yıkamadan önce düşük sıklıkta bir yıkama gerçekleştirilir. Örnek bir düşük sıklıkta yıkama, 15 dakika boyunca 40°C'de 2x SSC'dir. Genel olarak, belirli hibridizasyon deneyinde ilgisiz bir prob için gözlenene göre 5x (veya daha yüksek) bir sinyal-gürültü oranı, spesifik bir hibridizasyonun saptandığını belirtir.

Southern ve Northern hibridizasyonları gibi nükleik asit hibridizasyon deneyleri bağlamında "sıkı hibridizasyon yıkama koşulları", diziye bağımlıdır ve farklı ortam parametreleri altında farklıdır. Daha uzun diziler, spesifik olarak daha yüksek sıcaklıklarda hibritleşir. Nükleik asitlerin hibridizasyonu ile ilgili kapsamlı bir kılavuz, Tijssen (1993) (yukarıda) ve Hames ve Higgins, 1 ve 2'de (yukarıda) bulunmaktadır. Sıkı hibridizasyon ve yıkama koşulları, herhangi bir test nükleik asidi için ampirik olarak kolayca belirlenebilir. Örneğin, oldukça sıkı hibridizasyon ve yıkama koşullarının belirlenmesinde, hibridizasyon ve yıkama koşulları, seçilmiş bir kriter kümesi karşılanana kadar aşama aşama yükseltilir (örneğin, hibridizasyon veya yıkamada sıcaklığı arttırma, tuz konsantrasyonunu azaltma, deterjan konsantrasyonunu arttırma ve/veya formalin gibi organik çözücülerin konsantrasyonunu arttırma yoluyla). Örneğin, hibridizasyon ve yıkama koşulları, bir

proben, proben eşleşmeyen bir hedefe hibridizasyonunda gözlenenin en az 5 katı kadar yüksek bir sinyal-gürültü oranıyla mükemmel bir şekilde eşleşen tamamlayıcı hedefe bağlanmasına kadar aşama aşama yükseltilir.

- 5 "Çok sıkı" koşullar, belirli bir prob için termal erime derecesine (T_m) eşit olacak şekilde seçilir. T_m , test dizisinin %50'sinin mükemmel olarak eşleşen bir proba hibritleştiği sıcaklıktır (tanımlanmış iyonik güç ve pH altında). Mevcut buluşun amaçları açısından, genel olarak "oldukça sıkı" hibridizasyon ve yıkama koşulları, belirtilen bir iyonik güç ve pH'ta spesifik dizinin T_m 'sinden yaklaşık 5°C daha düşük olacak şekilde seçilir.

- 10 "Ultra yüksek sıklıkta" hibridizasyon ve yıkama koşulları, proben, mükemmel olarak eşleşen tamamlayıcı hedef nükleik aside bağlanması için sinyal-gürültü oranı, eşleşmeyen hedef nükleik asitlerden herhangi birine hibritleşmede gözlenenden en az 10 kat yüksek olana kadar hibridizasyon ve yıkama koşullarının yükseltildiği koşullardır. Bu koşullar altında, mükemmel olarak eşleşen tamamlayıcı hedef nükleik asidin en az 1/2'si kadar bir sinyal-gürültü oranıyla bir proba hibritleşen bir hedef nükleik asidin, ultra yüksek sıklık
- 15 koşulları altında proba bağlandığı ifade edilir.

- Benzer şekilde, ilgili hibridizasyon deneyinin hibridizasyon ve/veya yıkama koşulları aşama aşama yükseltilerek, daha da yüksek sıklık seviyeleri belirlenebilir. Örneğin, proben, mükemmel olarak eşleşen tamamlayıcı hedef nükleik aside bağlanması için sinyal-gürültü oranı, eşleşmeyen hedef nükleik asitlerden herhangi birine hibritleşmede
- 20 gözlenenden en az 10 kat, 20 kat, 50 kat, 100 kat veya 500 kat veya daha yüksek olana kadar hibridizasyon ve yıkama koşullarının sıklığının arttırıldığı koşullar. Bu koşullar altında, mükemmel olarak eşleşen tamamlayıcı hedef nükleik asidin en az 1/2'si kadar bir sinyal-gürültü oranıyla bir proba hibritleşen bir hedef nükleik asidin, ultra-ultra yüksek sıklık koşulları altında proba bağlandığı ifade edilir.

- 25 Sıkı koşullar altında bir diğerine hibritleşmeyen nükleik asitler, kodladıkları polipeptitlerin esas itibariyle özdeş olmaları halinde, yine esas itibariyle özdeştirler. Bu, örneğin genetik kod tarafından izin verilen maksimum kodon yozlaşması kullanılarak bir nükleik asidin bir kopyası oluşturulduğunda meydana gelir.

Benzersiz alt diziler

- 30 Ayrıca, burada açıklanan O-tRNA'ların ve O-RS'lerin dizilerinden seçilen bir nükleik asitte benzersiz bir alt dizi içeren bir nükleik asit sağlanmaktadır. Benzersiz alt dizi, bilinen herhangi bir O-tRNA veya O-RS nükleik asit dizisine tekabül eden bir nükleik aside

kıyasla benzersizdir. Hizalama, örneğin, varsayılan parametrelere ayarlanmış BLAST kullanılarak gerçekleştirilebilir. Herhangi bir benzersiz alt dizi, örneğin, mevcut açıklamanın nükleik asitlerini tanımlamak için bir prob olarak yararlıdır.

Benzer şekilde, bu açıklama, burada açıklanan O-RS'lerin dizilerinden seçilen bir polipeptitte benzersiz bir alt dizi içeren bir polipeptiti kapsamaktadır. Burada, benzersiz alt dizi, bilinen herhangi bir polipeptit dizisine tekabül eden bir polipeptite kıyasla benzersizdir.

Ayrıca, sıkı koşullar altında, O-RS'lerin dizilerinden seçilen bir polipeptitteki benzersiz bir alt diziyi kodlayan bir benzersiz kodlayıcı oligonükleotide hibritleşen hedef nükleik asitler açıklanmakta olup, burada benzersiz alt dizi, kontrol polipeptitlerinin (örneğin, mevcut açıklamanın sentetazlarının, örneğin mutasyon yoluyla türetildiği ana diziler) herhangi birine tekabül eden bir polipeptite kıyasla benzersizdir. Benzersiz diziler aşağıda belirtildiği gibi belirlenir.

Dizi karşılaştırması, özdeşlik ve homoloji

İki veya daha çok nükleik asit veya polipeptit dizisi bağlamında "özdeş" veya yüzde "özdeşlik" terimleri, karşılaştırıldıklarında ve bir karşılaştırma penceresi veya belirlenmiş rejyona göre maksimum tekabül etme için hizalandıklarında, aşağıdaki açıklanan dizi karşılaştırma algoritmalarından biri (veya teknikte normal deneyim sahibi kişilerce kullanılabilen diğer algoritmalar) ya da manüel hizalama ve görsel denetim kullanılarak ölçüldüğü şekilde, aynı olan ya da aynı amino asit kalıntılarının veya nükleotitlerin belirlenmiş bir yüzdesine sahip olan iki veya daha çok diziyi veya alt diziyi ifade eder.

İki nükleik asit veya polipeptit (örneğin, bir O-tRNA veya O-RS'yi, veya bir O-RS'nin amino asit dizisini kodlayan DNA'lar) bağlamında "esas itibariyle özdeş" terimi, karşılaştırıldıklarında ve bir karşılaştırma penceresi veya belirlenmiş rejyona göre maksimum tekabül etme için hizalandıklarında, bir dizi karşılaştırma algoritması (veya teknikte normal deneyim sahibi kişilerce kullanılabilen diğer algoritmalar) ya da manüel hizalama ve görsel denetim kullanılarak ölçüldüğü şekilde, en az yaklaşık %60, yaklaşık %80, yaklaşık %90 ila %95, yaklaşık %98, yaklaşık %99 veya daha fazla nükleotit veya amino asit kalıntısı özdeşliğine sahip iki veya daha çok diziyi veya alt diziyi ifade eder. Bu tip "esas itibariyle özdeş" diziler, gerçek ataya atıfta bulunulmadan, "homolog" kabul edilir. "Esas itibariyle özdeşlik", dizilerin en az yaklaşık 50 kalıntı uzunluğunda bir

rejyonu, en az yaklaşık 100 kalıntılık bir rejyon, veya en az yaklaşık 150 kalıntılık bir rejyon, veya karşılaştırılacak iki dizinin tam uzunluğu boyunca mevcut olabilir.

Dizi karşılaştırması ve homoloji belirlemesi için, tipik olarak bir adet dizi, test dizilerinin karşılaştırıldığı bir referans dizisi olarak görev yapar. Bir dizi karşılaştırma algoritması kullanılırken, test ve referans dizileri bir bilgisayara girilir, gerekirse alt dizi koordinatları belirtilir ve dizi algoritma program parametreleri belirtilir. Daha sonra dizi karşılaştırma algoritması, program parametrelerini temel alarak, referans diziye göre test dizisi/dizileri için yüzde dizi özdeşliğini hesaplar.

Karşılaştırma için dizileri hizalama usulleri, teknikte normal deneyim sahibi kişilerce bilinmektedir. Karşılaştırma için dizilerin optimum hizalanması, örneğin Smith ve Waterman'ın (Adv. Appl. Math. 2:482c (1981)) lokal homoloji algoritması, Needleman ve Wunsch'un (J. Mol. Biol. 48:443 (1970)) homoloji hizalama algoritması, Pearson ve Lipman'ın (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)) benzerlik arama usulü, bu algoritmaların bilgisayarlı uygulamaları (GAP, BESTFIT, FASTA ve TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), veya manuel hizalama ve görsel denetim (bakınız, örneğin, Ausubel ve diğerleri, Current Protocols in Molecular Biology (1995 eki)) yoluyla yürütülebilir.

Yüzde dizi özdeşliğini ve dizi benzerliğini belirlemek için uygun bir algoritmanın bir örneği, Altschul ve diğerleri (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, ve Altschul ve diğerleri, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) kapsamında açıklanan BLAST algoritması ve BLAST 2.0 algoritmalarıdır. BLAST analizlerini gerçekleştirmek için yazılım, World Wide Web'de ncbi.nlm.nih.gov adresinde bulunan National Center for Biotechnology Information'dan halka açık olarak mevcuttur. Bu algoritma ilk olarak, bir veritabanı dizisinde aynı uzunluktaki bir kelimeyle hizalandığında, sorgu dizisindeki, eşleşen veya bir miktar pozitif değerli eşik puanını karşılayan W uzunluğundaki kısa kelimeleri tanımlama yoluyla yüksek puanlı dizi çiftlerinin (HSP'ler) tanımlanmasını kapsar. T, yakın kelime puanı eşiği olarak bilinir (Altschul ve diğerleri, yukarıda). Bu ilk yakın kelime isabetleri, onları içeren daha uzun HSP'leri bulmaya yönelik aramaları başlatmak için tohumlar olarak görev yapar. Daha sonra kelime isabetleri, kümülatif hizalama puanı artırılabilirdiği sürece, her dizi boyunca her iki yönde uzatılır. Kümülatif puanlar, nükleotit dizileri için M (eşleşen kalıntılardan oluşan bir çift için ödül puanı; her zaman > 0) ve N (eşleşmeyen kalıntılar için ceza puanı; her zaman < 0) parametreleri kullanılarak hesaplanır. Amino asit dizilerinde, kümülatif puanı hesaplamak için bir puanlama matrisi kullanılır. Kümülatif

hizalama puanı, elde edilen maksimum değerinde X miktarı kadar azaldığında; bir veya daha çok negatif puanlı kalıntı hizalamasının birikmesinden dolayı kümülatif puan sıfıra veya sıfırın altına düştüğünde; veya dizilerden birinin sonuna ulaşıldığında, kelime isabetlerinin her yönde uzatılmasına son verilir. BLAST algoritma parametreleri W, T ve X, hizalamanın hassasiyetini ve hızını belirler. BLASTN programı (nükleotit dizileri için), varsayılanlar olarak 11 kelime uzunluğu (W), bir tahmin (E) olarak 10, bir kesme olarak 100, M=5, N=-4, ve her iki zincirin bir karşılaştırmasını kullanır. Amino asit dizilerinde, BLASTP programı, varsayılanlar olarak 3 kelime uzunluğu (W), bir tahmin (E) olarak 10, ve BLOSUM62 puanlama matrisi (bakınız, Henikoff ve Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) hizalamalar (B) 50, tahmin (E) olarak 10, M=5, N=-4, ve her iki zincirin bir karşılaştırmasını kullanır. BLAST algoritması tipik olarak "düşük komplekslik" filtresi kapalı halde yürütülür.

BLAST algoritması, yüzde dizi özdeşliğinin hesaplanmasına ek olarak, ayrıca iki dizi arasındaki benzerliğin istatistiksel bir analizini gerçekleştirir (bakınız, örneğin, Karlin ve Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). BLAST algoritmasıyla sağlanan bir benzerlik ölçüsü, iki nükleotit veya amino asit dizisi arasında tesadüfen bir eşleşmenin gerçekleşme ihtimalinin bir göstergesini sağlayan en küçük toplam ihtimalidir (P(N)). Örneğin, test nükleik asidi ile referans nükleik asidinin bir karşılaştırmasında en küçük toplam ihtimali yaklaşık 0.2'den düşük, yaklaşık 0.01'den düşük, veya yaklaşık 0.001'den düşük olduğunda, bir nükleik asidin bir referans diziye benzer olduğu kabul edilebilir.

Mutajenez ve Diğer Moleküler Biyoloji Teknikleri

Polinükleotit ve polipeptitler, moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak manipüle edilebilir. Bir nükleotit dizisi, geleneksel usullere göre, bölgeye yönelik mutajenezle uygun biçimde modifiye edilebilir. Alternatif olarak nükleotit dizisi, oligonükleotitlerin, arzu edilen polipeptitin amino asit dizisi temel alınarak tasarlandığı bir oligonükleotit sentez cihazı kullanma, ve tercihen rekombinant polipeptitin üretileceği konakçı hücrede tercih edilen kolonları seçme dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, kimyasal sentez yoluyla hazırlanabilir. Örneğin, arzu edilen polipeptitin bölümlerini kodlayan bazı küçük oligonükleotitler sentezlenebilir ve PCR, ligasyon veya ligasyon zincir reaksiyonu ile birleştirilebilir. Bakınız, örneğin, Barany ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); A.B.D. Patenti 6,521,427.

Bu buluşta rekombinant genetik alanındaki rutin tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu buluşta yararlı olan genel usullerin açıklandığı temel metinler aşağıdakileri içerir: Sambrook ve diğerleri, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3. Baskı, 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); ve Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel ve diğerleri, editörler, 1994)).

Moleküler biyoloji tekniklerinin açıklandığı genel metinler aşağıdakileri içerir: Berger ve Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, Cilt 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook ve diğerleri, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2. Baskı), Cilt 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 ("Sambrook") ve Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel ve diğerleri, editörler, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. ve John Wiley & Sons, Inc. arasındaki bir ortak girişim (1999'dan itibaren ilavelerle) ("Ausubel"). Bu metinlerde mutajenez, vektörlerin kullanımı, promoterler, ve örneğin seçilen amino asitler (örneğin, doğadışı amino asitler), ortogonal tRNA'lar, ortogonal sentetazlar ve bunların çiftlerini kapsayan proteinlerin üretimi için selektör kodonları içeren genlerin veya polinükleotitlerin oluşumu ile ilgili başka birçok konu açıklanmaktadır.

Bu buluşta, yeni sentetazlar veya tRNA'lar üretmek, tRNA moleküllerini mutasyona uğratmak, tRNA kitaplıkları üretmek, RS moleküllerini mutasyona uğratmak, sentetaz kitaplıkları üretmek, selektör kodonlar üretmek, ilgilenilen bir proteine veya polipeptite seçilen bir amino asidi kodlayan selektör kodonlar eklemek dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, çeşitli amaçlarla, çeşitli tiplerde mutajenezler kullanılmaktadır. Bunlar, bölgeye yönelik, rasgele nokta mutajenez, homolog rekombinasyon, DNA karıştırma veya diğer tekrarlamalı mutajenez usulleri, kimerik yapı, şablonlar içeren urasil kullanarak mutajenez, oligonükleotide yönelik mutajenez, fosforotiyoat ile modifiye edilmiş DNA mutajenezi, aralıklı dubleks DNA kullanarak mutajenez veya benzerleri ile bunların herhangi bir kombinasyonunu içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Ek uygun yöntemler, noktasal uyumsuzluk onarımı, eksik onarımlı konakçı suşları kullanılarak mutajenez, restriksiyon seçimi ve restriksiyon saflaştırması, çıkarma mutajenezi, toplam gen sentezi yoluyla mutajenez, çift zincir kırığı onarımı ve benzerlerini içerir. Kimerik yapılar içerenler dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, mutajenez de mevcut buluşa dahil edilmektedir. Bir düzenlemede, mutajenez; dizi, dizi karşılaştırmaları, fiziksel özellikler, ikincil, üçüncül veya dördüncül yapı, kristal yapı dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak

üzere, doğal olarak meydana gelen molekül ya da değiştirilmiş veya mutasyona uğratılmış doğal olarak meydana gelen molekül hakkındaki bilinen bilgilerle yönlendirilebilir.

Bu prosedürler, burada bulunan metinlerde ve örneklerde tarif edilmektedir. İlave bilgiler, aşağıdaki yayınlarda ve buralarda söz edilen referanslarda bulunmaktadır: Ling ve diğerleri, Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale ve diğerleri, Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein ve Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. ve Lilley, D.M.J. editörler, Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel ve diğerleri, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass ve diğerleri, Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller ve Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller ve Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller ve Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor ve diğerleri, The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor ve diğerleri, The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye ve Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers ve diğerleri, 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers ve diğerleri, Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer ve diğerleri, The gapped duplex DNA

approach to oligonucleotide-directed mutation construction, Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456 (1984); Kramer ve Fritz, Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, Methods in Enzymol. 154:350-367 (1987); Kramer ve diğerleri, Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, Nucl. Acids Res. 16: 7207 (1988); Fritz ve diğerleri, Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999 (1988); Kramer ve diğerleri, Different base/base mismatched are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of E. coli, Cell 38:879-887 (1984); Carter ve diğerleri, Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, Methods in Enzymol. 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh ve Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, Nucl. Acids Res. 14: 5115 (1986); Wells ve diğerleri, Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423 (1986); Nambiar ve diğerleri, Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, Science 223: 1299-1301 (1984); Sakmar ve Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372 (1988); Wells ve diğerleri, Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, Gene 34:315-323 (1985); Grundström ve diğerleri, Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316 (1985); Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, Current Opinion in Biotechnology 4:450-455 (1993); Sieber ve diğerleri, Nature Biotechnology, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, Nature 370, 389-91 (1994); ve, I. A. Lorimer, I. Pastan, Nucleic Acids Res. 23, 3067-8 (1995). Yukarıdaki usullerin birçoğu hakkında ilave detaylar, çeşitli mutajenez usulleriyle ilgili sorunların giderilmesine yönelik yararlı denetimlerin de açıklandığı Methods in Enzymology, Cilt 154'te bulunabilir.

Örneğin, mevcut buluşun mutajenezinde (örneğin, sentetaz kitaplıklarının mutasyona uğratılması veya tRNA'ların değiştirilmesi yoluyla) kullanıma yönelik oligonükleotitler, tipik olarak, Beaucage ve Caruthers (Tetrahedron Letts. 22(20):1859-1862, (1981))

tarafından açıklanan katı faz fosforamidit triester usulüne göre, örneğin Needham-VanDevanter ve diğerleri (Nucleic Acids Res., 12:6159-6168 (1984)) kapsamında açıklandığı gibi bir otomatik sentez cihazı kullanılarak, kimyasal olarak sentezlenir.

İlave olarak, esas itibariyle herhangi bir nükleik asit, The Midland Certified Reagent Company (mcrc@oligos.com), The Great American Gene Company (www.genco.com), ExpressGen Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.) ve birçok diğerleri gibi çeşitli ticari kaynakların herhangi birinden özel veya standart olarak sipariş edilebilir..

Ayrıca, ortogonal tRNA/RS çiftleri vasıtasıyla doğadışı bir amino asidin in vivo olarak dahil edilmesine yönelik ökaryotik konakçı hücreler, ökaryotik olmayan konakçı hücreler ve organizmalar da açıklanmaktadır. Konakçı hücreler, mevcut açıklamanın polinükleotitleri, ya da mevcut açıklamanın, örneğin bir klonlama vektörü veya bir ekspresyon vektörü olabilen bir vektörü dahil, ancak bununla sınırlı olmamak üzere, mevcut açıklamanın bir polinükleotitini içeren yapılarla genetik olarak tasarlanabilir (sınırlayıcı olmamak üzere, transformasyon, dönüştürme veya transfekte etme dahil). Örneğin, ortogonal tRNA, ortogonal tRNA sentetaz ve derive edilecek protein için kodlama rejyonları, arzu edilen konakçı hücrede fonksiyonel olan gen ekspresyon kontrol elemanlarına çalışabilir durumda bağlanır. Vektör, örneğin bir plazmit, bir kozmit, bir faj, bir bakteri, bir virüs, bir çıplak polinükleotit veya bir eşlenik polinükleotit formunda olabilir. Vektörler, elektroporasyon (Fromm ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824 (1985)), viral vektörlerle enfeksiyon, küçük boncuklar veya partiküllerden oluşan matrisin içindeki veya yüzeydeki nükleik asitli küçük partiküllerle yüksek hızlı balistik penetrasyon (Klein ve diğerleri, Nature 327, 70-73 (1987)) ve/veya benzerlerini içeren standart usullerle hücrelere ve/veya mikroorganizmalara dahil edilir.

Hedef nükleik asitlerin hücrelere eklenmesi için iyi bilinen çeşitli usuller mevcut olup, bu buluşta bunların herhangi biri kullanılabilir. Bunlar, alıcı hücrelerin DNA içeren bakteri protoplastlarıyla füzyonu, elektroporasyon, projektıl bombardıman ve viral vektörlerle enfeksiyon (aşağıda ayrıca açıklanacaktır) ve benzerlerini içerir. Bu açıklamanın DNA yapılarını içeren plazmitlerin sayısını arttırmak için bakteri hücreleri kullanılabilir. Bakteriler log fazına kadar büyütülür ve bakterilerin içindeki plazmitler, teknikte bilinen çeşitli usullerle izole edilebilir (bakınız, örneğin, Sambrook). İlave olarak, bakterilerden plazmitlerin saflaştırılmasına yönelik kitler ticari olarak temin edilebilir (bakınız, örneğin, ikisi de Pharmacia Biotech'ten olmak üzere, EasyPrep™, FlexiPrep™; Stratagene'den

StrataClean™; ve Qiagen'den QIAprep™). İzole edilmiş ve saflaştırılmış plazmitler daha sonra diğer plazmitleri üretmek için ayrıca manipüle edilir, hücreleri transfekte etmek için kullanılır veya organizmaları enfekte etmek için ilgili vektörlere eklenir. Tipik vektörler, kopyalama ve translasyon terminatörleri, kopyalama ve translasyonu başlatma dizileri, ve

5 belirli hedef nükleik asidin ekspresyonunun düzenlenmesi için yararlı promoterler içerir. Vektörler isteğe bağlı olarak en az bir adet bağımsız terminatör dizi, ökaryotlarda veya prokaryotlarla veya her ikisinde kasetin replikasyonuna imkan veren diziler (sınırlayıcı olmamak üzere, mekik vektörleri dahil) ve hem prokaryotik hem ökaryotik sistemler için seçim işaretleri içeren jenerik ekspresyon kasetleri içerir. Vektörler, prokaryotlarda,

10 ökaryotlarda ve/veya her ikisinde replikasyon ve entegrasyon için uygundur. Bakınız, Gillam ve Smith, *Gene* 8:81 (1979); Roberts ve diğerleri, *Nature*, 328:731 (1987); Schneider, E. ve diğerleri, *Protein Expr. Purif.* 6(1)10-14 (1995); Ausubel, Sambrook, Berger (tümü yukarıda). Klonlamada kullanışlı bakterilerin ve bakteriyofajların bir kataloğu, örneğin ATCC tarafından sağlanmaktadır (örneğin, ATCC tarafından yayınlanan

15 The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna ve diğerleri (editörler)). Dizilim, klonlama ve moleküler biyolojinin diğer yönleriyle ilgili ilave temel prosedürler ve temel teorik değerlendirmeler, ayrıca Watson ve diğerleri (1992) *Recombinant DNA* (İkinci Baskı, Scientific American Books, NY) kapsamında bulunmaktadır. İlave olarak, esas itibarıyla herhangi bir nükleik asit (ve standart veya

20 standart dışı olmak üzere, hemen hemen her türlü etiketli nükleik asit), Midland Certified Reagent Company (Midland, TX; World Wide Web'de mrc.com adresinde bulunabilir), The Great American Gene Company (Ramona, CA; World Wide Web'de genco.com adresinde bulunabilir), ExpressGen Inc. (Chicago, IL; World Wide Web'de expressgen.com adresinde bulunabilir), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA) ve

25 birçok diğerleri gibi çeşitli ticari kaynakların herhangi birinden özel veya standart olarak sipariş edilebilir.

Tasarlanan konakçı hücreler, örneğin tarama aşamaları, promoterlerin aktif hale getirilmesi veya transformantların seçilmesi gibi aktiviteler için uygun olarak modifiye edilmiş geleneksel nütrient ortamlarında kültürlenebilir. Bu hücreler isteğe bağlı olarak transgenik

30 organizmalarda kültürlenebilir. Örneğin hücre izolasyonu ve kültürü (örneğin, daha sonraki nükleik asit izolasyonu için) ile ilgili diğer yararlı referanslar aşağıdakileri kapsar: Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, Üçüncü Baskı, Wiley- Liss, New York ve içerdiği referanslar; Payne ve diğerleri (1992) *Plant Cell and*

Tissue Culture in Liquid, Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamburg ve Phillips (editörler) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York), ve Atlas ve Parks (editörler) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

- 5 Doğadışı amino asitleri in vivo olarak doğrudan proteinlere dahil etme kabiliyeti; yüksek mutant protein verimleri, teknik kolaylık, mutant proteinleri hücrelerin veya muhtemelen canlı organizmaların içinde inceleme potansiyeli ve bu mutant proteinlerden terapötik tedavilerde ve teşhis kullanımlarında yararlanmayı içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan çok çeşitli avantajlar sağlar. Çeşitli boyutlara, asiditelere, nükleofilikliklere, hidroforikliklere ve başka özelliklere sahip doğal olmayan amino asitleri proteinlere dahil etme kabiliyeti, hem protein fonksiyonunu incelemek, hem de yeni özelliklere sahip yeni proteinler veya organizmalar oluşturmak için proteinlerin yapılarını rasyonel ve sistematik olarak manipüle etme kabiliyetini büyük oranda genişletir.

İLGİLENİLEN PROTEİNLER VE POLİPEPTİTLER

- 15 Bir doğadışı amino asidin dahil edilmesi; protein yapısındaki ve/veya fonksiyonundaki değişiklikleri uygun hale getirme, proteaz hedef bölgelerinin boyutunu, asiditesini, nükleofilikliğini, hidrojen bağlamayı, hidrofilikliğini, erişilebilirliğini değiştirme, bir parçaya (sınırlayıcı olmamak üzere, bir protein dizisi için dahil) hedefleme, biyolojik açıdan aktif bir molekül ekleme, bir polimer bağlama, bir radyonüklid bağlama, serum yarı
- 20 ömrünü düzenleme, doku penetrasyonunu (örneğin, tümörler) düzenleme, aktif taşımayı düzenleme, doku düzenleme, hücre veya organ spesifikliği veya dağılımı, immünojenikliği düzenleme, proteaz direncini düzenleme ve benzerlerini içeren, ancak bunlarla sınırlı olmayan çeşitli amaçlarla yapılabilir. Bir doğadışı amino asit içeren proteinler, gelişmiş, hatta tamamen yeni katalitik veya biyofiziksel özelliklere sahip olabilir. Örneğin bir
- 25 doğadışı amino asidin bir proteine dahil edilmesiyle aşağıdaki özellikler isteğe bağlı olarak modifiye edilir: toksisite, biyolojik dağılım, yapısal özellikler, spektroskopik özellikler, kimyasal ve/veya fotokimyasal özellikler, katalitik kabiliyet, yarı ömür (sınırlayıcı olmamak üzere, serum yarı ömrü dahil), diğer moleküllerle reaksiyona girme kabiliyeti (sınırlayıcı olmamak üzere, eşdeğerli veya eşdeğerli olmayan şekilde dahil) ve benzerleri.
- 30 En az bir adet doğadışı amino aside sahip proteinler içeren bileşimler, sınırlayıcı olmamak üzere, yeni terapötikler, teşhisler, katalitik enzimler, endüstriyel enzimler, bağlayıcı proteinler (sınırlayıcı olmamak üzere, antikörler dahil), ve protein yapısının ve fonksiyonunun incelenmesi dahil, ancak bunlarla sınırlı olmayan yararlılara sahiptir.

Bakınız, örneğin, Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652.

Bir protein, en az iki, en az üç, en az dört, en az beş, en az altı, en az yedi, en az sekiz, en az dokuz veya en az on ya da daha fazlası dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, en az bir adet doğadışı amino asit içerebilir. Doğadışı amino asitler, proteinde, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 ya da daha fazla sayıda farklı doğadışı amino asit içeren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 ya da daha fazla sayıda farklı bölgenin mevcut olabilmesi dahil, ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, aynı veya farklı olabilir. Bir proteinde, doğadışı amino asitle süstitüe edilen, proteinde mevcut belirli bir amino asitten en az bir adet, ancak tümünden daha azına sahip olabilir. Birden çok doğadışı amino aside sahip belirli bir proteinde, doğadışı amino asitler özdeş veya farklı olabilir (sınırlayıcı olmamak üzere, proteinin iki veya daha çok sayıda farklı türde doğadışı amino asit içerebilmesi, veya aynı doğadışı amino asitten iki adet içerebilmesi dahil). İki'den çok doğadışı amino aside sahip belirli bir proteinde, doğadışı amino asitler, aynı, farklı, ya da en az bir adet farklı doğadışı amino asit içeren aynı türden birden çok doğadışı amino asidin bir kombinasyonu olabilir.

Ökaryotik hücrelerde en az bir adet doğadışı asit ile ilgilenilen proteinlerin veya polipeptitlerin üretilmesiyle, proteinler veya polipeptitler, tipik olarak ökaryotik, posttranslasyonel modifikasyonlar içerecektir. Belirli düzenlemelerde, bir protein, en az bir adet doğadışı amino asit ve bir ökaryotik hücre tarafından in vivo olarak yapılan en az bir adet posttranslasyonel modifikasyon içermekte olup, burada posttranslasyonel modifikasyon, bir prokaryotik hücre tarafından yapılmaz. Örneğin, posttranslasyonel modifikasyon, sınırlayıcı olmamak üzere, asetilasyon, açılasyon, lipid modifikasyonu, palmitoilasyon, palmitat ilavesi, fosforilasyon, glikolipid bağlantı modifikasyonu, glikozilasyon ve benzerlerini içerir. Yine bir başka açıdan posttranslasyonel modifikasyon, öncülerin (sınırlayıcı olmamak üzere, kalsitonin öncüsü, kalsitonin geniyle ilgili peptit öncüsü, preproparatiroid hormonu, preproinsülin, proinsülin, prepro-opiomelanokortin, pro-opiomelanokortin ve benzerleri dahil) proteolitik işlenmesi, çok alt birimli bir protein halinde birleştirme veya makromoleküler birleştirme, hücredeki bir başka bölgeye translasyonu (sınırlayıcı olmamak üzere, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, çekirdek, lizozomlar, peroksizomlar, mitokondri, kloroplastlar, vaküoller ve benzerleri gibi organellere, ya da salgılayıcı yol vasıtasıyla dahil) kapsar. Belirli düzenlemelerde, protein; bir salgılama veya lokalizasyon dizisi, bir epitop etiketi, bir FLAG etiketi, bir polihistidin etiketi, bir GST füzyonu veya benzerlerini içerir.

Bir hücrede, belirtilen bir konumda seçilmiş bir amino asitle bir protein üretme usulleri de açıklanmaktadır. Örneğin bir usul, hücrenin uygun bir ortamda büyütülmesini (burada hücre, en az bir adet selektör kodon içeren ve bir proteini kodlayan bir nükleik asit içerir) ve seçilmiş amino asidin sağlanmasını kapsamakta olup, burada hücre ayrıca aşağıdakileri

5 içerir: hücrenin içinde fonksiyon gerçekleştiren ve selektör kodonu tanıyan bir ortogonal tRNA (O-tRNA); ve tercih edilen şekilde O-tRNA'yı seçilmiş amino asitle aminoaçıleyen bir ortogonal aminoaçil-tRNA sentetaz (O-RS). Tipik olarak O-tRNA, bir selektör kodona tepki olarak aynı türden bir sentetaz mevcudiyetinde baskılama aktivitesi içerir. Bu usulle üretilen bir protein de açıklanmaktadır.

- 10 Mevcut açıklamanın bileşimleri ve mevcut açıklamanın usulleriyle yapılan bileşimler, isteğe bağlı olarak bir hücrenin içindedir. Mevcut açıklamanın O-tRNA/O-RS çiftleri veya ayrı ayrı bileşenleri daha sonra bir konakçı sistemin translasyon mekanizmasında kullanılabilir; bu da seçilen bir amino asidin, örneğin doğadışı amino asidin bir proteine dahil edilmesine yol açar. Patent başvuruları "Expanding the Eukaryotic Genetic Code"
- 15 başlıklı USSN 10/825,867 ve "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS" başlıklı 10/126,927'de bu işlem açıklanmaktadır. Örneğin, bir O-tRNA/O-RS çifti bir konakçıya, örneğin *Escherichia coli*'ye dahil edildiğinde, bu çift, seçilen amino asidin (bir doğadışı amino asit gibi), örneğin ekzojen olarak büyüme ortamına eklenebilen bir lösin amino asidin türevi gibi bir sentetik amino asidin, bir selektör kodona tepki olarak
- 20 proteine dahil edilmesine yol açar. İsteğe bağlı olarak mevcut açıklamanın bileşimleri bir in vitro translasyon sisteminde veya bir in vivo sistemde/sistemlerde olabilir.

- Seçilen bir amino asidi, örneğin bir doğadışı amino asidi (ve örneğin bir veya daha çok selektör kodon içeren, herhangi bir kodlayıcı nükleik asidi) içeren herhangi bir protein (veya onun bölümü), buradaki bileşimler ve usuller kullanılarak üretilebilir. Seçilen bir
- 25 veya daha çok amino asidin dahil edilmesi için herhangi bir polipeptit uygundur. Bilinen yüz binlerce proteinin tanımlanmasına çalışılmamıştır; bunlardan herhangi biri, örneğin herhangi bir mevcut mutasyon usulünün, ilgili bir translasyon sistemine bir veya daha çok sayıda uygun selektör kodon eklemek için uygun hale getirilmesi yoluyla bir veya daha çok sayıda doğadışı amino asit içerecek şekilde modifiye edilebilir. Bilinen proteinler için
- 30 genel dizi havuzları, GenBank EMBL, DDBJ ve NCBI'yi içerir. Diğer havuzlar, internet araması ile kolayca tanımlanabilir.

Tipik olarak, proteinler, herhangi bir mevcut proteine (örneğin, bir terapötik protein, bir teşhis proteini, bir endüstriyel enzim, veya bunların bölümü ve benzerleri) örneğin en az

%60, en az %70, en az %75, en az %80, en az %90, en az %95 veya en az %99 özdeştir ve bir veya daha çok sayıda seçilmiş amino asit içerir. Bir veya daha çok sayıda seçilmiş amino asit, örneğin bir doğadışı amino asit içermek üzere modifiye edilebilen terapötik, teşhis amaçlı ve diğer proteinlerin örnekleri, sınırlayıcı olmamak üzere, "Expanding the Eukaryotic Genetic Code" başlıklı USSN 10/825,867, ve "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS" başlıklı A.B.D. Patent Başvurusu Seri No. 10/126,927'de bulunabilir.

Belirli düzenlemelerde, mevcut açıklamanın usullerindeki ve/veya bileşimlerindeki ilgilenilen protein veya polipeptit (veya onun bölümü), bir nükleik asit tarafından kodlanır.

- 10 Tipik olarak nükleik asit en az bir adet selektör kodon, en az iki selektör kodon, en az üç selektör kodon, en az dört selektör kodon, en az beş selektör kodon, en az altı selektör kodon, en az yedi selektör kodon, en az sekiz selektör kodon, en az dokuz selektör kodon, on veya daha çok sayıda selektör kodon içerir.

- İlgilenilen proteinleri veya polipeptitleri kodlayan genler, teknikte deneyimli kişilerce iyi bilinen ve burada, örneğin seçilen bir amino asidin, örneğin bir doğadışı amino asidin dahil edilmesi için bir veya daha çok selektör kodon eklemek üzere "Mutajenez ve Diğer Moleküler Biyoloji Teknikleri" kapsamında açıklanan usuller kullanılarak mutajenize edilebilir. Örneğin, ilgilenilen bir protein için bir nükleik asit, bir veya daha çok selektör kodon içerecek şekilde mutajenize edilerek, bir veya daha çok sayıda seçilmiş amino asidin, örneğin doğadışı amino asidin eklenmesi sağlanır. Bu buluş, herhangi bir proteinin, 20 örneğin en az bir adet seçilmiş amino asit içeren herhangi bir varyant (örneğin mutant) versiyonunu içerir. Benzer şekilde, bu buluş ayrıca mütakabil nükleik asitleri, yani bir veya daha çok sayıda seçilmiş amino asidi kodlayan bir veya daha çok selektör kodona sahip herhangi bir nükleik asidi de içerir.

- 25 Seçilen bir amino asidi içeren bir protein yapmak üzere, ortogonal tRNA/RS çiftleri vasıtasıyla, seçilen amino asidi in vivo olarak dahil etmek için uyarlanan konakçı hücreler ve organizmalar kullanılabilir. Konakçı hücreler; ortogonal tRNA'yı eksprese eden bir veya daha çok vektör, ortogonal tRNA sentetaz, ve derive edilecek proteini kodlayan bir vektörle genetik olarak tasarlanır (örneğin, transforme edilir, dönüştürülür veya transfekte edilir). Bu bileşenlerden her biri aynı vektörde olabilir veya her biri ayrı bir vektörde 30 olabilir; iki bileşen bir vektörde, üçüncü bileşen ise ikinci bir vektörde olabilir. Vektör, örneğin bir plazmit, bir kozmit, bir faj, bir bakteri, bir virüs, bir çıplak polinükleotit veya bir eşlenik polinükleotid formunda olabilir.

ALTERNATİF SİSTEMLER

Rekombinant olmayan konakçı hücrelerde, mutajenize edilmiş konakçı hücrelerde veya hücresiz sistemlerde proteinlere doğadışı amino asitlerin katılması için çeşitli stratejiler kullanılmıştır. Amino asitlerin Lys, Cys ve Tyr gibi reaktif yan zincirlerle derivatizasyonu, lizinin N²-asetil-lizine dönüşmesine yol açmıştır. Kimyasal sentez de doğadışı amino asitleri dahil etmek için basit bir usul sağlar. Peptit fragmanlarının enzimatik ligasyonunun ve doğal kimyasal ligasyonunun yakın zamanda geliştirilmesiyle, daha büyük proteinlerin yapılması mümkün hale gelmiştir. Bakınız, örneğin, P. E. Dawson ve S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000). Kimyasal peptit ligasyonu ve doğal kimyasal ligasyon, A.B.D. Patent No. 6,184,344, A.B.D. Patent Yayını No. 2004/0138412, A.B.D. Patent Yayını No. 2003/0208046, WO 02/098902 ve WO 03/042235'te açıklanmaktadır. 100'den fazla doğadışı amino asidi, hemen hemen her boyuttaki çeşitli proteinlere bölgeye özgü bir şekilde dahil etmek için, arzu edilen doğadışı amino asitle kimyasal olarak açılınmış bir baskılayıcı tRNA'nın, protein biyosentezini destekleme kabiliyetine sahip bir in vitro ekstrakta ilave edildiği genel bir in vitro biyosentez usulü kullanılmıştır. Bakınız, örneğin, V. W. Cornish, D. Mendel ve P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* 244:182-188 (1989); ve, J.D. Bain, C.G. Glabe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989). Protein stabilitesi, protein katlanması, enzim mekanizması ve sinyal transdüksiyonu incelemeleri için proteinlere çok çeşitli fonksiyonel gruplar katılmıştır.

Vahşi tip sentetazların gelişigüzelliğinden yararlanmak için, seçici basınç ekleme olarak adlandırılan bir in vivo usul geliştirilmiştir. Bakınız, örneğin, N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder ve R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999). Hücreye belirli bir doğal amino asit sağlayan ilgili metabolik yolun kapatıldığı bir oksotrofik suş, sınırlı konsantrasyonlarda doğal amino asit içeren minimum ortamlarda büyütülürken, hedef genin kopyalanması baskılanır. Sabit bir büyüme evresinin başlangıcında, doğal amino asit tükenir ve doğadışı amino asit analogu, onun yerini alır. Rekombinant proteinin ekspresyonunun indüklenmesi, doğadışı analogu içeren bir proteinin birikmesine yol açar. Örneğin, bu strateji kullanılarak, proteinlere o, m ve p-florofenilalaninler dahil edilmiştir, ve UV spektrumunda, kolayca tanımlanabilen iki

- karakteristik omuz ortaya koyar (bakınız, örneğin, C. Minks, R. Huber, L. Moroder ve N. Budisa, Anal. Biochem., 284:29 (2000)); ¹⁹F NMR ile, kito-oligosakarit ligandlarıyla etkileşimini incelemek için, bakteriyofaj lizoziminde metiyoninin yerini almak üzere triflorometiyonin kullanılmıştır (bakınız, örneğin, H. Duewel, E. Daub, V. Robinson ve J. F. Honek, Biochemistry, 36:3404 (1997); ve triflorolösin, lösinin yerine dahil edilerek, bir lösin fermuar proteininin termal ve kimyasal stabilitesinde artışa neden olmuştur. Bakınız, örneğin, Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado ve D. A. Tirrell, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 40:1494 (2001). Ayrıca, X ışını kristalografisinde fazların çözülmesini kolaylaştırmak için çeşitli rekombinant proteinlere selenometiyonin ve tellürometiyonin dahil edilir. Bakınız, örneğin, W. A. Hendrickson, J. R. Horton ve D. M. Lemaster, EMBO J., 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda ve M. Hatada, Nat. Struct. Biol., 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann ve R. Huber, Eur. J. Biochem., 230:788 (1995); ve, N. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neuefeind, L. Moroder ve R. Huber, J. Mol. Biol., 270:616 (1997). Alken veya alkin fonksiyonelliklerine sahip metiyonin analogları da etkin biçimde dahil edilerek, proteinlerin kimyasal araçlarla ilave modifikasyonuna imkan sağlandı. Bakınız, örneğin, J. C. van Hest ve D. A. Tirrell, FEBS Lett., 428:68 (1998); J. C. van Hest, K. L. Kiick ve D. A. Tirrell, J. Am. Chem. Soc., 122:1282 (2000); ve, K. L. Kiick ve D. A. Tirrell, Tetrahedron, 56:9487 (2000); A.B.D. Patenti No. 6,586,207; A.B.D. Patent Yayını 2002/0042097.

Bu usulün başarısı, doğadışı amino asit analoglarının aminoasıl-tRNA sentetazları tarafından tanınmasına bağlıdır; bu da genel olarak protein translasyonunun doğruluğunu sağlamak için yüksek seçicilik gerektirir. Bu usulün kapsamını genişletmenin bir yolu, sınırlı sayıda durumda gerçekleştirildiği şekilde, aminoasıl-tRNA sentetazlarının sübat spesifikliğinin gevşetilmesidir. Örneğin, *Escherichia coli* fenilalanil-tRNA sentetazında (PheRS) Ala²⁹⁴ün Gly ile değiştirilmesi, sübat bağlanma cebinin boyutunu büyütür ve tRNAPhe'nin p-Cl-fenilalanin (p-Cl-Phe) tarafından açılasyonuna yol açar. Bakınız, M. Ibba, P. Kast ve H. Hennecke, Biochemistry, 33:7107 (1994). Bu mutant PheRS'yi barındıran bir *Escherichia coli* suşu, fenilalanin yerine p-Cl-fenilalanin veya p-Br-fenilalaninin dahil edilmesine imkan verir. Bakınız, örneğin, M. Ibba ve H. Hennecke, FEBS Lett., 364:272 (1995); ve, N. Sharma, R. Furter, P. Kast ve D. A. Tirrell, FEBS Lett., 467:37 (2000). Benzer şekilde, *Escherichia coli* tirozil-tRNA sentetazın amino asit bağlayıcı bölgesinin yakınındaki bir nokta mutasyon Phe130Ser'in, azatirosinin, tiroside

daha verimli bir şekilde dahil edilmesine imkan verdiği gösterilmiştir. Bakınız, F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll ve S. Nishimura, J. Biol. Chem., 275:40324 (2000).

Doğadışı amino asitleri in vivo olarak proteinlere dahil etmek için bir diğer strateji, düzeltme mekanizmalarına sahip sentetazların modifiye edilmesidir. Bu sentetazlar, aynı türden doğal amino asitlere yapısal olarak benzeyen amino asitleri ayırt edemez ve dolayısıyla aktif hale getiremez. Bu hata, protein translasyonunun doğruluğunun muhafaza edilmesi için, yanlış yüklenmiş amino asidin tRNA'dan deaçillendiği ayrı bir bölgede düzeltilir. Sentetazın düzeltme aktivitesi devre dışı bırakılırsa, yanlış şekilde aktif hale getirilen yapısal analoglar, düzenleme fonksiyonundan kaçabilir ve dahil edilebilir. Bu yaklaşım, yakın zamanlarda valil-tRNA sentetazıyla (ValRS) ortaya konmuştur. Bakınız, V. Doring, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel ve P. Marliere, Science, 292:501 (2001). ValRS, tRNAVal'ı Cys, Thr veya aminobütirat (Abu) ile yanlış şekilde aminoaçilleyebilir; aynı türden olmayan bu amino asitler daha sonra düzenleme bölgesi tarafından hidrolizlenir. *Escherichia coli* kromozomunun rasgele mutajenezinden sonra, ValRS'nin düzenleme bölgesinde bir mutasyona sahip bir mutant *Escherichia coli* suşu seçilmiştir. Bu kusurlu düzenlenmiş ValRS, yanlış bir şekilde tRNAVal'ı Cys ile yükler. Abu, sterik olarak Cys ile benzer olduğundan (Cys'in -SH grubu, Abu'da -CH₃ ile değiştirilir), bu mutant *Escherichia coli* suşu Abu'nun mevcudiyetinde büyütüldüğünde, mutant ValRS de Abu'yu proteinlere dahil eder. Kütle spektrometrik analizi, doğal proteindeki her valin pozisyonunda, valinlerin yaklaşık %24'ünün Abu ile değiştirildiğini gösterir.

Katı faz sentezi ve yarı sentetik usuller ayrıca, yeni amino asitler içeren çeşitli proteinlerin sentezine imkan vermiştir. Örneğin, aşağıdaki yayınlara ve içerdikleri referanslara bakınız: Crick, F.H.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. Nature, 192:1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, J. Am Chem, 88(24):5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzyms, Acc Chem Res, 22:47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, J Am Chem Soc, 109:3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, Science,

256(5054):221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, CRC Crit Rev Biochem, 11(3):255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? Protein Eng., 1(3):151-157 (1987); ve, Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, Science, 266(5183):243 (1994).

Kofaktörler, spin etiketleri ve oligonükleotitleri içeren çeşitli doğadışı yan zincirleri in vitro olarak proteinlere dahil etmek için kimyasal modifikasyon kullanılmıştır. Bakınız, örneğin, Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, Science, 238(4832):1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D.S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, Annu Rev Biochem, 54:565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme active sites, Science, 226(4674):505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, J Biol. Chem, 243(24):6392-6401 (1968); Polgar, L. ve M.L. Bender. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. J. Am Chem Soc, 88:3153-3154 (1966); ve, Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, Science, 242(4881):1038-1040 (1988).

Poliipeptitlerin İmmünoreaktivite ile Tanımlanması

Burada açıklanan poliipeptitlerin çeşitli yeni poliipeptit dizileri (örneğin, buradaki translasyon sistemlerinde sentezlenen proteinler durumunda, seçilmiş amino asitleri (örneğin, doğadışı amino asitler), veya yeni sentetazlar durumunda, standart amino asitlerin yeni dizilerini içerir) sağlaması nedeniyle, poliipeptitler ayrıca, örneğin immünolojik deneylerde tanınabilen yeni yapısal özellikler de sağlamaktadır. Mevcut açıklamanın poliipeptitlerini spesifik olarak bağlayan antiserumların yanı sıra bu antiserumlar tarafından bağlanan poliipeptitlerin oluşturulması da açıklanmaktadır. Burada kullanıldığı şekilde "antikor" terimi, bir immünoglobülin geni veya immünoglobülin genleri tarafından esas itibarıyla kodlanan bir poliipeptiti ya da onun, bir analiti (antijen) spesifik olarak bağlayan ve tanıyan fragmanlarını içerir, ancak bunlarla sınırlı değildir. Örnekler, poliklonal, monoklonal, kimerik ve tek zincirli antikorları ve benzerlerini içerir. Fab fragmanları ve faj görüntülemesi içeren bir ekspresyon kitaplığı tarafından üretilen fragmanlar dahil olmak üzere, immünoglobülinlerin fragmanları da burada kullanıldığı şekilde "antikor" terimine dahildir. Antikor yapısı ve terminoloji için, bakınız, örneğin, Paul, Fundamental Immunology, 4. Baskı, 1999, Raven Press, New York. Doğal olmayan

amino asitlerin kullanımı ve immünolojik tekniklerin örnekleri, The Scripps Research Institute'a ait Breaking Immunological Tolerance With a Genetically Encoded Unnatural Amino Acid başlıklı WO/2009/099672'de verilmektedir.

Örneğin, mevcut açıklamanın tRNA'larından ve/veya RS'lerinden yararlanılarak, bir amino asit dizisi içeren bir immünojene karşı oluşturulan bir antikora veya antiseruma spesifik olarak bağlanan ya da onlarla spesifik olarak immünoreaktif olan proteinler de açıklanmaktadır. Diğer homologlarla çapraz reaktiviteyi ortadan kaldırmak üzere, antikor veya antiserum, vahşi tip polipeptit, örneğin "kontrol" polipeptitleri gibi mevcut protein ile çıkarılır. Vahşi tip proteinin bir nükleik aside tekabül ettiği yerlerde, nükleik asit tarafından kodlanan bir polipeptit oluşturulur ve antikor/antiserum çıkarma amaçları için kullanılır.

Tipik bir formatta, immünolojik analizde, bir veya daha çok polipeptite veya onun önemli bir alt dizisine (yani, sağlanan tam uzunluktaki dizinin en az yaklaşık %30'u) karşı üretilmiş bir poliklonal antiserum kullanılır. Proteinden türetilen potansiyel polipeptit immünojenleri kümesi, aşağıda topluca "immünojenik polipeptitler" olarak ifade edilmektedir. Ortaya çıkan antiserum, isteğe bağlı olarak, kontrol sentetaz homologlarına karşı çapraz reaktiviteye sahip olacak şekilde seçilir ve bu tip herhangi bir çapraz reaktivite, poliklonal antiserumun immünolojik deneyde kullanılmasından önce, bir veya daha çok kontrol homologue ile, örneğin immünoabsorbsiyon yoluyla giderilir.

Bir immünolojik deneyde kullanmak üzere antiserumlar üretmek için, bir veya daha çok immünojenik polipeptit üretilir ve burada açıklandığı gibi saflaştırılır. Örneğin, bir rekombinant hücrede rekombinant protein üretilir. Bir soy içi fare suşu (farelerin fiili genetik özdeşliğinden dolayı sonuçların daha tekrarlanabilir olması nedeniyle bu deneyde kullanılmıştır), Freund adjuvanı gibi standart bir adjuvanla kombinasyon halinde, immünojenik protein/proteinler, ve standart bir fare immünizasyon protokolü ile immünize edilir (antikor üretimi, immünolojik deney formatları ve spesifik immünoreaktiviteyi belirlemek için kullanılabilen koşullarla ilgili standart bir açıklama için, bakınız örneğin, Harlow ve Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York).

Burada, antikorlarla ilgili ilave referanslar ve değerlendirme de bulunmakta olup, immünoreaktivite yoluyla polipeptitlerin tanımlanması için burada uygulanabilir. Alternatif olarak, burada açıklanan dizilerden türetilmiş bir veya daha çok sentetik veya rekombinant polipeptit, bir taşıyıcı proteine eşlenik hale getirilir ve bir immünojen olarak kullanılır.

Poliklonal serumlar toplanır ve bir immünolojik deneyde, örneğin bir katı destek üzerinde sabitleştirilmiş bir veya daha çok immünojenik proteinle yapılan bir katı faz immünolojik deneyinde, immünojenik polipeptite karşı titre edilir. 10^6 veya daha yüksek titreli poliklonal antiserumlar seçilir, havuzda toplanır ve çıkarılan havuzda toplanmış, titre edilmiş poliklonal antiserumları üretmek için kontrol sentetaz polipeptitleriyle çıkarılır.

Çıkarılan havuzda toplanmış, titre edilmiş poliklonal antiserumlar, karşılaştırmalı bir immünolojik deneyde kontrol homologlarına karşı çapraz reaktivite için test edilir. Bu karşılaştırmalı deneyde, çıkarılan titre edilmiş poliklonal antiserumlarda, titre edilmiş poliklonal antiserumların immünojenik proteine bağlanması için, kontrol sentetaz homologlarına bağlanmaya kıyasla en az yaklaşık 5 ila 10 kat yüksek bir sinyal-gürültü oranına yol açan ayırt edici bağlanma koşulları belirlenir. Yani, bağlanma reaksiyonunun sıklığı, albümin veya yağsız kuru süt gibi spesifik olmayan rakiplerin ilave edilmesi ve/veya tuz koşulları, sıcaklık ve/veya benzerlerinin ayarlanması yoluyla ayarlanır. Bu bağlanma koşulları, daha sonraki deneylerde, bir test polipeptitinin (bir polipeptit, immünojenik polipeptitlerle ve/veya kontrol polipeptitleriyle karşılaştırılır) çıkarılan havuzda toplanmış poliklonal antiserumlar tarafından spesifik olarak bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için kullanılır.

Bir başka örnekte, bir test polipeptitinin saptanması için, rekabetçi bağlanma formatındaki immünolojik deneyler kullanılır. Örneğin, belirtilmiş olduğu gibi çapraz reaksiyona giren antikorlar, kontrol polipeptitleriyle immünoabsorbsiyon yoluyla, havuzda toplanmış antiserum karışımından giderilir. Daha sonra immünojenik polipeptit/polipeptitler, çıkarılan havuzda toplanmış antiserumlara maruz bırakılan bir katı desteğe sabitleştirilir. Çıkarılan havuzda toplanmış antiserumlara bağlanmak için rekabet etmek üzere, deneye test proteinleri ilave edilir. Test proteininin/proteinlerinin, sabitleştirilmiş proteine/proteinlere kıyasla, çıkarılan havuzda toplanmış antiserumlara bağlanma için rekabet etme kabiliyeti, deneye ilave edilen immünojenik polipeptitin/polipeptitlerin, bağlanma için rekabet etme kabiliyeti ile karşılaştırılır (immünojenik polipeptitler, havuzda toplanmış antiserumlara bağlanma için, sabitleştirilmiş immünojenik polipeptitlerle etkin bir şekilde rekabet eder). Test proteinleri için yüzde çapraz reaktivite, standart hesaplamalar kullanılarak hesaplanır.

Paralel bir deneyde, kontrol proteinlerinin, çıkarılan havuzda toplanmış antiserumlara bağlanma için rekabet etme kabiliyeti, isteğe bağlı olarak, immünojenik polipeptitin/polipeptitlerin antiserumlara bağlanma için rekabet etme kabiliyeti ile

karşılaştırılarak belirlenir. Yine, kontrol polipeptitleri için yüzde çapraz reaktivite, standart hesaplamalar kullanılarak hesaplanır. Yüzde çapraz reaktivitenin, kontrol polipeptitlerine kıyasla, test polipeptitleri için en az 5 ila 10 kat yüksek olması durumunda ve/veya test polipeptitlerinin bağlanması, yaklaşık olarak immünojenik polipeptitlerin bağlanması

5 aralığında olması durumunda, test polipeptitlerinin, çıkarılan havuzda toplanmış antiserumlara spesifik olarak bağlandığı ifade edilir.

Genel olarak, immünoabsorbe edilmiş ve havuzda toplanmış antiserumlar, herhangi bir test polipeptitinin immünojenik polipeptit/polipeptitler ve/veya kontrol polipeptiti/polipeptitleri ile karşılaştırılması için, burada açıklandığı gibi bir rekabetçi bağlanma immünolojik

10 deneyinde kullanılabilir. Bu karşılaştırmanın yapılması için, immünojenik polipeptitlerin, test polipeptitlerinin ve kontrol polipeptitlerinin her biri, geniş bir konsantrasyon aralığında analiz edilir ve standart teknikler kullanılarak her polipeptitin, çıkarılan antiserumların örneğin bir sabitleştirilmiş kontrol proteinine, test proteinine veya immünojenik proteine bağlanmasını %50 oranında engellemek için gereken miktarı belirlenir. Test polipeptitinin,

15 rekabetçi deneyde bağlanma için gereken miktarı, gereken immünojenik polipeptitin miktarının iki katından daha az ise, bu miktarın, kontrol polipeptitine göre en az yaklaşık 5 ila 10 kat yüksek olması koşuluyla, test polipeptitin, immünojenik protein için oluşturulan bir antikora spesifik olarak bağlandığı ifade edilir.

İlave bir spesifiklik belirlemesi olarak, ortaya çıkan immünojenik polipeptitten çıkarılan

20 havuzda toplanmış antiserumun, immünosorpsiyonda kullanılan immünojenik polipeptite/polipeptitlere bağlanması az miktarda saptanabilene veya hiç saptanamayana kadar, havuzda toplanmış antiserum, isteğe bağlı olarak immünojenik polipeptite/polipeptitlerle (kontrol polipeptitleri yerine) tamamen immünosorbe edilir. Tamamen immünosorbe edilen bu antiserum, daha sonra test polipeptitiyle reaktivite için

25 test edilir. Az miktarda reaktivitenin gözlenmesi veya hiç gözlenmemesi halinde (yani, tamamen immünosorbe edilmiş antiserumun immünojenik polipeptite bağlanması için en fazla 2 kat sinyal-gürültü oranı gözleendiğinde), test polipeptiti, immünojenik protein tarafından sağlanan antiserumla spesifik olarak bağlanır.

Proteinler, antikorlar, antiserumlar ve benzerleriyle ilgili ilave detaylar, "Expanding the

30 Eukaryotic Genetic Code" başlıklı USSN 10/825,867; "IN VIVO INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS" başlıklı WO 2002/085923; "Glycoprotein synthesis" başlıklı A.B.D. Patenti No. 6,927,042; ve "Protein Arrays" başlıklı A.B.D. Patent Yayını No. US 2004/0198637'de bulunabilir.

KİTLER

Kitler de açıklanmaktadır. Örneğin, bir hücrede en az bir adet seçilmiş amino asit, örneğin bir doğadışı amino asit içeren bir protein üreten bir kit sağlanmakta olup, burada kit, bir O-tRNA'yı kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/veya bir O-tRNA, ve/veya bir O-RS'yi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/veya bir O-RS içeren bir hazneyi kapsar. Bir düzenlemede, kit, ayrıca en azından seçilmiş amino asidi içerir. Bir başka düzenlemede, kit, açıklamanın bir aminoaçillenmiş tRNA'sını içerir. Bir diğer düzenlemede, kit ayrıca proteinin üretilmesi için endüstriyel malzemeler içerir.

İlave bir örnek, hücresiz bir translasyon sisteminde en az bir adet seçilmiş amino asit, örneğin bir doğadışı amino asit içeren bir protein üreten bir kit olup, burada kit, bir O-tRNA'yı kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/veya bir O-tRNA, ve/veya bir O-RS'yi kodlayan bir polinükleotit dizisi ve/veya bir O-RS içeren bir hazneyi kapsar. Bir düzenlemede, kit, ayrıca seçilmiş bir amino asidi içerir. Bir başka düzenlemede, kit, açıklamanın bir aminoaçillenmiş tRNA'sını içerir. Bir diğer düzenlemede, kit ayrıca proteinin üretilmesi için endüstriyel malzemeler içerir.

ÖRNEKLER

Örnek 1:

Para-Asetil Fenilalanine Karşı Aminoaçıl-tRNA Sentetaz Seçimi

Doğal olmayan şekilde kodlanmış bir amino asit olan para-asetil fenilalanine karşı aminoaçıl-tRNA sentetazlar için iki DNA kitaplığı tarandı. Bu kitaplıklar, pBK plazmitinde Methanococcus janneschii'den tirozil tRNA sentetaz geninde altı mutasyon içermiştir.

Üç pozitif, iki negatif olmak üzere beş alternatif seçim turundan oluşan seçim prosedürü gerçekleştirildi. Kitaplıklar 1:1 oranıyla birleştirildi; pozitif seçim hücre türüne (pozitif seçim plazmiti pREP içeren GeneHog) elektroporasyonu yapıldı ve uygun antibiyotikler ve doğal olmayan şekilde kodlanmış bir amino asit para-asetil fenilalanin (pAF) ile minimum ortam plakalarına (GMML) yerleştirildi. Plakalar yaklaşık 40 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi; bu noktada hücreler kazıma yoluyla hasat edildi. DNA, bir Qiagen Mini-Prep prosedürü kullanılarak ekstrakte edildi ve daha sonra, kitaplık plazmit DNA'sının izole edilmesi için agaroz jeliyle saflaştırıldı.

Daha sonra bu DNA'nın, negatif seçim hücre türüne (negatif seçim plazmiti pBAD türevi içeren GeneHog) elektroporasyonu yapıldı. Bu transformantlar, doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asit (pAF) olmadan, uygun antibiyotikle LB plakalarına yerleştirildi. Yaklaşık 17 saat sonra bu hücreler kazıma yoluyla hasat edildi ve Qiagen Mini-Prep

5 prosedürü ve agaroz jeli saflaştırması kullanılarak, plazmit DNA'sı saflaştırıldı.

Daha sonraki seçim turları, aynı elektroporasyon, plakalara yerleştirme, hasat etme ve DNA saflaştırma usulü kullanılarak yapıldı. Son (beşinci) seçim turunda, minimum ortam plakalarına yerleştirilen dönüştürülmüş pozitif seçim hücrelerinin seri dilüsyonları yapıldı. Daha sonra ayrı ayrı koloniler toplandı ve 96 hazneli bir blokta gece boyunca büyütüldü.

10 Bu blok daha sonra, doğadışı amino asit pAF içeren ve içermeyen, değişen konsantrasyonlarda kloramfenikol (pozitif seçim antibiyotigi) ile, kopya halinde minimum ortam plakalarına yerleştirildi. 37°C'de yaklaşık 40 saatlik büyümeden sonra, hangi kolonilerin en yüksek kloramfenikol konsantrasyonunda büyüdüğünü, ancak doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asit pAF mevcut olmadığına büyümediğini veya

15 yetersiz büyüdüğünü belirlemek için, plakalar görsel olarak karşılaştırıldı. Bu kriterleri karşılayan koloniler gece boyunca büyütüldü. DNA, Mini-Prep ve agaroz jeli saflaştırması yoluyla kültürlerden izole edildi ve dizilimleri yapıldı.

pAF ile ilgili bu seçimden, 13 klonun benzersiz amino asit dizilerine sahip olduğu tespit edildi ve pAF-tRNA sentetazın doğruluğunu ve işlenebilirliğini belirlemek için ilave

20 karakterizasyona tabi tutuldu.

Bu sentetazları karakterize etmek için, doğal olmayan şekilde kodlanmış amino asit pAF'nin bir polipeptite dahil edildiğini göstermek üzere küçük ölçekli amber baskılamaları gerçekleştirildi ve sonuçlar, SDS-PAGE ile görüntülendi. Tek bir koloni toplandı ve gece boyunca LB broth içinde büyütüldü; daha sonra bu, 50 mL LB'yi inoküle etmek için

25 kullanıldı. Hücreler 0.3 ila 0.4 OD'ye kadar büyütüldü; bu noktada ön indüksiyon noktaları olarak 1.5 mL alikuotlar alındı ve kültür, iki şişeye bölündü. Bir bölüme 1 mM pAF ilave edildi ve her ikisi, 30 dakika boyunca büyütüldü. 30 dakikalık büyütmenin ardından, her iki kültür (+/- pAF), %0.2 L-Arabinoz ile indüklendi, 4.5 saat büyütüldü ve OD₆₀₀ kaydedildi. Daha sonra SDS-PAGE analizi için +/- pAF şişelerinden 1.5 mL alikuotlar

30 alındı.

1.5 mL alikuotlar (İndüksiyon öncesi, + pAF, -pAF), hücreleri pelet haline getirmek için 10 dakika boyunca 10,000 xg'de santrifüjlendi. Daha sonra hücreler, hasat zamanında OD₆₀₀ değerlerine göre orantılı Bakteriyel Protein Ekstraksiyon Reaktif (BPER, Pierce)

içinde süspansiyon halinde tutuldu. Parçalanmış hücrelere DNase I ilave edildi ve 20 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi. Numuneler daha sonra bir indirgeme maddesi ve yükleme boyar maddesiyle birleştirildi ve 30 dakika boyunca MES tamponunda %4 ila %12 Bis-TRIS jelinde işlendi. Bu jel, 10 dakika boyunca iki kez DI H₂O içinde yıkandı ve

5 coomassie mavimsi boyar maddesiyle boyandı. +/- pAF bantları, pAF-tRNA RS'nin pAF'nin dahil edilmesine yol açma doğruluğu açısından karşılaştırıldı; + pAF bandı da daha önce seçilen pAF-tRNA RS ile karşılaştırıldı.

RS'lerin işlenebilirliğini kontrol etmek için, aynı işlem, C-H6 S4am miyoglobins (S4am-Myo) içeren bir plazmitle gerçekleştirildi. Daha sonra S4am Myo, IMAC ile saflaştırıldı ve

10 içerdikleri pAF'nin miktarını belirlemek için protein dizilimine gönderildi.

Bu seçim sonucunda tanımlanan pAF-tRNA RS'ler arasında, bir sentetazın (E9) verimli bir şekilde pAF içererek, S4am-Myo'ya %95'in üzerinde verimlilikle pAF katılımı sağladığı tespit edildi. Katılım, amino asit dizilimiyle belirlenirken, işlenebilirlik, SDS-PAGE jellerindeki protein bantlarının karşılaştırılması yoluyla gösterildi. E9 için nükleotit

15 dizilimi DİZİ ID NO: 4'te gösterilmekte, E9'un amino asit dizilimi ise DİZİ ID NO: 5'te gösterilmektedir.

E9 ile benzer aktiviteye sahip ilave bir mutant tanımlanmış olup, DİZİ ID NO: 17'de gösterilen amino asit dizisine sahiptir.

Örnek 2:

20 tRNA Mutajenezi

tRNA J17'nin üç mutanını oluşturuldu. Vahşi tip J17'nin DNA dizilimi, DİZİ ID NO: 8 olarak ve A.B.D. Patent Yayınları No. 2003/0108885'te DİZİ ID NO: 1 olarak ve US 2003/0082575'te DİZİ ID NO: 1 olarak gösterilmektedir (sırasıyla, A.B.D. Patent Yayınları Seri No. 10/126,931 ve 10/126,927). J17 tRNA, Şekil 1'de gösterildiği gibi TΨC kökünde

25 bir U51:G63 wobble çiftine sahiptir.

TΨC kökünün 51 ve 63 pozisyonlarında Watson-Crick baz çiftleri üretmek için üç adet J17 mutanını (F12, F13 ve F14) oluşturuldu. Örtüşmeli PCR ile mutajenez gerçekleştirildi ve nihai yapılar, aminoasit tRNA sentetaz E9'u kodlayan polinükleotit dizisini (DİZİ ID NO: 4) ve bir amber kodon substitüsyonu ile insan büyüme hormonunu (hGH) kodlayan polinükleotit dizisini (DİZİ ID NO: 16) içeren bir pET19 plazmitindeki EcoRI ve NdeI

30 bölgelerine klonlandı. hGH'nin ekspresyonu, T7 promotörünün kontrolü altındaydı.

Örtüşmeli PCR için iki fragman oluşturuldu. Birinci fragman, primer uzatma yoluyla elde edildi. Üç mutantın her birini oluşturmak için aşağıdaki düz primer dizisi kullanıldı:

GTAACGCTGAATTCCCGGCGGCTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAAT
CCGCATGGCGC (FTam11; DİZİ ID NO: 9)

F12 mutantını (51C:63G) oluşturmak için aşağıdaki revers primer kullanıldı:

GATCTGCAGTGGTCCGGCGGGCCGGATTCTGAACCGGCGCCATGCGGATTTAGAG
TCCGCCGTTCTGC (FTam12; DİZİ ID NO: 10).

F13 mutantını (51U:63A) oluşturmak için aşağıdaki revers primer kullanıldı:

GATCTGCAGTGGTCCGGCGGGCTGGATTTGAACCGCGCCATGCGGATTTAGAGT
CCGCCGTTCTGC (FTam13; DİZİ ID NO: 11).

F14 mutantını (51A:63U) oluşturmak için aşağıdaki revers primer kullanıldı:

GATCTGCAGTGGTCCGGCGGGCAGGATTTGAACCTGCGCCATGCGGATTTAGAGT
CCGCCGTTCTGC (FTam14; DİZİ ID NO: 12).

- 10 İkinci fragmanı oluşturmak üzere, aşağıdaki primer kümesi ile amplifikasyon için bir şablon olarak, J17 tRNA için polinükleotit dizisini (DİZİ ID NO: 8), tRNA sentetaz E9'u kodlayan polinükleotit dizisini (DİZİ ID NO: 4) ve bir amber kodon süstitüsüyonu ile insan büyüme hormonunu kodlayan polinükleotit dizisini (DİZİ ID NO: 16) içeren plazmit pET19 J17 E9 hGH kullanıldı:

- 15 CGCCGGACCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGCTAAGGATTTTTTTTAAGC
(düz primer; FTam15; DİZİ ID NO: 13) ve CAAATTCGTCCATATGGGATTCC
(FTam 16; DİZİ ID NO: 14). Diziyi tRNA'nın 3' ucundan, plazmitin Nde I bölgesine kadar uzatmak için düz primer kullanıldı. Sonuçtaki ürün, jelle saflaştırıldı.

- 20 Örtüşmeli PCR'nin son aşaması, düz primer GTAACGCTGAATTCCCGGCG (FTam17, DİZİ ID NO: 15), revers primer FTam16 (DİZİ ID NO: 14), birinci fragman ve ikinci fragmanı kapsamıştır. Birleştirilen ürünler EcoR I ve Nde I ile sindirildi ve EcoR I ve Nde I ile sindirilmiş plazmit pET19 J17 E9 hGH'ye bağlandı. Her yapının dizisi, dizilim yoluyla teyit edilmiş olup, J17 mutant tRNA'larının her biri için DNA dizileri, DİZİ ID NO: 1

(F12), DİZİ ID NO: 2 (F13) ve DİZİ ID NO: 3 (F14) olarak gösterilmektedir. tRNA'lara mütakabil revers primerlerinin adları verildi.

Protein ekspresyonu

- tRNA'ları (J17, F12, F13 veya F14) kodlayan plazmitlerin her biri, kimyasal araçlarla *E. coli* suş 1 ve suş 2 bakteriyel konakçı hücrelerine dönüştürüldü ve 50 ug/ml karbenisilin ile LB agar plakalarına yerleştirildi. Plakalar gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Her tRNA için, 50 ug/ml karbenisilin ile 1 ml 2xYT'de 37°C'de gecelik kültürü başlatmak için tek bir koloni seçildi. Bu 1 ml kültür, 37°C'de 50 ug/ml karbenisilin ile iki adet 10 ml 2xYT kültürü inoküle etmek için kullanıldı. Bir adet 10 ml kültür, 4 mM *para*-asetilfenilalanin ile takviye edildi. OD₆₀₀=0.7'de, 0.4 mM IPTG ile hGH ekspresyonu indüklendi. Hücrelerin 250 rpm ile 4 saat boyunca 37°C'de kültürlenmesinden sonra, hücreler 5 dakika boyunca 5000 x g'de santrifügasyonla hasat edildi. Hücreler, 5 ug/ml DNase I ile takviye edilmiş B-PER Reagent (Pierce, Rockford, IL) ile parçalandı. Toplam hücre lizatı, %4 ila %12% SDS PAGE ile analiz edildi.
- Şekil 2'de, bir *E. coli* suş 1 toplam hücre lizatlarının SDS PAGE ile bir analizi gösterilmektedir. İnsan büyüme hormonunda bir selektör kodonun baskılanması, J17 veya J17 mutanlığı (F12, F13, F14) tRNA ve aminoasit tRNA sentetaz E9 kullanılarak gerçekleştirildi. J17 mutanlığını barındıran hücreler, J17'yi barındıran hücrelerden biraz daha yavaş büyüdü. 4 mM *para*-asetilfenilalanin mevcut olmayan ortamda, tRNA mutanlığı için SDS-PAGE ile hiçbir tam uzunlukta hGH ürünü gözlenmedi. 4 mM *para*-asetilfenilalanin mevcudiyetinde, tRNA mutanlığının her biriyle tam uzunlukta ürün üretilmesi, bu tRNA mutanlığı-RS E9 çiftlerinin, *E. coli* mekanizmasına ortogonal olduğunu ortaya koydu. SDS-PAGE esas alındığında, J17 mutanlığının baskılanan hGH verimi, J17'nin *E. coli* suş 1'deki veriminden yaklaşık 1.5 ila 2 kat yüksekti.
- Şekil 3'te gösterildiği gibi, bir adet J17 mutanlığı, ayrıca amber baskılaması için *E. coli* suş 2 bakteriyel hücre türünde (F13) test edildi. *E. coli* suş 2'de, ekspresyon ve amber baskılaması verimleri, *E. coli* suş 1'dekine kıyasla azaldı. *para*-asetilfenilalanin mevcut olmayan ortamda, SDS-PAGE ile hiçbir tam uzunlukta hGH ürünü gözlenmedi. 4 mM *para*-asetilfenilalanin mevcudiyetinde, her iki tRNA için tam uzunlukta hGH gözlemlendi. SDS-PAGE esas alındığında, F13'ün baskılanan hGH verimi, J17'ninkinden yaklaşık üç kat yüksekti.

Yaklaşık 1.5 L nihai hacimle, J17 ile F13'ün karşılaştırıldığı bir fermentasyon çalışması yürütüldü. J17 tRNA'yı kodlayan plazmit ve F13 tRNA'yı kodlayan plazmitten her biri, E. coli suş 1'e dönüştürüldü. Her biri için nihai hücre yoğunluğu, yaklaşık 190 g yaş hücre/l idi. hGH titresi, J17 klonu için 347 mg/L ve F13 klonu için 542 mg/L idi.

5

TABLO 1

DİZİ ID NO:	Etiket	DİZİ
1	F12 DNA	CCGGCGGTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCG CATGGCGCCGGTTCAAATCCGGCCCCGCCGGACCA
2	F13 DNA	CCGGCGGTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCG CATGGCGCTGGTTCAAATCCAGCCCCGCCGGACCA
3	F14 DNA	CCGGCGGTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCG CATGGCGCAGGTTCAAATCCTGCCCCGCCGGACCA
4	E9 RS nükleik asidi	ATGGACGAATITGAAATGATAAAGAGAAACACATCTGAAATTAT CAGCGAGGAAGAGTTAAGAGAGGTTTTAAAAAAGATGAAAAA TCTGCTGTTATAGGTTTGAACCAAGTGGTAAATACATTTAGG GCATTATCTCCAAATAAAAAAGATGATTGATTTACAAAAATGCTG GATTTGATATAATTATATATTTGGCTGATTTACACGCCTATTTAA ACCAGAAAAGGAGAGTTGGATGAGATTAGAAAAATAGGAGATTAA TAACAAAAAAGTTTTTGAAGCAATGGGGTTAAAGGCAAAATAT GTTTATGGAAGTGAACATGGTCTTGAATAAGGAATTACACTGAA TGTCTATAGATTGGCTTTAAAAACTACCTTAAAAAGAGCAAGAA GGAGTATGGAACCTTATAGCAAGAGAGGATGAAAAATCCAAAGGT TGCTGAAGTTATCTATCCAATAATGCAGGTTAATGGGATTCAT ATGAGGGCGTTGATGTTCAGTTGGAGGGATGGAGCAGAGAAAA AATACACATGTTAGCAAGGGAGCTTTTACCAAAAAAAGGTTGTTT GTATTCACAACCCCTGTCTTAACGGGTTTGGATGGAGAAGGAAAG ATGAGTTCTTCAAAAGGGAATTTTATAGCTGTTGATGACTCTCCA GAAGAGATTAGGGCTAAGATAAAGAAAGCATACTGCCCAGCTG GAGTTGTTGAAGGAAAATCCAATAATGGAGATAGCTAAATACTTC CTTGAATATCCTTTAACCATAAAAAGGCCAGAAAAATTTGCTGG AGATTTGACAGTTAATAGCTATGAGGAGTTAGAGAGTTTATTTA AAAAATAAGGAATTGCATCCAATGGATTTAAAAAATGCTGTAGCT GAAGAACTTATAAAGATTTTAGAGCCAATTAGAAAGAGATTATA A
5	E9 RS Amino Asidi	MDEFEMIKRNTSEIISFEELREVLKKDEKSAVIGFEPGKIHLGHYIQ IKKMIDIQNAGFDIIHILADLHAYLNQKGELDEIRKIGDYNKKVFEA MGLKAKYVYVYGEHGLDKDYTLNVYRLALKTTLKRARRSMELIAR EDENPKVAEVIYPIMQVNGIHYEGVDVAVGGMEQRKJHMLAREIL PKKVVCIHNPVLTGLDGEKGMSSSKGNFLAVDDSPPEIRAKIKKAY CPAGVVEGNPIMEIAKYFLHYPLTIKRPEKFGGDLTVNSYFEELISLF KNKELIHPMDLKNVAEELIKILEPIRKRL

6	HL(TAG)3 tRNA DNA	CCCAGGGT ^T AGCCAAGCTCGGCCAACGGCGACGGACTCTAAATCC GTTCTCGTAGGAGTTCGAGGGTTCGAATCCCTTCCCTGGGACCA
7	HL(TGA)1 tRNA DNA	GCGGGGGTTGCCGAGCCTGGCCAAAGGCGCCGGACTTCAAATCC GGTCCCGTAGGGGTTCGGGGTTCAAATCCCCGCCCCCGCACCA
8	J17 <i>M</i> <i>jannaschii</i>	CCGGCGGTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGCGGACTCTAAATCCG CATGGCGCTGGTTCAAATCCGGCCCCGCGGACCA
	mtRNA ^{Tyr} _{CUA}	
	DNA	
9	FTam11 primer	GTAACGCTGAATTCCCGGCGGTAGTTCAGCAGGGCAGAACGGC GGACTCTAAATCCGCATGGCGC
10	FTam12 primer	GATCTGCAGTGGTCCGGCGGGCCGGATTGAACCGGCGCCATGC GGATTTAGAGTCCGCCGTTCTGC
11	FTam13 primer	GATCTGCAGTGGTCCGGCGGGCTGGATTGAACCGGCGCCATGC GGATTTAGAGTCCGCCGTTCTGC
12	FTam14 primer	GATCTGCAGTGGTCCGGCGGGCAGGATTGAACCTGCGCCATGC GGATTTAGAGTCCGCCGTTCTGC
13	FTam15 primer	CGCCGGACCACTGCAGATCCTTAGCGAAAGCTAAGGATTTTTT TAAGC
14	FTam16 primer	CAAATTCGTCCATATGGGATTCC
15	FTam17 primer	GTAACGCTGAATTCCCGGCG

16	hGH (DNA)	ATGGGCCACCACCACCACCACCCTTCCCAACCATTCCCTTATCC AGGCTTTTGTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCA GCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTAGATCC CAAAGGAACAGAAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCC CTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCCTCCAACAGGGAGGA AACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGC TGCTCATCCAGTCCGTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGT GTCTTCGCCAACAGCCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGT CTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGA TGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTT CAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACACAACGAT GACGCACTACTCAAGAACTACGGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAA GGACATGGACAAGGTCGAGACATTCTTGCGCATCGTGCAGTGCC GCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAA
17	E9'un D286R mutant	MDEFEMIKRN TSEIIEEEI REVLKKDEKS AVIGFEPGK IIILGHYI.LQIK KMIDI.QNAGE DIIYI.ADLI AYI.NQKGEID EIRKIGDYNK KVFEAMGLKA KYVYGSEIHL DKDYTLNVYR LALKTTLKRA RRSMEIARE DENPKVAEVI YPIMQVNGIH YEGVDVAVGG MEQRKIHMLA RELPKKVVC IHNPLVLTGLD GEGKMSSSKG NFIAVDDSP EIRAKIKKAY CPAGVVEGNP IMEIAKYFLE YPI.TIKRPEK FGGDLTVNSY EEL.ESLFKNK ELHPMRLKNA VAEELIKILE PIRKRL
18	Y31 Primer 1	gtattaccctgttatccctatggcgaaattcagaatgattctc
19	Y31 Primer 2	cagaaaccgcgtgtgttcctaaacaatgtaatcattac
20	Y31 Primer 3	gtaatgattacattgttaggaacaacacgcggtttctg
21	Y31 Primer 4	gagagcgggtgttgcgtactg
22	Y31 Primer 5	attaccctgttatccctagacgtcagtggaaacgaaaactcagc
23	Y31 Primer 6	tagggataacagggtataacaatttcaggtg
24	Y31 Primer 7	ggtcagcttgctgaaagtaccg
25	Y31 Primer 8	ctacggttcgatcatctccagctagggataacagggtaat
26	N51 Primer 1	gtattaccctgttatccctatggcgaaattcagaatgattctc
27	N51 Primer 2	gattacattgttaggaacaacacgcggtttctg
28	N51 Primer 3	cagaaaccgcgtgtgttcctaaacaatgtaatc
29	N51 Primer 4	gagagcgggtgttgcgtactg

30	N51 Primer 5	attaccctgttatcccta gacgctcagtgaacgaaaactcacg
31	N51 Primer 6	tagggataacagggtaataacaatttcagggtg
32	N51 Primer 7	ggtcagcttgctcgaaagtaccg
33	N51 Primer 8	ctaaacaatgtaatctagggataacagggtaat
34	MAP Y31 Amber Mutant A12	atggctatctcaatcaagaccccagaagatatcgaaaaaatgcegcgtcgctggcc gactggctgcccgaagtgcctggagatgatcgaaacgct agg gttaaaccgggctcag caaccggcgagctggatcgcatctgtaatgattacattgtttaatgaacaacacgcg gtttctgcctgcctcggtatcacggetatccgaaatccggttgcatctctatta atgaagtgggtgtgccacgggtatcccggaatgctaaagctgctgaaagatggcga taccgttaacattgatgtcaccgtaatacaagatgggttccacggcgataacctcg aaaatgtttatcgctcggttaagccgacccatcatgggggaacgctctgtgcgcgatca cgcaagaaagcctgtacctggcgctacgcattggtaaaaccaggcattaatctgcg cgaaatcgggtgcggcgattcagaaatttgcgaagcagaaggcttctccgctcgtt cgtgaatattgcccgaacgggtattgggtcgcggttccatgaagaaccgcagggtgc tgcactatgactcccgtaaaaccaacgctcgtactgaaacctgggatgacgttcac catcgagccaatgggtcaacgcgggttaaaaaagagatccgcaccatgaaagatggc tggacggtaaaaaaccaagatcgcaagcttgtctgcacaatatgagcataactattg tgggtgactgataacgggtgcgaaattctgacgctacgcaaggatgacaccatccc ggcgataatctcgcacgacgaataa
35	MAP N51 Amber Mutant D2	atggctatctcaatcaagaccccagaagatatcgaaaaaatgcegcgtcgctggcc gactggctgcccgaagtgcctggagatgatcgaaacgctatgttaaaccgggctcag caaccggcgagctggatcgcatctgtaatgattacattgttt tagga aacaacacgcg gtttctgcctgcctcggtatcacggetatccgaaatccggttgcatctctatta atgaagtgggtgtgccacgggtatcccggaatgctaaagctgctgaaagatggcga taccgttaacattgatgtcaccgtaatacaagatgggttccacggcgataacctcg aaaatgtttatcgctcggttaagccgacccatcatgggggaacgctctgtgcgcgatca cgcaagaaagcctgtacctggcgctacgcattggtaaaaccaggcattaatctgcg cgaaatcgggtgcggcgattcagaaatttgcgaagcagaaggcttctccgctcgtt cgtgaatattgcccgaacgggtattgggtcgcggttccatgaagaaccgcagggtgc tgcactatgactcccgtaaaaccaacgctcgtactgaaacctgggatgacgttcac catcgagccaatgggtcaacgcgggttaaaaaagagatccgcaccatgaaagatggc tggacggtaaaaaaccaagatcgcaagcttgtctgcacaatatgagcataactattg tgggtgactgataacgggtgcgaaattctgacgctacgcaaggatgacaccatccc ggcgataatctcgcacgacgaataa

Örnek 3: *Mycobacterium avium* alt türü *paratuberculosis* için canlı *Ambrex* Aşısı

Mycobacterium avium alt türü *paratuberculosis* (MAP), sığırlarda ve diğer geniş getirenlerde Johne hastalığına neden olan zorunlu bir patojenik bakteridir. Yakın zamanlardaki bir çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri'nde süt ineği sürülerinin %21'inin enfekte olduğu, bunun da süt endüstrisi için yılda 200 milyon doları aşan önemli ekonomik kayıtlara yol açtığı tahmin edilmiştir. Johne hastalığı sadece Rifabutin gibi antibiyotikler ve Klaritromisin gibi bir makrolitten oluşan bir kombinasyon ile tedavi edilebilmektedir. Tedavi rejimleri yıllar sürebilir. Paratuberculosis aşılarının ticari olarak temin edilebilmesi,

ancak hastalığın önlenmesine tam olarak etkin olmaması nedeniyle, etkin bir MAP aşısı çok önemlidir.

MAP ile İnsan Crohn Hastalığı Arasındaki Bağlantı

- Crohn hastalığı, Kuzey Amerika'da 400,000 ila 600,000 kişiyi etkilemektedir. Kuzey
- 5 Avrupa için yaygınlık tahminleri, her 100,000 kişide 27 ile 48 arasındadır. Uzun süredir, bunun, insanlarda Crohn hastalığına neden olan bir madde olduğundan kuşulanılmaktadır; bu bağlantı tartışmalıdır. Giaconda, MAP'nin Crohn hastalığına neden olan bir madde olduğu varsayımına dayanarak, Crohn hastalığı için potansiyel bir ilaç terapisi olarak Rifabutin, klaritromisin ve klofaziminden (Myoconda) oluşan bir kombinasyonu ticari hale
- 10 getirmeye çalışmaktadır ve II. Evre klinik deneyde klinik etki hemen hemen %95'tir. IIIa Evresi deneyi, geleneksel terapiyle karşılaştırıldığında, 16 haftada remisyona elde etmede istatistiksel açıdan anlamlı bir gelişme ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Myoconda®, bu deneyde terapinin tamamlanmasından sonra remisyona muhafaza etme konusunda istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde etmemiştir.
- 15 Halen, önerilen mevcut aşılarda, canlı, zayıflatılmış (suş 316 F), ölü tam hücre bazlı aşılardır (suş 18) ve ayrıca bir alt birim aşısı deneyi üzerinde çalışılmaktadır; bununla birlikte mevcut aşılarda sadece dışkıyla dökmeyi ve klinik hastalığın ilerlemesini geciktirmekte, ancak enfeksiyona karşı korumamaktadır (Expert Rev. Vaccines 7(6) 2008). Bu alanda, ideal olarak, rasyonel şekilde zayıflatılmış bir aşısı beklenmektedir.
- 20 MAP'nin tam genom dizisinin yayınlanmış olması (PNAS 2005 12344-12349) ve MAP'de yabancı gen ekspresyonunun gerçekleştirilmesi nedeniyle, MAP için gene özgü çıkarma ve bölgeye özgü mutasyon artık kullanılabilmektedir (Applied and Environmental Microbiology 2008 1687-1695). Ambrix aşısı, hayvanlarda MAP enfeksiyonunu önlemeye yönelik bir aşısı olarak verilecek olan genetik olarak modifiye edilmiş tam organizma
- 25 doğadışı amino aside bağımlı bir MAP olacaktır. Zorunlu genler seçilir ve daha sonra bir veya daha çok bölgeye özgü amber mutasyonu içerecek şekilde dönüştürülür. MAP, kültür ortamında mevcut doğal olmayan amino asidi içeren ve içermeyen hücre kültürü ile karakterize edilir, reversiyon oranları karakterize edilir ve tam organizma elde edilir.

Örnek 4: Baskılama Kompetan/Lambda Red Hücrelerin Oluşturulması

- 30 Bir *E. coli* suşu hazırlandı. *E. coli* suşu hem amber baskılamasını, hem Lambda Red Rekombinasyonunu gerçekleştirebilir. Şekil 5'te gösterilen pKD46n'yi içeren W3110 *E. coli* hazırlandı ve daha sonra Şekil 4'te gösterilen plazmit pVK10/camR ile

elektroporasyon yoluyla dönüştürüldü. 30°C'de 48 saat süresince büyütülmüş 50 µg/mL ampicilin ve 34 µg/mL kloramfenikol içeren LB agar plakalarında pozitif transformantlar seçildi.

50 µg/mL ampicilin, 34 µg/mL kloramfenikol ve %0.2 arabinoz içeren LB ortamında her iki plazmiti kapsayan bir 500 mL kültürün 0.5 nihai OD600 değerine kadar büyütülmesiyle, her iki plazmiti içeren elektrokompentan hücreler hazırlandı. Hücreler daha sonra %10 gliserolde üç kez yıkandı ve 500 µL %10 gliserol içinde tekrar süspansiyon halinde tutuldu. 60 µL alikotlar, sonraki kullanım için -80°C'de saklandı.

Örnek 5: Koşullu Ölümcül Metiyonin Amino Peptidazın Oluşturulması

- 10 Koşullu ölümcül metiyonin amino peptidaz içeren *E. coli* suşları oluşturuldu. Metiyonin amino peptidaz geni içindeki iki bölgenin birinde (Y31 veya N51) bir amber mutasyonu eklendi. Bu mutantların *E. coli* kromozomuna entegre edilmesi için, Şekil 6'daki diyagramda gösterildiği gibi, örtüşmeli PCR ile rekombinant DNA'nın doğrusal bir parçası oluşturuldu. Önce, primerler 1 ve 2 (DİZİ ID NO: 18 veya 26) kullanılarak, doğal
- 15 kodondan amber kodona dönüştürülen seçilmiş amino asitte (Y31 veya N51) sonlanacak şekilde, metiyonin amino peptidaz geninin 5' ucu klonlandı (PCR ürünü A). Metiyonin amino peptidaz geninin 3' ucu, amber mutasyonu ile başlanarak, primerler 3 (DİZİ ID NO: 20 veya 28) ve 4 (DİZİ ID NO: 21 veya 29) kullanılarak klonlandı (PCR ürünü B). İki reaksiyon ürünü, amber mutasyonu ile sınırdaş dizide örtüşmekte olup, bu ürünler, 31 veya
- 20 51 pozisyonunda bir amber kodon süstitüsyonuna sahip tam metiyonin amino peptidaz geni olan C ürününü sağlamak üzere, primerler 1 (DİZİ ID NO: 18 veya 26) ve 4 (DİZİ ID NO: 21 veya 29) ile amplifiye edilmiştir.

- Tam mutajenez şablonunu oluşturmak için, I-sceI homing endonükleaz tanıma bölgeleriyle sınırdaş bir Kanamisin direnç işareti, daha önce oluşturulmuş bir *E. coli* suşundan DNA
- 25 üzerinde primerler 5 (DİZİ ID NO: 22 veya 30) ve 6 (DİZİ ID NO: 23 veya 31) kullanılarak amplifiye edildi (PCR ürünü D). Kanamisin direnç işaretinin ve homolog rekombinasyonun kaldırılmasına imkan vermek üzere, metiyonin amino peptidazın akış yukarı yöndeki genomik dizisini ve metiyonin amino peptidazın 5' ucunu amplifiye etmek için, primerler 7 (DİZİ ID NO: 24 veya 32) ve 8 (DİZİ ID NO: 25 veya 33) kullanıldı
- 30 (PCR ürünü E). Transformasyon için nihai DNA şablonu, primerler 7 (DİZİ ID NO: 24 veya 32) ve 4 (DİZİ ID NO: 21 veya 29) kullanılarak E, D ve C fragmanlarının amplifiye edilmesi yoluyla oluşturuldu.

Örnek 7: Koşullu Ölümcül Metiyonin Amino Peptidaz Klonlarının Transformasyonu ve Seçimi

Elektrokompetan pKD46, pVK10-camR pozitif hücreleri dönüştürmek için, örtüşmeli PCR ile oluşturulan transformasyon şablonu kullanıldı. Kolonilerin 50 µg/mL Ampisilin, 50 µg/mL Kanamisin ve 2mM pAF içeren LB agar plakalarında 48 ila 72 saat boyunca 30°C'de büyütülmesiyle, pozitif transformantlar seçildi. pAF'ye bağımlı büyümeyi test etmek üzere, her bölge için 96 koloni, 50 µg/mL Ampisilin, 50 µg/mL Kanamisin ve 1 mM pAF içeren 1 mL LB'de 72 saat boyunca 30°C'de büyütülmüş olup, yine Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9'da gösterilmektedir. Bu klonlar daha sonra 50 µg/mL Ampisilin, 50 µg/mL Kanamisin ve 2 mM pAF içeren LB agar'da, ve pAF mevcut olmadan, 50 µg/mL Ampisilin ve 50 µg/mL Kanamisin içeren LB agar'da kopya halinde plakalara yerleştirildi. Bu kopya plakalar 30°C'de 72 saat büyütüldü ve daha sonra büyüme yönünden puanlandı. Sadece 2 mM pAF mevcudiyetinde büyüme ortaya koyan klonlar, ayrıca analiz için seçildi.

Örnek 8: Klon Seçimi ve Olgunlaştırma

pAF bağımlılığı için pozitif olan klonlar, ayrıca incelenmek üzere seçildi. Bu klonlar Y31 A12, Y31 C5, Y31 E3, N51 D2 ve N51 H9 idi. Klonlar ayrı ayrı tekrar tarandı ve tümü, sadece pAF içeren ortamda büyütüldü. Tüm klonların, uygun bölgede (Y31 veya N51) bir amber kodon (tag) mevcudiyetine göre dizilimi yapıldı. Beşi de uygun konumda bir amber kodona sahipti. Daha sonra klonlar Y31 A12 ve N51 D2 izole edildi ve 37 derece Santigrat'ta tekrarlı ısıl işlemle pKD46 plasmiti giderildi.

pKD46 ve ampisilin direnci kaybolduğunda, hücreler, I-SceI enzimi içeren plazmitle dönüştürüldü. Bu enzimin işlem görmesinden sonra bazı klonlar seçildi ve kanamisin direnci yönünden test edildi. Kanamisine dirençli olmayan klonların tekrar dizilimi yapıldı ve bunlar, %10 gliserol hammaddelerinde donduruldu. Bu klonlar nihai, pAF'ye bağımlı metiyonin amino peptidaz klonları olacaktır.

Mevcut buluşun bazı düzenlemelerinde, Şekil 11'de şematik olarak tasarlanan arzu edilen reversiyon oranları, tek bir değişimle 10^{-9} dönme sıklığından az olacaktır. Y31 ve N51 klonları test edilmiş olup, reversiyon oranları Tablo 2'de gösterilmektedir.

TABLO 2:

Klon	Test 1	Test 2
Y31	2.78×10^{-8}	$<3 \times 10^{-8}$
		(saptanmadı)
N51	6.82×10^{-8}	$<2 \times 10^{-8}$
		(saptanmadı)

TABLO 3:

<i>E. coli</i>'de Zorunlu Genler		
Alt. Sembol	Sembol	Gen Ürünü
b0026	ileS	İzolösil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.5)
b0027	IspA	Lipoprotein sinyal peptidazı (EC 3.4.23.36)
b0029	ispH*	IspH proteini (lytB)
b0083	ftsL	Hücre bölünmesi proteini ftsL
b0084	ftsI	Peptidoglikan sentetaz ftsI öncüsü
b0085	murE	UDP-N-asetilmuramoilalanil-D-glutamat--2,6-diaminopimelat ligaz (EC 6.3.2.13)
b0088	murD	UDP-N-asetilmuramoilalanin--D-glutamat ligaz (EC 6.3.2.9)
b0089	ftsW	Hücre bölünmesi proteini ftsW
b0090	murG	UDP-N-asetilglükozamin--N-asetilmuramil-(Pentapeptid) pirofosforil-undekaprenol N-asetilglükozamin transferaz (EC 2.4.1.-)
b0091	murC	UDP-N-asetilmuramat--alanin ligaz (EC 6.3.2.8)

b0093	ftsQ	Hücre bölünmesi proteini ftsQ
b0094	ftsA	Hücre bölünmesi proteini ftsA
b0095	ftsZ	Hücre bölünmesi proteini ftsZ
b0098	secA	Preprotein translokaz secA alt birimi
b0168	map	Metiyonin aminopeptidaz (EC 3.4.11.18)
b0169	rpsB	30S ribozomal protein S2
b0171	pyrH	Üridilat kinaz (EC 2.7.4.-)
b0172	fir	Ribozom sirkülasyon faktörü
b0174	uppS	Undekaprenil pirofosfat sentetaz (EC 2.5.1.31)
b0175	cdsA	Fosfatidat sitidililtransferaz (EC 2.7.7.41)
b0180	fabZ	(3R)-hidroksimiristoil-[açıl taşıyıcı protein] dehidrataz (EC 4.2.1.-)
b0181	lpxA	Açıl-[açıl taşıyıcı protein]--UDP-N-asetilglükozamin O-açıltransferaz (EC 2.3.1.129)
b0182	lpxB	Lipid-A-disakarit sentaz (EC 2.4.1.182)
b0184	dnaE	DNA polimeraz III alfa alt birimi (EC 2.7.7.7)
b0185	accA	Asetil-koenzim A karboksilaz karboksil transferaz alt birimi alfa (EC 6.4.1.2)
b0194	proS	Prolil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.15)
b0416	nusB	N kullanım maddesi proteini B
b0420	dxs	1-deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat sentaz (EC 4.1.3.37)
b0421	ispA	Geraniltranstransferaz (EC 2.5.1.10)
b0470	dnaX	DNA polimeraz III alt birimi tau (EC 2.7.7.7)

b0474	adk	Adenilat kinaz (EC 2.7.4.3)
b0526	cysS	Sisteinil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.16)
b0634	mrdB	Çubuk şeklini belirleyen protein rodA
b0635	mrdA	Penisilin bağlayıcı protein 2
b0640	holA	DNA polimeraz III, delta alt birimi (EC 2.7.7.7)
b0642	leuS	Lösil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.4)
b0680	glnS	Glütaminil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.18)
b0893	serS	Seril-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.11)
b0914	msbA	Muhtemel transport ATP bağlayıcı protein msbA
b0918	kdsB	3-deoksi-manno-oktülösonat sitidililtransferaz (EC 2.7.7.38)
b0930	asnS	Asparajinil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.22)
b0954	fabA	3-hidroksidekanoil-[açıl taşıyıcı protein] dehidrataz (EC 4.2.1.60)
b1084	rne	Ribonükleaz E (EC 3.1.4.-)
b1092	fabD	Malonil CoA-açıl taşıyıcı protein trans açılaz (EC 2.3.1.39)
b1093	fabG	3-oksoaçıl-[açıl taşıyıcı protein] redüktaz (EC 1.1.1.100)
b1098	tmk	Timidilat kinaz (EC 2.7.4.9)
b1099	holB	DNA polimeraz III, delta' alt birimi (EC 2.7.7.7)
b1116	lolC	Lipoprotein salgılayıcı sistem transmembran proteini lolC
b1117	lold	Lipoprotein salgılayıcı sistem ATP bağlayıcı protein lold
b1118	lolE	Lipoprotein salgılayıcı sistem transmembran proteini lolE
b1133	trmU	tRNA (5-metilaminometil-2-tiyoüridilat)-metiltransferaz (EC 2.1.1.61)
b1207	prsA	Riboz-fosfat pirofosfokinaz (EC 2.7.6.1)

b1274	topA	DNA topoizomeraz I (EC 5.99.1.2)
b1288	fabI	Enoil-[açıl taşıyıcı protein] redüktaz [NADH] (EC 1.3.1.9)
b1714	pheS	Fenilalanil-tRNA sentetaz alfa zinciri (EC 6.1.1.20)
b1716	rpIT	50S ribozomal protein L20
b 1718	infC	Translasyon başlatma faktörü IF-3
b1740	nadE	NH(3)'e bağımlı NAD(+) sentetaz (EC 6.3.5.1)
b1866	aspS	Aspartil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.12)
b1876	argS	Arjinil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.19)
b2185	rplY	50S ribozomal protein L25
b2234	nrdA	Ribonükleosit-difosfat redüktaz 1 alfa zinciri (EC 1.17.4.1)
b2235	nrdB	Ribonükleosit-difosfat redüktaz 1 beta zinciri (EC 1.17.4.1)
b2323	fabB	3-oksoaçıl-[açıl taşıyıcı protein] sentaz I (EC 2.3.1.41)
b2400	gltX	Glütamil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.17)
b2411	ligA	DNA ligaz (EC 6.5.1.2)
b2412	zipA	Hücre bölünmesi proteini zipA
b2496	yfgE	Hipotetik protein yfgE
b2514	hisS	Histidil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.21)
b2563	acpS	Holo-[açıl taşıyıcı protein] sentaz (EC 2.7.8.7)
b2606	rplS	50S ribozomal protein L19
b2607	trmD	tRNA (Guanin-N(1)-)-metiltransferaz (EC 2.1.1.31)
b2609	rpsP	30S ribozomal protein S16
b2610	ffh	Sinyal tanıma partikülü proteini

b2614	grpE	GrpE proteini
b3018	plsC	1-açıl-sn-gliserol-3-fosfat açıltransferaz (EC 2.3.1.51)
b3019	parC	Topoizomeraz IV alt birim A (EC 5.99.1.-)
b3030	parE	Topoizomeraz IV alt birim B (EC 5.99.1.-)
b3041	ribB	3,4-dihidroksi-2-bütanon 4-fosfat sentaz
b3067	rpoD	RNA polimeraz sigma faktörü rpoD
b3165	rpsO	30S ribozomal protein S15
b3183	yhbZ	Hipotetik GTP bağlayıcı protein yhbZ
b3230	rpsI	30S ribozomal protein S9
b3231	rplM	50S ribozomal protein L13
b3287	def	Peptit deformilaz (EC 3.5.1.88)
b3298	rpsM	30S ribozomal protein S13
b3300	secY	Preprotein translokaz secY alt birimi
b3301	rplO	50S ribozomal protein L15
b3303	rpsE	30S ribozomal protein S5
b3304	rplR	50S ribozomal protein L18
b3305	rplF	50S ribozomal protein L6
b3307	rpsN	30S ribozomal protein S14
b3309	rplX	50S ribozomal protein L24
b3310	rplN	50S ribozomal protein L14
b3311	rpsQ	30S ribozomal protein S17
b3316	rpsS	30S ribozomal protein S19

b3317	rplB	50S ribozomal protein L2
b3318	rplW	50S ribozomal protein L23
b3319	rplD	50S ribozomal protein L4
b3320	rplC	50S ribozomal protein L3
b3321	rpsJ	30S ribozomal protein S10
b3340	fusA	Uzama faktörü G
b3342	rpsL	30S ribozomal protein S12
b3384	trpS	Triptofanil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.2)
b3464	ftsY	Hücre bölünmesi proteini ftsY
b3559	glyS	Glisil-tRNA sentetaz beta zinciri (EC 6.1.1.14)
b3633	kdtA	3-deoksi-D-manno-oktülolonik asit transferaz (EC 2.-.-.-)
b3634	coaD	Fosfopantetein adenililtransferaz (EC 2.7.7.3)
b3640	dut	Deoksiüridin 5'-trifosfat nükleotidohidrolaz (EC 3.6.1.23)
b3648	gmK	Guanilat kinaz (EC 2.7.4.8)
b3702	dnaA	Kromozomal replikasyon başlatıcı protein dnaA
b3730	glmU	Bifonksiyonel glmU proteini
b3865	engB	Muhtemel GTP bağlayıcı protein engB
b3967	murI	Glutamat rasemaz (EC 5.1.1.3)
b3985	rplJ	50S ribozomal protein L10
b3986	rplL	50S ribozomal protein L7/L12
b3987	rpoB	DNA'ya yönelik RNA polimeraz beta zinciri (EC 2.7.7.6)
b3988	rpoC	DNA'ya yönelik RNA polimeraz beta zinciri (EC 2.7.7.6)

b4052	dnaB	Replikatif DNA helikaz (EC 3.6.1.-)
b4142	groS	10 kDa şaperonin
b4143	groL	60 kDa şaperonin
b4147	efp	Uzama faktörü P
b4200	rpsF	30S ribozomal protein S6
b4226	ppa	İnorganik pirofosfataz (EC 3.6.1.1)
b4258	valS	Valil-tRNA sentetaz (EC 6.1.1.9)
b4361	dnaC	DNA replikasyon proteini dnaC
b4362	dnaT	Primozomal protein I

Örnek 9:

Poliomyelit aşısı (oral) için kullanılanla aynı tip ve geçişteki tohum suş, birden çok zorunlu gende ve kültürde amber mutasyonları içermek üzere dönüşür.

5 Hücre Kültürü:

- i) Virüsün çoğalması için farklı hücre sübstratları, İnsan diploid hücre türü, Maymun böbrek hücreleri, Vero hücre türü veya başka herhangi bir uygun hücre kültürünü içerir. ii) Hücrelerin büyük ölçekli üretimi: 1. Manufacturer's working cell bank'ın (MWCB) hazırlanması: Birincil hücre kültürleri (normal dokudan türetilen ve eksi 70°C'de dondurularak saklanan hücreler) durumunda veya izin verilen herhangi bir başka kesintisiz hücre türünden MWCB, hücrelerden ve belirtilen sayıda hücre kültürü içinde seri alt kültürden sonra havuzda toplanmış hücrelerden hazırlanır . 2. Hücrelerin hacminin aşamalı olarak arttırılması için, aşağıdaki sistemlerden uygun olan herhangi biri kullanılabilir. Döner şişeler: Döner şişelerde büyütme, hücrelerin cam yüzeyde dağılımı ve maksimum elde edilebilir hücre yoğunluğu açısından sabit kültürlerdekinden farklıdır. Döner şişe kültürleri, sabit kültürlerdekinden yaklaşık iki kat yüksek bir yoğunluğa izin verebilmeleri nedeniyle daha yavaş bozulmazlar. Tek katmanlı kültürde büyütülen memeli hücreleri, döner şişe tekniğine en iyi şekilde uyum sağlar. Hücre fabrikaları: Bunlar, ortak bir giriş ve çıkış kapağını paylaşan kültür tepsileri kümesidir. Bunlar, hücreler için, döner şişenin

içindeki kadar geniş bir büyüme yüzeyi sağlar, ancak inkübatörün içinde daha az yer kaplar. Bunlar bağlı hücre kültürleri için idealdir, daha az kirlenme riski taşır ve sıkıdır. Roux şişeleri Mikro-taşıyıcı sistemi 3. Kontrol hücre kültürlerinin numuneleri en az iki hafta boyunca ayrı olarak inkübe edilir ve sitopatik değişim belirtisi yönünden incelenir.

5 **Hücre Kültürlerinde Polio Virüsün Çoğaltılması:**

- i) Tohum lotu sistemi: a) Oral polio aşısı için izlendiği şekilde geçiş seviyesi, veya b) Oral polio aşısı üretmek üzere kullanılabilen tek değerlikli kitle süspansiyonu için türetildiği şekilde, bir sonraki geçiş seviyesi. 1. Aşı, tohum lotu sistemi temel alınarak üretilir. Virüs tohum lotu, birlikte işlenen virüsün ve tohum lotundan hazırlanmış birörnek bileşimin miktarıdır. 2. Tohum virüsü alt kültürü, orijinal laboratuvar ve saha testlerinin yapıldığı aşının üretimi için kullanılan bir tohum lotundan itibaren sayılarak, 10 kereden fazla yapılmamalıdır.

Tekli Hasat ve Tek Değerlikli Havuzlar:

- Virüs, hücre kültürlerinde çoğaltılır, tek bir hücre partisinden türetilmiş hücre kültürlerinden hasat edilir ve birlikte işlenir. Bu, tekli hasat olarak bilinir. Bir tür virüs süspansiyonunun tekli hasatları, tek değerlikli havuzun ham formunu elde etmek için aynı zamanda işlenir.

Tek Değerlikli Havuzun Filtrasyonu veya Arıtılması:

- Her tek değerlikli havuzun ham virüs süspansiyonu, azalan poroziteye sahip filtrelerden, aşama aşama arıtılır. Filtrasyon aşamasının amacı, partiküllü malzemenin ve inaktivasyon işlemini etkileyebilen diğer maddenin giderilmesidir, çünkü bu tip topaklar, bekleme sırasında artma eğilimindedir.

Tek Değerlikli Havuzun Konsantrasyonu:

Filtreden geçirilen her tek değerlikli havuz, Ultrafiltrasyonla konsantre edilir.

25 **Tek Değerlikli Havuzun Saflaştırılması:**

- Tek değerlikli havuzun saflaştırılması için, DEAE sefaroze/sabitleştirilmiş DNA-ase sütunu/immünoadsorpsiyon sütunu ile kromatografi kullanılır. Saflaştırma işlemi, hücresel DNA'nın seviyesini, tutarlı biçimde, başlangıçtaki virüs hasadından en az 108 kat azaltır. D-antijen konsantrasyonu, ELISA ve sıçanlarda karşılaştırılabilir immünojenikliğin görüntülenmesi ile belirlenir. Buna göre, güç ayarlanır. Poliovirüsün tek değerlikli havuzları, nihai üç değerlikli kitle ürünü oluşturmak üzere harmanlanır.

Aşının oluşturulması ve Üretimi:

Saflaştırılan kitle filtreden, tercihen 0.22 mikron veya 0.45 mikron filtreden geçirilir. Tek değerlikli dönüştürülmüş virüsler, doğal olmayan amino asit mevcudiyetinde devam eder ve tek değerlikli, iki değerlikli, üç değerlikli veya çok değerlikli aşı yapmak için isteğe bağlı olarak stabilizatör ve/veya koruyucu ile karıştırılır.

Aşının Etkinliğinin Test Edilmesi:

Yukarıda üretildiği şekilde aşının etkinliğinin, belirlenmiş referans aşısıyla karşılaştırıldığında, in-vitro ve/veya in-vivo usulde benzer olduğu tespit edildi.

Yukarıda üretilen aşı üzerinde, pH belirleme, sterilite testi, etkin transformasyon testi (örneğin, doğal olmayan amino asit mevcut olmadığında bölme ve ölümü teyit etme), anormal toksisite incelemesi, hacim ölçümü, in vitro güç belirleme, endotoksin testi, özdeşlik testi, protein azot içeriği tahmini, ve etkinlik, güvenlik ve gücünü garanti etmek için stabilizatör içeriği ve formaldehit içeriği belirlemesi gibi, kabul edilen standart usullere dayanan başka çeşitli testler yürütüldü.

Yukarıda üretilen SIPV'nin in vitro gücü, Sandviç ELISA kullanılarak belirlendi. Bunun için de polio virüse karşı farklı türlerde geliştirilen iki birincil antikor kullanılmış olup, ikinci birincil antikorda yine HRP ile eşlenik ikinci bir antikor kullanılır. Sonuçlar, referans standartla karşılaştırılarak analiz edildi.

Aşı için özdeşlik testi, direkt ELISA kullanılarak yürütüldü. 96 hazneli ELISA plakaları antijenle kaplandı ve aşıda her üç tip polio virüsün mevcudiyetinin belirlenmesi için tipe özgü anti polio serumu kullanıldı.

DİZİ LİSTESİ

<110> Tian, Feng Hehli, Brad

<120> Doğal Olmayan Amino Asit Replikasyonuna Bağımlı Mikroorganizmalar Ve Aşılar

<130> AMBX-0157.00PCT

5 <150> 61/100,688

<151> 2008-09-26

<160> 35

<170> PatentIn versiyonu 3.4

<210> 1

10 <211> 77

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Methanococcus jannaschii tRNA'dan türetilen mutant tRNA

15 <400> 1

ccgggggtag ttcaagcaggg cagaacgggg gactctaaat ccgcctgggg ccggttccaa 60

tccggccggc ccgacaa 77

<210> 2

<211> 77

<212> DNA

20 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Methanococcus jannaschii tRNA'dan türetilen mutant tRNA

<400> 2

ccgggggtag ttcaagcaggg cagaacgggg gactctaaat ccgcctgggg ctgggtccaa 60

tccggccggc ccgacaa 77

<210> 3

<211> 77

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> Methanococcus jannaschii tRNA'dan türetilen mutant tRNA

<400> 3

```
ccggaggglag tttaaggaggg cagaacgggg gactctcaat ccgaatggg cagggtcaaa      60
tactggggg cggacaa                                     77
```

<210> 4

10 <211> 921

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Methanococcus jannaschii sentetazdan türetilen mutant sentetaz

15 <400> 4

atggaggaat ttgaaatgat aaagagaaac acatctgaaa :tatcagoga ggaagaglla 60
 agagaggttt taaaaaaga tgaaaaatct gctgttatag gttttgaacc aagtggtaaa 120
 atacatttag ggcattatct ccaataaaaa aagatgattg atttacaaaa tgcctggattt 180
 gatataatca tatatttggc tgatttacac gctattttaa accagaaagg agagtnggat 240
 gagattagaa aaataggaga ttataacaaa aaagtttttg aagcaatggg gttaaaggca 300
 aaataigtct atggaagtga acatggctct gataaggatt atacactgaa tctctataga 360
 ttggctttta aaactacctt aaaaagagca agaaggagta tggaaactat agcaagagag 420
 gatgaaaatc caaaggttgc tgaagttatc tatccaataa tgcaggttaa tgggattcat 480
 tatgaggggg atgatgttgc agttggaggg atggagcaga gaaaaataca catgttagca 540
 agggagctct taccaaaaaa agttctttct attcacaacc ctgtcttaac aggttttgat 600
 ggagaaggaa agatgagltc ttcaaaaggg aattttatag ctgttgatga ctctccagaa 660
 gagattaggg ctaagataaa gaaagcatac tgcacagctg gagttgttga aggaaatcca 720
 ataattgaga tagctaaata ctctcttgaa tatcctttta ccaataaaaag gccagaaaaa 780
 ttnggtggag atttgacagt taatagctat gaggagttag agagtttalt taaaaataag 840
 gaattgcac ccaatggattt aaaaaatgct gtagctgaag aacttataaa gatttttagag 900
 ccaattagaa aqacattata a 921

<210> 5

<211> 306

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Methanococcus jannaschii sentetazdan türetilen mutant sentetaz

<400> 5

Met Asp Glu Phe Glu Met Ile Lys Arg Asn Thr Ser Glu Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Leu Arg Glu Val Leu Lys Lys Asp Glu Lys Ser Ala Val
 20 25 30

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln

35						40						45			
Ile	Lys	Lys	Met	Ile	Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	Ile
50						55					60				
Tyr	Leu	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Glu	Leu	Asp
65					70					75				80	
Glu	Ile	Arg	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Lys	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Met
				85					90					95	
Gly	Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Val	Tyr	Gly	Ser	Glu	His	Gly	Leu	Asp	Lys
			100					105					110		
Asp	Tyr	Thr	Leu	Asn	Val	Tyr	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys
		115					120					125			
Arg	Ala	Arg	Arg	Ser	Met	Glu	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu	Asp	Glu	Asn	Pro
130						135					140				
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ile	Tyr	Pro	Ile	Met	Gln	Val	Asn	Gly	Ile	His
145					150					155					160
Tyr	Glu	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Gly	Met	Glu	Gln	Arg	Lys	Ile
			165					170						175	
His	Met	Leu	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Lys	Val	Val	Cys	Ile	His
			180					185					190		
Asn	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Glu	Gly	Lys	Met	Ser	Ser	Ser
		195					200					205			
Lys	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Ala
210						215					220				
Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Tyr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Gly	Asn	Pro
225					230					235					240
Ile	Met	Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Phe	Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
				245					250					255	
Arg	Pro	Glu	Lys	Phe	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Ser	Tyr	Glu	Glu
			260				265						270		
Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Met	Asp	Leu	Lys
275							280					285			

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 6

<211> 88

5 <212> DNA

<213> Halobacterium sp. NRC-1

<400> 6

ccagggtag ccaagctcgg ccaacggcga cggactctaa atccgtctct gtaggagttc 60
 qagggttcaa atcccttccc tggaccaa 88

<210> 7

10 <211> 88

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Bir opal kodonu tanıyan ortogonal tRNA

15 <400> 7

qggggggttg ccgagccttg ccaagggcgc cggacttcaa atccggtccc gtaggggttc 60
 cggggttcaa atcccgcgcc ccgcacaa 88

<210> 8

<211> 77

<212> DNA

20 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 8

cggcggggtag ttcaagcaggg cagaacggcg gactctaaat ccgcataggcg ctgggtcaaa 60
 tccggcccgcc cggaccc 77

<210> 9

<211> 65

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sentetik oligonükleotit primer

<400> 9

gtaacgctga attcccgggcg gtagttcagc agggcagaac ggccggactct aaatccgcct 60
 agcgcc 65

10 <210> 10

<211> 67

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> Sentetik oligonükleotit primer

<400> 10

gactcgcaagt ggtccggccc gcccgaatttc aaccggccgc atgcggattt agagtcggcc 60
 gttctgc 67

<210> 11

<211> 67

20 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sentetik oligonükleotit primer

<400> 11

```
gattctgcaat ggtagggggg gctggatttg aaccagcgcc atggggattt agagtcggcc 60
gttctgc 67
```

<210> 12

5 <211> 67

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sentetik oligonükleotit primer

10 <400> 12

```
gattctgcaat ggtagggggg gctggatttg aaccagcgcc atggggattt agagtcggcc 60
gttctgc 67
```

<210> 13

<211> 49

<212> DNA

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sentetik oligonükleotit primer

<400> 13

```
cgccggacca ctgcagatcc ttagcgaaag ctaaggattt ttttaagc 49
```

20 <210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sentetik oligonükleotit primer

<400> 14

caaattcgtc catatgggat tcc 23

5 <210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> Sentetik oligonükleotit primer

<400> 15

gtaacgctga attccccggcg 20

<210> 16

<211> 600

15 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

atggggccacc accaccacca ccacttccca accattccct tatccagggt ttltgacaac      60
gatatgctcc ggcgccatcg tatgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagtttgaa      120
gaagcctaga tcccaaaqga acagaagtat tcattccctgc agaaccacca gacctccctc      180
tgtttctcag agtctattcc gacacctcc aacagggagg aaacacaaca gaaatccaac      240
ctagagctgc tcgcctctc cctgctgctc atccagtctg ggtggagcc cgtgcagttc      300
ctcaggagtg tcttggccaa cagcctgggt tacggcgct ctgacagcaa cgtctatgac      360
ctcctaaagg acctagagga aggcattcaa agctgatgg ggaggctgga agatggcagc      420
ccccggaactg ggcagatctt caagcagacc tacagcaagt tcgacacaaa ctacacaaac      480
gatgagccac tactcaagaa ctaagggtc ctctactgct tcaggaagga catggacaag      540
ctcagagacat tcttgcgcct cgtgcagtc cgtctctgtg agggcagctg tggcttctaa      600

```

<210> 17

<211> 306

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> Methanococcus jannaschii sentetazdan türetilen mutant sentetaz

<400> 17

Met	Asp	Glu	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Arg	Asn	Thr	Ser	Glu	Ile	Ile	Ser
1				5					10					15	

Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Lys	Ser	Ala	Val
			20					25					30		

Ile Gly Phe Glu Pro Ser Gly Lys Ile His Leu Gly His Tyr Leu Gln
 25 40 45

Ile Lys Lys Met Ile Asp Leu Gln Asn Ala Gly Phe Asp Ile Ile Ile
 50 55 60

Tyr Leu Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu Asn Gln Lys Gly Glu Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Lys Ile Gly Asp Tyr Asn Lys Lys Val Phe Glu Ala Met
 85 90 95

Gly Leu Lys Ala Lys Tyr Val Tyr Gly Ser Glu His Gly Leu Asp Lys
 100 105 110

Asp Tyr Thr Leu Asn Val Tyr Arg Leu Ala Leu Lys Thr Thr Leu Lys
 115 120 125

Arg Ala Arg Arg Ser Met Glu Leu Ile Ala Arg Glu Asp Glu Asn Pro
 130 135 140

Lys Val Ala Glu Val Ile Tyr Pro Ile Met Glu Val Asn Gly Ile His
 145 150 155 160

Tyr Glu Gly Val Asp Val Ala Val Gly Gly Met Glu Glu Arg Lys Ile
 165 170 175

His Met Leu Ala Arg Glu Leu Leu Pro Lys Lys Val Val Cys Ile His
 180 185 190

Asn Pro Val Leu Thr Gly Leu Asp Gly Glu Gly Lys Met Ser Ser Ser
 195 200 205

Lys Gly Asn Phe Ile Ala Val Asp Asp Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala
 210 215 220

Lys Ile Lys Lys Ala Tyr Cys Pro Ala Gly Val Val Glu Gly Asn Pro
 225 230 235 240

Ile Met Glu Ile Ala Lys Tyr Phe Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Ile Lys
 245 250 255

Arg Pro Glu Lys Phe Gly Gly Asp Leu Thr Val Asn Ser Tyr Glu Glu
 260 265 270

Leu Glu Ser Leu Phe Lys Asn Lys Glu Leu His Pro Met Arg Leu Lys
 275 280 285

Asn Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Ile Leu Glu Pro Ile Arg Lys
 290 295 300

Arg Leu
 305

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

5 <213> Yapay

<220>

<223> Y31 Primer 1

<400> 18

gtattaccct gttatcccta tggcgaaatt cagaatgatt etc 43

10 <210> 19

<211> 39

<212> DNA

<213> Yapay

<220>

15 <223> Y31 Primer 2

<400> 19

cagaaaccgc gtgtgtgtcc taaacaatgt aatcattac 39

<210> 20

<211> 39

20 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

	<223> Y31 Primer 3	
	<400> 20	
	gtaatgatta cattgtttag gaacaacacg cggtttctg	39
	<210> 21	
5	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Yapay	
	<220>	
	<223> Y31 Primer 4	
10	<400> 21	
	gagagcgggtg ttgcgtact g	21
	<210> 22	
	<211> 44	
	<212> DNA	
15	<213> Yapay	
	<220>	
	<223> Y31 Primer 5	
	<400> 22	
	attacctgt tatccctaga cgctcagtgg aacgaaaact cacg	44
20	<210> 23	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Yapay	
	<220>	
25	<223> Y31 Primer 6	
	<400> 23	

	tagggataac agggtataac aatttcaggt g	31
	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> DNA	
5	<213> Yapay	
	<220>	
	<223> Y31 Primer 7	
	<400> 24	
	ggtcagcttg tcgaaagtac cg	22
10	<210> 25	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Yapay	
	<220>	
15	<223> Y31 Primer 8	
	<400> 25	
	ctacgggtcg atcatctcca gctagggata acagggtaat	40
	<210> 26	
	<211> 43	
20	<212> DNA	
	<213> Yapay	
	<220>	
	<223> N51 Primer 1	
	<400> 26	
25	gtattaccct gttatcccta tggcgaaatt cagaatgatt etc	43
	<210> 27	

- <211> 34
- <212> DNA
- <213> Yapay
- <220>
- 5 <223> N51 Primer 2
- <400> 27
- gattacattg ttaggaaca acacgcggtt tctg 34
- <210> 28
- <211> 34
- 10 <212> DNA
- <213> Yapay
- <220>
- <223> N51 Primer 3
- <400> 28
- 15 cagaaaccgc gtgtgttcc taaacaatgt aatc 34
- <210> 29
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Yapay
- 20 <220>
- <223> N51 Primer 4
- <400> 29
- gagagcgggtg ttgcgtact g 21
- <210> 30
- 25 <211> 44
- <212> DNA

	<213> Yapay	
	<220>	
	<223> N51 Primer 5	
	<400> 30	
5	attaccctgt tatccctaga cgctcagtg aacgaaaact cacg	44
	<210> 31	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Yapay	
10	<220>	
	<223> N51 Primer 6	
	<400> 31	
	tagggataac agggtataac aatttcaggt g	31
	<210> 32	
15	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Yapay	
	<220>	
	<223> N51 Primer 7	
20	<400> 32	
	ggtcagcttg tcgaaagtac cg	22
	<210> 33	
	<211> 33	
	<212> DNA	
25	<213> Yapay	
	<220>	

<223> N51 Primer 8

<400> 33

ctaaacaatg taatctaggg ataacagggt aat 33

<210> 34

5 <211> 795

<212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> MAP Y31 Amber Mutant A12

10 <400> 34

```

atgggtatct caatcaagac cccagaagat atcgaaaaaa tgggggtcgc tggccgactg      60
gtctgcgaag tgcctggagat gatcgaaacc taggttaaac cggggcgtcag caccggcgag      120
ccggatcgca tctctaatga ttacattgtt aatgaacaac acgcggtttc tgcctgcctc      180
ggcatcacg gcataccgaa atccgtttgc atctctatca atgaagtggc gtgcacgggt      240
atcccggaag atgctaagct gctgaaagat ggcgatatcg ttaacattga tgtcacgta      300
atcaaaqatg gttccacgg ccatacctcg aaaaatctta tcttcggtaa cccgaccatc      360
atggggcgaac gtcctgtcgc catcacgcaa gaaagccctg acctggcgct accgacggta      420
aaaccaggca ttaattctgc cgaattcggt gggcgcttcc agaaatttgt cgaagcagaa      480
ggcttctcgc tgcctcgtga atattcgcca cactgtattg gtgcgggctt ccataaagaa      540
ccgcgggtgc tgcactatga ctcccgctga accaacgtcg tactgaaacc tgggatgaag      600
ttcaccaatg agccaatagt caacgcgggt aaaaaagaga tcgcaccat caaaqatgcc      660
tggagcgtaa aaaccaaaga tcgcagcttc tctgcacaat atgaacatac tatttctgtg      720
actgataaag gctgcgaaat tctgacgcta cgcaggatg acaccatccc ggcgataatc      780
tcgcacgaag aataa                                     795

```

<210> 35

<211> 795

<212> DNA

15 <213> Yapay

<220>

<223> MAP N51 Amber Mutant D2

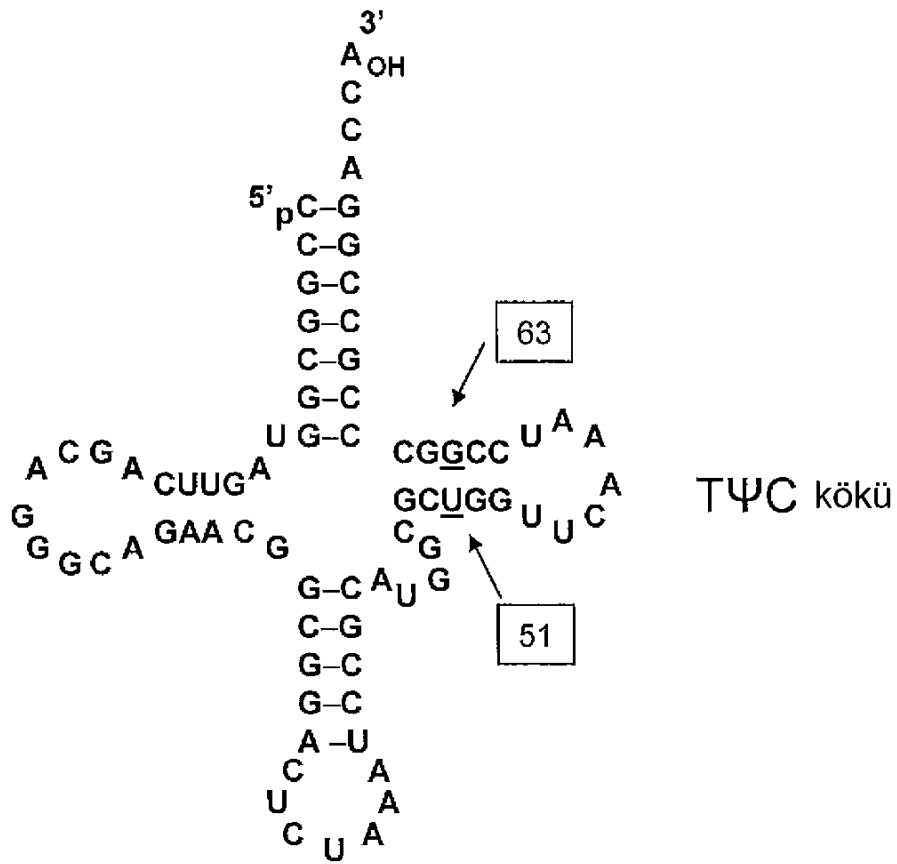
<400> 35

```

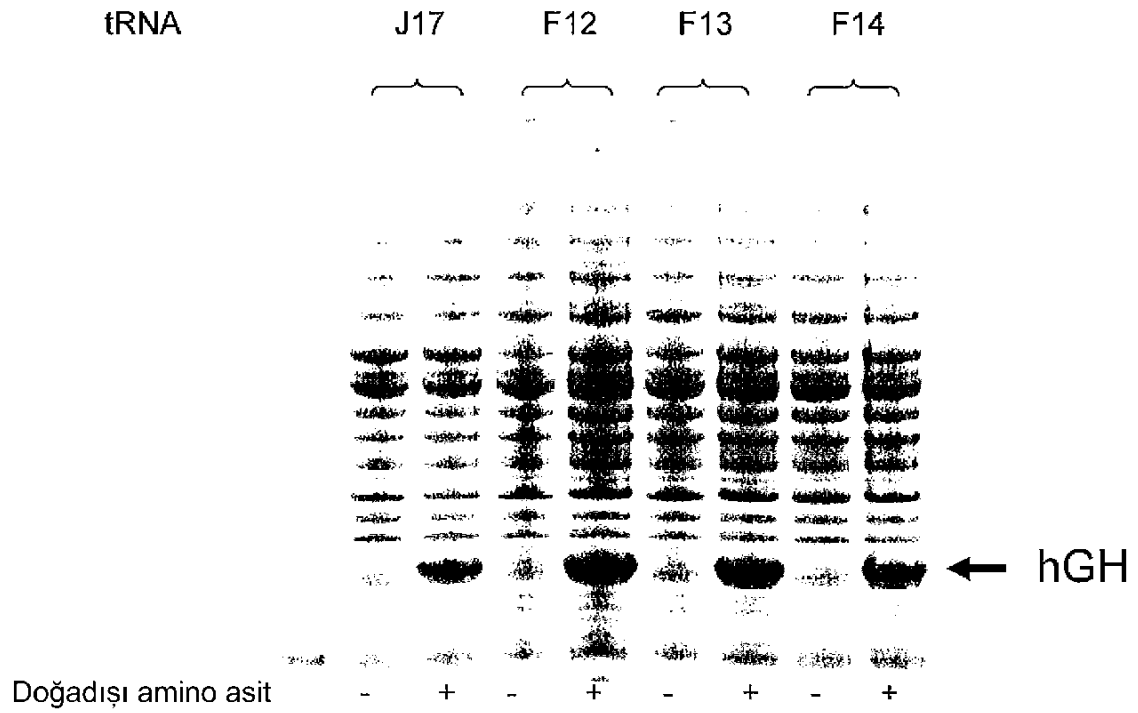
atggctatct caatcaagac cccagaagat atcgaaaaa tgcgcgtcgc tggcgcactg      60
gtcgcgcgaag tgcctggagat gatcgaaacg tatgttaaac cgggcgcacg cacgcgcgag      120
ctggatcgca ttgttaatga ttacattgtt taggaacaaat agcgggtttc tgcctgcctc      180
ggctatcaccg gctatccgaa atccgttttc atctctatta atgaagtggc gtgcacgggt      240
atcccggaacg atgctaagct gctgaaagat ggcgatatcg ttaacattga tctcaccgta      300
atcaagatg gttccacgg cgataccctc aaaatgttta tgcctcgtaa gccgaccatc      360
atggcggaac gtctgtgcgc catcaccgaa gaaagcctgt acctggcgtt acgcatggta      420
aaaccaggca ttaattctgc tgaattcggt gcgcgcattc agaaatttgt cgaagcagaa      480
ggcttctccg tgcctgtga atattcgga caccgtattg gtgcgcgctt ccattgaagaa      540
ccgcaggctc tgcactatga ctcccgtaaa accaacgtcg tactgaaacc tgggatgaac      600
ttcaccatcg agccaatggt caacgcgggt aaaaaagaga ccgcaccat gaaagatggc      660
tggagggtaa aaaccaaaga tgcagcttg ttgcacaaat atgagcatal tatltgtgtg      720
actgataacg gctgcgaaat ttgacgcta cgcacgatac acaccatccc cgcgataatc      780
tcgcacgacg aataa

```

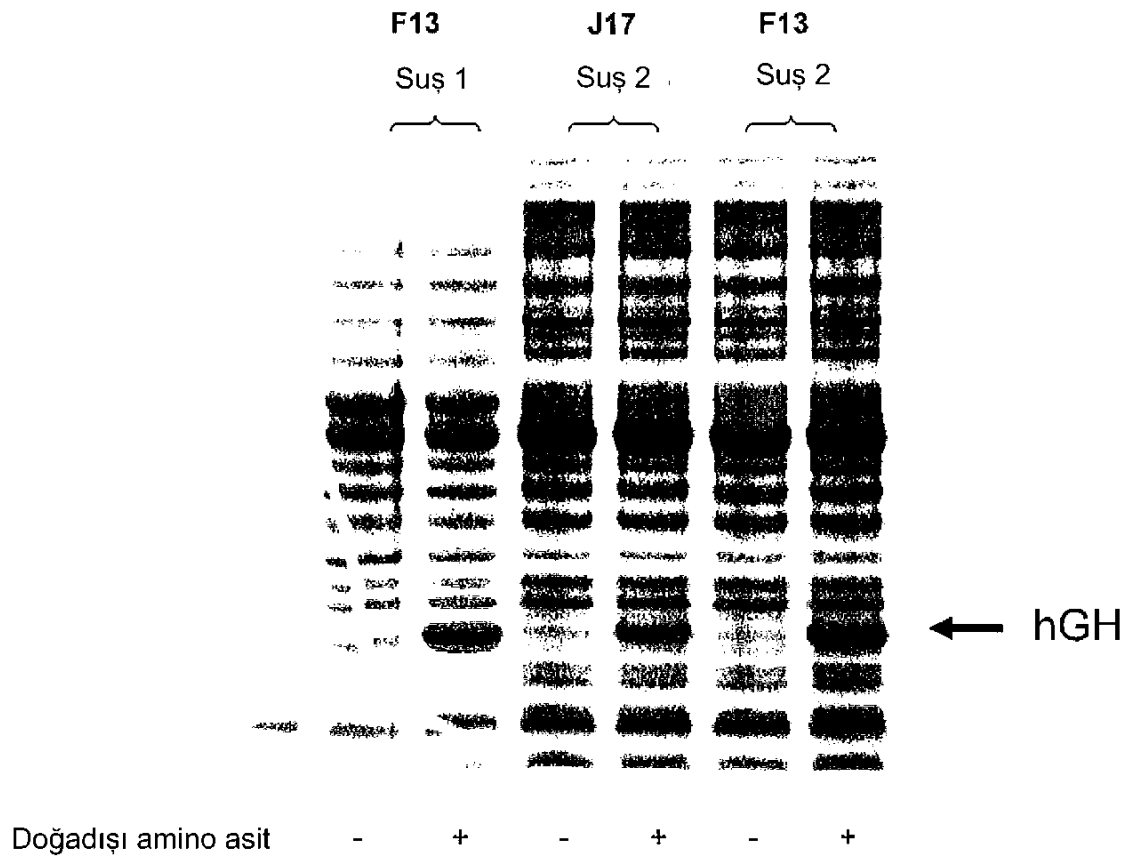
ŞEKİL 1



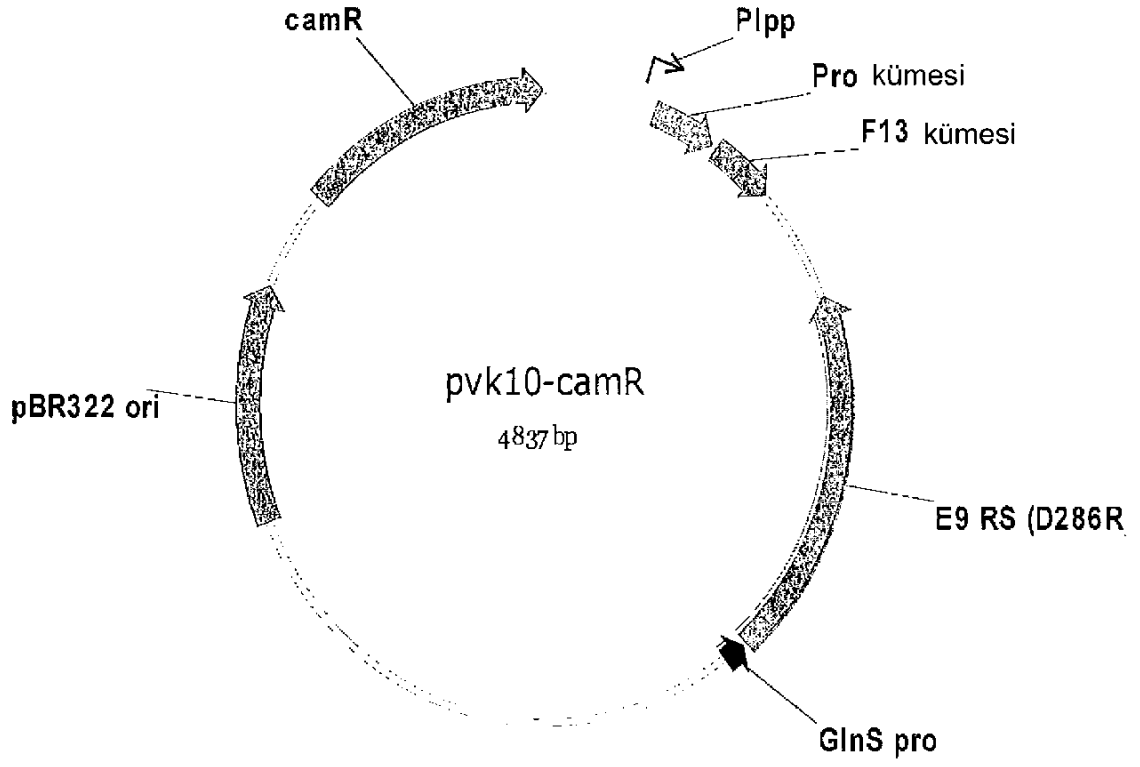
ŞEKİL 2



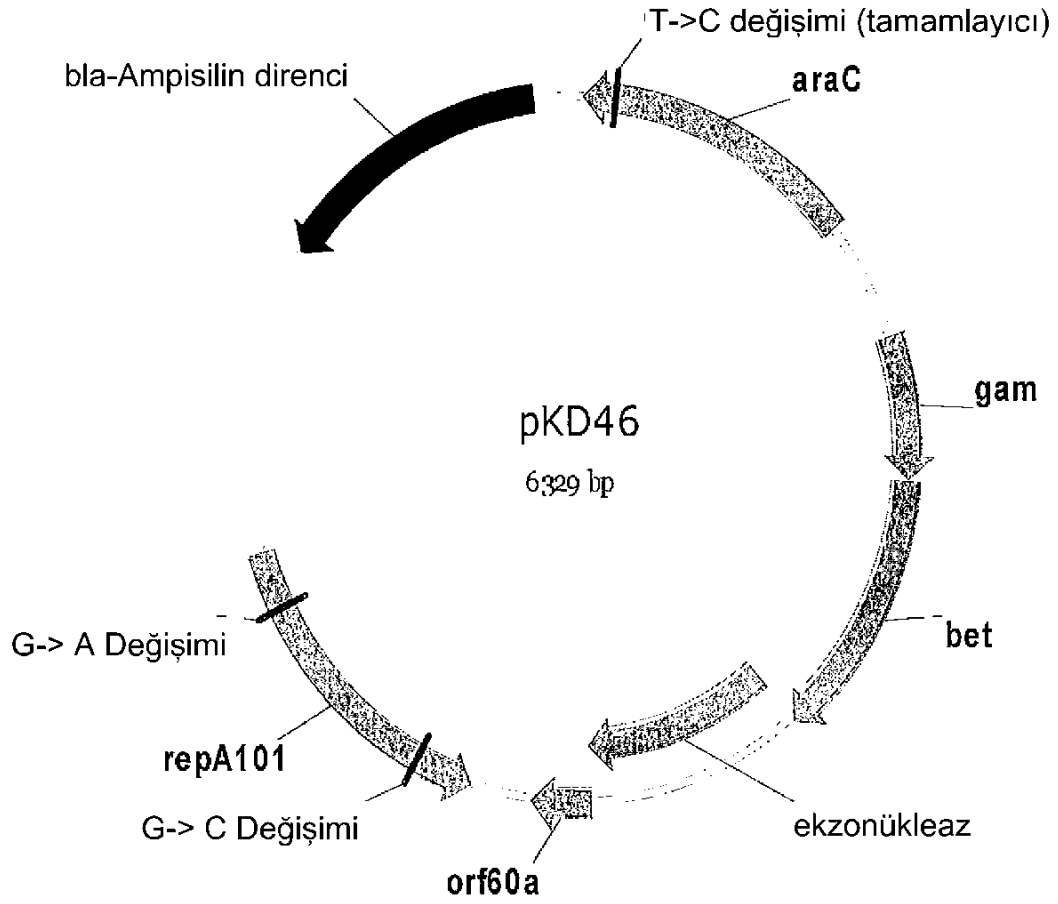
ŞEKİL 3



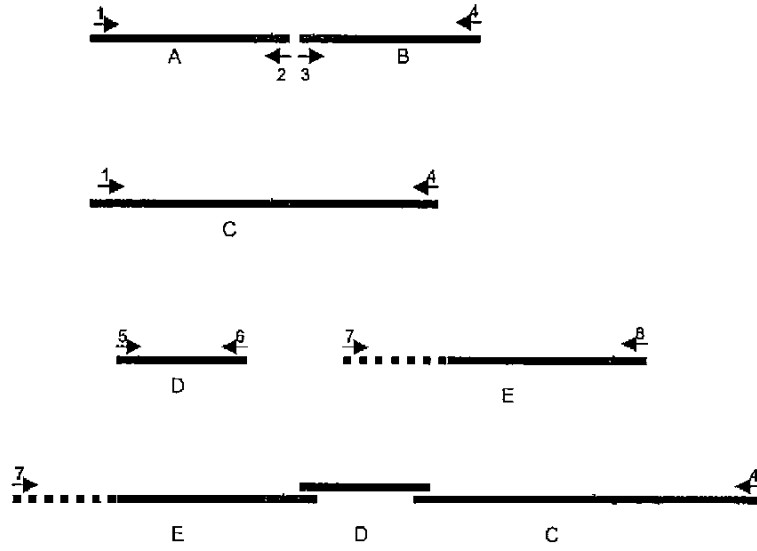
ŞEKİL 4



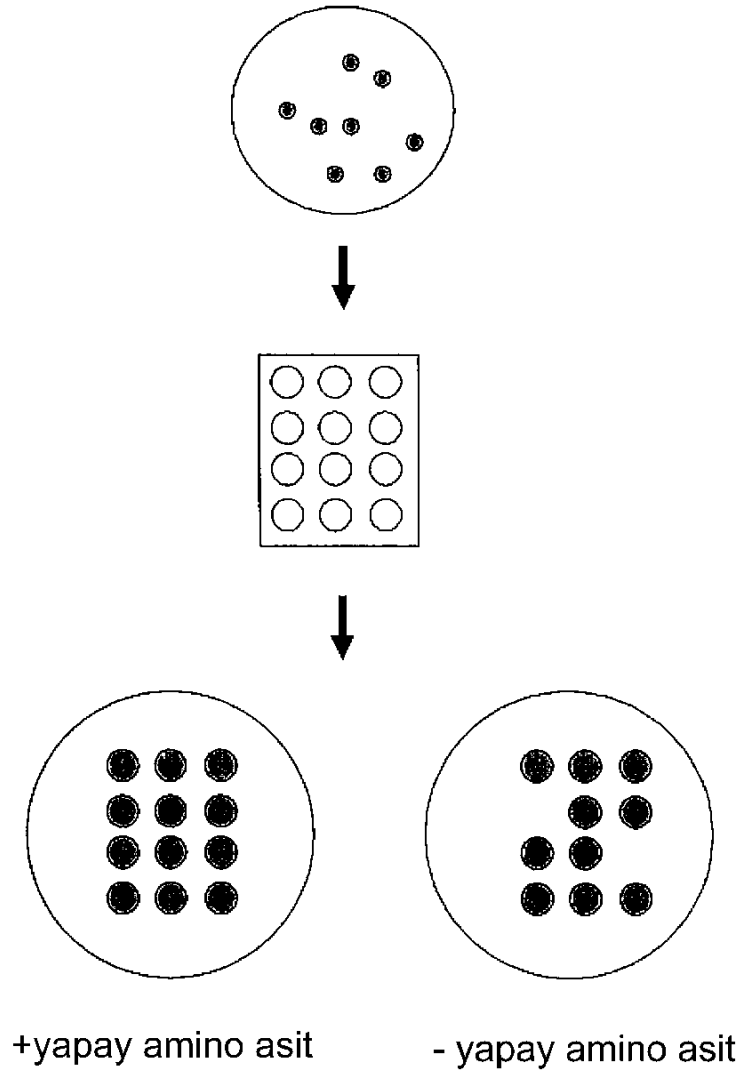
ŞEKİL 5



ŞEKİL 6

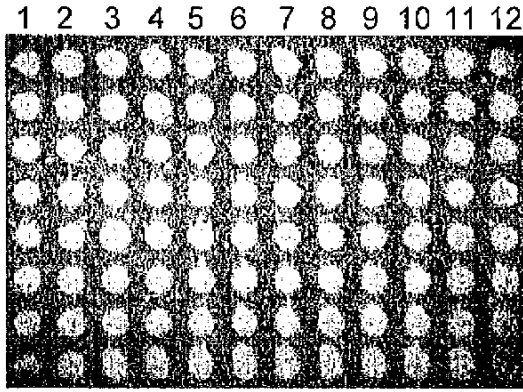


ŞEKİL 7



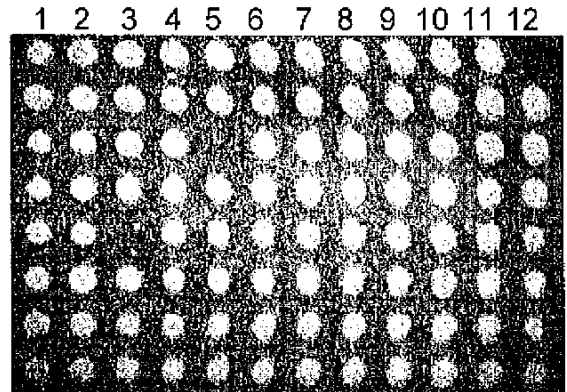
ŞEKİL 8

Y31 - 1. Tarama



Y31 MAP
LB agar
50ug/mL Amp
50ug/mL Kan
+ 2mM pAF

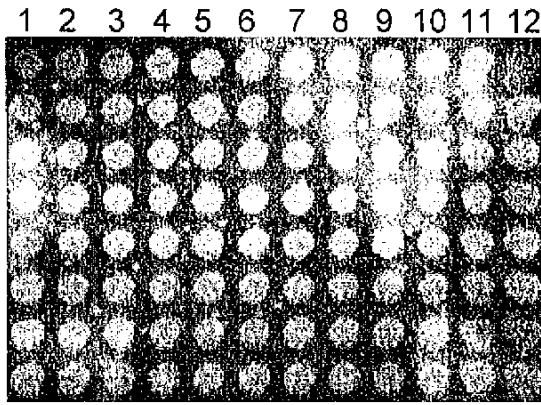
A
B
C
D
E
F
G
H



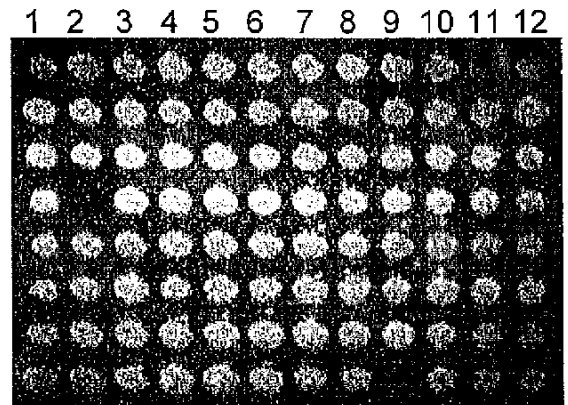
Y31 MAP
LB agar
50ug/mL Amp
50ug/mL Kan

ŞEKİL 9

N51 - 1. Tarama

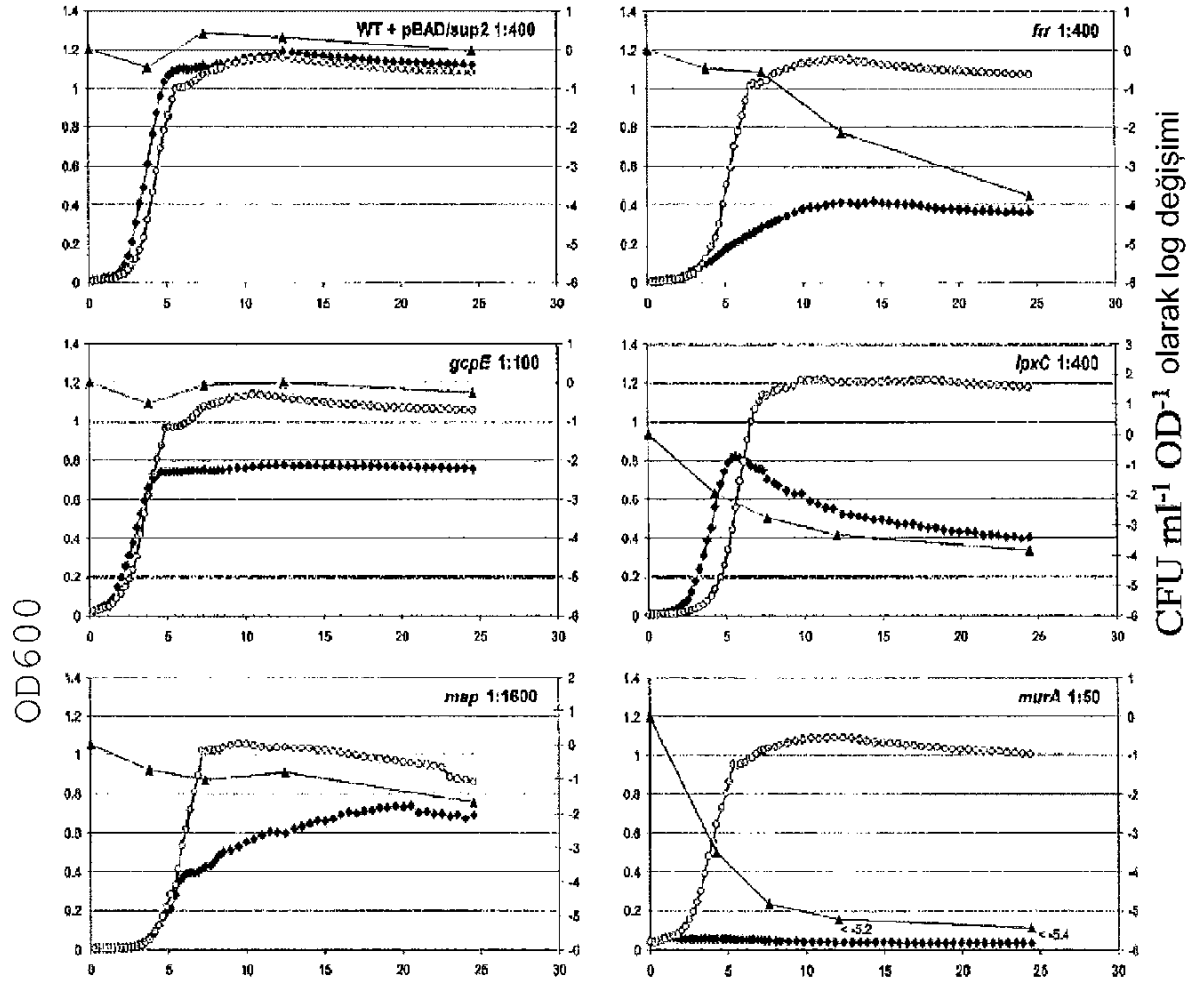


N51 MAP
LB agar
50ug/mL Amp
50ug/mL Kan
+ 2mM pAF

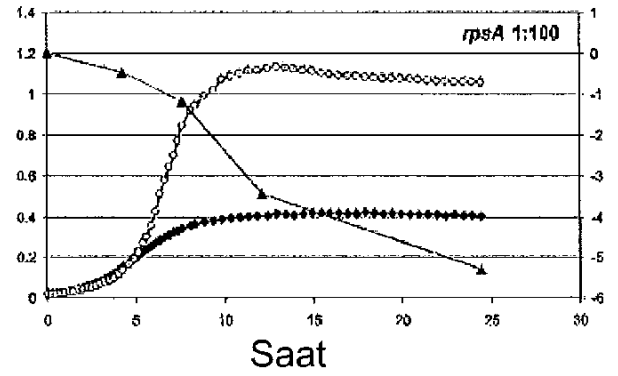
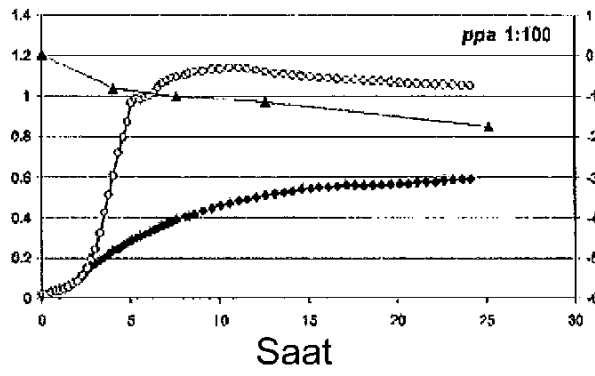


N51 MAP
LB agar
50ug/mL Amp
50ug/mL Kan

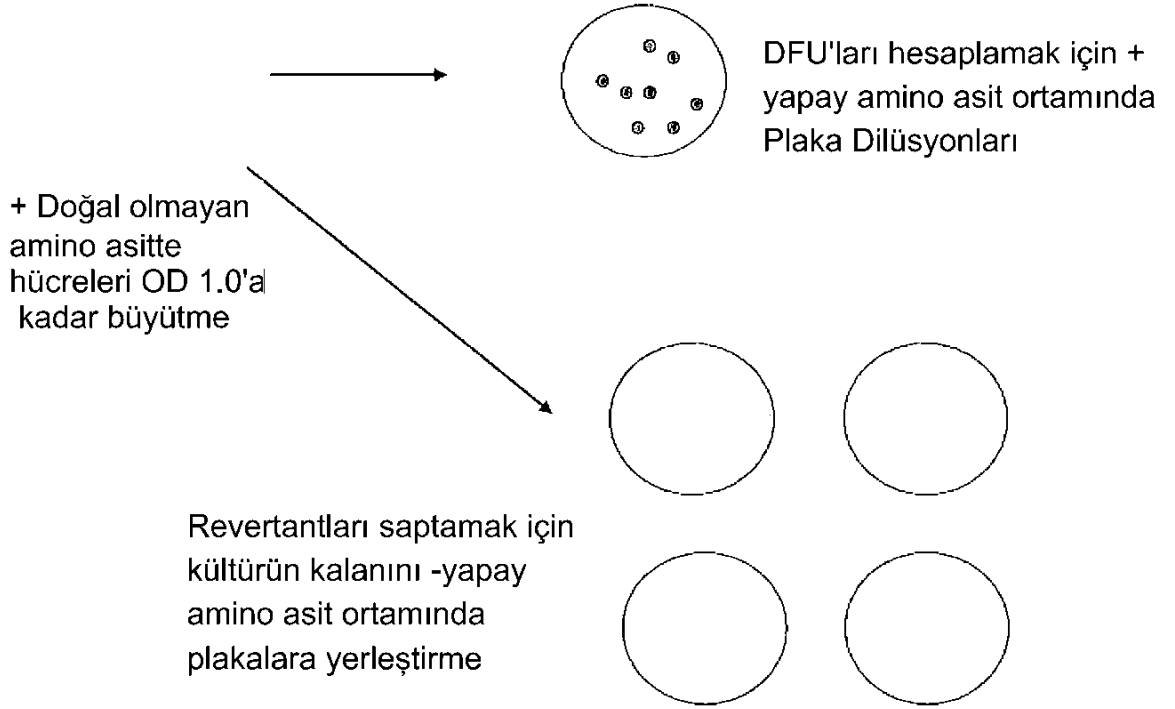
ŞEKİL 10A



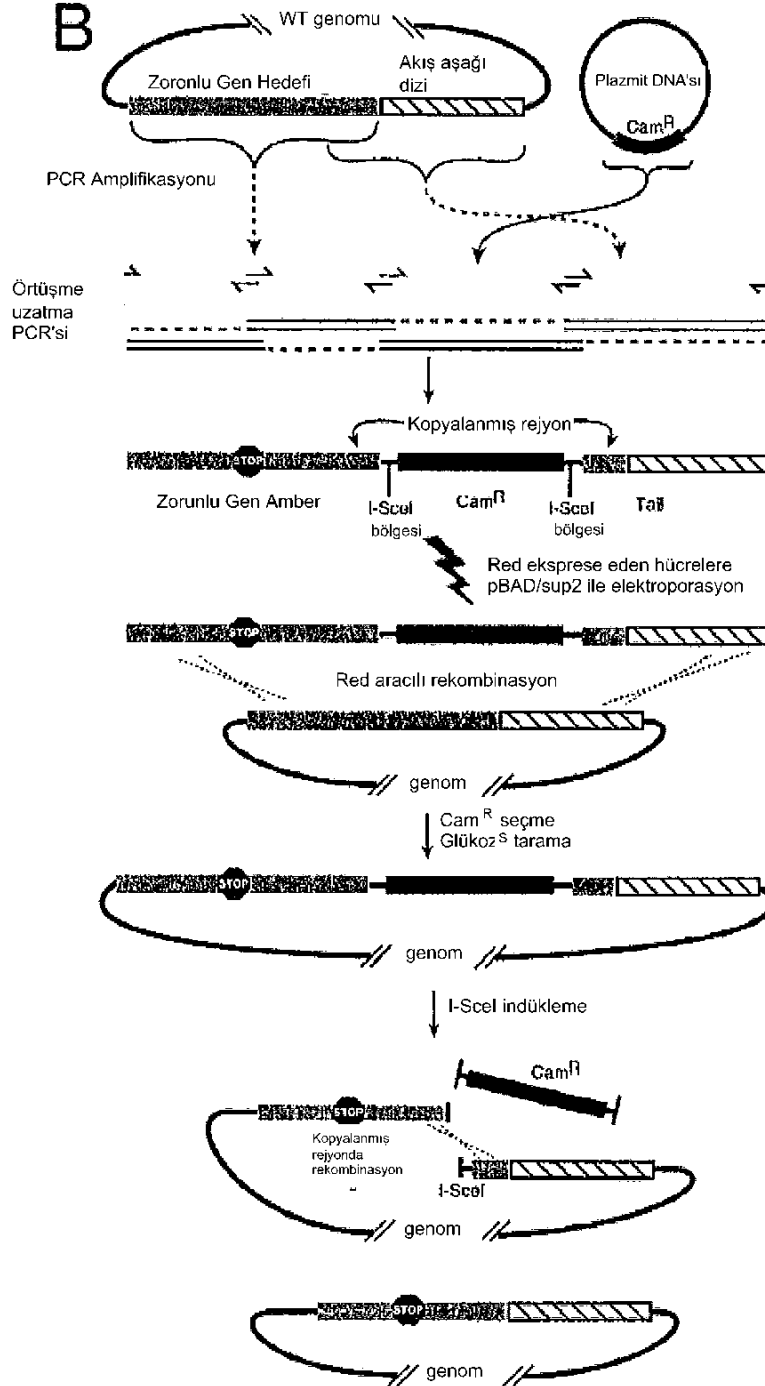
ŞEKİL 10B



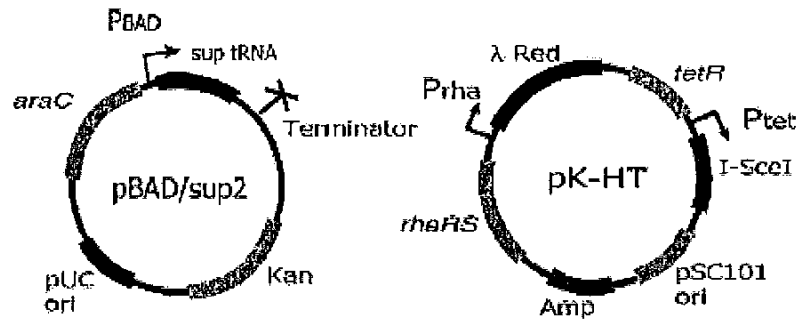
ŞEKİL 11



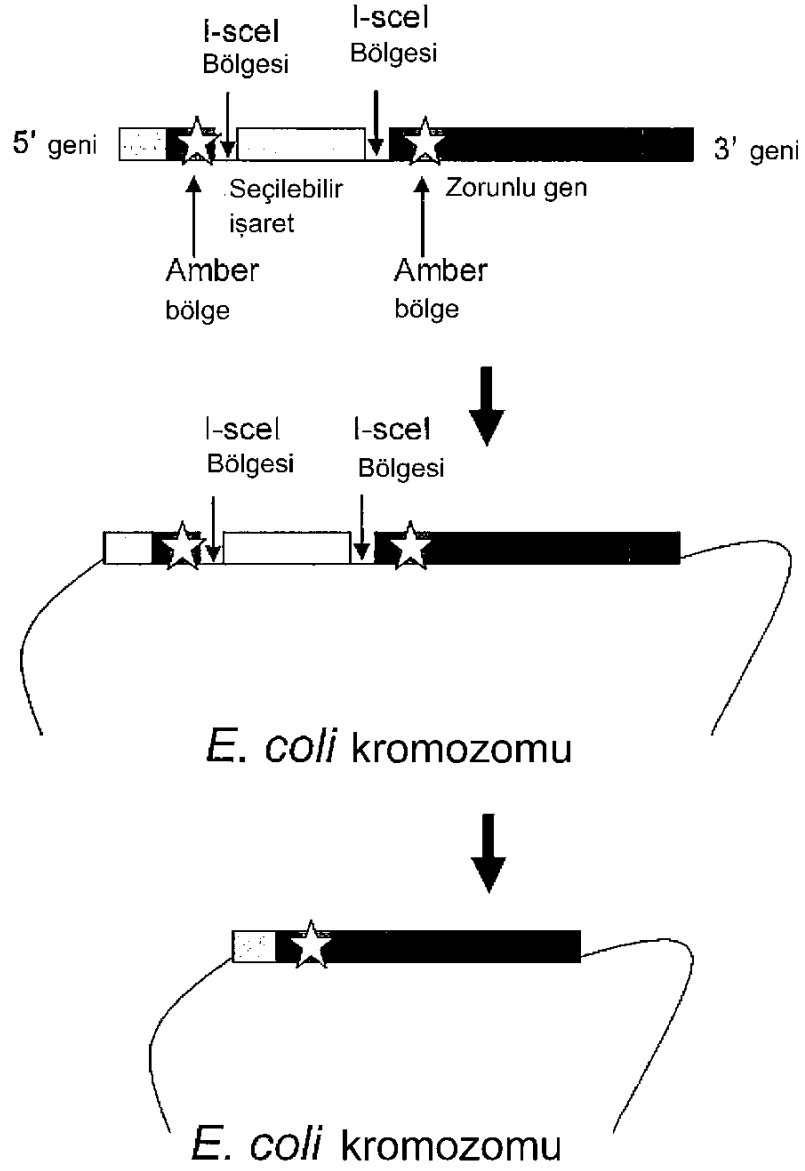
ŞEKİL 12



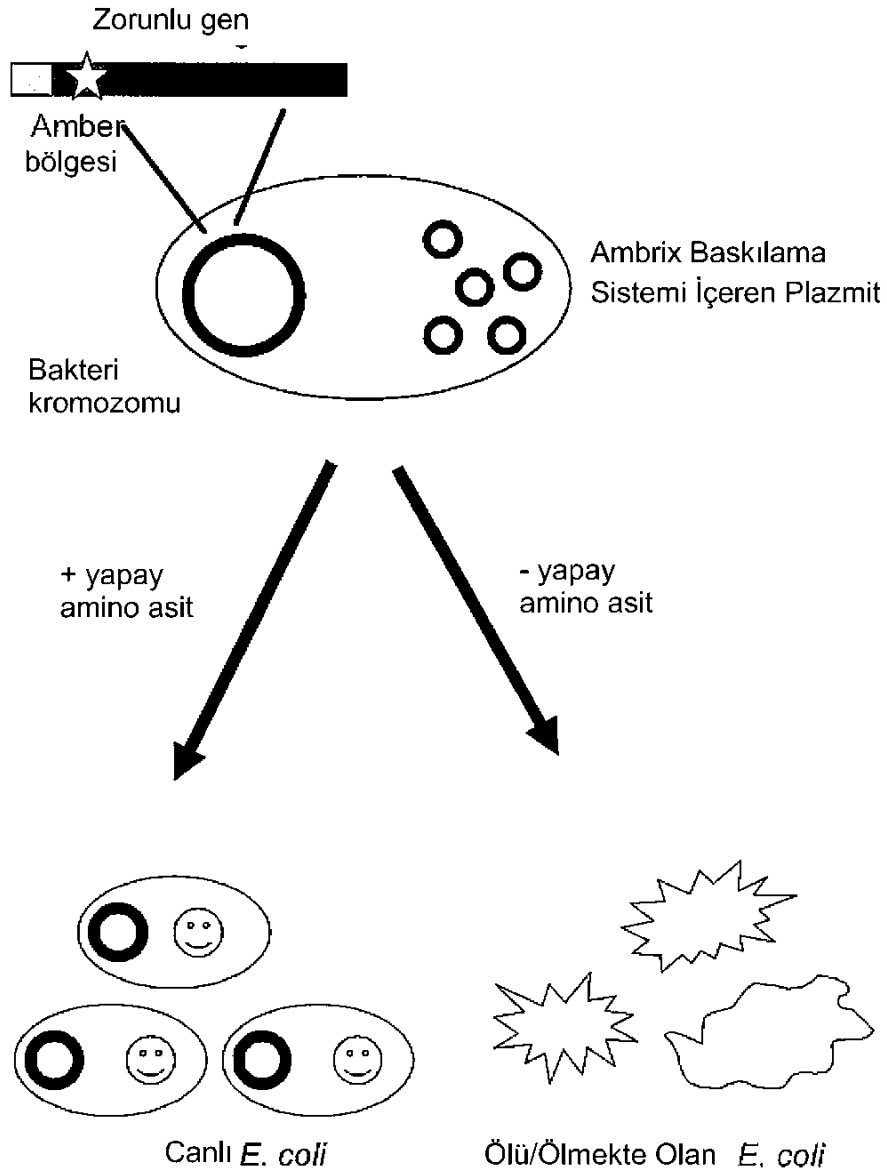
ŞEKİL 13



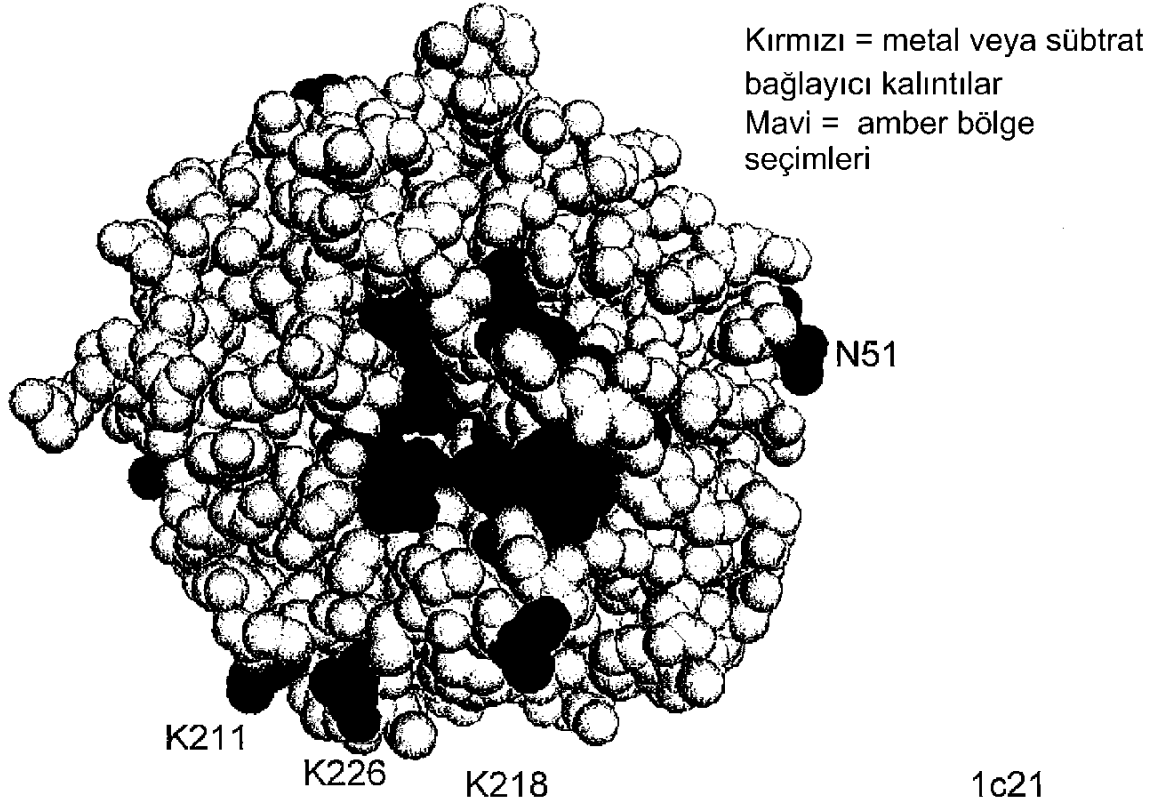
ŞEKİL 14



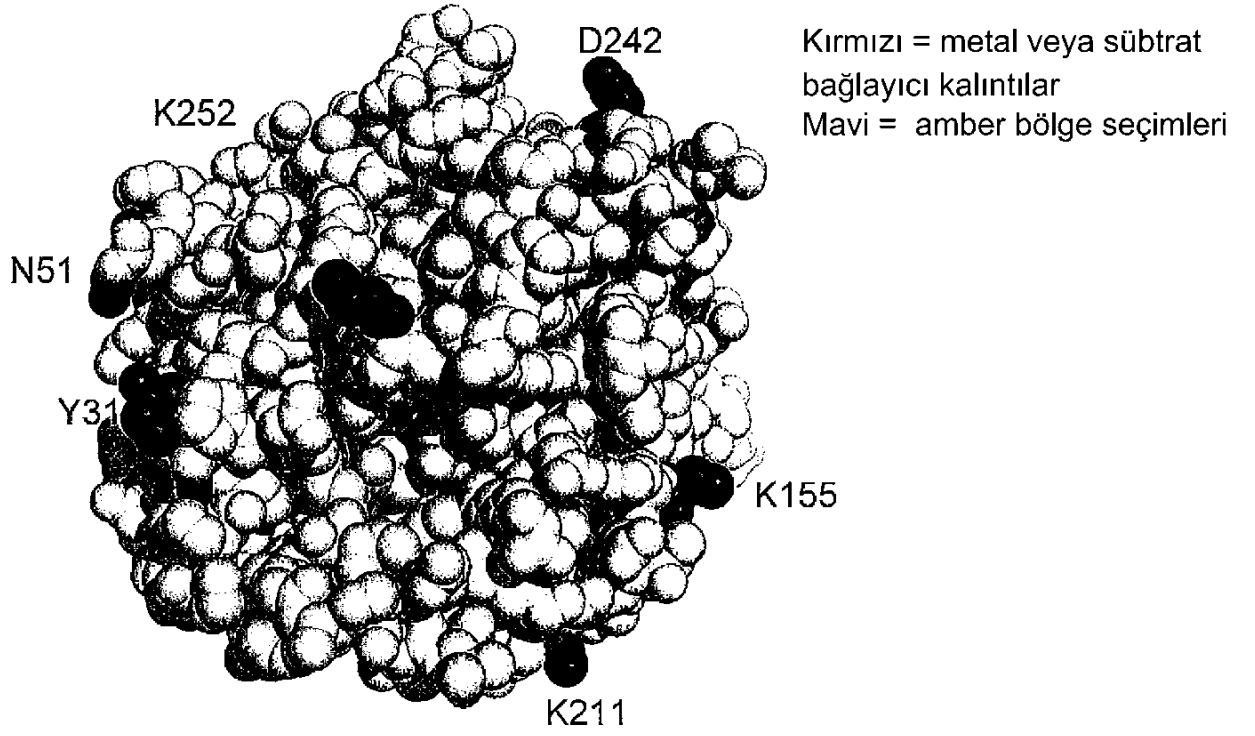
ŞEKİL 15



ŞEKİL 16



ŞEKİL 17



1c21