

ÖZET**PROTEİN EKSPRESYONU İÇİN
REKOMBİNANT BAKTERİYEL KONAKÇI HÜCRE**

Bu buluş aşağıdakileri içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücrelerine ilişkindir:
a.) D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135,
5 L136, G140, R144 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona
sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni ve b.) FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPID
gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese veya aşırı
eksprese edebilen bir gen, burada hücrenin Tsp protein aktivitesi bir yabancı tip hücreye göre
azalmıştır; hücreleri kullanma usulleri, hücrelerin proteinlerin, özellikle anti-FcRn antikorları
10 gibi antikorların ekspresyonunda kullanımı ve burada açıklanan usullerle yapılan proteinler de
açıklanmaktadır.

ÖZET**PROTEİN EKSPRESYONU İÇİN
REKOMBİNANT BAKTERİYEL KONAKÇI HÜCRE**

Bu buluş aşağıdakileri içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücrelerine ilişkindir:
a.) D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135,
5 L136, G140, R144 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona
sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni ve b.) FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPID
gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese veya aşırı
eksprese edebilen bir gen, burada hücrenin Tsp protein aktivitesi bir yabancı tip hücreye göre
azalmıştır; hücreleri kullanma usulleri, hücrelerin proteinlerin, özellikle anti-FcRn antikorları
10 gibi antikorların ekspresyonunda kullanımı ve burada açıklanan usullerle yapılan proteinler de
açıklanmaktadır.

İSTEMLER

1. Aşağıdakileri içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi:

a. D133, H145, H157, N31, R62, 170, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni ve

b. FkpA, Skp veya bir FkpA ve Skp kombinasyonu arasından seçilen, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese eden veya aşırı eksprese eden bir gen ihtiva eden bir ekspresyon vektörü,

burada hücrenin Tsp protein aktivitesi yabancı tip bir hücreye göre azalmıştır ve burada hücre DsbC'yi kodlayan bir rekombinant polinükleotit içermez ve burada bakteri hücresi mutasyondan geçmiş spr geni ve yabancı tip bir hücreye göre Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli modifikasyon dışında bir yabancı tip E. coli hücresine izojeniktir.

2. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni D133A, H145A, H157A, N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, V135D, V135G, L136P, G140C, R144C ve G147C arasından seçilen bir veya daha fazla mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

3. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni C94 ve H145A mutasyonlarına sahip bir spr proteinini kodlar.

4. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni D133A, H145A ve H157A arasından seçilen bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

5. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni C94A'dan seçilen bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

6. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada mutant spr geni hücrenin genomu içine entegre edilir.

7. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini kodlayan bir gen hücre içine geçici olarak transfekte edilir.

8. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada protein katlanmasını kolaylaştırabilen protein FkpA'dır.

9. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre ayrıca aşağıdaki mutasyondan geçmiş genlerin birini veya daha fazlasını içerir:

İSTEMLER

1. Aşağıdakileri içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi:

a. D133, H145, H157, N31, R62, 170, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni ve

b. FkpA, Skp veya bir FkpA ve Skp kombinasyonu arasından seçilen, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese eden veya aşırı eksprese eden bir gen ihtiva eden bir ekspresyon vektörü,

burada hücrenin Tsp protein aktivitesi yabani tip bir hücreye göre azalmıştır ve burada hücre DsbC'yi kodlayan bir rekombinant polinükleotit içermez ve burada bakteri hücresi mutasyondan geçmiş spr geni ve yabani tip bir hücreye göre Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli modifikasyon dışında bir yabani tip E. coli hücresine izojeniktir.

2. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni D133A, H145A, H157A, N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, V135D, V135G, L136P, G140C, R144C ve G147C arasından seçilen bir veya daha fazla mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

3. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni C94 ve H145A mutasyonlarına sahip bir spr proteinini kodlar.

4. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni D133A, H145A ve H157A arasından seçilen bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

5. İstem 1'e göre bir hücre olup, burada mutant spr geni C94A'dan seçilen bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

6. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada mutant spr geni hücrenin genomu içine entegre edilir.

7. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini kodlayan bir gen hücre içine geçici olarak transfekte edilir.

8. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada protein katlanmasını kolaylaştırabilen protein FkpA'dır.

9. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre ayrıca aşağıdaki mutasyondan geçmiş genlerin birini veya daha fazlasını içerir:

a. şaperon aktivitesine sahip ve proteaz aktivitesi azalmış bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni;

b. mutasyondan geçmiş bir ptr geni, burada mutasyondan geçmiş ptr geni, proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ptr genidir; ve

c. mutasyondan geçmiş bir OmpT geni, burada mutasyondan geçmiş OmpT geni proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan bir geçmiş OmpT genidir.

10. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre proteaz aktivitesi azalmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içerir veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp genidir.

11. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre, gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma kodonunun akış yukarısına yerleştirilmiş bir veya daha fazla durdurma kodonunda bir mutasyon içeren, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp genine sahiptir.

12. İstem 11'e göre bir hücre olup, burada işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş Tsp geni, gen başlatma kodonunda bir missens mutasyonla ve isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla başka nokta mutasyonuyla yaratılan bir kısıtlama markörü yeri içerir.

13. İstem 12'ye göre bir hücre olup, burada işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş Tsp geni DİZİ İD NO:3'ü içerir.

14. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre E. coli'dir.

15. İstem 14'e göre bir hücre olup, burada E. coli K12 veya W3110 suşudur.

16. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı arasından seçilen ilgilenilen bir proteini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerir.

17. İstem 16'ya uygun bir hücre olup, burada antikor veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı FcRn için spesifiktir.

18. İlgilenilen bir proteini üretmek için bir usul olup, istem 1 ila 17'nin herhangi birinde tanımlandığı gibi bir rekombinant gram negatif bakteri hücresinin, bir kültür ortamında,

ilgilenilen rekombinant proteini eksprese etmek için etkili koşullar altında kültürlenmesini ve

a. şaperon aktivitesine sahip ve proteaz aktivitesi azalmış bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni;

b. mutasyondan geçmiş bir ptr geni, burada mutasyondan geçmiş ptr geni, proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ptr genidir; ve

c. mutasyondan geçmiş bir OmpT geni, burada mutasyondan geçmiş OmpT geni proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan bir geçmiş OmpT genidir.

10. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre proteaz aktivitesi azalmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içerir veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp genidir.

11. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre, gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma kodonunun akış yukarısına yerleştirilmiş bir veya daha fazla durdurma kodonunda bir mutasyon içeren, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp genine sahiptir.

12. İstem 11'e göre bir hücre olup, burada işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş Tsp geni, gen başlatma kodonunda bir missens mutasyonla ve isteğe bağlı olarak bir veya daha fazla başka nokta mutasyonuyla yaratılan bir kısıtlama markörü yeri içerir.

13. İstem 12'ye göre bir hücre olup, burada işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş Tsp geni DİZİ İD NO:3'ü içerir.

14. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre E. coli'dir.

15. İstem 14'e göre bir hücre olup, burada E. coli K12 veya W3110 suşudur.

16. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre bir hücre olup, burada hücre bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanı arasından seçilen ilgilenilen bir proteini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerir.

17. İstem 16'ya uygun bir hücre olup, burada antikor veya bunun antijen bağlayıcı fragmanı FcRn için spesifiktir.

18. İlgilenilen bir proteini üretmek için bir usul olup, istem 1 ila 17'nin herhangi birinde tanımlandığı gibi bir rekombinant gram negatif bakteri hücresinin, bir kültür ortamında,

ilgilenilen rekombinant proteini eksprese etmek için etkili koşullar altında kültürlenmesini ve

ilgilenilen rekombinant proteinin rekombinant gram negatif bakteri hücresinin periplazmasından ve/veya kültür ortamından geri kazanılmasını içerir.

19. İstem 18'e göre bir usul olup, burada usul ayrıca ilgilenilen proteinin hücreden geri kazanılmasını içerir.

5 **20.** İstem 19'a göre bir usul olup, burada ilgilenilen protein periplazmadan ve/veya üst fazdan geri kazanılır.

ilgilenilen rekombinant proteinin rekombinant gram negatif bakteri hücresinin periplazmasından ve/veya kültür ortamından geri kazanılmasını içerir.

19. İstem 18'e göre bir usul olup, burada usul ayrıca ilgilenilen proteinin hücreden geri kazanılmasını içerir.

5 **20.** İstem 19'a göre bir usul olup, burada ilgilenilen protein periplazmadan ve/veya üst fazdan geri kazanılır.

TARİFNAME
PROTEİN EKSPRESYONU İÇİN
REKOMBİNANT BAKTERİYEL KONAKÇI HÜCRE

Açıklama

5 Buluş bir rekombinant bakteriyel konakçı suşa, özellikle *E. coli*'ye ilişkindir. Buluş aynı zamanda ilgilenilen bir proteini böyle bir hücrede üretmek için bir usule ilişkindir.

Buluşa Dair Bilinen Hususlar

10 *E. coli* gibi bakteri hücreleri rekombinant proteinler üretmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle, plazmitler vasıtasıyla gen eklemeye (insersiyon) izin veren konakçı hücreler olarak bakteri hücrelerinin çok yönlü yapısı nedeniyle, rekombinant proteinler üretmek için *E. coli* gibi bakteri hücrelerini kullanmanın birçok avantajı vardır. *E. coli* beşeri insülin de dâhil olmak üzere birçok rekombinant proteini üretmek için kullanılmıştır.

15 Rekombinant proteinleri üretmek için bakteri hücreleri kullanmanın birçok avantajı olmasına rağmen, proteaza duyarlı proteinler üretme güçlüğü de dâhil olmak üzere hâlâ önemli sınırlamalar vardır. Proteazlar *E. coli* periplazmasında ve sitoplazmasında yaşlı, hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerle ilişkili önemli bir rol oynarlar. Bakteriyel proteazlar, ilgilenilen rekombinant proteini ayrıştırma etkisi gösterirler, böylece genellikle aktif protein verimini önemli ölçüde azaltırlar.

20 Bir dizi bakteriyel proteaz tespit edilmiştir. *E. coli*'de Proteaz III (ptr), DegP, OmpT, Tsp, prlC, ptrA, ptrB, pepA-T, tsh, espc, eatA, clpP ve Ion da dâhil olmak üzere proteazlar tespit edilmiştir.

25 Tsp (Prc olarak da bilinir) 60kDa'lık bir periplazmik proteazdır. Bilinen ilk Tsp substratı Penisilin bağlayıcı protein-3'tü (PBP3) (Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli; Nagasawa H, Sakagami Y, Suzuki A, Suzuki H, Hara H, Hirota Y. J Bacteriol. 1989 Kasım; 171(11):5890-3 ve Cloning, mapping and characterization of the Escherichia coli Tsp gene which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3; Hara H, Yamamoto Y, Higashitani A, Suzuki H, Nishimura Y. J Bacteriol. 1991 Ağustos;173 (15):4799-813) ama
30 daha sonra Tsp'nin faj kuyruk proteinlerini de yarabildiği keşfedildi ve adı Kuyruğa Spesifik Proteaz (Tsp) olarak değiştirildi (Silber ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 89: 295-299

TARİFNAME
PROTEİN EKSPRESYONU İÇİN
REKOMBİNANT BAKTERİYEL KONAKÇI HÜCRE

Açıklama

5 Buluş bir rekombinant bakteriyel konakçı suşa, özellikle *E. coli*'ye ilişkindir. Buluş aynı zamanda ilgilenilen bir proteini böyle bir hücrede üretmek için bir usule ilişkindir.

Buluşa Dair Bilinen Hususlar

10 *E. coli* gibi bakteri hücreleri rekombinant proteinler üretmek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle, plazmitler vasıtasıyla gen eklemeye (insersiyon) izin veren konakçı hücreler olarak bakteri hücrelerinin çok yönlü yapısı nedeniyle, rekombinant proteinler üretmek için *E. coli* gibi bakteri hücrelerini kullanmanın birçok avantajı vardır. *E. coli* beşeri insülin de dâhil olmak üzere birçok rekombinant proteini üretmek için kullanılmıştır.

15 Rekombinant proteinleri üretmek için bakteri hücreleri kullanmanın birçok avantajı olmasına rağmen, proteaza duyarlı proteinler üretme güçlüğü de dâhil olmak üzere hâlâ önemli sınırlamalar vardır. Proteazlar *E. coli* periplazmasında ve sitoplazmasında yaşlı, hasarlı veya yanlış katlanmış proteinlerle ilişkili önemli bir rol oynarlar. Bakteriyel proteazlar, ilgilenilen rekombinant proteini ayrıştırma etkisi gösterirler, böylece genellikle aktif protein verimini önemli ölçüde azaltırlar.

20 Bir dizi bakteriyel proteaz tespit edilmiştir. *E. coli*'de Proteaz III (ptr), DegP, OmpT, Tsp, prlC, ptrA, ptrB, pepA-T, tsh, espc, eatA, clpP ve Ion da dâhil olmak üzere proteazlar tespit edilmiştir.

25 Tsp (Prc olarak da bilinir) 60kDa'lık bir periplazmik proteazdır. Bilinen ilk Tsp substratı Penisilin bağlayıcı protein-3'tü (PBP3) (Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of Escherichia coli; Nagasawa H, Sakagami Y, Suzuki A, Suzuki H, Hara H, Hirota Y. J Bacteriol. 1989 Kasım; 171(11):5890-3 ve Cloning, mapping and characterization of the Escherichia coli Tsp gene which is involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3; Hara H, Yamamoto Y, Higashitani A, Suzuki H, Nishimura Y. J Bacteriol. 1991 Ağustos;173 (15):4799-813) ama
30 daha sonra Tsp'nin faj kuyruk proteinlerini de yarabildiği keşfedildi ve adı Kuyruğa Spesifik Proteaz (Tsp) olarak değiştirildi (Silber ve diğerleri, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 89: 295-299

(1992)). Silber ve diğeri (Deletion of the *prc(tsp)* gene provides evidence for additional tail-specific proteolytic activity in *Escherichia coli* K-12; Silber, K.R., Sauer, R.T.; *Mol Gen Genet* 1994 242:237-240), mutasyonun *prc* geninin bir segmenti bir Kan^f markörü içeren bir fragmanla değiştirilerek yaratıldığı bir *prc* silinti (delesyon) suşunu (KS1000) açıklamaktadır.

- 5 Tsp (*prc*) aktivitesindeki azalma, ilgilenilen proteinlerin proteolizini azaltmak için istenir. Ancak, proteaz *prc*'den yoksun olan hücrelerin düşük ozmolaritede ısıya duyarlı büyüme gösterdiği tespit edildi. Hara ve diğeri ekstrasjenik süpresör (*spr*) mutasyonları içeren ısıya dayanıklı revertantları (ters evrim geçirenler) izole ettiler (Hara ve diğeri, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996)). *Spr* 18kDa'lık membrana bağlı bir periplazmik proteazdır ve *spr* substratları Tsp ve hücre bölünmesi sırasında hücre cidarı hidrolizinde rol oynayan dış
- 10 membrandaki peptidoglikanlardır. *spr* geni UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (*SPR_ECOLI*) olarak adlandırılmaktadır.

- Bir mutant *spr* geni içeren, proteaz eksikliği olan geliştirilmiş suşlar açıklanmıştır. Chen ve diğeri, genin akış yukarı ve akış aşağı bölgeleri amplifiye edilerek ve bunlar seçim
- 15 markörleri ve bir *sprW174R* mutasyonu içeren bir vektör üzerinde birbirine bağlanarak yaratılan, *prc* (*Tsp*) ve başka bir proteaz olan *DegP*'deki mutasyonların farklı kombinasyonlarını taşıyan *E. coli* suşlarının oluşturulmasını açıklamaktadırlar (High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (Δ *DegP* Δ *prc* *sprW174R*) host strain (Chen C, Snedecor B, Nishihara
- 20 JC, Joly JC, McFarland N, Andersen DC, Battersby JE, Champion KM. *Biotechnol Bioeng.* 5 Mart 2004;85(5):463-74). Δ *DegP*, Δ *prc* ve *sprW174R* mutasyonları kombinasyonunun en yüksek seviyelerde antikor hafif zinciri, antikor ağır zinciri ve F(ab')₂-LZ temin ettiği saptandı. EP1341899'da kromozomal *DegP*, ve *DegP* ve *Prc* proteazlarını kodlayan *prc* eksikliği olan ve *prc* mutantları barındıran suşlar tarafından gösterilen büyüme fenotiplerini
- 25 bastıran bir proteini kodlayan bir mutant *spr* geni barındıran bir *E. coli* suşu açıklanmaktadır.

Hem Tsp hem *spr*'de mutasyonlar içeren başka geliştirilmiş, proteaz eksikliği olan suşlar WO2011/086136'da ve WO 2012/013930'da açıklanmaktadır.

- WO02/48376'da açıklanan suşlar lac⁻'dir ve karbon kaynağı olarak timidin, fukoz veya maltozun kullanıldığı kültürlerde üreyemez. Bu, ticari bir ölçekte kullanılması amaçlanan
- 30 suşlar için önemli bir dezavantaj olabilir. Bu suşlarla ilişkili, alkalik fosfataz üretiminin olmaması gibi başka dezavantajlar olabilir. Sonucusu kültür ortamlarından fosfat kullanımında rol oynayan bir periplazmik proteindir.

(1992)). Silber ve diğeri (Deletion of the *prc(tsp)* gene provides evidence for additional tail-specific proteolytic activity in *Escherichia coli* K-12; Silber, K.R., Sauer, R.T.; *Mol Gen Genet* 1994 242:237-240), mutasyonun *prc* geninin bir segmenti bir Kan^f markörü içeren bir fragmanla değiştirilerek yaratıldığı bir *prc* silinti (delesyon) suşunu (KS1000) açıklamaktadır.

- 5 Tsp (*prc*) aktivitesindeki azalma, ilgilenilen proteinlerin proteolizini azaltmak için istenir. Ancak, proteaz *prc*'den yoksun olan hücrelerin düşük ozmolaritede ısıya duyarlı büyüme gösterdiği tespit edildi. Hara ve diğeri ekstrasjenik süpresör (*spr*) mutasyonları içeren ısıya dayanıklı revertantları (ters evrim geçirenler) izole ettiler (Hara ve diğeri, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996)). *Spr* 18kDa'lık membrana bağlı bir periplazmik proteazdır ve *spr* substratları Tsp ve hücre bölünmesi sırasında hücre cidarı hidrolizinde rol oynayan dış
- 10 membrandaki peptidoglikanlardır. *spr* geni UniProtKB/Swiss-Prot P0AFV4 (*SPR_ECOLI*) olarak adlandırılmaktadır.

- Bir mutant *spr* geni içeren, proteaz eksikliği olan geliştirilmiş suşlar açıklanmıştır. Chen ve diğeri, genin akış yukarı ve akış aşağı bölgeleri amplifiye edilerek ve bunlar seçim
- 15 markörleri ve bir *sprW174R* mutasyonu içeren bir vektör üzerinde birbirine bağlanarak yaratılan, *prc* (*Tsp*) ve başka bir proteaz olan *DegP*'deki mutasyonların farklı kombinasyonlarını taşıyan *E. coli* suşlarının oluşturulmasını açıklamaktadırlar (High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant ($\Delta DegP \Delta prc sprW174R$) host strain (Chen C, Snedecor B, Nishihara
- 20 JC, Joly JC, McFarland N, Andersen DC, Battersby JE, Champion KM. *Biotechnol Bioeng.* 5 Mart 2004;85(5):463-74). $\Delta DegP$, Δprc ve *sprW174R* mutasyonları kombinasyonunun en yüksek seviyelerde antikor hafif zinciri, antikor ağır zinciri ve F(ab')₂-LZ temin ettiği saptandı. EP1341899'da kromozomal *DegP*, ve *DegP* ve *Prc* proteazlarını kodlayan *prc* eksikliği olan ve *prc* mutantları barındıran suşlar tarafından gösterilen büyüme fenotiplerini
- 25 bastıran bir proteini kodlayan bir mutant *spr* geni barındıran bir *E. coli* suşu açıklanmaktadır.

Hem Tsp hem *spr*'de mutasyonlar içeren başka geliştirilmiş, proteaz eksikliği olan suşlar WO2011/086136'da ve WO 2012/013930'da açıklanmaktadır.

- WO2/48376'da açıklanan suşlar lac⁻'dir ve karbon kaynağı olarak timidin, fukoz veya maltozun kullanıldığı kültürlerde üreyemez. Bu, ticari bir ölçekte kullanılması amaçlanan
- 30 suşlar için önemli bir dezavantaj olabilir. Bu suşlarla ilişkili, alkalik fosfataz üretiminin olmaması gibi başka dezavantajlar olabilir. Sonucusu kültür ortamlarından fosfat kullanımında rol oynayan bir periplazmik proteindir.

Bazı proteinler peptidil-prolil izomeraz ve/veya izomeraz aktivitesi ve/veya şaperon aktivitesi gösterirler ve rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan hücre hatlarında kullanıldıklarında avantajlı özellikler sağladıkları tespit edilmiştir.

Bu buluş hem Tsp hem spr mutasyonları ve protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini veya proteinleri kodlayan en az bir gen taşıyan, rekombinant proteinler üretmek için avantajlı bir araç temin eden yeni bakteriyel suşlar sunmaktadır.

Buluşun Özeti

Burada aşağıdakileri içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi açıklanmaktadır:

a. D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 ve G147'den seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni ve

b. FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir gen veya genler, burada yabancı tip bir hücreyle karşılaştırıldığında hücrenin Tsp protein aktivitesi azalmıştır.

Ayrıca aşağıdakileri kodlayan bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi açıklanmaktadır:

a. D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 ve G147'den seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni,

b. FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir gen veya genler,

c. ilgilenilen bir proteini, örneğin bir antikoru veya bunun bir bağlayıcı fragmanını eksprese edebilen bir gen,

burada yabancı tip bir hücreyle karşılaştırıldığında hücrenin Tsp protein aktivitesi azalmıştır ve hücre genomik DNA'sının geri kalanı rekombinant hücrenin elde edildiği yabancı tip hücreyle izojeniktir.

Bir durumda, mutasyondan geçmiş spr geni, yabancı tip bir hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon ve protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini eksprese eden gen veya genler hariç olmak üzere, hücrenin genomu bir yabancı tip bakteri hücrene izojeniktir.

Burada ayrıca yabancı tip bir hücreyle karşılaştırıldığında Tsp protein aktivitesi azalmış ve bir

Bazı proteinler peptidil-prolil izomeraz ve/veya izomeraz aktivitesi ve/veya şaperon aktivitesi gösterirler ve rekombinant protein ekspresyonu için kullanılan hücre hatlarında kullanıldıklarında avantajlı özellikler sağladıkları tespit edilmiştir.

Bu buluş hem Tsp hem spr mutasyonları ve protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini veya proteinleri kodlayan en az bir gen taşıyan, rekombinant proteinler üretmek için avantajlı bir araç temin eden yeni bakteriyel suşlar sunmaktadır.

Buluşun Özeti

Burada aşağıdakileri içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi açıklanmaktadır:

a. D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 ve G147'den seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni ve

b. FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir gen veya genler, burada yabancı tip bir hücreyle karşılaştırıldığında hücrenin Tsp protein aktivitesi azalmıştır.

Ayrıca aşağıdakileri kodlayan bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi açıklanmaktadır:

a. D133, H145, H157, N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, V135, L136, G140, R144 ve G147'den seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni,

b. FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir gen veya genler,

c. ilgilenilen bir proteini, örneğin bir antikoru veya bunun bir bağlayıcı fragmanını eksprese edebilen bir gen,

burada yabancı tip bir hücreyle karşılaştırıldığında hücrenin Tsp protein aktivitesi azalmıştır ve hücre genomik DNA'sının geri kalanı rekombinant hücrenin elde edildiği yabancı tip hücreyle izojeniktir.

Bir durumda, mutasyondan geçmiş spr geni, yabancı tip bir hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon ve protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini eksprese eden gen veya genler hariç olmak üzere, hücrenin genomu bir yabancı tip bakteri hücrelerine izojeniktir.

Burada ayrıca yabancı tip bir hücreyle karşılaştırıldığında Tsp protein aktivitesi azalmış ve bir

spr proteinin kodlayan bir mutant spr geni içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi açıklanmakta olup, burada hücrenin genomu, bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini eksprese etmek için dâhil edilen gen veya genler dışında bir yabancı tip bakteriyel hücreye izojeniktir.

Açıklanan hücreler avantajlı büyüme ve protein üretimi fenotipleri göstermektedir.

Burada ayrıca ilgilenilen bir proteini üretmek için, ilgilenilen proteinin yukarıda tanımlandığı gibi bir rekombinant gram negatif bakteri hücresinde eksprese edilmesini içeren bir usul açıklanmaktadır.

10 Çizimlerin Kısa Açıklaması

Şekil 1'de konakçı hücreler ve "şaperon"un çeşitli kombinasyonlarıyla uygulanan 5L ölçekte fermantasyonların sonuçları gösterilmektedir. W3110 bir yabancı tip *E. coli* suşudur. Çeşitli kombinasyonlar şöyledi: şaperon olmadan yabancı tip; FkpA ve Skp'syle birlikte yabancı tip; WO2011/086136'da yayımlandığı gibi MXE016 mutant spr ve Δ Tsp; MXE016 ve FkpA; MXE016 ve Skp; MXE016 ve FkpA ve Skp; WO2011/086136'da açıklanan MXE017; MXE017 ve FkpA ve Skp.

Şekil 2'de 5.4, 6.0 ve 7.0 g/saat uyarım sonrası besleme hızlarında, besleme hızı değiştirme deneylerinin sonuçları gösterilmektedir. MXE016 için yüksek besleme hızlarında yapılan ek Fab''ın çoğu üst fazda kayboldu.

20 **Şekil 3A,B**'de MXE016 +/- FkpA için hücre yaşayabilirliği (3A) ve Fab' titreleri (3B) gösterilmektedir.

Şekil 4'te 20L pilot ölçekli üretim için birincil geri kazanım verileri gösterilmektedir.

Şekil 5'te 20L pilot ölçekli üretimin indirgeyici olmayan koşulları altında SDS-PAGE boyalı jel üzerinde birincil geri kazanım gösterilmektedir. FkpA'yla ilişkili bantlar dışında protein profili iki suşta çok benzer görünmektedir.

Şekil 6'da 20L pilot ölçekli bir işlem için indirgeyici olmayan koşullar altında bir His etiketi western blot'u gösterilmektedir. Tam uzunlukta FkpA saptandı ve ~30 kDa bandına karşılık gelmekteydi ve beklendiği gibi tek başına MXE016'da hiç sinyal saptanmadı.

Şekil 7A-C'de çeşitli genlerdeki çeşitli mutasyonlar gösterilmektedir.

30 **Şekil 7D**'de bir antikorun bir hafif zincirini (LC), bir antikorun bir ağır zincirini (HC)

spr proteinin kodlayan bir mutant spr geni içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi açıklanmakta olup, burada hücrenin genomu, bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir proteini eksprese etmek için dâhil edilen gen veya genler dışında bir yabancı tip bakteriyel hücreye izojeniktir.

Açıklanan hücreler avantajlı büyüme ve protein üretimi fenotipleri göstermektedir.

Burada ayrıca ilgilenilen bir proteini üretmek için, ilgilenilen proteinin yukarıda tanımlandığı gibi bir rekombinant gram negatif bakteri hücrelerinde eksprese edilmesini içeren bir usul açıklanmaktadır.

10 Çizimlerin Kısa Açıklaması

Şekil 1'de konakçı hücreler ve "şaperon"un çeşitli kombinasyonlarıyla uygulanan 5L ölçekte fermantasyonların sonuçları gösterilmektedir. W3110 bir yabancı tip *E. coli* suşudur. Çeşitli kombinasyonlar şöyledi: şaperon olmadan yabancı tip; FkpA ve Skp'syle birlikte yabancı tip; WO2011/086136'da yayımlandığı gibi MXE016 mutant spr ve Δ Tsp; MXE016 ve FkpA; MXE016 ve Skp; MXE016 ve FkpA ve Skp; WO2011/086136'da açıklanan MXE017; MXE017 ve FkpA ve Skp.

Şekil 2'de 5.4, 6.0 ve 7.0 g/saat uyarım sonrası besleme hızlarında, besleme hızı değiştirme deneylerinin sonuçları gösterilmektedir. MXE016 için yüksek besleme hızlarında yapılan ek Fab''ın çoğu üst fazda kayboldu.

20 **Şekil 3A,B**'de MXE016 +/- FkpA için hücre yaşayabilirliği (3A) ve Fab' titreleri (3B) gösterilmektedir.

Şekil 4'te 20L pilot ölçekli üretim için birincil geri kazanım verileri gösterilmektedir.

Şekil 5'te 20L pilot ölçekli üretimin indirgeyici olmayan koşulları altında SDS-PAGE boyalı jel üzerinde birincil geri kazanım gösterilmektedir. FkpA'yla ilişkili bantlar dışında protein profili iki suşta çok benzer görünmektedir.

Şekil 6'da 20L pilot ölçekli bir işlem için indirgeyici olmayan koşullar altında bir His etiketi western blot'u gösterilmektedir. Tam uzunlukta FkpA saptandı ve ~30 kDa bandına karşılık gelmekteydi ve beklendiği gibi tek başına MXE016'da hiç sinyal saptanmadı.

Şekil 7A-C'de çeşitli genlerdeki çeşitli mutasyonlar gösterilmektedir.

30 **Şekil 7D**'de bir antikorun bir hafif zincirini (LC), bir antikorun bir ağır zincirini (HC)

kodlayan bir polinükleotit dizisi, bir FkpA polinükleotit dizisi ve/veya Skp polinükleotit içeren bir vektörün oluşturulmasının diyagramatik bir temsili gösterilmektedir.

Şekil 8'de çeşitli polinükleotit ve amino asit dizileri gösterilmektedir.

Dizilerin Kısa Açıklaması

- 5 DİZİ İD NO: 1 başlatma kodonunun akış yukarısında 6 nükleotit - ATGAAC - içeren yabancı tip Tsp geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 2 yabancı tip Tsp proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 3 başlatma kodonunun akış yukarısında 6 nükleotit - ATGAAT - içeren mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş (knock-out) bir Tsp geninin DNA dizisidir.

- 10 DİZİ İD NO: 4 yabancı tip Proteaz III geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 5 yabancı tip Proteaz III proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 6 mutasyondan geçirilmiş, işlevsiz hale getirilmiş Proteaz III geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 7 yabancı tip DegP geninin DNA dizisidir.

- 15 DİZİ İD NO: 8 yabancı tip DegP proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 9 mutasyondan geçirilmiş bir DegP geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 10 mutasyondan geçirilmiş bir DegP proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 11 mutasyondan geçirilmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primerinin dizisidir.

- 20 DİZİ İD NO: 12 mutasyondan geçirilmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 13 mutasyondan geçirilmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primerinin dizisidir.

- 25 DİZİ İD NO: 14 mutasyondan geçirilmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 15 mutasyondan geçirilmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 16 mutasyondan geçirilmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi

kodlayan bir polinükleotit dizisi, bir FkpA polinükleotit dizisi ve/veya Skp polinükleotit içeren bir vektörün oluşturulmasının diyagramatik bir temsili gösterilmektedir.

Şekil 8'de çeşitli polinükleotit ve amino asit dizileri gösterilmektedir.

Dizilerin Kısa Açıklaması

- 5 DİZİ İD NO: 1 başlatma kodonunun akış yukarısında 6 nükleotit - ATGAAC - içeren yabancı tip Tsp geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 2 yabancı tip Tsp proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 3 başlatma kodonunun akış yukarısında 6 nükleotit - ATGAAT - içeren mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş (knock-out) bir Tsp geninin DNA dizisidir.

- 10 DİZİ İD NO: 4 yabancı tip Proteaz III geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 5 yabancı tip Proteaz III proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 6 mutasyondan geçirilmiş, işlevsiz hale getirilmiş Proteaz III geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 7 yabancı tip DegP geninin DNA dizisidir.

- 15 DİZİ İD NO: 8 yabancı tip DegP proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 9 mutasyondan geçirilmiş bir DegP geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 10 mutasyondan geçirilmiş bir DegP proteininin amino asit dizisidir.

DİZİ İD NO: 11 mutasyondan geçirilmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primerinin dizisidir.

- 20 DİZİ İD NO: 12 mutasyondan geçirilmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 13 mutasyondan geçirilmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primerinin dizisidir.

- 25 DİZİ İD NO: 14 mutasyondan geçirilmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 15 mutasyondan geçirilmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 16 mutasyondan geçirilmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yerini içeren bölgesi

için 3' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 17 yabancı tip spr geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 18 ilk 26 amino asit kalıntısı olan sinyal dizisini içeren yabancı tip spr geninin dizisidir.

5 DİZİ İD NO: 19 sinyal dizisi olmadan, mutasyondan geçirilmemiş spr geninin dizisidir.

DİZİ İD NO: 20 D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçirilmiş bir OmpT dizisinin nükleotit dizisidir.

DİZİ İD NO: 21 D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçirilmiş bir OmpT dizisinin amino asit dizisidir.

10 DİZİ İD NO: 22 mutasyondan geçirilmiş, işlevsiz hale getirilmiş OmpT dizisinin nükleotit dizisidir.

DİZİ İD NO: 23'te OmpA oligonükleotit adaptörünün dizisi gösterilmektedir.

DİZİ İD NO: 24'te E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 1'i (IGS1) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

15 DİZİ İD NO: 25'te E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 2'yi (IGS2) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

DİZİ İD NO: 26'da E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 3'ü (IGS3) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

20 DİZİ İD NO: 27'de E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 4'ü (IGS4) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

DİZİ İD NO: 28 yabancı tip FkpA geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 29 yabancı tip FkpA geninin protein dizisidir.

DİZİ İD NO: 30 FkpA his etiketli geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 31 FkpA his etiketli geninin protein dizisidir.

25 DİZİ İD NO: 32 yabancı tip skp geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 33 yabancı tip skp geninin protein dizisidir.

DİZİ İD NO: 34 skp his etiketli geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 35 skp his etiketli geninin protein dizisidir.

için 3' oligonükleotit primerinin dizisidir.

DİZİ İD NO: 17 yabancı tip spr geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 18 ilk 26 amino asit kalıntısı olan sinyal dizisini içeren yabancı tip spr geninin dizisidir.

5 DİZİ İD NO: 19 sinyal dizisi olmadan, mutasyondan geçirilmemiş spr geninin dizisidir.

DİZİ İD NO: 20 D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçirilmiş bir OmpT dizisinin nükleotit dizisidir.

DİZİ İD NO: 21 D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçirilmiş bir OmpT dizisinin amino asit dizisidir.

10 DİZİ İD NO: 22 mutasyondan geçirilmiş, işlevsiz hale getirilmiş OmpT dizisinin nükleotit dizisidir.

DİZİ İD NO: 23'te OmpA oligonükleotit adaptörünün dizisi gösterilmektedir.

DİZİ İD NO: 24'te E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 1'i (IGS1) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

15 DİZİ İD NO: 25'te E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 2'yi (IGS2) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

DİZİ İD NO: 26'da E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 3'ü (IGS3) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

20 DİZİ İD NO: 27'de E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 4'ü (IGS4) kodlayan oligonükleotit kaseti gösterilmektedir.

DİZİ İD NO: 28 yabancı tip FkpA geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 29 yabancı tip FkpA geninin protein dizisidir.

DİZİ İD NO: 30 FkpA his etiketli geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 31 FkpA his etiketli geninin protein dizisidir.

25 DİZİ İD NO: 32 yabancı tip skp geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 33 yabancı tip skp geninin protein dizisidir.

DİZİ İD NO: 34 skp his etiketli geninin DNA dizisidir.

DİZİ İD NO: 35 skp his etiketli geninin protein dizisidir.

DİZİ İD NO: 36 ila 74'te bu buluşun hücre hattında ekspresyon için uygun olan, FcRn antikorlarının veya bunların fragmanlarının çeşitli amino asit ve DNA dizileri gösterilmektedir. Özellikle DİZİ İD NO: 50 bir anti-FcRn antikorunun hafif zinciri 1519gH20'nin hafif zincir değişken bölgesinin amino asit dizisidir ve DİZİ İD NO:58 bir anti-FcRn antikorunun ağır zinciri 1519gH20'nin ağır zincir değişken bölgesinin amino asit dizisidir.

Buluşun Tercih Edilen Düzenlemelerinin Ayrıntılı Açıklaması

Buluş sahipleri ilgilenilen bir rekombinant proteini eksprese etmek için uygun geliştirilmiş rekombinant gram negatif bakteri hücreleri temin ettiler.

10 Bir düzenlemede protein bir antikor veya bunun bağlayıcı bir fragmanı, özellikle bir terapötik antikordur.

Özellikle, buluş sahipleri protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan bir veya daha fazla geni, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan gram negatif bakteri hücrelerine dâhil ederek ilgilenilen bir rekombinant proteini eksprese etmek için geliştirilmiş rekombinant gram negatif bakteri hücreleri temin ettiler.

15 Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için proteini kodlayan gen veya genler, örneğin stabil bir hücre hattı temin etmek için hücre genomu içine entegre edilir. Bir düzenlemede, ekspresyon için bir rekombinant protein (terapötik bir protein gibi) istenen rekombinant proteinin ekspresyonunu sağlamak için stabil bir hücre hattı içine transfekte edilir.

20 Bir düzenlemede protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler bir veya daha fazla plazmit üzerinde temin edilir, örneğin plazmitler bu buluşun bir hücre hattını temin etmek için bir hücre içine geçici olarak transfekte edilir.

25 Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler, aynı zamanda ilgilenilen bir rekombinant protein için kodlama dizisini içeren bir plazmit üzerinde temin edilir.

Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler ilgilenilen bir rekombinant protein için kodlama dizisini içermeyen bir plazmit üzerinde temin edilir.

30 Bir düzenlemede buluş yabancı tip bakteri hücreleriyle ve sadece mutasyondan geçmiş bir Tsp geni veya mutasyondan geçmiş bir Tsp ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında gelişmiş hücre büyümesi fenotipine sahip yeni suşlar sunmaktadır.

DİZİ İD NO: 36 ila 74'te bu buluşun hücre hattında ekspresyon için uygun olan, FcRn antikorlarının veya bunların fragmanlarının çeşitli amino asit ve DNA dizileri gösterilmektedir. Özellikle DİZİ İD NO: 50 bir anti-FcRn antikorunun hafif zinciri 1519gH20'nin hafif zincir değişken bölgesinin amino asit dizisidir ve DİZİ İD NO:58 bir anti-FcRn antikorunun ağır zinciri 1519gH20'nin ağır zincir değişken bölgesinin amino asit dizisidir.

Buluşun Tercih Edilen Düzenlemelerinin Ayrıntılı Açıklaması

Buluş sahipleri ilgilenilen bir rekombinant proteini eksprese etmek için uygun geliştirilmiş rekombinant gram negatif bakteri hücreleri temin ettiler.

10 Bir düzenlemede protein bir antikor veya bunun bağlayıcı bir fragmanı, özellikle bir terapötik antikordur.

Özellikle, buluş sahipleri protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan bir veya daha fazla geni, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan gram negatif bakteri hücrelerine dâhil ederek ilgilenilen bir rekombinant proteini eksprese etmek için geliştirilmiş rekombinant gram negatif bakteri hücreleri temin ettiler.

15 Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için proteini kodlayan gen veya genler, örneğin stabil bir hücre hattı temin etmek için hücre genomu içine entegre edilir. Bir düzenlemede, ekspresyon için bir rekombinant protein (terapötik bir protein gibi) istenen rekombinant proteinin ekspresyonunu sağlamak için stabil bir hücre hattı içine transfekte edilir.

20 Bir düzenlemede protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler bir veya daha fazla plazmit üzerinde temin edilir, örneğin plazmitler bu buluşun bir hücre hattını temin etmek için bir hücre içine geçici olarak transfekte edilir.

25 Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler, aynı zamanda ilgilenilen bir rekombinant protein için kodlama dizisini içeren bir plazmit üzerinde temin edilir.

Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler ilgilenilen bir rekombinant protein için kodlama dizisini içermeyen bir plazmit üzerinde temin edilir.

30 Bir düzenlemede buluş yabancı tip bakteri hücreleriyle ve sadece mutasyondan geçmiş bir Tsp geni veya mutasyondan geçmiş bir Tsp ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında gelişmiş hücre büyümesi fenotipine sahip yeni suşlar sunmaktadır.

Bu buluşun hücrelerinin birçok avantajı vardır. Buluş sahipleri bu buluşa uygun hücrelerin yabancı tip bir hücreye veya mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni içeren bir hücreye kıyasla artmış hücre yaşayabilirliği gösterebildiğini şaşkıncu bir şekilde tespit ettiler.

- 5 Hücre yaşayabilirliği pratik açıdan özellikle önemlidir, çünkü yaşayabilir olmayan hücreler kültürde lize olma (erime, parçalanma) ve DNA döküntüsü yaratma eğilimindedir. Bu DNA döküntüsü istenen proteini saflaştırmanın güçlüğü, maliyetini ve giderini artırır. Dolayısıyla lize olmuş, yaşayabilir olmayan hücrelerdeki DNA döküntüsünün en aza indirilmesi, verimli bir şekilde rekombinant proteinler imal etme açısından önemli bir
- 10 meseledir, örneğin US 6,258,560'ye bakınız.

Hücre yaşayabilirliği çeşitli rutin tekniklerin herhangi biriyle, örneğin bir floresan boya ve FACS analizi veya benzeri kullanılarak ölçülebilir.

- Spesifik olarak, buluşa uygun hücreler genellikle mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında daha az hücre lizisi
- 15 fenotipi gösterir.

- Ayrıca yeni suşlar, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş spr geni taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında, hücrelerden protein sızıntısını azaltabilir ve daha uzun süre periplazmik birikime izin verebilir. Örneğin hedef proteinin toplam ekspresyon seviyeleri benzer olduğu ama daha fazla protein periplazma içinde biriktiği veya daha az protein üst
- 20 fazda biriktiği durumda bu özellikle önemlidir, çünkü bu daha az sızıntılı özelliklere sahip hücrelerden daha az sızıntılı olan suş protein geri kazanımını kolaylaştırdığı için tesis ölçeğine üretim için genellikle daha uygun olacaktır.

- Ayrıca bu buluşa uygun hücreler, bir yabancı tip bakteri hücresiyle veya FkpA gibi bir proteini kodlayan bir genin veya genlerin yokluğunda mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve
- 25 mutasyondan geçmiş bir spr geni içeren bir hücreyle karşılaştırıldığında ilgilenilen bir proteinin verimini arttırabilmektedir. Artan protein verimi periplazmik protein verimi ve/veya üst faz protein verimi artışı olabilir. Bir düzenlemede, bu buluşun hücreleri, hücreden sızıntının azalması nedeniyle, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan bir hücreyle karşılaştırıldığında periplazmik protein veriminde artış
- 30 göstermektedir.

Rekombinant bakteri hücreleri ilgilenilen bir proteini daha hızlı üretebilmektedir ve dolayısıyla aynı miktarda ilgilenilen bir protein, bir yabancı tip bakteri hücresiyle veya

Bu buluşun hücrelerinin birçok avantajı vardır. Buluş sahipleri bu buluşa uygun hücrelerin yabancı tip bir hücreye veya mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni içeren bir hücreye kıyasla artmış hücre yaşayabilirliği gösterebildiğini şaşkıncu bir şekilde tespit ettiler.

- 5 Hücre yaşayabilirliği pratik açıdan özellikle önemlidir, çünkü yaşayabilir olmayan hücreler kültürde lize olma (erime, parçalanma) ve DNA döküntüsü yaratma eğilimindedir. Bu DNA döküntüsü istenen proteini saflaştırmanın güçlüğü, maliyetini ve giderini artırır. Dolayısıyla lize olmuş, yaşayabilir olmayan hücrelerdeki DNA döküntüsünün en aza indirilmesi, verimli bir şekilde rekombinant proteinler imal etme açısından önemli bir
- 10 meseledir, örneğin US 6,258,560'ye bakınız.

Hücre yaşayabilirliği çeşitli rutin tekniklerin herhangi biriyle, örneğin bir floresan boya ve FACS analizi veya benzeri kullanılarak ölçülebilir.

- Spesifik olarak, buluşa uygun hücreler genellikle mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında daha az hücre lizisi
- 15 fenotipi gösterir.

- Ayrıca yeni suşlar, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş spr geni taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında, hücrelerden protein sızıntısını azaltabilir ve daha uzun süre periplazmik birikime izin verebilir. Örneğin hedef proteinin toplam ekspresyon seviyeleri benzer olduğu ama daha fazla protein periplazma içinde biriktiği veya daha az protein üst
- 20 fazda biriktiği durumda bu özellikle önemlidir, çünkü bu daha az sızıntılı özelliklere sahip hücrelerden daha az sızıntılı olan suş protein geri kazanımını kolaylaştırdığı için tesis ölçeğine üretim için genellikle daha uygun olacaktır.

- Ayrıca bu buluşa uygun hücreler, bir yabancı tip bakteri hücresiyle veya FkpA gibi bir proteini kodlayan bir genin veya genlerin yokluğunda mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve
- 25 mutasyondan geçmiş bir spr geni içeren bir hücreyle karşılaştırıldığında ilgilenilen bir proteinin verimini arttırabilmektedir. Artan protein verimi periplazmik protein verimi ve/veya üst faz protein verimi artışı olabilir. Bir düzenlemede, bu buluşun hücreleri, hücreden sızıntının azalması nedeniyle, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni taşıyan bir hücreyle karşılaştırıldığında periplazmik protein veriminde artış
- 30 göstermektedir.

Rekombinant bakteri hücreleri ilgilenilen bir proteini daha hızlı üretebilmektedir ve dolayısıyla aynı miktarda ilgilenilen bir protein, bir yabancı tip bakteri hücresiyle veya

mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni içeren bir hücreyle karşılaştırıldığında daha kısa bir sürede üretilebilir. İlgilenilen bir proteinin daha hızlı üretimi, hücrenin büyümesinin ilk döneminde, örneğin protein ekspresyonunun uyarılmasından sonraki ilk 5, 10, 20 veya 30 saatte özellikle önemli olabilir.

- 5 Bu buluşa uygun hücrelerin periplazmada ve/veya ortamda maksimum ekspresyonu tercihen 1.0g/L, 1.5g/L, 1.8g/L, 2.0g/L, 2.4g/L, 2.5g/L, 3.0g/L, 3.5g/L veya 4.0g/L ilgilenilen bir proteindir.

Katlanmayı kolaylaştıran bir proteinin veya proteinlerin ekspresyonu, doğru katlanmayla temin edilen proteini maksimize ederek ekspresyonu daha da optimize eder. Bu alanda uzman olanlar, uygun katlanmanın biyolojik işlev için elzem olduğunun ve dolayısıyla istenen katlanmayı haiz proteinin izole edilmesinin çok önemli olduğunun farkındadırlar. Protein bir gram negatif hücrede eksprese olduğunda bu özellikle önemlidir, çünkü eksprese edilen protein hücre için doğal olmayacaktır ve dolayısıyla hücre uygun katlanmayı haiz proteini otomatik olarak eksprese etmeyebilir. Uygun olmayan katlanma yığılımlarla veya başka

10 katışkılarla kendini gösterebilir. İstenen proteinin izolasyonu kapsamlı saflaştırmayı gerektirebilir ve bunun maliyetle ilişkili sonuçları vardır ve ayrıca istenen proteinin düşük verimiyle de sonuçlanabilir. Eksprese edilen doğru katlanmış protein miktarının maksimize edilmesi, gerekli saflaştırma miktarını en aza indirir ve kullanılabilir verimi optimize edebilir ve dolayısıyla avantajlıdır.

- 20 Katlanmayı kolaylaştıran bir proteinin ekspresyonuyla ilişkili avantajlar arasında aşağıdakilerin biri veya daha fazlası yer alır: yüksek titre (örneğin yabani tipte 0.5 g/L'den yaklaşık 1.05 g/L'ye çıkar); toplamada daha fazla yaşayabilirlik (örneğin >%95); artan besleme hızıyla birlikte artan titre (süreç geliştirme için daha büyük beklentiler); 20L ölçeği gibi ticari üretim öleklerinde daha yüksek titre ve toplamada daha yüksek yaşayabilirlik; ve
- 25 özellikle 20L ölçekte ekstraktın daha kolay berraklaştırılması.

Bu buluşla sunulan hücrelerde, Tsp proteaz aktivitesi bir yabani tip hücreye kıyasla azalmıştır, bu ilgilenilen bir proteinin, özellikle proteolitik olarak Tsp'ye duyarlı olan ilgilenilen proteinlerin proteolizini azaltabilir. Dolayısıyla, bu buluşla sunulan hücreler, bir yabani tip bakteri hücresiyle karşılaştırıldığında, bütün halde proteinlerin, tercihen ilgilenilen proteinin daha yüksek bir verimini sağlayabilir ve proteinlerin, tercihen ilgilenilen proteinin proteolitik

30 fragmanlarının daha düşük bir verimini sağlayabilir veya tercihen bunu hiç sağlamaz.

Burada, genomda, sadece bu buluşa uygun modifikasyonları dâhil etmek için gerekli olan

mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni içeren bir hücreyle karşılaştırıldığında daha kısa bir sürede üretilebilir. İlgilenilen bir proteinin daha hızlı üretimi, hücrenin büyümesinin ilk döneminde, örneğin protein ekspresyonunun uyarılmasından sonraki ilk 5, 10, 20 veya 30 saatte özellikle önemli olabilir.

- 5 Bu buluşa uygun hücrelerin periplazmada ve/veya ortamda maksimum ekspresyonu tercihen 1.0g/L, 1.5g/L, 1.8g/L, 2.0g/L, 2.4g/L, 2.5g/L, 3.0g/L, 3.5g/L veya 4.0g/L ilgilenilen bir proteindir.

Katlanmayı kolaylaştıran bir proteinin veya proteinlerin ekspresyonu, doğru katlanmayla temin edilen proteini maksimize ederek ekspresyonu daha da optimize eder. Bu alanda uzman olanlar, uygun katlanmanın biyolojik işlev için elzem olduğunun ve dolayısıyla istenen katlanmayı haiz proteinin izole edilmesinin çok önemli olduğunun farkındadırlar. Protein bir gram negatif hücrede eksprese olduğunda bu özellikle önemlidir, çünkü eksprese edilen protein hücre için doğal olmayacaktır ve dolayısıyla hücre uygun katlanmayı haiz proteini otomatik olarak eksprese etmeyebilir. Uygun olmayan katlanma yığılımlarla veya başka katışkılarla kendini gösterebilir. İstenen proteinin izolasyonu kapsamlı saflaştırmayı gerektirebilir ve bunun maliyetle ilişkili sonuçları vardır ve ayrıca istenen proteinin düşük verimiyle de sonuçlanabilir. Eksprese edilen doğru katlanmış protein miktarının maksimize edilmesi, gerekli saflaştırma miktarını en aza indirir ve kullanılabilir verimi optimize edebilir ve dolayısıyla avantajlıdır.

- 20 Katlanmayı kolaylaştıran bir proteinin ekspresyonuyla ilişkili avantajlar arasında aşağıdakilerin biri veya daha fazlası yer alır: yüksek titre (örneğin yabani tipte 0.5 g/L'den yaklaşık 1.05 g/L'ye çıkar); toplamada daha fazla yaşayabilirlik (örneğin >%95); artan besleme hızıyla birlikte artan titre (süreç geliştirme için daha büyük beklentiler); 20L ölçeği gibi ticari üretim öleklerinde daha yüksek titre ve toplamada daha yüksek yaşayabilirlik; ve 25 özellikle 20L ölçekte ekstraktın daha kolay berraklaştırılması.

Bu buluşla sunulan hücrelerde, Tsp proteaz aktivitesi bir yabani tip hücreye kıyasla azalmıştır, bu ilgilenilen bir proteinin, özellikle proteolitik olarak Tsp'ye duyarlı olan ilgilenilen proteinlerin proteolizini azaltabilir. Dolayısıyla, bu buluşla sunulan hücreler, bir yabani tip bakteri hücresiyle karşılaştırıldığında, bütün halde proteinlerin, tercihen ilgilenilen proteinin daha yüksek bir verimini sağlayabilir ve proteinlerin, tercihen ilgilenilen proteinin proteolitik fragmanlarının daha düşük bir verimini sağlayabilir veya tercihen bunu hiç sağlamaz.

Burada, genomda, sadece bu buluşa uygun modifikasyonları dâhil etmek için gerekli olan

minimal mutasyonları taşıyan hücreler açıklanmaktadır. Bakteri hücresi, bir yabancı tip bakteri hücresinden sadece spr genindeki bir veya daha fazla mutasyonla ve bir yabancı tip hücreye göre Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyonla farklılaşabilir, çünkü örneğin protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler hücre içine, örneğin bir plazmit üzerine geçici olarak dâhil edilebilir. Burada açıklanan hücreler, hücrenin büyümesi ve/veya ilgilenilen bir proteini eksprese etme kapasitesi üzerinde zararlı etkileri olabilen başka mutasyonlar taşımaz.

Dolayısıyla, burada açıklanan rekombinant konakçı hücrelerin biri veya daha fazlası, genomik dizide başka genetik olarak tasarlanmış mutasyonlar içeren hücrelerle karşılaştırıldığında artmış protein ekspresyonu ve/veya gelişmiş büyüme özellikleri gösterebilir. Burada açıklanan hücreler ayrıca, hücre genomunda başka bozulmalar içeren hücrelerle karşılaştırıldığında terapötik proteinler üretmek üzere kullanım için daha uygundur.

Bu alanda uzman olanlar, bir fermantasyon usulü, ELISA ve protein G HPLC dâhil olmak üzere bu alanda iyi bilinen usulleri kullanarak, ilgilenilen bir proteinin istenen verimine sahip olup olmadığını görmek için bir aday hücre klonunu kolayca test edebilecektir. Uygun fermantasyon usulleri Humphreys D P. ve diğerleri (1997), Formation of dimeric Fabs in E. coli: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. J. IMMUNOL. METH. 209: 193-202; Backlund E. Reeks D. Markland K. Weir N. Bowering L. Larsson G. Fedbatch design for periplasmic product retention in Escherichia coli, Dergi Makalesi. Research Support, Non-U.S. Gov't Journal of Biotechnology. 135(4):358-65, 31 Temmuz 2008; Champion KM. Nishihara JC. Joly JC. Arnott D. Similarity of the Escherichia coli proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes. [Dergi Makalesi] Proteomics. 1(9):1133-48, 2001 Eylül; ve Horn U. Strittmatter W. Krebber A. Knupfer U. Kujau M. Wenderoth R. Muller K. Matzku S. Pluckthun A. Riesenber D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in Escherichia coli, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, Dergi Makalesi. Research Support, Non-U.S. Gov't Applied Microbiology & Biotechnology. 46(5-6):524-32, 1996 Aralık'ta açıklanmaktadır. Bu alanda uzman olanlar ayrıca, protein G HPLC, dairesel dikroizm, NMR, X Işını kristalografisi ve epitop afinite ölçüm usulleri gibi bu alanda iyi bilinen usulleri kullanarak ,proteinin doğru katlanıp katlanmadığını görmek için salgılanan proteini kolayca test edebilecekler.

Bu buluş şimdi daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

minimal mutasyonları taşıyan hücreler açıklanmaktadır. Bakteri hücresi, bir yabancı tip bakteri hücresinden sadece spr genindeki bir veya daha fazla mutasyonla ve bir yabancı tip hücreye göre Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyonla farklılaşabilir, çünkü örneğin protein katlanmasını kolaylaştırmak için bir proteini kodlayan gen veya genler hücre içine, örneğin bir plazmit üzerine geçici olarak dâhil edilebilir. Burada açıklanan hücreler, hücrenin büyümesi ve/veya ilgilenilen bir proteini eksprese etme kapasitesi üzerinde zararlı etkileri olabilen başka mutasyonlar taşımaz.

Dolayısıyla, burada açıklanan rekombinant konakçı hücrelerin biri veya daha fazlası, genomik dizide başka genetik olarak tasarlanmış mutasyonlar içeren hücrelerle karşılaştırıldığında artmış protein ekspresyonu ve/veya gelişmiş büyüme özellikleri gösterebilir. Burada açıklanan hücreler ayrıca, hücre genomunda başka bozulmalar içeren hücrelerle karşılaştırıldığında terapötik proteinler üretmek üzere kullanım için daha uygundur.

Bu alanda uzman olanlar, bir fermantasyon usulü, ELISA ve protein G HPLC dâhil olmak üzere bu alanda iyi bilinen usulleri kullanarak, ilgilenilen bir proteinin istenen verimine sahip olup olmadığını görmek için bir aday hücre klonunu kolayca test edebilecektir. Uygun fermantasyon usulleri Humphreys D P. ve diğerleri (1997), Formation of dimeric Fabs in E. coli: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. J. IMMUNOL. METH. 209: 193-202; Backlund E. Reeks D. Markland K. Weir N. Bowering L. Larsson G. Fedbatch design for periplasmic product retention in Escherichia coli, Dergi Makalesi. Research Support, Non-U.S. Gov't Journal of Biotechnology. 135(4):358-65, 31 Temmuz 2008; Champion KM. Nishihara JC. Joly JC. Arnott D. Similarity of the Escherichia coli proteome upon completion of different biopharmaceutical fermentation processes. [Dergi Makalesi] Proteomics. 1(9):1133-48, 2001 Eylül; ve Horn U. Strittmatter W. Krebber A. Knupfer U. Kujau M. Wenderoth R. Muller K. Matzku S. Pluckthun A. Riesenber D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in Escherichia coli, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions, Dergi Makalesi. Research Support, Non-U.S. Gov't Applied Microbiology & Biotechnology. 46(5-6):524-32, 1996 Aralık'ta açıklanmaktadır. Bu alanda uzman olanlar ayrıca, protein G HPLC, dairesel dikroizm, NMR, X Işımı kristalografisi ve epitop afinite ölçüm usulleri gibi bu alanda iyi bilinen usulleri kullanarak ,proteinin doğru katlanıp katlanmadığını görmek için salgılanan proteini kolayca test edebilecekler.

Bu buluş şimdi daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

“Protein” ve “polipeptit” terimleri bağlam aksini işaret etmedikçe burada alternatifli olarak kullanılmaktadır. “Peptit” 10 veya daha az amino asidi belirtmeye yöneliktir.

“Polinükleotit” terimi, bağlam aksini işaret etmedikçe bir gen, DNA, cDNA, RNA, mRNA ve benzerini kapsamaktadır.

- 5 Burada “azalmış aktivite” ifadesi, uygun bir tahlilde benzer koşullar altında ölçüldüğünde bir yabancı tip suştaki karşılık gelen enzimatik aktiviteye kıyasla Tsp enzimatik aktivitesi gibi enzimatik ativitenin “daha düşük seviyelerini” belirtmek için kullanılmaktadır. Bir düzenlemede, azalmış aktivite bir yabancı tip karşılaştırma örneğinin enzimatik aktivitesinin %50’si veya daha azı, %40’ı veya daha azı, %30’u veya daha azı, %20’si veya daha azı, %10’u veya daha azı veya 5’i veya daha azıdır. Bir düzenlemede, enzimatik aktivite seviyelerini belirlemek için analiz, sonuçlar doğrudan bir karşılaştırmada kullanılacağı zaman eş zamanlı olarak yapılır.

Direkt karşılaştırma, burada iki veya daha fazla sonucun sayısal değerinin, burada tanımlandığı gibi azalmış aktivite olup olmadığını değerlendirmek veya bir tahlilden elde edilen aktivite sonuçlarını sınıflandırmak amacıyla karşılaştırıldığı durumu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada “içerme” terimi bu tarifname çerçevesinde kullanıldığında, “kapsama” olarak yorumlanmalıdır.

Yabancı tip hücre terimi burada mutasyondan geçmemiş hücre veya kontrol hücresiyle alternatifli olarak kullanılmaktadır.

Bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmemiş hücre veya kontrol hücresi buluşun rekombinant gram negatif hücresiyle aynı tipte bir hücreyi belirtmekte olup, burada hücre yukarıdaki azalmış Tsp protein aktivitesini taşımak ve mutant spr genini taşımak üzere modifiye edilmemiştir. Örneğin, mutasyondan geçmemiş bir hücre bir yabancı tip hücre olabilir ve mutasyonlar dâhil etmeye yönelik modifikasyondan önce buluşun hücreleriyle aynı konakçı hücreler popülasyonundan elde edilebilir.

“Hücre”, “hücre hattı”, “hücre kültürü” ve “suş” ifadeleri alternatifli olarak kullanılmaktadır.

“Mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipi” ifadesi bu buluş çerçevesinde, bir mutant Tsp genine sahip bir hücre tarafından gösterilen fenotipi belirtmektedir. Tipik olarak, bir mutant Tsp geni içeren hücreler özellikle yüksek hücre yoğunluklarında lize olabilir. Bu hücrelerin lizisi herhangi bir rekombinant proteinin üst faz

“Protein” ve “polipeptit” terimleri bağlam aksini işaret etmedikçe burada alternatifli olarak kullanılmaktadır. “Peptit” 10 veya daha az amino asidi belirtmeye yöneliktir.

“Polinükleotit” terimi, bağlam aksini işaret etmedikçe bir gen, DNA, cDNA, RNA, mRNA ve benzerini kapsamaktadır.

- 5 Burada “azalmış aktivite” ifadesi, uygun bir tahlilde benzer koşullar altında ölçüldüğünde bir yabancı tip suştaki karşılık gelen enzimatik aktiviteye kıyasla Tsp enzimatik aktivitesi gibi enzimatik ativitenin “daha düşük seviyelerini” belirtmek için kullanılmaktadır. Bir düzenlemede, azalmış aktivite bir yabancı tip karşılaştırma örneğinin enzimatik aktivitesinin %50’si veya daha azı, %40’ı veya daha azı, %30’u veya daha azı, %20’si veya daha azı, %10’u veya daha azı veya 5’i veya daha azıdır. Bir düzenlemede, enzimatik aktivite seviyelerini belirlemek için analiz, sonuçlar doğrudan bir karşılaştırmada kullanılacağı zaman eş zamanlı olarak yapılır.

Direkt karşılaştırma, burada iki veya daha fazla sonucun sayısal değerinin, burada tanımlandığı gibi azalmış aktivite olup olmadığını değerlendirmek veya bir tahlilden elde edilen aktivite sonuçlarını sınıflandırmak amacıyla karşılaştırıldığı durumu belirtmek için kullanılmaktadır.

Burada “içerme” terimi bu tarifname çerçevesinde kullanıldığında, “kapsama” olarak yorumlanmalıdır.

Yabancı tip hücre terimi burada mutasyondan geçmemiş hücre veya kontrol hücresiyle alternatifli olarak kullanılmaktadır.

Bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmemiş hücre veya kontrol hücresi buluşun rekombinant gram negatif hücresiyle aynı tipte bir hücreyi belirtmekte olup, burada hücre yukarıdaki azalmış Tsp protein aktivitesini taşımak ve mutant spr genini taşımak üzere modifiye edilmemiştir. Örneğin, mutasyondan geçmemiş bir hücre bir yabancı tip hücre olabilir ve mutasyonlar dâhil etmeye yönelik modifikasyondan önce buluşun hücreleriyle aynı konakçı hücreler popülasyonundan elde edilebilir.

“Hücre”, “hücre hattı”, “hücre kültürü” ve “suş” ifadeleri alternatifli olarak kullanılmaktadır.

“Mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipi” ifadesi bu buluş çerçevesinde, bir mutant Tsp genine sahip bir hücre tarafından gösterilen fenotipi belirtmektedir. Tipik olarak, bir mutant Tsp geni içeren hücreler özellikle yüksek hücre yoğunluklarında lize olabilir. Bu hücrelerin lizisi herhangi bir rekombinant proteinin üst faz

içine sızmasına neden olur. Mutasyondan geçmiş Tsp geni taşıyan hücreler düşük ozlomaritede ısıya duyarlı büyüme de gösterebilir. Örneğin, 40°C veya daha üzeri gibi yüksek bir sıcaklıkta hipotonik ortamda hücreler büyüme göstermez veya düşük büyüme hızı gösterir veya hücreler ölür.

- 5 “İzojenik” terimi bu buluş çerçevesinde, bu buluşun hücrelerinin genomunun, mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon dışında hücrenin elde edildiği yabancı tip hücreyle karşılaştırıldığında esas itibarıyla aynı veya aynı genomik diziye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Bu düzenlemede hücrenin genomu hiçbir başka doğal olarak oluşmayan veya
- 10 genetik olarak tasarlanmış mutasyon içermez. Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre, oluşabilecek doğal olarak oluşan mutasyonlar dikkate alınarak, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gereken modifikasyon haricinde yabancı tip hücreyle esas itibarıyla aynı genomik diziye sahip olabilir. Bir
- 15 düzenlemede, bu buluşa uygun hücre, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon dışında yabancı tip hücreyle tam aynı genomik diziye sahip olabilir.

“Yabancı tip” terimi bu buluş çerçevesinde doğada oluşabildiği veya çevreden izole edilebildiği haliyle, genetik olarak tasarlanmış mutasyonlar taşımayan bir gram negatif bakteri suşu anlamındadır. Yabancı tip bir *E. coli* suşu W3110, örneğin W3110 K-12 suşudur.

- 20 Bu buluşun rekombinant hücrelerini üretmek için ana hücre olarak herhangi bir uygun gram negatif bakteri kullanılabilir. Uygun gram negatif bakteriler arasında *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *E. coli* yer alır. Tercihen ana hücre *E. coli*'dir. Bu buluşta *E. coli*'nin herhangi bir uygun suşu kullanılabilir,
- 25 ama tercihen bir yabancı tip W3110 suşu, örneğin K-12 W3110 kullanılır.

- Daha önce yaratılan ve rekombinant proteinleri eksprese etmek için kullanılan proteaz eksikliği olan bakteri suşlarıyla ilişkili bir sakınca, örneğin *E. coli* suşlarında *phoA*, *fhuA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* ve *pro* gibi hücre metabolizmasında ve DNA replikasyonunda rol oynayan genlerin ek mutasyonlarını içermeleridir. Bu mutasyonların hücre büyümesi,
- 30 stabilite, rekombinant protein ekspresyon verimi ve toksisite üzerindeki etkiler de dâhil olmak üzere konakçı hücre üzerinde birçok zararlı etkisi olabilmektedir. Bu genomik mutasyonların birine veya daha fazlasına sahip suşlar, özellikle çok sayıda bu tür mutasyonlara sahip suşlar, bakteri üreme hızını sınırlı proteini üretimi için uygun olmayan bir seviyeye düşüren bir

içine sızmasına neden olur. Mutasyondan geçmiş Tsp geni taşıyan hücreler düşük ozlomaritede ısıya duyarlı büyüme de gösterebilir. Örneğin, 40°C veya daha üzeri gibi yüksek bir sıcaklıkta hipotonik ortamda hücreler büyüme göstermez veya düşük büyüme hızı gösterir veya hücreler ölür.

- 5 “İzojenik” terimi bu buluş çerçevesinde, bu buluşun hücresinin genomunun, mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon dışında hücrenin elde edildiği yabancı tip hücreyle karşılaştırıldığında esas itibarıyla aynı veya aynı genomik diziye sahip olduğu anlamına gelmektedir. Bu düzenlemede hücrenin genomu hiçbir başka doğal olarak oluşmayan veya
- 10 genetik olarak tasarlanmış mutasyon içermez. Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre, oluşabilecek doğal olarak oluşan mutasyonlar dikkate alınarak, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gereken modifikasyon haricinde yabancı tip hücreyle esas itibarıyla aynı genomik diziye sahip olabilir. Bir
- 15 düzenlemede, bu buluşa uygun hücre, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon dışında yabancı tip hücreyle tam aynı genomik diziye sahip olabilir.

“Yabancı tip” terimi bu buluş çerçevesinde doğada oluşabildiği veya çevreden izole edilebildiği haliyle, genetik olarak tasarlanmış mutasyonlar taşımayan bir gram negatif bakteri suşu anlamındadır. Yabancı tip bir *E. coli* suşu W3110, örneğin W3110 K-12 suşudur.

- 20 Bu buluşun rekombinant hücresini üretmek için ana hücre olarak herhangi bir uygun gram negatif bakteri kullanılabilir. Uygun gram negatif bakteriler arasında *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Shigella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *E. coli* yer alır. Tercihen ana hücre *E. coli*'dir. Bu buluşta *E. coli*'nin herhangi bir uygun suşu kullanılabilir,
- 25 ama tercihen bir yabancı tip W3110 suşu, örneğin K-12 W3110 kullanılır.

- Daha önce yaratılan ve rekombinant proteinleri eksprese etmek için kullanılan proteaz eksikliği olan bakteri suşlarıyla ilişkili bir sakınca, örneğin *E. coli* suşlarında *phoA*, *fhuA*, *lac*, *rec*, *gal*, *ara*, *arg*, *thi* ve *pro* gibi hücre metabolizmasında ve DNA replikasyonunda rol oynayan genlerin ek mutasyonlarını içermeleridir. Bu mutasyonların hücre büyümesi,
- 30 stabilite, rekombinant protein ekspresyon verimi ve toksisite üzerindeki etkiler de dâhil olmak üzere konakçı hücre üzerinde birçok zararlı etkisi olabilmektedir. Bu genomik mutasyonların birine veya daha fazlasına sahip suşlar, özellikle çok sayıda bu tür mutasyonlara sahip suşlar, bakteri üreme hızını sınırlı proteini üretimi için uygun olmayan bir seviyeye düşüren bir

uygunluk kaybı gösterebilmektedir. Ayrıca, yukarıdaki genomik mutasyonların herhangi biri cis'te ve/veya trans'ta başka genleri öngörülemeyen zararlı şekillerde etkileyebilir, böylece suşun fenotipini, uygunluğunu ve protein profilini değiştirebilir. Ayrıca aşırı bir şekilde mutasyondan geçmiş hücrelerin kullanılması, ticari kullanıma yönelik proteinler, özellikle

5 terapötik maddeler üretmek için genellikle uygun değildir, çünkü bu suşlar genellikle kusurlu metabolik yollara sahiptir ve dolayısıyla minimal veya kimyasal olarak tanımlı ortamlarda pek üremeyebilir veya hiç üremeyebilir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun bir hücre, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon dışında bir

10 yabancı tip bakteri hücrelerine izojeniktir. Mutasyonları dâhil etmek için hücrenin genomunda sadece minimal mutasyonlar yapılır. Hücreler, hücrenin üremesi ve/veya ilgilenilen bir proteini eksprese etme kabiliyeti üzerinde zararlı etkileri olabilecek başka mutasyonlar taşımaz. Dolayısıyla, bu buluşun rekombinant konakçı hücrelerinin biri veya daha fazlası genomik dizide genetik olarak tasarlanmış başka mutasyonlar içeren hücrelerle

15 karşılaştırıldığında artmış protein ekspresyonu ve/veya gelişmiş büyüme özellikleri gösterebilmektedir. Bu buluşun sunduğu hücreler, hücre genomunda başka bozulmalar içeren hücrelerle karşılaştırıldığında terapötik proteinlerin üretiminde kullanım için daha uygundur.

Tercih edilen bir düzenlemede, hücre, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreyle karşılaştırıldığında Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon hariç

20 olmak üzere bir yabancı tip *E. coli* hücrelerine, örneğin W3110 suşuna izojeniktir.

Bu buluşun hücresi ayrıca ilgilenilen proteini kodlayan bir polinükleotit içermesiyle bir yabancı tip hücreden farklılaşabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit dizisi eksojen veya endojen olabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit hücreye transforme edilen ve/veya konakçı hücrenin genomu içine entegre edilen uygun bir ekspresyon vektörü içinde

25 bulunabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotidin konakçı hücrenin genomu içine eklendiği düzenlemede, bu buluşun hücresi ilgilenilen proteini kodlayan eklenmiş polinükleotit dizisiyle de bir yabancı tip hücreden farklı olacaktır. Tercihen polinükleotit hücre içindeki bir ekspresyon vektörü içindedir, böylece konakçı hücrenin genomunda minimal bozulmaya neden olur.

30 spr proteini bir *E. coli* membrana bağlı periplazmik proteazıdır.

spr proteininin yabancı tip amino asit dizisi sinyal dizisi N-terminalde olmak üzere DİZİ İD NO:21'de ve 26 amino asitli sinyal dizisi olmadan DİZİ İD NO:22'de gösterilmektedir

uygunluk kaybı gösterebilmektedir. Ayrıca, yukarıdaki genomik mutasyonların herhangi biri cis'te ve/veya trans'ta başka genleri öngörülemez zararlı şekillerde etkileyebilir, böylece suşun fenotipini, uygunluğunu ve protein profilini değiştirebilir. Ayrıca aşırı bir şekilde mutasyondan geçmiş hücrelerin kullanılması, ticari kullanıma yönelik proteinler, özellikle

5 terapötik maddeler üretmek için genellikle uygun değildir, çünkü bu suşlar genellikle kusurlu metabolik yollara sahiptir ve dolayısıyla minimal veya kimyasal olarak tanımlı ortamlarda pek üremeyebilir veya hiç üremeyebilir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun bir hücre, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreye kıyasla Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon dışında bir

10 yabancı tip bakteri hücrelerine izojeniktir. Mutasyonları dâhil etmek için hücrenin genomunda sadece minimal mutasyonlar yapılır. Hücreler, hücrenin üremesi ve/veya ilgilenilen bir proteini eksprese etme kabiliyeti üzerinde zararlı etkileri olabilecek başka mutasyonlar taşımaz. Dolayısıyla, bu buluşun rekombinant konakçı hücrelerinin biri veya daha fazlası genomik dizide genetik olarak tasarlanmış başka mutasyonlar içeren hücrelerle

15 karşılaştırıldığında artmış protein ekspresyonu ve/veya gelişmiş büyüme özellikleri gösterebilmektedir. Bu buluşun sunduğu hücreler, hücre genomunda başka bozulmalar içeren hücrelerle karşılaştırıldığında terapötik proteinlerin üretiminde kullanım için daha uygundur.

Tercih edilen bir düzenlemede, hücre, mutasyondan geçmiş spr geni ve bir yabancı tip hücreyle karşılaştırıldığında Tsp protein aktivitesini azaltmak için gerekli olan modifikasyon hariç

20 olmak üzere bir yabancı tip *E. coli* hücrelerine, örneğin W3110 suşuna izojeniktir.

Bu buluşun hücresi ayrıca ilgilenilen proteini kodlayan bir polinükleotit içermesiyle bir yabancı tip hücreden farklılaşabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit dizisi eksojen veya endojen olabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit hücreye transforme edilen ve/veya konakçı hücrenin genomu içine entegre edilen uygun bir ekspresyon vektörü içinde

25 bulunabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotidin konakçı hücrenin genomu içine eklendiği düzenlemede, bu buluşun hücresi ilgilenilen proteini kodlayan eklenmiş polinükleotit dizisiyle de bir yabancı tip hücreden farklı olacaktır. Tercihen polinükleotit hücre içindeki bir ekspresyon vektörü içindedir, böylece konakçı hücrenin genomunda minimal bozulmaya neden olur.

30 spr proteini bir *E. coli* membrana bağlı periplazmik proteazıdır.

spr proteininin yabancı tip amino asit dizisi sinyal dizisi N-terminalde olmak üzere DİZİ İD NO:21'de ve 26 amino asitli sinyal dizisi olmadan DİZİ İD NO:22'de gösterilmektedir

(UniProt Erişim Numarası P0AFV4'e göre). Bu buluşta spr protein dizisinin amino asit numaralandırması sinyal dizisini içermektedir. Dolayısıyla, spr proteininin 1. amino asidi DİZİ İD NO: 21'de gösterilen ilk amino asittir (Met).

Mutasyondan geçmiş spr geni hücrenin kromozomal spr genidir.

- 5 Mutasyondan geçmiş spr geni, ayrıca mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteinini kodlar. Mutasyondan geçmiş bir Tsp geni taşıyan hücreler iyi bir hücre büyümesi hızına sahip olabilir ama bu hücrelerin bir dezavantajı özellikle yüksek hücre yoğunluklarında lize olma eğilimleridir. Dolayısıyla, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipi özellikle yüksek hücre yoğunluklarında lize
- 10 olma eğilimidir. Mutasyondan geçmiş bir Tsp geni taşıyan hücreler ayrıca düşük ozmolaritede ısıya duyarlı büyüme gösterir. Ancak, bu buluşun hücreleri tarafından uygulanan spr mutasyonları, Tsp aktivitesi azalmış bir hücre içine dâhil edildiklerinde, azalmış Tsp fenotipini bastırır ve dolayısıyla hücreler özellikle yüksek bir hücre yoğunluğunda azalmış lizis gösterir. Bir hücrenin büyüme fenotipi bu alanda uzman olanlar tarafından çalkalama
- 15 şişesi veya yüksek hücre yoğunluklu fermantasyon tekniği sırasında kolayca ölçülebilir. Hücre lizisi fenotipinin bastırılması, özellikle periplazmada, spr mutantı taşıyan ve Tsp aktivitesi Tsp mutantı ve bir yabancı tip spr taşıyan bir hücreye göre azalmış bir hücrenin gösterdiği artan büyüme hızından ve/veya rekombinant protein üretiminden görülebilir.

- Bu buluşa uygun hücreler N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115,
- 20 D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147 ve H157 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip, tercihen C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 ve H157 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni içerir. Bu düzenlemede, spr proteini tercihen herhangi bir başka mutasyona sahip değildir.

- 25 Yukarıdaki amino asitlerin birinin veya daha fazlasının mutasyonu amino asidi kodlayan nükleotitlerin birine, ikisine veya üçüne herhangi bir uygun missens mutasyon (yanlış anlamlı mutasyon) olabilir. Mutasyon amino asit kalıntısını, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen mutasyondan geçmiş bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun amino asitle değiştirir. Missens mutasyon amino asidi, yabancı tip amino
- 30 asitle karşılaştırıldığında farklı bir büyüklüğe ve/veya farklı kimyasal özelliklere sahip bir amino aside dönüştürebilir.

Bir düzenlemede, mutant spr geni C94A, S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D veya G,

(UniProt Erişim Numarası P0AFV4'e göre). Bu buluşta spr protein dizisinin amino asit numaralandırması sinyal dizisini içermektedir. Dolayısıyla, spr proteininin 1. amino asidi DİZİ İD NO: 21'de gösterilen ilk amino asittir (Met).

Mutasyondan geçmiş spr geni hücrenin kromozomal spr genidir.

- 5 Mutasyondan geçmiş spr geni, ayrıca mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteinini kodlar. Mutasyondan geçmiş bir Tsp geni taşıyan hücreler iyi bir hücre büyümesi hızına sahip olabilir ama bu hücrelerin bir dezavantajı özellikle yüksek hücre yoğunluklarında lize olma eğilimleridir. Dolayısıyla, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipi özellikle yüksek hücre yoğunluklarında lize
- 10 olma eğilimidir. Mutasyondan geçmiş bir Tsp geni taşıyan hücreler ayrıca düşük ozmolaritede ısıya duyarlı büyüme gösterir. Ancak, bu buluşun hücreleri tarafından uygulanan spr mutasyonları, Tsp aktivitesi azalmış bir hücre içine dâhil edildiklerinde, azalmış Tsp fenotipini bastırır ve dolayısıyla hücreler özellikle yüksek bir hücre yoğunluğunda azalmış lizis gösterir. Bir hücrenin büyüme fenotipi bu alanda uzman olanlar tarafından çalkalama
- 15 şişesi veya yüksek hücre yoğunluklu fermantasyon tekniği sırasında kolayca ölçülebilir. Hücre lizisi fenotipinin bastırılması, özellikle periplazmada, spr mutantı taşıyan ve Tsp aktivitesi Tsp mutantı ve bir yabancı tip spr taşıyan bir hücreye göre azalmış bir hücrenin gösterdiği artan büyüme hızından ve/veya rekombinant protein üretiminden görülebilir.

- Bu buluşa uygun hücreler N31, R62, I70, Q73, C94, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115,
- 20 D133, V135, L136, G140, R144, H145, G147 ve H157 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip, tercihen C94, S95, V98, Y115, D133, V135, H145, G147 ve H157 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlayan bir mutant spr geni içerir. Bu düzenlemede, spr proteini tercihen herhangi bir başka mutasyona sahip değildir.

- 25 Yukarıdaki amino asitlerin birinin veya daha fazlasının mutasyonu amino asidi kodlayan nükleotitlerin birine, ikisine veya üçüne herhangi bir uygun missens mutasyon (yanlış anlamlı mutasyon) olabilir. Mutasyon amino asit kalıntısını, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen mutasyondan geçmiş bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun amino asitle değiştirir. Missens mutasyon amino asidi, yabancı tip amino
- 30 asitle karşılaştırıldığında farklı bir büyüklüğe ve/veya farklı kimyasal özelliklere sahip bir amino aside dönüştürebilir.

Bir düzenlemede, mutant spr geni C94A, S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D veya G,

H145A, G147C ve H157A arasından seçilen bir veya daha fazla mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede mutasyon C94, H145 ve H157 amino asit kalıntıları katalitik üçlüsünün biri, ikisi veya üçündedir (Solution NMR Structure of the NlpC/P60 Domain of Lipoprotein Spr from Escherichia coli Structural Evidence for a Novel Cysteine Peptidase Catalytic Triad, Biochemistry, 2008, 47, 9715-9717).

Dolayısıyla mutasyondan geçmiş spr geni C94'te bir mutasyon; veya H145'te bir mutasyon; veya H157'de bir mutasyon; veya C94 ve H145'te bir mutasyon; veya C94 ve H157'de bir mutasyon; veya H145 ve H157'de bir mutasyon; veya C94, H145 ve H157'de bir mutasyon içerebilir.

Bu düzenlemede, spr proteini tercihen herhangi bir başka mutasyona sahip değildir.

C94, H145 ve H157'nin biri, ikisi veya üçü mutasyonla, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin C94, H145 ve H157'nin biri, ikisi veya üçü mutasyonla Gly veya Ala gibi bir küçük amino aside dönüştürülebilir. Dolayısıyla, spr proteini C94A, H145A ve H157A mutasyonlarının birine, ikisine veya üçüne sahip olabilir. Bir düzenlemede, spr geni, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteini ürettiği tespit edilen missens mutasyon C94A'yı içerir. Başka bir düzenlemede, spr geni, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteini ürettiği tespit edilen missens mutasyon H145A'yı içerir.

Burada bir substitüsyon mutanti için adlandırma, bir harf, ardından bir sayı, ardından bir harften oluşur. İlk harf yabani tip proteindeki amino asidi belirtir. Sayı amino asit substitüsyonunun yapılmakta olduğu amino asit pozisyonunu belirtir ve ikinci harf yabani tip amino asidin yerine kullanılan amino asidi belirtir

Bir düzenlemede mutant spr proteini N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyon, tercihen S95, V98, Y115, D133, V135 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyon içerir. Bu düzenlemede spr proteini tercihen başka herhangi bir mutasyon içermez. Dolayısıyla, mutasyondan geçmiş spr geni N31'de bir mutasyon; veya R62'de bir mutasyon; veya 170'te bir mutasyon; veya Q73'te bir mutasyon; veya S95'de bir mutasyon; veya V98'de bir mutasyon; veya Q99'da bir mutasyon; veya R100'de bir mutasyon; veya L108'de bir mutasyon; veya Y115'te bir mutasyon; veya D133'te bir mutasyon; veya V135'te bir mutasyon; veya L136'da bir mutasyon; veya G140'ta bir

H145A, G147C ve H157A arasından seçilen bir veya daha fazla mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede mutasyon C94, H145 ve H157 amino asit kalıntıları katalitik üçlüsünün biri, ikisi veya üçündedir (Solution NMR Structure of the NlpC/P60 Domain of Lipoprotein Spr from Escherichia coli Structural Evidence for a Novel Cysteine Peptidase Catalytic Triad, Biochemistry, 2008, 47, 9715-9717).

Dolayısıyla mutasyondan geçmiş spr geni C94'te bir mutasyon; veya H145'te bir mutasyon; veya H157'de bir mutasyon; veya C94 ve H145'te bir mutasyon; veya C94 ve H157'de bir mutasyon; veya H145 ve H157'de bir mutasyon; veya C94, H145 ve H157'de bir mutasyon içerebilir.

Bu düzenlemede, spr proteini tercihen herhangi bir başka mutasyona sahip değildir.

C94, H145 ve H157'nin biri, ikisi veya üçü mutasyonla, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin C94, H145 ve H157'nin biri, ikisi veya üçü mutasyonla Gly veya Ala gibi bir küçük amino aside dönüştürülebilir. Dolayısıyla, spr proteini C94A, H145A ve H157A mutasyonlarının birine, ikisine veya üçüne sahip olabilir. Bir düzenlemede, spr geni, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteini ürettiği tespit edilen missens mutasyon C94A'yı içerir. Başka bir düzenlemede, spr geni, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteini ürettiği tespit edilen missens mutasyon H145A'yı içerir.

Burada bir substitüsyon mutanti için adlandırma, bir harf, ardından bir sayı, ardından bir harften oluşur. İlk harf yabancı tip proteindeki amino asidi belirtir. Sayı amino asit substitüsyonunun yapılmakta olduğu amino asit pozisyonunu belirtir ve ikinci harf yabancı tip amino asidin yerine kullanılan amino asidi belirtir

Bir düzenlemede mutant spr proteini N31, R62, I70, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyon, tercihen S95, V98, Y115, D133, V135 ve G147 arasından seçilen bir veya daha fazla amino asitte bir mutasyon içerir. Bu düzenlemede spr proteini tercihen başka herhangi bir mutasyon içermez. Dolayısıyla, mutasyondan geçmiş spr geni N31'de bir mutasyon; veya R62'de bir mutasyon; veya 170'te bir mutasyon; veya Q73'te bir mutasyon; veya S95'de bir mutasyon; veya V98'de bir mutasyon; veya Q99'da bir mutasyon; veya R100'de bir mutasyon; veya L108'de bir mutasyon; veya Y115'te bir mutasyon; veya D133'te bir mutasyon; veya V135'te bir mutasyon; veya L136'da bir mutasyon; veya G140'ta bir

mutasyon; veya R144'te bir mutasyon; veya G147'de bir mutasyon içerir.

Bir düzenlemede mutant spr proteini, amino asitler S95 ve Y115; veya N31, Q73, R100 ve G140; veya Q73, R100 ve G140; veya R100 ve G140; veya Q73 ve G140; veya Q73 ve R100; veya R62, Q99 ve R144; veya Q99 ve R144'te birden fazla mutasyon içerir.

- 5 Amino asitler N31, R62,170, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 ve G147'nin biri veya daha fazlası mutasyondan geçirilerek, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin N31, R62, 170, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140 ve R144'ün biri veya daha fazlası
- 10 mutasyondan geçirilerek Gy veya Ala gibi bir küçük amino aside dönüştürülebilir.

- Bir düzenlemede spr proteini aşağıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerir: N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D veya V135G, L136P, G140C, R144C ve G147C. Bir düzenlemede spr proteini aşağıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerir: S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D veya
- 15 V135G ve G147C. Bu düzenlemede, spr proteini tercihen başka mutasyonlar içermez.

- Bir düzenlemede spr proteini N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D veya V135G, L136P, G140C, R144C ve G147C arasından seçilen bir mutasyona sahiptir. Bu düzenlemede, spr proteini tercihen herhangi bir başka mutasyon içermez.
- 20 Başka bir düzenlemede spr proteini S95F ve Y115F; N31Y, Q73R, R100G ve G140C; Q73R, R100G ve G140C; R100G ve G140C; Q73R ve G140C; Q73R ve R100G; R62C, Q99P ve R144C; veya Q99P ve R144C arasından seçilen birden fazla mutasyon içerir.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir C94A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

- 25 Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir V103E mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir D133A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

- Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir V135D mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.
- 30

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir V135A mutasyonuna sahip bir spr

mutasyon; veya R144'te bir mutasyon; veya G147'de bir mutasyon içerir.

Bir düzenlemede mutant spr proteini, amino asitler S95 ve Y115; veya N31, Q73, R100 ve G140; veya Q73, R100 ve G140; veya R100 ve G140; veya Q73 ve G140; veya Q73 ve R100; veya R62, Q99 ve R144; veya Q99 ve R144'te birden fazla mutasyon içerir.

- 5 Amino asitler N31, R62,170, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140, R144 ve G147'nin biri veya daha fazlası mutasyondan geçirilerek, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin N31, R62, 170, Q73, S95, V98, Q99, R100, L108, Y115, D133, V135, L136, G140 ve R144'ün biri veya daha fazlası
- 10 mutasyondan geçirilerek Gy veya Ala gibi bir küçük amino aside dönüştürülebilir.

- Bir düzenlemede spr proteini aşağıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerir: N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D veya V135G, L136P, G140C, R144C ve G147C. Bir düzenlemede spr proteini aşağıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerir: S95F, V98E, Y115F, D133A, V135D veya
- 15 V135G ve G147C. Bu düzenlemede, spr proteini tercihen başka mutasyonlar içermez.

- Bir düzenlemede spr proteini N31Y, R62C, I70T, Q73R, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D veya V135G, L136P, G140C, R144C ve G147C arasından seçilen bir mutasyona sahiptir. Bu düzenlemede, spr proteini tercihen herhangi bir başka mutasyon içermez.
- 20 Başka bir düzenlemede spr proteini S95F ve Y115F; N31Y, Q73R, R100G ve G140C; Q73R, R100G ve G140C; R100G ve G140C; Q73R ve G140C; Q73R ve R100G; R62C, Q99P ve R144C; veya Q99P ve R144C arasından seçilen birden fazla mutasyon içerir.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir C94A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

- 25 Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir V103E mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir D133A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

- Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir V135D mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.
- 30

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir V135A mutasyonuna sahip bir spr

proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir H145A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

5 Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir G147C mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir H157A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni H145A, H157A ve D133A arasından seçilen bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

10 Bu buluşun bir düzenlemesinde, spr geninde, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun mutasyon veya mutasyonlar yapılabilir. Tercihen spr proteini aşağıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerebilir: N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D, V135G, L136P, G140C, R144C, H145A, G147C, H157A ve
15 W174R. Bir düzenlemede spr proteini W174R mutasyonunu içermez. Tercihen spr geni yukarıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerir.

Bu buluşa uygun hücrelerde Tsp protein aktivitesi bir yabancı tip hücreye göre azalmıştır. “Bir yabancı tip hücreye göre azalmış Tsp protein aktivitesi” ifadesi, hücrenin Tsp aktivitesinin bir yabancı tip hücrenin Tsp aktivitesine kıyasla azaldığı anlamındadır. Tsp aktivitesini azaltmak
20 için hücre herhangi bir uygun yolla modifiye edilebilir.

Bir düzenlemede, azalmış Tsp aktivitesi Tsp’yi kodlayan endojen polinükleotidin ve/veya ilişkili regülatör ekspresyon dizilerinin modifikasyonundan kaynaklanır. Modifikasyon Tsp gen transkripsiyonunu ve translasyonunu azaltabilir veya durdurabilir veya proteaz aktivitesi yabancı tip Tsp proteinine göre azalmış olan eksprese edilmiş bir Tsp proteini temin edebilir.

25 Bir düzenlemede, ilişkili bir regülatör ekspresyon dizisi Tsp ekspresyonunu azaltmak için modifiye edilir. Örneğin Tsp geni için promotör, genin ekspresyonunu önlemek için mutasyondan geçirilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücreler proteaz aktivitesi azalmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir Tsp geni veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan
30 geçmiş bir Tsp geni taşır.

Tercihen kromozomal Tsp geni mutasyondan geçmiştir.

proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir H145A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

5 Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir G147C mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni bir H157A mutasyonuna sahip bir spr proteinini kodlar.

Bir düzenlemede, mutasyondan geçmiş spr geni H145A, H157A ve D133A arasından seçilen bir mutasyona sahip bir spr proteinini kodlar.

10 Bu buluşun bir düzenlemesinde, spr geninde, mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içeren bir hücrenin fenotipini bastırabilen bir spr proteiniyle sonuçlanan herhangi bir uygun mutasyon veya mutasyonlar yapılabilir. Tercihen spr proteini aşağıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerebilir: N31Y, R62C, I70T, Q73R, C94A, S95F, V98E, Q99P, R100G, L108S, Y115F, D133A, V135D, V135G, L136P, G140C, R144C, H145A, G147C, H157A ve
15 W174R. Bir düzenlemede spr proteini W174R mutasyonunu içermez. Tercihen spr geni yukarıdaki mutasyonların birini veya daha fazlasını içerir.

Bu buluşa uygun hücrelerde Tsp protein aktivitesi bir yabancı tip hücreye göre azalmıştır. “Bir yabancı tip hücreye göre azalmış Tsp protein aktivitesi” ifadesi, hücrenin Tsp aktivitesinin bir yabancı tip hücrenin Tsp aktivitesine kıyasla azaldığı anlamındadır. Tsp aktivitesini azaltmak
20 için hücre herhangi bir uygun yolla modifiye edilebilir.

Bir düzenlemede, azalmış Tsp aktivitesi Tsp’yi kodlayan endojen polinükleotidin ve/veya ilişkili regülatör ekspresyon dizilerinin modifikasyonundan kaynaklanır. Modifikasyon Tsp gen transkripsiyonunu ve translasyonunu azaltabilir veya durdurabilir veya proteaz aktivitesi yabancı tip Tsp proteinine göre azalmış olan eksprese edilmiş bir Tsp proteini temin edebilir.

25 Bir düzenlemede, ilişkili bir regülatör ekspresyon dizisi Tsp ekspresyonunu azaltmak için modifiye edilir. Örneğin Tsp geni için promotör, genin ekspresyonunu önlemek için mutasyondan geçirilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücreler proteaz aktivitesi azalmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir Tsp geni veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan
30 geçmiş bir Tsp geni taşır.

Tercihen kromozomal Tsp geni mutasyondan geçmiştir.

Burada “Tsp geni” Penisilin bağlayıcı protein 3 (PBP3) ve faj kuyruk proteinleri üzerinde etki yapabilen bir periplazmik proteaz olan proteaz Tsp’yi (Prc olarak da bilinir) bir geni belirtmek için kullanılmaktadır. Yabani tip Tsp geninin dizisi DİZİ İD NO: 1’de gösterilmektedir ve yabani tip Tsp proteininin dizisi DİZİ İD NO: 2’de gösterilmektedir.

- 5 Mutasyondan geçmiş Tsp genine veya Tsp’yi kodlayan mutasyondan geçmiş Tsp genine referans, aksi belirtilmedikçe, proteaz aktivitesi azaltılmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçirilmiş bir Tsp genine veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir Tsp genine referansta bulunmaktadır.

- 10 “Proteaz aktivitesi azaltılmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş Tsp geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmiş Tsp geninin yabani tip mutasyondan geçmemiş Tsp geniyle karşılaştırıldığında tam proteaz aktivitesine sahip olmadığını belirtmektedir.

- 15 Tercihen mutasyondan geçmiş Tsp geni, mutasyondan geçmemiş bir yabani tip Tsp proteininin proteaz aktivitesinin %50’sine veya daha azına, %40’ına veya daha azına, %30’una veya daha azına, %20’sine veya daha azına, %10’una veya daha azına veya %5’ine veya daha azına sahip bir Tsp proteinini kodlar. Daha tercihen mutasyondan geçmiş Tsp geni hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir Tsp proteinini kodlar. Bu düzenlemede, hücrede kromozomal Tsp eksikliği yoktur, yani Tsp gen dizisi, Tsp proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir.

- 20 Proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için Tsp genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Bir gram negatif bakteriden eksprese edilen bir Tsp proteininin proteaz aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından Keiler ve diğerleri (Tsp’nin proteaz aktivitesinin test edildiği Identification of Active Site Residues of the Tsp Protease* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Cilt 270, No. 48, 1 Aralık sayısı, sayfa 28864-28868, 1995
- 25 Kenneth C. Keiler and Robert T. Sauer) tarafından açıklanan usul gibi, bu alanda bilinen herhangi bir uygulla kolayca test edilebilir.

- Keiler ve diğerleri (yukarıda) Tsp’nin S430, D441 ve K455 kalıntılarını içeren ve G375, G376, E433 ve T452 kalıntılarının Tsp yapısını korumak için önemli olduğu bir aktif yere sahip olduğunu açıklamışlardır. Keiler ve diğerleri (yukarıda) mutasyondan geçmiş Tsp
- 30 genleri S430A, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A ve T452A’nın hiçbir saptanabilir proteaz aktivitesine sahip olmadığı bulgusunu bildirmektedirler. Ayrıca mutasyondan geçmiş Tsp geni S430C’nin yaklaşık %5-10 yabani aktivite gösterdiği

Burada “Tsp geni” Penisilin bağlayıcı protein 3 (PBP3) ve faj kuyruk proteinleri üzerinde etki yapabilen bir periplazmik proteaz olan proteaz Tsp’yi (Prc olarak da bilinir) bir geni belirtmek için kullanılmaktadır. Yabani tip Tsp geninin dizisi DİZİ İD NO: 1’de gösterilmektedir ve yabani tip Tsp proteininin dizisi DİZİ İD NO: 2’de gösterilmektedir.

- 5 Mutasyondan geçmiş Tsp genine veya Tsp’yi kodlayan mutasyondan geçmiş Tsp genine referans, aksi belirtilmedikçe, proteaz aktivitesi azaltılmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçirilmiş bir Tsp genine veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir Tsp genine referansta bulunmaktadır.

- 10 “Proteaz aktivitesi azaltılmış bir Tsp proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş Tsp geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmiş Tsp geninin yabani tip mutasyondan geçmemiş Tsp geniyle karşılaştırıldığında tam proteaz aktivitesine sahip olmadığını belirtmektedir.

- 15 Tercihen mutasyondan geçmiş Tsp geni, mutasyondan geçmemiş bir yabani tip Tsp proteininin proteaz aktivitesinin %50’sine veya daha azına, %40’ına veya daha azına, %30’una veya daha azına, %20’sine veya daha azına, %10’una veya daha azına veya %5’ine veya daha azına sahip bir Tsp proteinini kodlar. Daha tercihen mutasyondan geçmiş Tsp geni hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir Tsp proteinini kodlar. Bu düzenlemede, hücrede kromozomal Tsp eksikliği yoktur, yani Tsp gen dizisi, Tsp proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir.

- 20 Proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için Tsp genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Bir gram negatif bakteriden eksprese edilen bir Tsp proteininin proteaz aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından Keiler ve diğerleri (Tsp’nin proteaz aktivitesinin test edildiği Identification of Active Site Residues of the Tsp Protease* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Cilt 270, No. 48, 1 Aralık sayısı, sayfa 28864-28868, 1995
- 25 Kenneth C. Keiler and Robert T. Sauer) tarafından açıklanan usul gibi, bu alanda bilinen herhangi bir uygulla kolayca test edilebilir.

- Keiler ve diğerleri (yukarıda) Tsp’nin S430, D441 ve K455 kalıntılarını içeren ve G375, G376, E433 ve T452 kalıntılarının Tsp yapısını korumak için önemli olduğu bir aktif yere sahip olduğunu açıklamışlardır. Keiler ve diğerleri (yukarıda) mutasyondan geçmiş Tsp
- 30 genleri S430A, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A ve T452A’nın hiçbir saptanabilir proteaz aktivitesine sahip olmadığı bulgusunu bildirmektedirler. Ayrıca mutasyondan geçmiş Tsp geni S430C’nin yaklaşık %5-10 yabani aktivite gösterdiği

bildirilmektedir. Dolayısıyla, proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için Tsp mutasyonu, S430, D441, K455, G375, G376, E433 ve T452 kalıntılarının birinde veya daha fazlasında bir missens mutasyon gibi bir mutasyon içerebilir. Tercihen proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için Tsp mutasyonu S430, D441 ve K455 aktif yer kalıntılarının birinde, ikisinde veya üçünde birden bir missens mutasyon gibi bir mutasyon içerebilir.

Dolayısıyla mutasyondan geçmiş Tsp geni S430'da bir mutasyon; veya D441'de bir mutasyon; veya K455'te bir mutasyon; veya S430 ve D441'de bir mutasyon; veya S430 ve K455'te bir mutasyon; veya D441 ve K455'te bir mutasyon; veya S430, D441 ve K455'te bir mutasyon içerebilir.

S430, D441, K455, G375, G376, E433 ve T452'nin biri veya daha fazlası mutasyondan geçirilerek, proteaz aktivitesi azalmış bir proteinle sonuçlanan herhangi bir amino aside dönüştürülebilir. Uygun mutasyonların örnekleri S430A, S430C, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A ve T452A'dır. Mutasyondan geçmiş Tsp geni aktif yer kalıntılarında bir, iki veya üç mutasyon içerebilir, örneğin gen S430A ve S430C; ve/veya D441A; ve/veya K455A veya K455H veya K455R'yi içerebilir.

Tercihen Tsp geni nokta mutasyonu S430A veya S430C'ye sahiptir.

“İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde genin, Tsp proteininin eksik olduğu bir hücre temin etmek için yabancı tip gen tarafından kodlanan Tsp proteininin ekspresyonunu önleyen bir veya daha fazla mutasyon içerdiği anlamına gelmektedir. İşlevi iptal edilmiş gen kısmen veya tamamen transkribe edilebilir ama kodlanmış protein içine translasyona tabi tutulmaz. İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni, genin hiç eksprese olmaması için, herhangi bir uygun yolla, örneğin bir veya daha fazla silinti, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyona tabi tutulabilir. Örneğin gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi yabancı bir DNA dizisi eklenerek genin işlevi iptal edilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, Tsp geni, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi yabancı bir DNA dizisinin eklenmesiyle mutasyona tabi tutulmaz. Bu düzenlemede, Tsp geni gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısında ve gen durdurma kodonunun akış yukarısında bulunan bir veya daha fazla durdurma kodonunda bir mutasyon içerebilir, böylece Tsp proteininin ekspresyonu önlenir. Başlatma kodonundaki mutasyon, başlatma kodonunun nükleotitlerinin birindeki, ikisindeki veya üçündeki bir missens mutasyon olabilir. Alternatif veya ek olarak, başlatma kodonu, bir ekleme veya silme

bildirilmektedir. Dolayısıyla, proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için Tsp mutasyonu, S430, D441, K455, G375, G376, E433 ve T452 kalıntılarının birinde veya daha fazlasında bir missens mutasyon gibi bir mutasyon içerebilir. Tercihen proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için Tsp mutasyonu S430, D441 ve K455 aktif yer kalıntılarının birinde, ikisinde veya üçünde birden bir missens mutasyon gibi bir mutasyon içerebilir.

Dolayısıyla mutasyondan geçmiş Tsp geni S430'da bir mutasyon; veya D441'de bir mutasyon; veya K455'te bir mutasyon; veya S430 ve D441'de bir mutasyon; veya S430 ve K455'te bir mutasyon; veya D441 ve K455'te bir mutasyon; veya S430, D441 ve K455'te bir mutasyon içerebilir.

S430, D441, K455, G375, G376, E433 ve T452'nin biri veya daha fazlası mutasyondan geçirilerek, proteaz aktivitesi azalmış bir proteinle sonuçlanan herhangi bir amino aside dönüştürülebilir. Uygun mutasyonların örnekleri S430A, S430C, D441A, K455A, K455H, K455R, G375A, G376A, E433A ve T452A'dır. Mutasyondan geçmiş Tsp geni aktif yer kalıntılarında bir, iki veya üç mutasyon içerebilir, örneğin gen S430A ve S430C; ve/veya D441A; ve/veya K455A veya K455H veya K455R'yi içerebilir.

Tercihen Tsp geni nokta mutasyonu S430A veya S430C'ye sahiptir.

“İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde genin, Tsp proteininin eksik olduğu bir hücre temin etmek için yabancı tip gen tarafından kodlanan Tsp proteininin ekspresyonunu önleyen bir veya daha fazla mutasyon içerdiği anlamına gelmektedir. İşlevi iptal edilmiş gen kısmen veya tamamen transkribe edilebilir ama kodlanmış protein içine translasyona tabi tutulmaz. İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni, genin hiç eksprese olmaması için, herhangi bir uygun yolla, örneğin bir veya daha fazla silinti, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyona tabi tutulabilir. Örneğin gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi yabancı bir DNA dizisi eklenerek genin işlevi iptal edilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, Tsp geni, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi yabancı bir DNA dizisinin eklenmesiyle mutasyona tabi tutulmaz. Bu düzenlemede, Tsp geni gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısında ve gen durdurma kodonunun akış yukarısında bulunan bir veya daha fazla durdurma kodonunda bir mutasyon içerebilir, böylece Tsp proteininin ekspresyonu önlenir. Başlatma kodonundaki mutasyon, başlatma kodonunun nükleotitlerinin birindeki, ikisindeki veya üçündeki bir missens mutasyon olabilir. Alternatif veya ek olarak, başlatma kodonu, bir ekleme veya silme

çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyona tabi tutulabilir. Tsp geni kodlama dizisinin 5' ucunda iki ATG kodonu içerir, ATG kodonlarının biri veya her ikisi bir missens mutasyonla mutasyondan geçirilebilir. Tsp geni ikinci ATG kodonunda (kodon 3) mutasyondan geçirilerek TCG'ye dönüştürülebilir. Tsp geni alternatif veya ek olarak gen başlatma

5 kodonunun akış aşağısında ve gen durdurma kodonunun akış yukarısında bir veya daha fazla durdurma kodonu içerebilir. Tercihen işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni hem başlatma kodonunda hem de bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonunda bir missens mutasyon içerir. Tercih edilen bir düzenlemede Tsp geni beşinci kodondan "T"yi silmek üzere mutasyondan geçirilir, böylece kodon 11 ve 16'da durdurma kodonlarıyla

10 sonuçlanan bir çerçeve kayması oluşturulur. Tercih edilen bir düzenlemede Tsp geni kodon 21'de üçüncü bir çerçeve içi durdurma kodonu yaratmak üzere bir Ase I kısıtlama yeri eklemek için mutasyondan geçirilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni, başlatma kodonunun akış yukarısında 6 nükleotit - ATGAAT - içeren DİZİ İD NO: 3'ün DNA dizisine

15 sahiptir. Bir düzenlemede, mutasyondan geçirilmiş Tsp geni DİZİ İD NO:3'ün 7. ila 2048. nükleotitlerinin DNA dizisine sahiptir.

Bu buluşta hücreler ayrıca protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir veya daha fazla gen taşır. Örnekler arasında FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi proteinler yer alır.

20 Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için protein FkpA, Skp veya bunların bir kombinasyonudur.

Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için protein FkpA veya bir FkpA ve Skp kombinasyonu arasından seçilir.

FkpA Swiss-Prot numarası P45523 olan bir peptidil-prolil cis-trans izomerazıdır.

25 Skp Swiss-Prot numarası P0AEU7 olan şaperon proteindir.

Protein katlanmasını kolaylaştırmak için, hangisi uygunsa, protein hücre genomunda bir gen tarafından kodlanabilir veya orada, örneğin bir plazmit üzerinde geçici olarak transfekte edilebilir veya bunların bir kombinasyonu uygulanabilir.

Buluşun rekombinant gram negatif bakteri hücresi DsbC'yi kodlayan bir rekombinant

30 polinükleotit içermez.

Bu buluşun bir düzenlemesinde, rekombinant gram negatif bakteri hücresi ayrıca şaperon

çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyona tabi tutulabilir. Tsp geni kodlama dizisinin 5' ucunda iki ATG kodonu içerir, ATG kodonlarının biri veya her ikisi bir missens mutasyonla mutasyondan geçirilebilir. Tsp geni ikinci ATG kodonunda (kodon 3) mutasyondan geçirilerek TCG'ye dönüştürülebilir. Tsp geni alternatif veya ek olarak gen başlatma

5 kodonunun akış aşağısında ve gen durdurma kodonunun akış yukarısında bir veya daha fazla durdurma kodonu içerebilir. Tercihen işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni hem başlatma kodonunda hem de bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonunda bir missens mutasyon içerir. Tercih edilen bir düzenlemede Tsp geni beşinci kodondan "T"yi silmek üzere mutasyondan geçirilir, böylece kodon 11 ve 16'da durdurma kodonlarıyla

10 sonuçlanan bir çerçeve kayması oluşturulur. Tercih edilen bir düzenlemede Tsp geni kodon 21'de üçüncü bir çerçeve içi durdurma kodonu yaratmak üzere bir Ase I kısıtlama yeri eklemek için mutasyondan geçirilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş Tsp geni, başlatma kodonunun akış yukarısında 6 nükleotit - ATGAAT - içeren DİZİ İD NO: 3'ün DNA dizisine

15 sahiptir. Bir düzenlemede, mutasyondan geçirilmiş Tsp geni DİZİ İD NO:3'ün 7. ila 2048. nükleotitlerinin DNA dizisine sahiptir.

Bu buluşta hücreler ayrıca protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir veya daha fazla gen taşır. Örnekler arasında FkpA, Skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi proteinler yer alır.

20 Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için protein FkpA, Skp veya bunların bir kombinasyonudur.

Bir düzenlemede, protein katlanmasını kolaylaştırmak için protein FkpA veya bir FkpA ve Skp kombinasyonu arasından seçilir.

FkpA Swiss-Prot numarası P45523 olan bir peptidil-prolil cis-trans izomerazıdır.

25 Skp Swiss-Prot numarası P0AEU7 olan şaperon proteindir.

Protein katlanmasını kolaylaştırmak için, hangisi uygunsa, protein hücre genomunda bir gen tarafından kodlanabilir veya orada, örneğin bir plazmit üzerinde geçici olarak transfekte edilebilir veya bunların bir kombinasyonu uygulanabilir.

Buluşun rekombinant gram negatif bakteri hücresi DsbC'yi kodlayan bir rekombinant

30 polinükleotit içermez.

Bu buluşun bir düzenlemesinde, rekombinant gram negatif bakteri hücresi ayrıca şaperon

aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni ve/veya mutasyondan geçmiş bir ptr geni (burada mutasyondan geçmiş ptr geni azalmış proteaz aktivitesine sahip bir Proteaz III proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir ptr genidir) ve/veya mutasyondan geçmiş bir OmpT geni içerir, burada mutasyondan geçmiş OmpT geni proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir OmpT genidir.

Bu düzenlemede, hücrenin genomu yukarıdaki mutasyonlar dışında bir yabancı tip bakteri hücrene izojeniktir.

Burada “DegP” bir şaperon ve bir proteaz olarak ikili işleve sahip, DegP proteinini (HtrA olarak da bilinir) kodlayan bir geni belirtmek için kullanılmaktadır (Families of serine peptidases; Rawlings ND, Barrett AJ. *Methods Enzymol.* 1994;244:19-61). Mutasyondan geçmemiş DegP geninin dizisi DİZİ İD NO: 7’de gösterilmektedir ve mutasyondan geçmemiş DegP proteininin dizisi DİZİ İD NO: 8’de gösterilmektedir.

Düşük sıcaklıklarda DegP bir şaperon olarak işlev görür ve yüksek sıcaklıklarda DegP bir proteaz olarak işlev görme eğilimindedir (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell*, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) ve The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures, Skorko-Glonek J ve diğerleri, *Microbiology* 2008, 154, 3649-3658).

Hücrenin DegP mutasyonunu içerdiği düzenlemelerde, hücredeki DegP mutasyonu, şaperon aktivitesine sahip ama tam proteaz aktivitesine sahip olmayan bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni temin eder.

“Şaperon aktivitesine sahip” ifadesi, bu buluş çerçevesinde, mutasyondan geçmiş DegP proteininin yabancı tip mutasyondan geçmemiş DegP proteiniyle aynı veya esas itibarıyla aynı şaperon aktivitesine sahip olduğu anlamına gelmektedir. Tercihen, mutasyondan geçmiş DegP geni, bir yabancı tip mutasyondan geçmemiş DegP proteininin şaperon aktivitesinin %50’sine veya daha fazlasına, %60’ına veya daha fazlasına, %70’ine veya daha fazlasına, %80’ine veya daha fazlasına, %90’ına veya daha fazlasına, %95’ine veya daha fazlasına sahip bir DegP proteinini kodlar. Daha tercihen, mutasyondan geçmiş DegP geni yabancı tip DegP’yle aynı şaperon aktivitesine sahip bir DegP proteinini kodlar.

“Azalmış proteaz aktivitesine sahip” ifadesi, bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmiş DegP proteininin yabancı tip mutasyondan geçmemiş DegP proteiniyle karşılaştırıldığında tam

aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni ve/veya mutasyondan geçmiş bir ptr geni (burada mutasyondan geçmiş ptr geni azalmış proteaz aktivitesine sahip bir Proteaz III proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir ptr genidir) ve/veya mutasyondan geçmiş bir OmpT geni içerir, burada mutasyondan geçmiş OmpT geni proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir OmpT genidir.

Bu düzenlemede, hücrenin genomu yukarıdaki mutasyonlar dışında bir yabancı tip bakteri hücrene izojeniktir.

Burada “DegP” bir şaperon ve bir proteaz olarak ikili işleve sahip, DegP proteinini (HtrA olarak da bilinir) kodlayan bir geni belirtmek için kullanılmaktadır (Families of serine peptidases; Rawlings ND, Barrett AJ. *Methods Enzymol.* 1994;244:19-61). Mutasyondan geçmemiş DegP geninin dizisi DİZİ İD NO: 7’de gösterilmektedir ve mutasyondan geçmemiş DegP proteininin dizisi DİZİ İD NO: 8’de gösterilmektedir.

Düşük sıcaklıklarda DegP bir şaperon olarak işlev görür ve yüksek sıcaklıklarda DegP bir proteaz olarak işlev görme eğilimindedir (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell*, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) ve The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures, Skorko-Glonek J ve diğerleri, *Microbiology* 2008, 154, 3649-3658).

Hücrenin DegP mutasyonunu içerdiği düzenlemelerde, hücredeki DegP mutasyonu, şaperon aktivitesine sahip ama tam proteaz aktivitesine sahip olmayan bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni temin eder.

“Şaperon aktivitesine sahip” ifadesi, bu buluş çerçevesinde, mutasyondan geçmiş DegP proteininin yabancı tip mutasyondan geçmemiş DegP proteiniyle aynı veya esas itibarıyla aynı şaperon aktivitesine sahip olduğu anlamına gelmektedir. Tercihen, mutasyondan geçmiş DegP geni, bir yabancı tip mutasyondan geçmemiş DegP proteininin şaperon aktivitesinin %50’sine veya daha fazlasına, %60’ına veya daha fazlasına, %70’ine veya daha fazlasına, %80’ine veya daha fazlasına, %90’ına veya daha fazlasına, %95’ine veya daha fazlasına sahip bir DegP proteinini kodlar. Daha tercihen, mutasyondan geçmiş DegP geni yabancı tip DegP’yle aynı şaperon aktivitesine sahip bir DegP proteinini kodlar.

“Azalmış proteaz aktivitesine sahip” ifadesi, bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmiş DegP proteininin yabancı tip mutasyondan geçmemiş DegP proteiniyle karşılaştırıldığında tam

proteaz aktivitesine sahip olmadığı anlamına gelmektedir. Tercihen mutasyondan geçmiş DegP geni, yabancı tip bir mutasyondan geçmemiş DegP proteininin proteaz aktivitesinin %50'sine veya daha azına, %40'ına veya daha azına, %30'una veya daha azına, %20'sine veya daha azına, %10'una veya daha azına veya %5'ine veya daha azına sahip bir DegP proteinini kodlar. Daha tercihen mutasyondan geçmiş DegP geni, hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir DegP proteinini kodlar. Hücrede kromozomal DegP eksikliği yoktur, yani DegP proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için DegP gen dizisi silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir.

Şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir protein üretmek için DegP genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Gram negatif bir bakteriden eksprese edilen bir DegP proteininin proteaz ve şaperon aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından, DegP'nin proteaz ve şaperon aktivitelerinin DegP'nin doğal bir substratı olan MalS üzerinde test edildiği Spiess ve diğerleri, A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein'de (Cell, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) açıklanan usul ve ayrıca The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from Escherichia coli at low temperatures, Skorko-Glonek J ve diğerleri, Microbiology 2008, 154, 3649-3658'da açıklanan usul gibi herhangi bir uygun usulle kolayca test edilebilir.

DegP bir serin proteazdır ve His105, Asp135 ve Ser210 amino asit kalıntıları katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif merkeze sahiptir (Families of serine peptidases, Methods Enzymol., 1994, 244:19-61 Rawlings N ca Barrett A). Şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir protein üretmek için DegP mutasyonu, His105, Asp135 ve Ser210'un biri, ikisi veya üçünde bir missens mutasyon gibi bir mutasyon içerebilir.

Dolayısıyla mutasyondan geçmiş DegP geni His105'te bir mutasyon; veya Asp135'te bir mutasyon; veya Ser210'da bir mutasyon; veya His105 ve Asp135'te bir mutasyon; veya His105 ve Ser210'da bir mutasyon; veya Asp135 ve Ser210'da bir mutasyon; veya His105, Asp135 ve Ser210'da bir mutasyon içerebilir.

His105, Asp135 ve Ser210'un biri, ikisi veya üçü mutasyona tabi tutularak, şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir proteinle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin His105, Asp135 ve Ser210'un biri, ikisi veya üçü mutasyona tabi tutularak Gly veya Ala gibi bir küçük amino aside dönüştürülebilir. Başka bir uygun mutasyon, His105, Asp135 ve Ser210'un birinin, ikisinin veya üçünün zıt özelliklere sahip bir amino aside dönüştürülmesidir, örneğin Asp135 mutasyonla Lys veya Arg'a

proteaz aktivitesine sahip olmadığı anlamına gelmektedir. Tercihen mutasyondan geçmiş DegP geni, yabancı tip bir mutasyondan geçmemiş DegP proteininin proteaz aktivitesinin %50'sine veya daha azına, %40'ına veya daha azına, %30'una veya daha azına, %20'sine veya daha azına, %10'una veya daha azına veya %5'ine veya daha azına sahip bir DegP proteinini kodlar. Daha tercihen mutasyondan geçmiş DegP geni, hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir DegP proteinini kodlar. Hücrede kromozomal DegP eksikliği yoktur, yani DegP proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için DegP gen dizisi silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir.

Şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir protein üretmek için DegP genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Gram negatif bir bakteriden eksprese edilen bir DegP proteininin proteaz ve şaperon aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından, DegP'nin proteaz ve şaperon aktivitelerinin DegP'nin doğal bir substratı olan MalS üzerinde test edildiği Spiess ve diğerleri, A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein'de (Cell, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M) açıklanan usul ve ayrıca The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from Escherichia coli at low temperatures, Skorko-Glonek J ve diğerleri, Microbiology 2008, 154, 3649-3658'da açıklanan usul gibi herhangi bir uygun usulle kolayca test edilebilir.

DegP bir serin proteazdır ve His105, Asp135 ve Ser210 amino asit kalıntıları katalitik üçlüsünden oluşan bir aktif merkeze sahiptir (Families of serine peptidases, Methods Enzymol., 1994, 244:19-61 Rawlings N ca Barrett A). Şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir protein üretmek için DegP mutasyonu, His105, Asp135 ve Ser210'un biri, ikisi veya üçünde bir missens mutasyon gibi bir mutasyon içerebilir.

Dolayısıyla mutasyondan geçmiş DegP geni His105'te bir mutasyon; veya Asp135'te bir mutasyon; veya Ser210'da bir mutasyon; veya His105 ve Asp135'te bir mutasyon; veya His105 ve Ser210'da bir mutasyon; veya Asp135 ve Ser210'da bir mutasyon; veya His105, Asp135 ve Ser210'da bir mutasyon içerebilir.

His105, Asp135 ve Ser210'un biri, ikisi veya üçü mutasyona tabi tutularak, şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir proteinle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin His105, Asp135 ve Ser210'un biri, ikisi veya üçü mutasyona tabi tutularak Gly veya Ala gibi bir küçük amino aside dönüştürülebilir. Başka bir uygun mutasyon, His105, Asp135 ve Ser210'un birinin, ikisinin veya üçünün zıt özelliklere sahip bir amino aside dönüştürülmesidir, örneğin Asp135 mutasyonla Lys veya Arg'a

dönüştürülür, polar His105 mutasyonla Gly, Ala, Val veya Leu gibi polar olmayan bir amino aside dönüştürülür ve küçük hidrofilik Ser210 mutasyonla Val, Leu, Phe veya Tyr gibi büyük veya hidrofobik bir kalıntıya dönüştürülür. Tercihen, DegP geni, şaperon aktivitesine sahip olan ama proteaz aktivitesine sahip olmayan bir protein ürettiği tespit edilen, Şekil 11c'de gösterildiği gibi, nokta mutasyonu S210A'yı içerir (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Cilt 97, sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

DegP, protein-protein etkileşimine aracılık eden iki PDZ sahasına sahiptir, PDN1 (kalıntı 260-358) ve PDZ2 (kalıntı 359-448) (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M). Bu buluşun bir düzenlemesinde, degP geni PDZ1 sahasını ve/veya PDZ2 sahasını silmek için mutasyona tabi tutulur. PDZ1 ve PDZ2'nin silinmesi, DegP proteininin proteaz aktivitesinin tamamen yok olması ve şaperon aktivitesinin yabancı tip DegP proteinine göre azalmasıyla sonuçlanır, PDZ1 veya PDZ2'nin silinmesi ise, %5 proteaz aktivitesi ve yabancı tip DegP proteinine benzer şaperon aktivitesiyle sonuçlanır (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

Mutasyondan geçirilmiş DegP geni, örneğin Şekil 7C'de gösterildiği gibi, bir tanımlama ve tarama usulüne yardım etmek için Ase I gibi sessiz bir doğal olarak oluşan kısıtlama yeri de içerebilir.

S210A nokta mutasyonunu ve bir Ase I kısıtlama markörü yeri içeren mutasyondan geçirilmiş DegP geninin tercih edilen dizisi DİZİ İD NO: 9'da verilmektedir ve kodlanmış protein dizisi DİZİ İD NO: 10'da gösterilmektedir.

Hücrenin şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir DegP proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni içerdiği bu buluşun düzenlemelerinde, bu buluşla temin edilen hücrelerin biri veya daha fazlası, kromozomal olarak kusurlu DegP gibi, DegP geninin mutasyondan geçirilerek DegP ekspresyonunu önleyen işlevi iptal edilmiş DegP'ye dönüştürüldüğü mutasyondan geçirilmiş hücelere göre hücreden doğru katlanmış proteinlerin verimini arttırabilir. DegP ekspresyonunu önleyen işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir DegP geni içeren bir hücrede, DegP'nin şaperon aktivitesi tamamen yok olur, bu buluşa uygun hücrede ise tam proteaz aktivitesi kaybolurken DegP'nin şaperon aktivitesi korunur. Bu düzenlemelerde, bu buluşa uygun bir veya daha fazla hücre, proteinin konakçı hücrede doğru katlanmasına ve taşınmasına izin vermek için şaperon aktivitesini

dönüştürülür, polar His105 mutasyonla Gly, Ala, Val veya Leu gibi polar olmayan bir amino aside dönüştürülür ve küçük hidrofilik Ser210 mutasyonla Val, Leu, Phe veya Tyr gibi büyük veya hidrofobik bir kalıntıya dönüştürülür. Tercihen, DegP geni, şaperon aktivitesine sahip olan ama proteaz aktivitesine sahip olmayan bir protein ürettiği tespit edilen, Şekil 11c'de

5 gösterildiği gibi, nokta mutasyonu S210A'yı içerir (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Cilt 97, sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

DegP, protein-protein etkileşimine aracılık eden iki PDZ sahasına sahiptir, PDN1 (kalıntı 260-358) ve PDZ2 (kalıntı 359-448) (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to

10 Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M). Bu buluşun bir düzenlemesinde, degP geni PDZ1 sahasını ve/veya PDZ2 sahasını silmek için mutasyona tabi tutulur. PDZ1 ve PDZ2'nin silinmesi, DegP proteininin proteaz aktivitesinin tamamen yok olması ve şaperon aktivitesinin yabancı tip DegP proteinine göre azalmasıyla sonuçlanır, PDZ1 veya PDZ2'nin silinmesi ise, %5

15 proteaz aktivitesi ve yabancı tip DegP proteinine benzer şaperon aktivitesiyle sonuçlanır (A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. Cell, Cilt 97, Sayı 3, Sayfa 339 - 347. Spiess C, Beil A, Ehrmann M).

Mutasyondan geçirilmiş DegP geni, örneğin Şekil 7C'de gösterildiği gibi, bir tanımlama ve tarama usulüne yardım etmek için Ase I gibi sessiz bir doğal olarak oluşan kısıtlama yeri de

20 içerebilir.

S210A nokta mutasyonunu ve bir Ase I kısıtlama markörü yeri içeren mutasyondan geçirilmiş DegP geninin tercih edilen dizisi DİZİ İD NO: 9'da verilmektedir ve kodlanmış protein dizisi DİZİ İD NO: 10'da gösterilmektedir.

Hücrenin şaperon aktivitesine ve azalmış proteaz aktivitesine sahip bir DegP proteinini

25 kodlayan mutasyondan geçmiş bir DegP geni içerdiği bu buluşun düzenlemelerinde, bu buluşla temin edilen hücrelerin biri veya daha fazlası, kromozomal olarak kusurlu DegP gibi, DegP geninin mutasyondan geçirilerek DegP ekspresyonunu önleyen işlevi iptal edilmiş DegP'ye dönüştürüldüğü mutasyondan geçirilmiş hücelere göre hücreden doğru katlanmış proteinlerin verimini arttırabilir. DegP ekspresyonunu önleyen işlevi iptal edilmiş

30 mutasyondan geçmiş bir DegP geni içeren bir hücrede, DegP'nin şaperon aktivitesi tamamen yok olur, bu buluşa uygun hücrede ise tam proteaz aktivitesi kaybolurken DegP'nin şaperon aktivitesi korunur. Bu düzenlemelerde, bu buluşa uygun bir veya daha fazla hücre, proteinin konakçı hücrede doğru katlanmasına ve taşınmasına izin vermek için şaperon aktivitesini

korurken proteinin proteolizini önlemek için daha düşük bir proteaz aktivitesine sahiptir.

Bu düzenlemelerde, bu buluşa uygun bir veya daha fazla hücrede hücre büyümesi DegP ekspresyonunu önleyen mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş bir DegP geni taşıyan hücrelere göre artmış olabilir. Teorinin bağlayıcılığı istenmeksizin, şaperon aktivitesini

5 gerektiren bütün proteinleri işlemde geçirmek için hücrenin kapasitesini arttırabilen şaperon aktivitesinin korunması nedeniyle hücre büyümesinde artış görülebilir. Dolayısıyla, hücrenin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan doğru katlanmış proteinlerin üretimi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir DegP taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında bu buluşun hücrelerinin birinde veya daha fazlasında artabilir, böylece büyümeyi düzenleyen hücresel

10 yollar gelişir. Ayrıca, bilinen DegP proteaz eksikliği olan suşlar genellikle sıcaklığa duyarlıdır ve yaklaşık 28°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda genellikle büyümmez. Ancak, bu buluşa uygun hücreler sıcaklığa duyarlı değildir ve 28°C'de veya daha yüksek sıcaklıklarda, örneğin bakterilerden proteinlerin sınırlı ölçekte üretimi için tipik olarak kullanılan yaklaşık 30°C ila yaklaşık 37°C'de büyüyebilir.

15 Bu buluşun bir düzenlemesinde, hücre mutasyondan geçmiş bir ptr geni taşır. Burada "ptr geni" terimi yüksek molekül ağırlıklı proteinleri ayrıştıran bir proteaz olan Proteaz III'ü kodlayan bir geni belirtmek için kullanılmaktadır. Mutasyondan geçmemiş ptr geninin dizisi DİZİ İD NO: 4'te gösterilmektedir ve mutasyondan geçmemiş Proteaz III proteininin dizisi DİZİ İD NO: 5'te gösterilmektedir.

20 Mutasyondan geçmiş ptr genine veya Proteaz III'ü kodlayan mutasyondan geçmiş ptr genine referans, aksi belirtilmedikçe proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir ptr genini veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ptr genini belirtmektedir.

"Proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş ptr geni" ifadesi, bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmiş ptr geninin yabancı tip mutasyondan geçmemiş ptr geniyle karşılaştırıldığında tam proteaz aktivitesine sahip olmadığı anlamına gelmektedir.

Tercihen mutasyondan geçmiş ptr geni, yabancı tip bir mutasyondan geçmemiş Proteaz III proteininin proteaz aktivitesinin %50'sine veya daha azına, %40'ına veya daha azına, %30'una veya daha azına, %20'sine veya daha azına, %10'una veya daha azına veya %5'ine veya daha azına sahip bir Proteaz III'ü kodlar. Daha tercihen mutasyondan geçmiş ptr geni, hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir Proteaz III proteinini kodlar. Bu düzenlemede

korurken proteinin proteolizini önlemek için daha düşük bir proteaz aktivitesine sahiptir.

Bu düzenlemelerde, bu buluşa uygun bir veya daha fazla hücrede hücre büyümesi DegP ekspresyonunu önleyen mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş bir DegP geni taşıyan hücrelere göre artmış olabilir. Teorinin bağlayıcılığı istenmeksizin, şaperon aktivitesini

5 gerektiren bütün proteinleri işlemekten geçirmek için hücrenin kapasitesini arttırabilen şaperon aktivitesinin korunması nedeniyle hücre büyümesinde artış görülebilir. Dolayısıyla, hücrenin büyümesi ve çoğalması için gerekli olan doğru katlanmış proteinlerin üretimi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir DegP taşıyan hücrelerle karşılaştırıldığında bu buluşun hücrelerinin birinde veya daha fazlasında artabilir, böylece büyümeyi düzenleyen hücresel

10 yollar gelişir. Ayrıca, bilinen DegP proteaz eksikliği olan suşlar genellikle sıcaklığa duyarlıdır ve yaklaşık 28°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda genellikle büyümmez. Ancak, bu buluşa uygun hücreler sıcaklığa duyarlı değildir ve 28°C'de veya daha yüksek sıcaklıklarda, örneğin bakterilerden proteinlerin sınırlı ölçekte üretimi için tipik olarak kullanılan yaklaşık 30°C ila yaklaşık 37°C'de büyüyebilir.

15 Bu buluşun bir düzenlemesinde, hücre mutasyondan geçmiş bir ptr geni taşır. Burada "ptr geni" terimi yüksek molekül ağırlıklı proteinleri ayrıştıran bir proteaz olan Proteaz III'ü kodlayan bir geni belirtmek için kullanılmaktadır. Mutasyondan geçmemiş ptr geninin dizisi DİZİ İD NO: 4'te gösterilmektedir ve mutasyondan geçmemiş Proteaz III proteininin dizisi DİZİ İD NO: 5'te gösterilmektedir.

20 Mutasyondan geçmiş ptr genine veya Proteaz III'ü kodlayan mutasyondan geçmiş ptr genine referans, aksi belirtilmedikçe proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir ptr genini veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ptr genini belirtmektedir.

"Proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş ptr geni" ifadesi, bu buluş çerçevesinde mutasyondan geçmiş ptr geninin yabancı tip mutasyondan geçmemiş ptr geniyle karşılaştırıldığında tam proteaz aktivitesine sahip olmadığı anlamına gelmektedir.

Tercihen mutasyondan geçmiş ptr geni, yabancı tip bir mutasyondan geçmemiş Proteaz III proteininin proteaz aktivitesinin %50'sine veya daha azına, %40'ına veya daha azına, %30'una veya daha azına, %20'sine veya daha azına, %10'una veya daha azına veya %5'ine veya daha azına sahip bir Proteaz III'ü kodlar. Daha tercihen mutasyondan geçmiş ptr geni, hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir Proteaz III proteinini kodlar. Bu düzenlemede

hücrede kromozomal ptr eksikliği yoktur, yani Proteaz III proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için ptr gen dizisi silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir

Proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteini üretmek için ptr genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Gram negatif bir bakteriden eksprese edilen bir Proteaz III

5 proteininin proteaz aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından bu alanda bilinen herhangi bir uygun usulle kolayca test edilebilir.

“İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş ptr geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde genin bir veya daha fazla mutasyon içerdiği, böylece işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş gen tarafından kodlanan proteinin eksik olduğu bir hücre temin etmek için gen tarafından

10 kodlanan proteinin hiç eksprese olmamasının sağlandığı anlamındadır. İşlevi iptal edilmiş gen kısmen veya tamamen transkribe edilebilir ama kodlanmış protein içine translasyonu yapılmaz. İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr geni, proteinin hiç eksprese olmamasını sağlamak için herhangi bir uygun yolla, örneğin bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyona tabi tutulabilir. Örneğin genin

15 işlevi, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi bir yabancı DNA dizisi eklenerek iptal edilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede gen, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi bir yabancı DNA dizisinin eklenmesiyle mutasyona tabi tutulmaz. Tercihen Proteaz III geni, gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma

20 kodonunun akış yukarısına yerleştirilen bir veya daha fazla durdurma kodonunda bir mutasyon içerir, böylece Proteaz III proteininin ekspresyonu önlenir.

İşlevi iptal edilmiş hedef gen başlatma kodonundaki bir mutasyon, başlatma kodonunun işlevinin yok olmasına neden olur ve böylece hedef genin kodlama dizisinin başında uygun bir başlatma kodonu içermemesini sağlar. Başlatma kodonundaki mutasyon başlatma

25 kodonundaki bir, iki veya üç nükleotidin bir missens mutasyonu olabilir. Alternatif veya ek olarak, başlatma kodonu bir ekleme veya silme çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyondan geçirilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, ptr geni ATG başlatma kodonuna ATT'ye dönüştürmek için mutasyona tabi tutulur.

30 İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr geni alternatif veya ek olarak gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma kodonunun akış yukarısına yerleştirilen bir veya daha fazla durdurma kodonu içerebilir. Tercihen işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr

hücrede kromozomal ptr eksikliği yoktur, yani Proteaz III proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için ptr gen dizisi silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir

Proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III proteini üretmek için ptr genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Gram negatif bir bakteriden eksprese edilen bir Proteaz III

5 proteininin proteaz aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından bu alanda bilinen herhangi bir uygun usulle kolayca test edilebilir.

“İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş ptr geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde genin bir veya daha fazla mutasyon içerdiği, böylece işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş gen tarafından kodlanan proteinin eksik olduğu bir hücre temin etmek için gen tarafından

10 kodlanan proteinin hiç eksprese olmamasının sağlandığı anlamındadır. İşlevi iptal edilmiş gen kısmen veya tamamen transkribe edilebilir ama kodlanmış protein içine translasyonu yapılmaz. İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr geni, proteinin hiç eksprese olmamasını sağlamak için herhangi bir uygun yolla, örneğin bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyona tabi tutulabilir. Örneğin genin

15 işlevi, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi bir yabancı DNA dizisi eklenerek iptal edilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede gen, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi bir yabancı DNA dizisinin eklenmesiyle mutasyona tabi tutulmaz. Tercihen Proteaz III geni, gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma

20 kodonunun akış yukarısına yerleştirilen bir veya daha fazla durdurma kodonunda bir mutasyon içerir, böylece Proteaz III proteininin ekspresyonu önlenir.

İşlevi iptal edilmiş hedef gen başlatma kodonundaki bir mutasyon, başlatma kodonunun işlevinin yok olmasına neden olur ve böylece hedef genin kodlama dizisinin başında uygun bir başlatma kodonu içermemesini sağlar. Başlatma kodonundaki mutasyon başlatma

25 kodonundaki bir, iki veya üç nükleotidin bir missens mutasyonu olabilir. Alternatif veya ek olarak, başlatma kodonu bir ekleme veya silme çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyondan geçirilebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, ptr geni ATG başlatma kodonuna ATT'ye dönüştürmek için mutasyona tabi tutulur.

30 İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr geni alternatif veya ek olarak gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma kodonunun akış yukarısına yerleştirilen bir veya daha fazla durdurma kodonu içerebilir. Tercihen işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr

geni hem başlatma kodonunda bir missens mutasyon hem de bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonu içerir.

Bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonu tercihen çerçeve içi durdurma kodonlarıdır. Ancak, bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonu alternatif veya ek olarak çerçeve dışı durdurma kodonları olabilir. Bir çerçeve dışı başlatma kodonunun, bir ekleme veya silme çerçeve kayması mutasyonu ile bir çerçeve içi başlatma kodonuna dönüştürüldüğü durumda translasyonu durdurmak için bir veya daha fazla çerçeve dışı durdurma kodonu gerekli olabilir. Bir veya daha fazla durdurma kodonu, bir nonsens nokta mutasyonu ve bir çerçeve kayması mutasyonu da dâhil olmak üzere herhangi bir uygun mutasyonla dâhil edilebilir. Bir veya daha fazla durdurma kodonu tercihen çerçeve kayması mutasyonu ile ve/veya bir ekleme mutasyonu ile, tercihen gen dizisinin bir segmenti bir durdurma kodonu içeren bir diziyle değiştirilerek dâhil edilir. Örneğin durdurma kodonu TAA'yı içeren bir Ase I kısıtlama yeri eklenebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, ptr geni Şekil 7A'da gösterildiği gibi bir Ase I kısıtlama yerinin eklenmesiyle bir çerçeve içi durdurma kodonu eklemek için mutasyondan geçirilir. Tercih edilen bir düzenlemede, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr geni DİZİ İD NO: 6'nın DNA dizisine sahiptir.

Yukarıda açıklanan işlevi iptal eden mutasyonlar, işlevi iptal edilmiş hedef gen yerinin akış yukarısında veya akış aşağısında kromozomal DNA'da minimal bozulmaya neden olduğu veya hiç olmadığı ve hücrenin ilgilenilen bir proteini, özellikle terapötik proteinleri ekspres etmek için uygunluğunu etkileyebilen, antibiyotik direnç markörleri gibi yabancı DNA'nın eklenmesini ve muhafaza edilmesini gerektirmediği için avantajlıdır. Dolayısıyla, bu buluşa uygun hücrelerin biri veya daha fazlası, proteaz geninin işlevinin, gen kodlama dizisine yabancı DNA eklenerek iptal edildiği hücrelerle karşılaştırıldığında gelişmiş büyüme özellikleri ve/veya protein ekspresyonu gösterebilmektedir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücreler mutasyondan geçmiş bir OmpT geni taşır. Burada "OmpT geni" bir dış membran proteazı olan proteaz OmpT'yi (dış membran proteazı T) kodlayan bir gen anlamında kullanılmaktadır. Yabancı tip mutasyondan geçmemiş OmpT geninin dizisi SWISS-PROT P09169'dur.

Mutasyondan geçmiş bir OmpT genine veya OmpT'yi kodlayan mutasyondan geçmiş OmpT genine referans, aksi belirtilmedikçe proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir OmpT genini veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir

geni hem başlatma kodonunda bir missens mutasyon hem de bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonu içerir.

Bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonu tercihen çerçeve içi durdurma kodonlarıdır. Ancak, bir veya daha fazla eklenmiş durdurma kodonu alternatif veya ek olarak çerçeve dışı durdurma kodonları olabilir. Bir çerçeve dışı başlatma kodonunun, bir ekleme veya silme çerçeve kayması mutasyonu ile bir çerçeve içi başlatma kodonuna dönüştürüldüğü durumda translasyonu durdurmak için bir veya daha fazla çerçeve dışı durdurma kodonu gerekli olabilir. Bir veya daha fazla durdurma kodonu, bir nonsens nokta mutasyonu ve bir çerçeve kayması mutasyonu da dâhil olmak üzere herhangi bir uygun mutasyonla dâhil edilebilir. Bir veya daha fazla durdurma kodonu tercihen çerçeve kayması mutasyonu ve/veya bir ekleme mutasyonu ile, tercihen gen dizisinin bir segmenti bir durdurma kodonu içeren bir diziyle değiştirilerek dâhil edilir. Örneğin durdurma kodonu TAA'yı içeren bir Ase I kısıtlama yeri eklenebilir.

Tercih edilen bir düzenlemede, ptr geni Şekil 7A'da gösterildiği gibi bir Ase I kısıtlama yerinin eklenmesiyle bir çerçeve içi durdurma kodonu eklemek için mutasyondan geçirilir. Tercih edilen bir düzenlemede, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş ptr geni DİZİ İD NO: 6'nın DNA dizisine sahiptir.

Yukarıda açıklanan işlevi iptal eden mutasyonlar, işlevi iptal edilmiş hedef gen yerinin akış yukarısında veya akış aşağısında kromozomal DNA'da minimal bozulmaya neden olduğu veya hiç olmadığı ve hücrenin ilgilenilen bir proteini, özellikle terapötik proteinleri ekspres etmek için uygunluğunu etkileyebilen, antibiyotik direnç markörleri gibi yabancı DNA'nın eklenmesini ve muhafaza edilmesini gerektirmediği için avantajlıdır. Dolayısıyla, bu buluşa uygun hücrelerin biri veya daha fazlası, proteaz geninin işlevinin, gen kodlama dizisine yabancı DNA eklenerek iptal edildiği hücrelerle karşılaştırıldığında gelişmiş büyüme özellikleri ve/veya protein ekspresyonu gösterebilmektedir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücreler mutasyondan geçmiş bir OmpT geni taşır. Burada "OmpT geni" bir dış membran proteazı olan proteaz OmpT'yi (dış membran proteazı T) kodlayan bir gen anlamında kullanılmaktadır. Yabancı tip mutasyondan geçmemiş OmpT geninin dizisi SWISS-PROT P09169'dur.

Mutasyondan geçmiş bir OmpT genine veya OmpT'yi kodlayan mutasyondan geçmiş OmpT genine referans, aksi belirtilmedikçe proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş bir OmpT genini veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir

OmpT genini belirtmektedir.

“Proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş OmpT geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde, mutasyondan geçmiş OmpT geninin yabancı tip mutasyondan geçmemiş OmpT geniyle karşılaştırıldığında tam proteaz aktivitesine sahip olmadığı anlamındadır. Mutasyondan geçmiş OmpT geni bir yabancı tip mutasyondan geçmemiş OmpT proteininin proteaz aktivitesinin %50’sine veya daha azına, %40’ına veya daha azına, %30’una veya daha azına, %20’sine veya daha azına, %10’una veya daha azına veya %5’ine veya daha azına sahip bir OmpT proteinini kodlayabilir. Mutasyondan geçmiş OmpT geni hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir OmpT proteinini kodlayabilir. Bu düzenlemede, hücrede kromozomal OmpT eksikliği yoktur, yani OmpT gen dizisi, OmpT proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir.

Proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için OmpT genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Gram negatif bir bakteriden eksprese edilen bir OmpT proteininin proteaz aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından, Kramer ve diğerleri (Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site, FEBS Letters 505 (2001) 426-430) ve Dekker ve diğerleri (Substrate Specificity of the Integral Membrane Protease OmpT Determined by Spatially Addressed Peptide Libraries, Biochemistry 2001, 40, 1694-1701) tarafından açıklanan usul gibi bu alanda bilinen herhangi bir uygun usulle kolayca test edilebilir.

OmpT Kramer ve diğerleri (Identification of active site serine and histidine residues in Escherichia coli outer membrane protease OmpT FEBS Letters 2000 468, 220-224) tarafından tanımlanmakta, serinler, histidinler ve asidik kalıntıların alaninlerle süstitüsyonunun Glu27, Asp97, Asp208 veya His101 için ~10 kat azalmış aktiviteyle, Ser99 için ~500 kat azalmış aktiviteyle ve Asp83, Asp85, Asp210 veya His212 için ~10000 kat azalmış aktiviteyle sonuçlandığı bildirilmektedir. Vandeputte-Rutten ve diğerleri (Crystal Structure of the Outer Membrane Protease OmpT from Escherichia coli suggests a novel catalytic site, The EMBO Journal 2001, Cilt 20 No 18 5033-5039) tarafından bir Asp83-Asp85 çifti ve bir His212-Asp210 çifti içeren bir aktif yere sahip olduğu açıklanmaktadır. Ayrıca Kramer ve diğerleri (Lipopolysaccharide regions involved in the activation of Escherichia coli outer membrane protease OmpT, Eur. J. Biochem. FEBS 2002, 269, 1746-1752) ilmek L4’te D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K/K217G, K217T ve R218L mutasyonlarının hepsinin enzimatik aktivitenin kısmi veya hemen hemen tam kaybıyla sonuçlandığını açıklamaktadır.

OmpT genini belirtmektedir.

“Proteaz aktivitesi azalmış bir OmpT proteinini kodlayan mutasyondan geçmiş OmpT geni” ifadesi bu buluş çerçevesinde, mutasyondan geçmiş OmpT geninin yabancı tip mutasyondan geçmemiş OmpT geniyle karşılaştırıldığında tam proteaz aktivitesine sahip olmadığı anlamındadır. Mutasyondan geçmiş OmpT geni bir yabancı tip mutasyondan geçmemiş OmpT proteininin proteaz aktivitesinin %50’sine veya daha azına, %40’ına veya daha azına, %30’una veya daha azına, %20’sine veya daha azına, %10’una veya daha azına veya %5’ine veya daha azına sahip bir OmpT proteinini kodlayabilir. Mutasyondan geçmiş OmpT geni hiç proteaz aktivitesine sahip olmayan bir OmpT proteinini kodlayabilir. Bu düzenlemede, hücrede kromozomal OmpT eksikliği yoktur, yani OmpT gen dizisi, OmpT proteininin herhangi bir formunun ekspresyonunu önlemek için silinmemiş veya mutasyondan geçirilmemiştir.

Proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için OmpT genine herhangi bir uygun mutasyon uygulanabilir. Gram negatif bir bakteriden eksprese edilen bir OmpT proteininin proteaz aktivitesi bu alanda uzman olanlar tarafından, Kramer ve diğerleri (Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site, FEBS Letters 505 (2001) 426-430) ve Dekker ve diğerleri (Substrate Specificity of the Integral Membrane Protease OmpT Determined by Spatially Addressed Peptide Libraries, Biochemistry 2001, 40, 1694-1701) tarafından açıklanan usul gibi bu alanda bilinen herhangi bir uygun usulle kolayca test edilebilir.

OmpT Kramer ve diğerleri (Identification of active site serine and histidine residues in Escherichia coli outer membrane protease OmpT FEBS Letters 2000 468, 220-224) tarafından tanımlanmakta, serinler, histidinler ve asidik kalıntıların alaninlerle süstitüsyonunun Glu27, Asp97, Asp208 veya His101 için ~10 kat azalmış aktiviteyle, Ser99 için ~500 kat azalmış aktiviteyle ve Asp83, Asp85, Asp210 veya His212 için ~10000 kat azalmış aktiviteyle sonuçlandığı bildirilmektedir. Vandeputte-Rutten ve diğerleri (Crystal Structure of the Outer Membrane Protease OmpT from Escherichia coli suggests a novel catalytic site, The EMBO Journal 2001, Cilt 20 No 18 5033-5039) tarafından bir Asp83-Asp85 çifti ve bir His212-Asp210 çifti içeren bir aktif yere sahip olduğu açıklanmaktadır. Ayrıca Kramer ve diğerleri (Lipopolysaccharide regions involved in the activation of Escherichia coli outer membrane protease OmpT, Eur. J. Biochem. FEBS 2002, 269, 1746-1752) ile L4’te D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K/K217G, K217T ve R218L mutasyonlarının hepsinin enzimatik aktivitenin kısmi veya hemen hemen tam kaybıyla sonuçlandığını açıklamaktadır.

Dolayısıyla, proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için OmpT mutasyonu, E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 ve E250 kalıntılarının birinde veya daha fazlasında bir mutasyon, örneğin bir missens mutasyon içerebilir.

- 5 E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 ve E250'nin biri veya daha fazlası mutasyona tabi tutularak proteaz aktivitesi azalmış bir proteinle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin, E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 ve E250'nin biri veya daha fazlası mutasyona tabi tutularak alanine
- 10 dönüştürülebilir. Uygun mutasyonların örnekleri E27A, D43A, D83A, D85A, D97A, S99A, H101A E111A, E136A, E193A, D206A, D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K, K217G, K217T, R218L ve E250A'dır. Bir düzenlemede, mutasyondan geçirilmiş OmpT geni D210A ve H212A mutasyonlarını içerir. D210A ve H212A mutasyonlarını içeren uygun bir mutasyondan geçirilmiş OmpT dizisi DİZİ İD NO: 23'te gösterilmektedir.
- 15 "İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş OmpT geni" ifadesi bu buluş çerçevesinde, genin, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş gen tarafından kodlanan proteinin eksik olduğu bir hücre temin etmek için gen tarafından kodlanan proteinin hiç eksprese olmamasını sağlayan bir veya daha fazla mutasyon içerdiği anlamındadır. İşlevi iptal edilmiş gen kısmen veya tamamen transkribe edilebilir ama kodlanmış proteine translasyonu yapılmaz. İşlevi iptal
- 20 edilmiş mutasyondan geçirilmiş OmpT geni herhangi bir uygun yolla, örneğin proteinin hiç eksprese olmamasını sağlamak için bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyondan geçirilebilir. Örneğin genin işlevi, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi bir yabancı DNA dizisinin eklenmesiyle iptal edilebilir.
- 25 Bir düzenlemede OmpT geni, gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma kodonunun akış yukarısına yerleştirilen bir veya daha fazla durdurma kodonunda, OmpT proteininin ekspresyonunu önleyen bir mutasyon içerir. Başlatma kodonundaki mutasyon başlatma kodonunun nükleotitlerinin biri, ikisi veya üçünün bir missens mutasyonu olabilir. Uygun bir mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş OmpT
- 30 dizisi DİZİ İD NO:24'te gösterilmektedir. Alternatif veya ek olarak başlatma kodonu bir ekleme veya silme çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyondan geçirilebilir.
- Bir düzenlemede, bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal ompT'nin eksik olduğu gibi işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ompT geni taşımaz.

Dolayısıyla, proteaz aktivitesi azalmış bir protein üretmek için OmpT mutasyonu, E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 ve E250 kalıntılarının birinde veya daha fazlasında bir mutasyon, örneğin bir missens mutasyon içerebilir.

- 5 E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 ve E250'nin biri veya daha fazlası mutasyona tabi tutularak proteaz aktivitesi azalmış bir proteinle sonuçlanan herhangi bir uygun amino aside dönüştürülebilir. Örneğin, E27, D43, D83, D85, D97, S99, H101 E111, E136, E193, D206, D208, D210, H212 G216, K217, R218 ve E250'nin biri veya daha fazlası mutasyona tabi tutularak alanine
- 10 dönüştürülebilir. Uygun mutasyonların örnekleri E27A, D43A, D83A, D85A, D97A, S99A, H101A E111A, E136A, E193A, D206A, D208A, D210A, H212A, H212N, H212Q, G216K, K217G, K217T, R218L ve E250A'dır. Bir düzenlemede, mutasyondan geçirilmiş OmpT geni D210A ve H212A mutasyonlarını içerir. D210A ve H212A mutasyonlarını içeren uygun bir mutasyondan geçirilmiş OmpT dizisi DİZİ İD NO: 23'te gösterilmektedir.
- 15 "İşlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş OmpT geni" ifadesi bu buluş çerçevesinde, genin, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş gen tarafından kodlanan proteinin eksik olduğu bir hücre temin etmek için gen tarafından kodlanan proteinin hiç eksprese olmamasını sağlayan bir veya daha fazla mutasyon içerdiği anlamındadır. İşlevi iptal edilmiş gen kısmen veya tamamen transkribe edilebilir ama kodlanmış proteine translasyonu yapılmaz. İşlevi iptal
- 20 edilmiş mutasyondan geçirilmiş OmpT geni herhangi bir uygun yolla, örneğin proteinin hiç eksprese olmamasını sağlamak için bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyondan geçirilebilir. Örneğin genin işlevi, gen kodlama dizisine bir antibiyotik direnç markörü gibi bir yabancı DNA dizisinin eklenmesiyle iptal edilebilir.
- 25 Bir düzenlemede OmpT geni, gen başlatma kodonunda ve/veya gen başlatma kodonunun akış aşağısına ve gen durdurma kodonunun akış yukarısına yerleştirilen bir veya daha fazla durdurma kodonunda, OmpT proteininin ekspresyonunu önleyen bir mutasyon içerir. Başlatma kodonundaki mutasyon başlatma kodonunun nükleotitlerinin biri, ikisi veya üçünün bir missens mutasyonu olabilir. Uygun bir mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş OmpT
- 30 dizisi DİZİ İD NO:24'te gösterilmektedir. Alternatif veya ek olarak başlatma kodonu bir ekleme veya silme çerçeve kayması mutasyonu ile mutasyondan geçirilebilir.
- Bir düzenlemede, bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal ompT'nin eksik olduğu gibi işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ompT geni taşımaz.

Bir düzenlemede bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal degP eksikliği olan gibi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir degP geni taşımaz. Bir düzenlemede, bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi mutasyondan geçmiş bir degP geni taşımaz.

5 Bir düzenlemede bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal ptr eksikliği olan gibi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir degP geni taşımaz.

İşlevi iptali mutasyonları da dâhil olmak üzere genetik mühendisliğiyle uygulanan birçok mutasyon, başarıyla mutasyondan geçmiş hücrelerin seçilmesine ve tespit edilmesine izin veren antibiyotik direnç markörlerinin kullanımını içerir. Ancak yukarıda açıklandığı gibi antibiyotik direnç markörleri kullanmanın çeşitli dezavantajları vardır.

10 Bu buluşun başka bir düzenlemesinde, hücre bir antibiyotik direnç markörü içermez ve mutasyondan geçmiş Tsp geninin, mutasyondan geçmiş spr geninin ve isteğe bağlı olarak mutasyondan geçmiş DegP geninin ve/veya mutasyondan geçmiş bir ptr geninin ve/veya mutasyondan geçmiş bir OmpT geninin bir veya daha fazla kısıtlama markörü yeri içermek üzere mutasyona tabi tutulduğu, antibiyotik direnç markörleri kullanımının yukarıdaki

15 dezavantajlarını ortadan kaldırır. Kısıtlama yerleri genetik mühendisliğiyle gen içine dâhil edilir ve doğal olarak oluşmaz. Kısıtlama markörü yerleri, gerekli kromozomal mutasyonları içeren doğru bir şekilde modifiye edilmiş hücrelerin taranmasına ve tespit edilmesine izin verdikleri için avantajlıdır. Mutasyondan geçmiş proteaz genlerinin birini veya daha fazlasını taşımak üzere modifiye edilmiş hücreler, doğal olarak oluşmayan bir kısıtlama markörü yeri

20 içeren genomik DNA'nın bir bölgesini amplifiye etmek için tasarlanmış oligonükleotit çiftleri kullanılarak hücre lizatlarından genomik DNA'nın PCR'siyle analiz edilebilir. Amplifiye edilmiş DNA daha sonra, doğal olarak oluşmayan kısıtlama markörü yerinde DNA'yı sindirebilen uygun bir kısıtlama enzimiyle inkübasyondan önce ve sonra agaroz jel elektroforezle analiz edilebilir. Kısıtlama enzimiyle inkübasyondan sonra DNA

25 fragmanlarının varlığı, hücrelerin bir veya daha fazla mutasyondan geçirilmiş gen taşımak üzere başarıyla modifiye edildiğini teyit eder.

Hücrenin DİZİ İD NO: 6'nın DNA dizisine sahip işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ptr geni taşıdığı düzenlemede, DİZİ İD NO: 17 ve DİZİ İD NO: 18'de gösterilen oligonükleotit primer dizileri, transforme olmuş hücrelerin genomik DNA'sından doğal olarak

30 oluşmayan Ase I kısıtlama yerini içeren DNA bölgesini amplifiye etmek için kullanılabilir. Amplifiye edilmiş genomik DNA daha sonra Ase I kısıtlama enzimiyle inkübe edilebilir ve genomik DNA'da mutasyondan geçmiş ptr geninin varlığını teyit etmek için jel elektroforezle analiz edilebilir.

Bir düzenlemede bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal degP eksikliği olan gibi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir degP geni taşımaz. Bir düzenlemede, bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi mutasyondan geçmiş bir degP geni taşımaz.

5 Bir düzenlemede bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal ptr eksikliği olan gibi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçirilmiş bir degP geni taşımaz.

İşlevi iptali mutasyonları da dâhil olmak üzere genetik mühendisliğiyle uygulanan birçok mutasyon, başarıyla mutasyondan geçmiş hücrelerin seçilmesine ve tespit edilmesine izin veren antibiyotik direnç markörlerinin kullanımını içerir. Ancak yukarıda açıklandığı gibi antibiyotik direnç markörleri kullanmanın çeşitli dezavantajları vardır.

10 Bu buluşun başka bir düzenlemesinde, hücre bir antibiyotik direnç markörü içermez ve mutasyondan geçmiş Tsp geninin, mutasyondan geçmiş spr geninin ve isteğe bağlı olarak mutasyondan geçmiş DegP geninin ve/veya mutasyondan geçmiş bir ptr geninin ve/veya mutasyondan geçmiş bir OmpT geninin bir veya daha fazla kısıtlama markörü yeri içermek üzere mutasyona tabi tutulduğu, antibiyotik direnç markörleri kullanımının yukarıdaki

15 dezavantajlarını ortadan kaldırır. Kısıtlama yerleri genetik mühendisliğiyle gen içine dâhil edilir ve doğal olarak oluşmaz. Kısıtlama markörü yerleri, gerekli kromozomal mutasyonları içeren doğru bir şekilde modifiye edilmiş hücrelerin taranmasına ve tespit edilmesine izin verdikleri için avantajlıdır. Mutasyondan geçmiş proteaz genlerinin birini veya daha fazlasını taşımak üzere modifiye edilmiş hücreler, doğal olarak oluşmayan bir kısıtlama markörü yeri

20 içeren genomik DNA'nın bir bölgesini amplifiye etmek için tasarlanmış oligonükleotit çiftleri kullanılarak hücre lizatlarından genomik DNA'nın PCR'siyle analiz edilebilir. Amplifiye edilmiş DNA daha sonra, doğal olarak oluşmayan kısıtlama markörü yerinde DNA'yı sindirebilen uygun bir kısıtlama enzimiyle inkübasyondan önce ve sonra agaroz jel elektroforezle analiz edilebilir. Kısıtlama enzimiyle inkübasyondan sonra DNA

25 fragmanlarının varlığı, hücrelerin bir veya daha fazla mutasyondan geçirilmiş gen taşımak üzere başarıyla modifiye edildiğini teyit eder.

Hücrenin DİZİ İD NO: 6'nın DNA dizisine sahip işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ptr geni taşıdığı düzenlemede, DİZİ İD NO: 17 ve DİZİ İD NO: 18'de gösterilen oligonükleotit primer dizileri, transforme olmuş hücrelerin genomik DNA'sından doğal olarak

30 oluşmayan Ase I kısıtlama yerini içeren DNA bölgesini amplifiye etmek için kullanılabilir. Amplifiye edilmiş genomik DNA daha sonra Ase I kısıtlama enzimiyle inkübe edilebilir ve genomik DNA'da mutasyondan geçmiş ptr geninin varlığını teyit etmek için jel elektroforezle analiz edilebilir.

Hücrenin DİZİ İD NO: 3'ün DNA dizisine veya DİZİ İD NO: 3'ün 7. ila 2048. nükleotitlerine sahip işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içerdiği düzenlemede, transforme olmuş hücrelerin genomik DNA'sından doğal olarak oluşmayan Ase I kısıtlama yerini içeren DNA bölgesini amplifiye etmek için DİZİ İD NO: 15 ve DİZİ İD NO: 16'da gösterilen
5 oligonükleotit primer dizileri kullanılabilir. Daha sonra amplifiye edilmiş genomik DNA Ase I kısıtlama enzimiyle birlikte inkübe edilebilir ve genomik DNA'da mutasyondan geçmiş Tsp geninin varlığını teyit etmek için jel elektroforezle analiz edilebilir.

Hücrenin DİZİ İD NO: 9'un DNA dizisine sahip mutasyondan geçmiş bir DegP geni içerdiği düzenlemede, transforme olmuş hücrelerin genomik DNA'sından doğal olarak oluşmayan
10 Ase I kısıtlama yerini içeren DNA bölgesini amplifiye etmek için DİZİ İD NO: 19 ve DİZİ İD NO: 20'de gösterilen oligonükleotit primer dizileri kullanılabilir. Daha sonra amplifiye edilmiş genomik DNA Ase I kısıtlama enzimiyle birlikte inkübe edilebilir ve genomik DNA'da mutasyondan geçmiş DegP geninin varlığını teyit etmek için jel elektroforezle analiz edilebilir.

15 Bir veya daha fazla kısıtlama yeri, bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu da dâhil olmak üzere herhangi bir uygun mutasyonla dâhil edilebilir. Yukarıda açıklandığı gibi, başlatma kodonunun mutasyonu ve/veya bir veya daha fazla durdurma kodonu dâhil etmek için mutasyonla bir kısıtlama yeri dâhil edilebilir. Bu düzenleme, kısıtlama markörü yeri dâhil edilen işlev iptali mutasyonlarının dolaysız ve
20 benzersiz bir markörü olduğu için avantajlıdır.

Bir Ase I kısıtlama yeri gibi, çerçeve içi bir durdurma kodonu içeren bir kısıtlama markörü yeri eklenebilir. Eklenen kısıtlama yeri hem bir kısıtlama markörü yeri olarak hem de gen kodlama dizisinin tam transkripsiyonunu önlemek için bir durdurma kodonu olarak işlev gördüğü için bu özellikle avantajlıdır. Örneğin, bir Ase I yerinin dâhil edilmesiyle ptr genine
25 bir durdurma kodonunun dâhil edildiği düzenlemede, bu aynı zamanda Şekil 7A'da gösterildiği gibi bir kısıtlama yeri yaratır. Örneğin bir Ase I yerinin dâhil edilmesiyle kodon 21'de Tsp genine bir durdurma kodonunun dâhil edildiği düzenlemede, bu ayrıca Şekil 7B'de gösterildiği gibi bir kısıtlama yeri yaratır.

Bir kısıtlama markörü yeri başlatma kodonundaki mutasyonla ve isteğe bağlı olarak bir veya
30 daha fazla başka nokta mutasyonu dâhil edilebilir. Bu düzenlemede, kısıtlama markörü yeri tercihen bir EcoR I kısıtlama yeridir. Başlatma kodonundaki mutasyon aynı zamanda bir kısıtlama markörü yeri yarattığı için bu özellikle avantajlıdır. Örneğin, ptr geninin başlatma kodonunun ATT olarak değiştirildiği düzenlemede, bu şekil 11a'da gösterildiği gibi bir EcoR

Hücrenin DİZİ İD NO: 3'ün DNA dizisine veya DİZİ İD NO: 3'ün 7. ila 2048. nükleotitlerine sahip işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp geni içerdiği düzenlemede, transforme olmuş hücrelerin genomik DNA'sından doğal olarak oluşmayan Ase I kısıtlama yerini içeren DNA bölgesini amplifiye etmek için DİZİ İD NO: 15 ve DİZİ İD NO: 16'da gösterilen
5 oligonükleotit primer dizileri kullanılabilir. Daha sonra amplifiye edilmiş genomik DNA Ase I kısıtlama enzimiyle birlikte inkübe edilebilir ve genomik DNA'da mutasyondan geçmiş Tsp geninin varlığını teyit etmek için jel elektroforezle analiz edilebilir.

Hücrenin DİZİ İD NO: 9'un DNA dizisine sahip mutasyondan geçmiş bir DegP geni içerdiği düzenlemede, transforme olmuş hücrelerin genomik DNA'sından doğal olarak oluşmayan
10 Ase I kısıtlama yerini içeren DNA bölgesini amplifiye etmek için DİZİ İD NO: 19 ve DİZİ İD NO: 20'de gösterilen oligonükleotit primer dizileri kullanılabilir. Daha sonra amplifiye edilmiş genomik DNA Ase I kısıtlama enzimiyle birlikte inkübe edilebilir ve genomik DNA'da mutasyondan geçmiş DegP geninin varlığını teyit etmek için jel elektroforezle analiz edilebilir.

15 Bir veya daha fazla kısıtlama yeri, bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu da dâhil olmak üzere herhangi bir uygun mutasyonla dâhil edilebilir. Yukarıda açıklandığı gibi, başlatma kodonunun mutasyonu ve/veya bir veya daha fazla durdurma kodonu dâhil etmek için mutasyonla bir kısıtlama yeri dâhil edilebilir. Bu düzenleme, kısıtlama markörü yeri dâhil edilen işlev iptali mutasyonlarının dolaysız ve
20 benzersiz bir markörü olduğu için avantajlıdır.

Bir Ase I kısıtlama yeri gibi, çerçeve içi bir durdurma kodonu içeren bir kısıtlama markörü yeri eklenebilir. Eklenen kısıtlama yeri hem bir kısıtlama markörü yeri olarak hem de gen kodlama dizisinin tam transkripsiyonunu önlemek için bir durdurma kodonu olarak işlev gördüğü için bu özellikle avantajlıdır. Örneğin, bir Ase I yerinin dâhil edilmesiyle ptr genine
25 bir durdurma kodonunun dâhil edildiği düzenlemede, bu aynı zamanda Şekil 7A'da gösterildiği gibi bir kısıtlama yeri yaratır. Örneğin bir Ase I yerinin dâhil edilmesiyle kodon 21'de Tsp genine bir durdurma kodonunun dâhil edildiği düzenlemede, bu ayrıca Şekil 7B'de gösterildiği gibi bir kısıtlama yeri yaratır.

Bir kısıtlama markörü yeri başlatma kodonundaki mutasyonla ve isteğe bağlı olarak bir veya
30 daha fazla başka nokta mutasyonu dâhil edilebilir. Bu düzenlemede, kısıtlama markörü yeri tercihen bir EcoR I kısıtlama yeridir. Başlatma kodonundaki mutasyon aynı zamanda bir kısıtlama markörü yeri yarattığı için bu özellikle avantajlıdır. Örneğin, ptr geninin başlatma kodonunun ATT olarak değiştirildiği düzenlemede, bu şekil 11a'da gösterildiği gibi bir EcoR

I markör yeri yaratır. Örneğin, Tsp geninin başlatma kodonunun (kodon 3) ATG'den TCG'ye değiştiği düzenlemede, Şekil 1b'de gösterildiği gibi, kodon 2'deki AAC'den AAT'ye başka bir nokta mutasyonu ve kodon 3'te ATG'den TCG'ye mutasyon Şekil 7B'de gösterildiği gibi bir EcoR I kısıtlama markörü yeri yaratır.

- 5 Hücrenin mutasyondan geçmiş bir OmpT geni içerdiği bu buluşun düzenlemesinde, bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu da dâhil olmak üzere herhangi bir uygun mutasyonla bir veya daha fazla kısıtlama yeri dâhil edilebilir. Örneğin, OmpT geninin D210A ve H212A mutasyonlarını içerdiği düzenlemede, bu mutasyonlar bir seçim markörü olarak kullanılabilen sessiz HindIII kısıtlama yerini dâhil
- 10 eder.

DegP geninde veya spr geninde, sessiz kodon değişiklikleri kullanılarak bir markör kısıtlama yeri dâhil edilebilir. Örneğin mutasyondan geçmiş DegP geni için Şekil 7C'de gösterildiği gibi, TAA durdurma kodonunun çerçeve dışı olduğu sessiz bir kısıtlama markörü yeri olarak Ase I yeri kullanılabilir.

- 15 Bu buluşun, ptr geninin ve/veya Tsp geninin proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III'ü veya Tsp'yi kodlamak için mutasyondan geçirildiği düzenlemelerinde, sessiz kodon değişiklikleri kullanılarak bir veya daha fazla markör kısıtlama yeri dâhil edilebilir.

Bu buluşa uygun rekombinant gram negatif bakteri hücresi herhangi bir uygun yolla üretilebilir. Bu alanda uzman olanlar, bir kromozomal gen dizisini mutasyondan geçirilmiş bir

20 gen dizisiyle değiştirmek için kullanılacak uygun teknikleri bilmektedirler. Homolog rekombinasyonla konakçı kromozomu içine entegrasyona izin veren uygun vektörler kullanılabilir.

Uygun gen replasman usulleri örneğin Hamilton (New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in Escherichia coli, Hamilton C. M. ve diğerleri, Journal of Bacteriology

25 Eylül 1989, Cilt 171, No. 9 sayfa 4617-4622), Skorupski ve diğerleri (Positive selection vectors for allelic exchange, Skorupski K ve Taylor R. K., Gene, 1996, 169, 47-52), Kiel ve diğerleri (A general method for the construction of Escherichia coli mutants by homologous recombination and plasmid segregation, Kiel J.A.K.W. ve diğerleri, Mol Gen Genet 1987, 207:294-301), Blomfield ve diğerleri (Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature sensitive pSC101 replicon, Blomfield I. C. ve diğerleri,

30 Molecular Microbiology 1991, 5(6), 1447-1457) ve Ried ve diğerleri (An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker

I markör yeri yaratır. Örneğin, Tsp geninin başlatma kodonunun (kodon 3) ATG'den TCG'ye değiştiği düzenlemede, Şekil 1b'de gösterildiği gibi, kodon 2'deki AAC'den AAT'ye başka bir nokta mutasyonu ve kodon 3'te ATG'den TCG'ye mutasyon Şekil 7B'de gösterildiği gibi bir EcoR I kısıtlama markörü yeri yaratır.

- 5 Hücrenin mutasyondan geçmiş bir OmpT geni içerdiği bu buluşun düzenlemesinde, bir veya daha fazla silme, ekleme, nokta, missens, nonsens ve çerçeve kayması mutasyonu da dâhil olmak üzere herhangi bir uygun mutasyonla bir veya daha fazla kısıtlama yeri dâhil edilebilir. Örneğin, OmpT geninin D210A ve H212A mutasyonlarını içerdiği düzenlemede, bu mutasyonlar bir seçim markörü olarak kullanılabilen sessiz HindIII kısıtlama yerini dâhil
- 10 eder.

DegP geninde veya spr geninde, sessiz kodon değişiklikleri kullanılarak bir markör kısıtlama yeri dâhil edilebilir. Örneğin mutasyondan geçmiş DegP geni için Şekil 7C'de gösterildiği gibi, TAA durdurma kodonunun çerçeve dışı olduğu sessiz bir kısıtlama markörü yeri olarak Ase I yeri kullanılabilir.

- 15 Bu buluşun, ptr geninin ve/veya Tsp geninin proteaz aktivitesi azalmış bir Proteaz III'ü veya Tsp'yi kodlamak için mutasyondan geçirildiği düzenlemelerinde, sessiz kodon değişiklikleri kullanılarak bir veya daha fazla markör kısıtlama yeri dâhil edilebilir.

Bu buluşa uygun rekombinant gram negatif bakteri hücresi herhangi bir uygun yolla üretilebilir. Bu alanda uzman olanlar, bir kromozomal gen dizisini mutasyondan geçirilmiş bir

20 gen dizisiyle değiştirmek için kullanılacak uygun teknikleri bilmektedirler. Homolog rekombinasyonla konakçı kromozomu içine entegrasyona izin veren uygun vektörler kullanılabilir.

Uygun gen replasman usulleri örneğin Hamilton (New Method for Generating Deletions and Gene Replacements in Escherichia coli, Hamilton C. M. ve diğerleri, Journal of Bacteriology

25 Eylül 1989, Cilt 171, No. 9 sayfa 4617-4622), Skorupski ve diğerleri (Positive selection vectors for allelic exchange, Skorupski K ve Taylor R. K., Gene, 1996, 169, 47-52), Kiel ve diğerleri (A general method for the construction of Escherichia coli mutants by homologous recombination and plasmid segregation, Kiel J.A.K.W. ve diğerleri, Mol Gen Genet 1987, 207:294-301), Blomfield ve diğerleri (Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature sensitive pSC101 replicon, Blomfield I. C. ve diğerleri,

30 Molecular Microbiology 1991, 5(6), 1447-1457) ve Ried ve diğerleri (An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker

exchange- eviction mutagenesis, Ried J. L. ve Collmer A., Gene 57 (1987) 239-246) tarafından açıklanmaktadır. Homolog rekombinasyonu/replasmanı mümkün kılan uygun bir plazmit pKO3 plazmittir (Link ve diğerleri, 1997, Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237).

Başarıyla mutasyondan geçmiş suşlar, koloni PCR DN dizileme ve koloni PCR kısıtlama 5 enzim eşleme dâhil olmak üzere bu alanda iyi bilinen usuller kullanılarak saptanabilir.

Hücrenin iki veya daha fazla mutasyondan geçmiş kromozomal gen içerdiği düzenlemede, mutasyondan geçmiş genler aynı vektör veya farklı vektörler üzerinde gram negatif bakteriye dâhil edilebilir.

Bir düzenlemede bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal ompT'nin eksik 10 olduğu gibi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ompT geni taşımaz.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücreler sadece üç karakterize edici mutasyon içerir: mutasyondan geçmiş spr, azaltılmış Tsp ve FkpA, Skp veya bir FkpA ve Skp kombinasyonu ekspresyonu.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre hattı mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve 15 mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir FkpA geninden oluşur.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre hattı mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir Skp geninden oluşur.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre hattı mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir FkpA geni ve bir Skp geninden oluşur.

20 Bir düzenlemede, FkpA ve Skp gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen gen veya genler, isteğe bağlı olarak bir antikoru veya bunun bağlayıcı fragmanını kodlayan bir polinükleotit dizisini içeren bir ekspresyon vektörü içinde geçici olarak hücreye transforme edilir.

Bir düzenlemede, antikoru kodlayan polinükleotit dizisi ve FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan 25 polinükleotit ayrı ekspresyon vektörleri içine eklenir.

Hem ağır hem hafif zincirler içeren ürünlerin üretimi için, hücre hattı iki vektörle transforme edilebilir, ilk vektör bir hafif zincir polipeptidini kodlar ve ikinci vektör bir ağır zincir polipeptidini kodlar. Alternatif olarak, tek bir vektör kullanılabilir ve vektör hafif zincir ve ağır zincir polipeptitlerini kodlayan diziler içerir.

30 Alternatif olarak, antikoru kodlayan polinükleotit dizisi ve FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan

exchange- eviction mutagenesis, Ried J. L. ve Collmer A., Gene 57 (1987) 239-246) tarafından açıklanmaktadır. Homolog rekombinasyonu/replasmanı mümkün kılan uygun bir plazmit pKO3 plazmittir (Link ve diğerleri, 1997, Journal of Bacteriology, 179, 6228-6237).

Başarıyla mutasyondan geçmiş suşlar, koloni PCR DN dizileme ve koloni PCR kısıtlama 5 enzim eşleme dâhil olmak üzere bu alanda iyi bilinen usuller kullanılarak saptanabilir.

Hücrenin iki veya daha fazla mutasyondan geçmiş kromozomal gen içerdiği düzenlemede, mutasyondan geçmiş genler aynı vektör veya farklı vektörler üzerinde gram negatif bakteriye dâhil edilebilir.

Bir düzenlemede bu buluşa uygun gram negatif bakteri hücresi, kromozomal ompT'nin eksik 10 olduğu gibi, işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir ompT geni taşımaz.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücreler sadece üç karakterize edici mutasyon içerir: mutasyondan geçmiş spr, azaltılmış Tsp ve FkpA, Skp veya bir FkpA ve Skp kombinasyonu ekspresyonu.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre hattı mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve 15 mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir FkpA geninden oluşur.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre hattı mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir Skp geninden oluşur.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre hattı mutasyondan geçmiş bir Tsp geni ve mutasyondan geçmiş bir spr geni ve bir FkpA geni ve bir Skp geninden oluşur.

20 Bir düzenlemede, FkpA ve Skp gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen gen veya genler, isteğe bağlı olarak bir antikoru veya bunun bağlayıcı fragmanını kodlayan bir polinükleotit dizisini içeren bir ekspresyon vektörü içinde geçici olarak hücreye transforme edilir.

Bir düzenlemede, antikoru kodlayan polinükleotit dizisi ve FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan 25 polinükleotit ayrı ekspresyon vektörleri içine eklenir.

Hem ağır hem hafif zincirler içeren ürünlerin üretimi için, hücre hattı iki vektörle transforme edilebilir, ilk vektör bir hafif zincir polipeptidini kodlar ve ikinci vektör bir ağır zincir polipeptidini kodlar. Alternatif olarak, tek bir vektör kullanılabilir ve vektör hafif zincir ve ağır zincir polipeptitlerini kodlayan diziler içerir.

30 Alternatif olarak, antikoru kodlayan polinükleotit dizisi ve FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan

polinükleotit bir vektör içine eklenir. Tercihen vektör antikorun hafif ve ağır zincir polipeptitlerini kodlayan dizileri içerir.

Bu buluş ayrıca FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan bir rekombinant polinükleotit ve beşeri FcRn için spesifik bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanını içeren bir ekspresyon vektörü sunmaktadır. Ekspresyon vektörü FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan polinükleotit dizisini ve antikoru kodlayan polinükleotit dizisini içeren multisistronik bir vektördür.

Multisistronik vektör polinükleotit dizilerinin bir vektör içine tekrarlanan ardışık klonlanmasına izin veren avantajlı bir klonlama usulüyle üretilebilir. Usulde, Ase I ve Nde I kısıtlama yerlerinin "AT" uçları gibi, bir çift kısıtlama yerinin uyumlu kohezif uçları kullanılır. AseI-NdeI fragmanı gibi, bir kodlama dizisi içeren ve uyumlu kohezif uçlara sahip bir polinükleotit dizisi, vektördeki Nde I gibi bir kısıtlama yeri içine klonlanabilir.

Polinükleotit dizisinin eklenmesi 5' kısıtlama yerini yok eder ama daha sonra uyumlu kohezif uçlar içeren başka bir polinükleotit dizisini eklemek için kullanılabilen NdeI gibi yeni bir 3' kısıtlama yeri yaratır. İşlem daha sonra başka diziler eklemek için tekrarlanabilir. Vektöre eklenen her polinükleotit dizisi, tarama için bir Ssp I yeri içerebilen durdurma kodonuna 3' kodlayıcı olmayan dizi, bir Shine Dalgarno ribozom bağlama dizisi, A açısından zengin bir aralayıcı ve bir başlatma kodonunu kodlayan bir NdeI yeri içerir.

Bir antikorun bir hafif zincirini (LC), bir antikorun bir ağır zincirini (HC) kodlayan bir polinükleotit dizisi, bir FkpA polinükleotit dizisi ve başka bir polinükleotit dizisi içeren bir vektörün oluşturulmasının diyagramatik bir temsili Şekil 7d'de gösterilmektedir.

Bu buluşa uygun hücre tercihen yukarıda tanımlandığı gibi bir ekspresyon vektörü içerir. Burada ayrıca hücrenin aşağıdaki bir veya daha fazla başka proteini de eksprese ettiği bir örnek açıklanmaktadır: skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla protein; ve isteğe bağlı olarak SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY ve Lep gibi protein sekresyonunu veya translokasyonunu kolaylaştırabilen bir veya daha fazla protein; bir veya daha fazla başka protein, FkpA'yı kodlayan polinükleotit ve/veya antikoru kodlayan polinükleotit dizisiyle aynı vektöre eklenen bir veya daha fazla polinükleotitten eksprese edilebilir. Alternatif olarak bir veya daha fazla polinükleotit ayrı vektörlere eklenebilir.

Ekspresyon vektörü yukarıda tanımlandığı gibi bir veya daha fazla ekspresyon kaseti uygun bir vektör içine eklenerek üretilebilir. Alternatif olarak, ekspresyon vektöründe polinükleotit dizisinin ekspresyonunu yönetmek için regülatör ekspresyon dizileri bulunabilir ve böylece

polinükleotit bir vektör içine eklenir. Tercihen vektör antikorun hafif ve ağır zincir polipeptitlerini kodlayan dizileri içerir.

Bu buluş ayrıca FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan bir rekombinant polinükleotit ve beşeri FcRn için spesifik bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanını içeren bir ekspresyon vektörü sunmaktadır. Ekspresyon vektörü FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan polinükleotit dizisini ve antikoru kodlayan polinükleotit dizisini içeren multisistronik bir vektördür.

Multisistronik vektör polinükleotit dizilerinin bir vektör içine tekrarlanan ardışık klonlanmasına izin veren avantajlı bir klonlama usulüyle üretilebilir. Usulde, Ase I ve Nde I kısıtlama yerlerinin "AT" uçları gibi, bir çift kısıtlama yerinin uyumlu kohezif uçları kullanılır. AseI-NdeI fragmanı gibi, bir kodlama dizisi içeren ve uyumlu kohezif uçlara sahip bir polinükleotit dizisi, vektördeki Nde I gibi bir kısıtlama yeri içine klonlanabilir.

Polinükleotit dizisinin eklenmesi 5' kısıtlama yerini yok eder ama daha sonra uyumlu kohezif uçlar içeren başka bir polinükleotit dizisini eklemek için kullanılabilen NdeI gibi yeni bir 3' kısıtlama yeri yaratır. İşlem daha sonra başka diziler eklemek için tekrarlanabilir. Vektöre eklenen her polinükleotit dizisi, tarama için bir Ssp I yeri içerebilen durdurma kodonuna 3' kodlayıcı olmayan dizi, bir Shine Dalgarno ribozom bağlama dizisi, A açısından zengin bir aralayıcı ve bir başlatma kodonunu kodlayan bir NdeI yeri içerir.

Bir antikorun bir hafif zincirini (LC), bir antikorun bir ağır zincirini (HC) kodlayan bir polinükleotit dizisi, bir FkpA polinükleotit dizisi ve başka bir polinükleotit dizisi içeren bir vektörün oluşturulmasının diyagramatik bir temsili Şekil 7d'de gösterilmektedir.

Bu buluşa uygun hücre tercihen yukarıda tanımlandığı gibi bir ekspresyon vektörü içerir. Burada ayrıca hücrenin aşağıdaki bir veya daha fazla başka proteini de eksprese ettiği bir örnek açıklanmaktadır: skp, SurA, PPIA ve PPIID gibi, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla protein; ve isteğe bağlı olarak SecY, SecE, SecG, SecYEG, SecA, SecB, FtsY ve Lep gibi protein sekresyonunu veya translokasyonunu kolaylaştırabilen bir veya daha fazla protein; bir veya daha fazla başka protein, FkpA'yı kodlayan polinükleotit ve/veya antikoru kodlayan polinükleotit dizisiyle aynı vektöre eklenen bir veya daha fazla polinükleotitten eksprese edilebilir. Alternatif olarak bir veya daha fazla polinükleotit ayrı vektörlere eklenebilir.

Ekspresyon vektörü yukarıda tanımlandığı gibi bir veya daha fazla ekspresyon kaseti uygun bir vektör içine eklenerek üretilebilir. Alternatif olarak, ekspresyon vektöründe polinükleotit dizisinin ekspresyonunu yönetmek için regülatör ekspresyon dizileri bulunabilir ve böylece

ekspresyon vektörünü tamamlamak için sadece polinükleotidin kodlayıcı bölgesi gerekli olabilir.

FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan polinükleotit ve/veya antikoru kodlayan polinükleotit, hücre için uygun bir promotörün kontrolü altında hücrede ekspresyon için uygun bir şekilde replike olabilir bir vektör içine, tipik olarak bağımsız bir şekilde replike olan bir ekspresyon vektörü içine eklenir. Bu alanda bu amaca yönelik birçok vektör bilinmektedir ve uygun vektör seçimi, nükleik asidin büyüklüğüne ve özellikle hücre tipine bağlı olabilir.

Konakçı hücreyi buluşa uygun bir polinükleotitle transforme etmek için kullanılabilen ekspresyon vektörleri arasında aşağıdakiler yer alır:

- 10 • pBR322 veya pACYC184 gibi bir plazmit ve/veya
- bakteriyel faj gibi bir viral vektör
- bir transpozon gibi transpoze edilebilir bir genetik öge

Bu ekspresyon vektörleri genellikle DNA replikasyonunun bir plazmit kaynağını, bir antibiyotik seçilebilir markörü, bir çoklu klonlama yeriyle (ekspresyon kaseti) ayrılan bir promotör ve transkripsiyon sonlandırıcı ve bir ribozom bağlama yerini kodlayan bir DNA dizisi içerir.

Bu buluşta kullanılan promotörler doğrudan ilgili polinükleotide bağlanabilir veya alternatif olarak uygun bir pozisyona, örneğin ilgili polipeptit eklendiğinde ilgili promotörün onun üzerinde etki yapabileceği şekilde bir vektör içine yerleştirilebilir. Bir düzenlemede, promotör, üzerinde etki yaptığı polinükleotidin kodlayıcı bölümünün öncesinde bulunur, örneğin polinükleotidin her kodlayıcı bölümünden önce ilgili bir promotör bulunur. “Önce” burada promotörün kodlayıcı polinükleotit bölümüne göre 5' ucunda bulunduğunu belirtmek için kullanılmaktadır.

Promotörler konakçı hücrelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun promotörler arasında lac, tac, trp, phoA, lpp, Arab, tet ve T7 yer alır.

Kullanılan bir veya daha fazla promotör uyarılabilir promotörler olabilir. FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan polinükleotidin ve antikoru kodlayan polinükleotidin bir vektör içine eklendiği düzenlemede, FkpA'yı ve antikoru kodlayan nükleotit dizileri tek bir promotörün veya ayrı promotörlerin kontrolü altında olabilir. FkpA ve/veya Skp'yi ve antikoru kodlayan nükleotit dizilerinin ayrı promotörlerin kontrolü altında olduğu düzenlemede, promotör bağımsız bir şekilde uyarılabilir promotörler olabilir.

ekspresyon vektörünü tamamlamak için sadece polinükleotidin kodlayıcı bölgesi gerekli olabilir.

FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan polinükleotit ve/veya antikoru kodlayan polinükleotit, hücre için uygun bir promotörün kontrolü altında hücrede ekspresyon için uygun bir şekilde replike olabilir bir vektör içine, tipik olarak bağımsız bir şekilde replike olan bir ekspresyon vektörü içine eklenir. Bu alanda bu amaca yönelik birçok vektör bilinmektedir ve uygun vektör seçimi, nükleik asidin büyüklüğüne ve özellikle hücre tipine bağlı olabilir.

Konakçı hücreyi buluşa uygun bir polinükleotitle transforme etmek için kullanılabilen ekspresyon vektörleri arasında aşağıdakiler yer alır:

- 10 • pBR322 veya pACYC184 gibi bir plazmit ve/veya
- bakteriyel faj gibi bir viral vektör
- bir transpozon gibi transpoze edilebilir bir genetik öge

Bu ekspresyon vektörleri genellikle DNA replikasyonunun bir plazmit kaynağını, bir antibiyotik seçilebilir markörü, bir çoklu klonlama yeriyle (ekspresyon kaseti) ayrılan bir promotör ve transkripsiyon sonlandırıcı ve bir ribozom bağlama yerini kodlayan bir DNA dizisi içerir.

Bu buluşta kullanılan promotörler doğrudan ilgili polinükleotide bağlanabilir veya alternatif olarak uygun bir pozisyona, örneğin ilgili polipeptit eklendiğinde ilgili promotörün onun üzerinde etki yapabileceği şekilde bir vektör içine yerleştirilebilir. Bir düzenlemede, promotör, üzerinde etki yaptığı polinükleotidin kodlayıcı bölümünün öncesinde bulunur, örneğin polinükleotidin her kodlayıcı bölümünden önce ilgili bir promotör bulunur. “Önce” burada promotörün kodlayıcı polinükleotit bölümüne göre 5' ucunda bulunduğunu belirtmek için kullanılmaktadır.

Promotörler konakçı hücrelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun promotörler arasında lac, tac, trp, phoA, Ipp, Arab, tet ve T7 yer alır.

Kullanılan bir veya daha fazla promotör uyarılabilir promotörler olabilir. FkpA ve/veya Skp'yi kodlayan polinükleotidin ve antikoru kodlayan polinükleotidin bir vektör içine eklendiği düzenlemede, FkpA'yı ve antikoru kodlayan nükleotit dizileri tek bir promotörün veya ayrı promotörlerin kontrolü altında olabilir. FkpA ve/veya Skp'yi ve antikoru kodlayan nükleotit dizilerinin ayrı promotörlerin kontrolü altında olduğu düzenlemede, promotör bağımsız bir şekilde uyarılabilir promotörler olabilir.

Bakteriyel sistemlerde kullanıma yönelik promotörler ilgilenilen polipeptidi kodlayan DNA'ya işlevsel olarak bağlı bir Shine-Dalgarno (S.D.) dizisi de içerir. Promotör bakteriyel kaynak DNA'dan kısıtlama enzimi sindirimiyle çıkarılabilir ve istenen DNA'yı içeren vektör içine eklenebilir.

- 5 Ekspresyon vektörü tercihen WO03/048208 veya WO2007/039714'te (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi antikor veya bunun antijen bağlayıcı fragmanını üretmek için disistronik bir mesaj da içerir. Tercihen akış yukarı sistron antikorun hafif zincirini kodlayan DNA'yı içerir ve akış aşağı sistron karşılık gelen ağır zinciri kodlayan DNA'yı içerir ve disistronik interjenik dizi (IGS) tercihen IGS1 (DİZİ İD NO: 23), IGS2
10 (DİZİ İD NO: 24), IGS3 (DİZİ İD NO: 25) ve IGS4 (DİZİ İD NO: 26) arasından seçilen bir diziyi içerir.

Sonlandırıcılar konakçı hücrelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun bir sonlandırıcı rrmB'dir.

- Promotörler ve sonlandırıcılar da dâhil olmak üzere başka uygun transkripsiyon regülatörleri ve protein hedefleme usulleri "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in
15 Escherichia coli" Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, Eylül 1996, sayfa 512-538'de bulunabilir.

- Ekspresyon vektörü içine eklenen FkpA polinükleotidi tercihen FkpA sinyal dizilerini ve FkpA kodlama dizisini kodlayan nükleik asidi içerir. Vektör tercihen vektörün bir veya daha
20 fazla seçilmiş konakçı hücrede replike olmasını, tercihen konakçı kromozomundan bağımsız bir şekilde replike olmasını mümkün kılan bir nükleik asit dizisi içerir. Bu diziler çeşitli bakteriler için iyi bilinmektedir.

Bir düzenlemede FkpA ve/veya Skp ve/veya ilgilenilen protein N-terminalde ve/veya C-terminalde bir histidin etiketi içerir.

- 25 Antikor molekülü hücreden salgılanabilir veya uygun sinyal dizileriyle periplazmaya hedeflenebilir. Alternatif olarak, antikor molekülleri hücrenin sitoplazması içinde birikebilir. Tercihen antikor molekülü periplazmaya hedeflenir.

- Antikoru kodlayan polinükleotit başka bir polipeptitle, tercihen bir sinyal dizisi veya olgun polipeptidin N-terminalinde spesifik bir yarıma yerine sahip başka polipeptitle bir füzyon
30 olarak eksprese edilebilir. Seçilen heterolog sinyal dizisinin konakçı hücre tarafından tanınan ve işlemde geçirilen bir dizi olması gerekir. Doğal veya bir ökaryotik polipeptit sinyal dizisini tanımayan ve işlemde geçirmeyen prokaryotik konakçı hücreler için, sinyal dizisi bir

Bakteriyel sistemlerde kullanıma yönelik promotörler ilgilenilen polipeptidi kodlayan DNA'ya işlevsel olarak bağlı bir Shine-Dalgarno (S.D.) dizisi de içerir. Promotör bakteriyel kaynak DNA'dan kısıtlama enzimi sindirimiyle çıkarılabilir ve istenen DNA'yı içeren vektör içine eklenebilir.

- 5 Ekspresyon vektörü tercihen WO03/048208 veya WO2007/039714'te (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi antikor veya bunun antijen bağlayıcı fragmanını üretmek için disistronik bir mesaj da içerir. Tercihen akış yukarı sistron antikorun hafif zincirini kodlayan DNA'yı içerir ve akış aşağı sistron karşılık gelen ağır zinciri kodlayan DNA'yı içerir ve disistronik interjenik dizi (IGS) tercihen IGS1 (DİZİ İD NO: 23), IGS2
10 (DİZİ İD NO: 24), IGS3 (DİZİ İD NO: 25) ve IGS4 (DİZİ İD NO: 26) arasından seçilen bir diziyi içerir.

Sonlandırıcılar konakçı hücrelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun bir sonlandırıcı rrmB'dir.

- Promotörler ve sonlandırıcılar da dâhil olmak üzere başka uygun transkripsiyon regülatörleri ve protein hedefleme usulleri "Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in
15 Escherichia coli" Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, Eylül 1996, sayfa 512-538'de bulunabilir.

- Ekspresyon vektörü içine eklenen FkpA polinükleotidi tercihen FkpA sinyal dizilerini ve FkpA kodlama dizisini kodlayan nükleik asidi içerir. Vektör tercihen vektörün bir veya daha
20 fazla seçilmiş konakçı hücrede replike olmasını, tercihen konakçı kromozomundan bağımsız bir şekilde replike olmasını mümkün kılan bir nükleik asit dizisi içerir. Bu diziler çeşitli bakteriler için iyi bilinmektedir.

Bir düzenlemede FkpA ve/veya Skp ve/veya ilgilenilen protein N-terminalde ve/veya C-terminalde bir histidin etiketi içerir.

- 25 Antikor molekülü hücreden salgılanabilir veya uygun sinyal dizileriyle periplazmaya hedeflenebilir. Alternatif olarak, antikor molekülleri hücrenin sitoplazması içinde birikebilir. Tercihen antikor molekülü periplazmaya hedeflenir.

- Antikoru kodlayan polinükleotit başka bir polipeptitle, tercihen bir sinyal dizisi veya olgun polipeptidin N-terminalinde spesifik bir yarılma yerine sahip başka polipeptitle bir füzyon
30 olarak eksprese edilebilir. Seçilen heterolog sinyal dizisinin konakçı hücre tarafından tanınan ve işleminden geçirilen bir dizi olması gerekir. Doğal veya bir ökaryotik polipeptit sinyal dizisini tanımayan ve işleminden geçirmeyen prokaryotik konakçı hücreler için, sinyal dizisi bir

prokaryotik sinyal dizisiyle süstitüe edilir. Uygun sinyal dizileri arasında OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA ve DsbC yer alır. Hücrenin antikorun bir ağır zincirini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve antikorun bir hafif zincirini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerdiği bir düzenlemede, her polinükleotit OmpA gibi bir sinyal dizisi içerebilir.

- 5 Yukarıda listelenen bileşenlerin birini veya daha fazlasını içeren uygun vektörlerin oluşturulmasında, standart ligasyon teknikleri kullanılır. İzole edilmiş plazmitler veya DNA fragmanları yarıılır, uygun hale getirilir ve gerekli plazmitleri üretmek için istenen formda yeniden bağlanır. Vektörleri oluşturmanın genel usulleri, transfeksiyon usulleri ve kültür usulleri bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir. Bu açıdan, “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York’a ve Cold Spring Harbor Publishing tarafından yayımlanan Maniatis Manual’a başvurulabilir.

10 Antikoru kodlayan DNA dizileri hazırlamak için standart moleküler biyoloji teknikleri kullanılabilir. İstenen DNA dizileri tamamen veya kısmen oligonükleotit sentez teknikleri kullanılarak sentezlenebilir. Yere yönelik mutagenез ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri uygun olduğu durumda kullanılabilir.

Buluşun burada polinükleotide referansla açıklanan düzenlemeleri, buluşun alternatif düzenlemeleri, örneğin ilgili yönün uygulanabilmesi koşuluyla, kullanılan bileşenleri içeren vektörler, ekspresyon kasetleri ve/veya konakçı hücreler için de geçerlidir.

20 Bu buluşa uygun hücre ayrıca ilgilenilen bir proteini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerebilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit dizisi eksojen veya endojen olabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit dizisi konakçı kromozomu içine entegre edilebilir veya bir vektör, tipik olarak bir plazmit içinde entegre edilmemiş olabilir.

25 Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre ilgilenilen bir proteini eksprese eder. “İlgilenilen protein”in bu tarifname çerçevesinde, ekspresyona yönelik polipeptidi, genellikle bir rekombinant polipeptidi belirtmesi amaçlanmaktadır. Ancak, ilgilenilen protein konakçı hücrede bir endojen genden eksprese edilen endojen bir protein olabilir.

30 Burada bir “rekombinant polipeptit” terimi, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak oluşturulan veya üretilen bir proteini belirtmek için kullanılmaktadır. İlgilenilen protein endojen bir proteine veya bunun mutasyondan geçmiş, örneğin biyolojik aktivitesi azaltılmış bir versiyonuna özdeş, bir eksojen vektörden eksprese edilen bir eksojen dizi veya bunun fragmanı olabilir. Alternatif olarak, ilgilenilen protein konakçı hücre tarafından normal olarak eksprese edilmeyen bir heterolog protein olabilir.

prokaryotik sinyal dizisiyle süstitüe edilir. Uygun sinyal dizileri arasında OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA ve DsbC yer alır. Hücrenin antikorun bir ağır zincirini kodlayan bir polinükleotit dizisi ve antikorun bir hafif zincirini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerdiği bir düzenlemede, her polinükleotit OmpA gibi bir sinyal dizisi içerebilir.

- 5 Yukarıda listelenen bileşenlerin birini veya daha fazlasını içeren uygun vektörlerin oluşturulmasında, standart ligasyon teknikleri kullanılır. İzole edilmiş plazmitler veya DNA fragmanları yarıılır, uygun hale getirilir ve gerekli plazmitleri üretmek için istenen formda yeniden bağlanır. Vektörleri oluşturmanın genel usulleri, transfeksiyon usulleri ve kültür usulleri bu alanda uzman olanlar tarafından iyi bilinmektedir. Bu açıdan, “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York’a ve Cold Spring Harbor Publishing tarafından yayımlanan Maniatis Manual’a başvurulabilir.

10 Antikoru kodlayan DNA dizileri hazırlamak için standart moleküler biyoloji teknikleri kullanılabilir. İstenen DNA dizileri tamamen veya kısmen oligonükleotit sentez teknikleri kullanılarak sentezlenebilir. Yere yönelik mutagenез ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri uygun olduğu durumda kullanılabilir.

Buluşun burada polinükleotide referansla açıklanan düzenlemeleri, buluşun alternatif düzenlemeleri, örneğin ilgili yönün uygulanabilmesi koşuluyla, kullanılan bileşenleri içeren vektörler, ekspresyon kasetleri ve/veya konakçı hücreler için de geçerlidir.

20 Bu buluşa uygun hücre ayrıca ilgilenilen bir proteini kodlayan bir polinükleotit dizisi içerebilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit dizisi eksojen veya endojen olabilir. İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit dizisi konakçı kromozomu içine entegre edilebilir veya bir vektör, tipik olarak bir plazmit içinde entegre edilmemiş olabilir.

25 Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre ilgilenilen bir proteini eksprese eder. “İlgilenilen protein”in bu tarifname çerçevesinde, ekspresyona yönelik polipeptidi, genellikle bir rekombinant polipeptidi belirtmesi amaçlanmaktadır. Ancak, ilgilenilen protein konakçı hücrede bir endojen genden eksprese edilen endojen bir protein olabilir.

30 Burada bir “rekombinant polipeptit” terimi, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak oluşturulan veya üretilen bir proteini belirtmek için kullanılmaktadır. İlgilenilen protein endojen bir proteine veya bunun mutasyondan geçmiş, örneğin biyolojik aktivitesi azaltılmış bir versiyonuna özdeş, bir eksojen vektörden eksprese edilen bir eksojen dizi veya bunun fragmanı olabilir. Alternatif olarak, ilgilenilen protein konakçı hücre tarafından normal olarak eksprese edilmeyen bir heterolog protein olabilir.

İlgilenilen protein bir terapötik, profilaktik veya diagnostik protein de dâhil olmak üzere herhangi bir uygun protein olabilir.

Bu alanda uzman olanlar, protein G HPLC, dairesel dikroizm, NMR, X-Işını kristalografisi ve epitop afinitesi ölçüm usulleri gibi bu alanda iyi bilinen usuller kullanarak proteinin doğru bir şekilde katlanıp katlanmadığını görmek için salgılanan proteini kolayca test edebilecektir.

Bir düzenlemede, ilgilenilen protein immünolojik hastalıklar ve/veya otoimmün hastalıklar da dâhil olmak üzere hastalıkların veya rahatsızlıkların tedavisinde yararlıdır.

Bir düzenlemede otoimmün hastalık akut dissemine ansefalomyelit (ADEM), akut nekrotizan hemorajik lökoansefalit, addison hastalığı, agamaglobülinemi, alopesi areata (saçkıran), amiloidoz, ANCA'yla ilişkili vaskülit, ankilozan spondilit, anti-GMB/Anti-TBM nefrit, antifosfolipit sendromu (APS), otoimmün anjiyoödem, otoimmün aplastik anemi, otoimmün disotonomi, otoimmün hepatit, otoimmün hiperlipidemi, otoimmün bağışıklık yetmezliği, otoimmün iç kulak hastalığı (AIED), otoimmün miyokardit, otoimmün pankreatit, otoimmün retinopati, otoimmün trombositopenik purpura (ATP), otoimmün tiroit hastalığı, otoimmün ürtikaryal, aksonal ve nöronal nöropatiler, balo hastalığı, Behçet hastalığı, büllöz pemfigoid, kardiyomyopati, Castleman hastalığı, çölyak hastalığı, Chagas hastalığı, kronik yorgunluk sendromu, kronik enflamatuvar dimiyelinizan polinöropati (CIDP), kronik tekrarlayan multifokal osteomyelit (CRMO), Churg-Strauss sendromu, sikatrisyel pemfigoid/selim mukozal pemfigoid, Crohn hastalığı, Cogans sendromu, soğuk aglutinin hastalığı, konjenital kalp bloğu, Cocksackie miyokarditi, CREST hastalığı, esansiyel karma kriyoglobülinemi, demiyelinizan nöropatiler, dermatitis herpetiformis, dermatomiyozit, devic hastalığı (nöromiyelitis optika), dilate kardiyomyopati, diskoid lupus, Dressler sendromu, endometriyoz, eozinofilik anjiyosentrik fibroz, eozinofilik fasiit, eritema nodozum, deneysel alerjik ansefalomyelit, Evans sendromu, fibromiyalji, fibrozan alveolit, dev hücreli arterit (temporal arterit), glomerülonefrit, Goodpasture sendromu, polianjit gösteren granülomatoz, bkz. Wegener, Graves hastalığı, Guillain-Barre sendromu, Hashimoto ansefaliti, Hishimoto tiroiditi, hemolitik anemi, Henoch-Schonlein purpurası, herpes gestationis, hipogamaglobülinemi, idiyopatik hipokomplementemik tübülointerstisyel nefrit, idiyopatik trombositopenik purpura (ITP), IgA nefropatisi, IgG4'le ilişkili hastalık, IgG4'le ilişkili sklerozan hastalık, immünoregülatör lipoproteinler, enflamatuvar aort anevrizması, enflamatuvar psödötümör, inklüzyon cisimciği miyoziti, insüline bağımlı diyabet (tip 1), interstisyel sistit, juvenil artrit, juvenil diyabet, Kawasaki sendromu, Kuttner tümörü, Lambert-Eaton sendromu, lökositoklastik vaskülit, liken planus, liken sklerosus, lignöz

İlgilenilen protein bir terapötik, profilaktik veya diagnostik protein de dâhil olmak üzere herhangi bir uygun protein olabilir.

Bu alanda uzman olanlar, protein G HPLC, dairesel dikroizm, NMR, X-Işını kristalografisi ve epitop afinitesi ölçüm usulleri gibi bu alanda iyi bilinen usuller kullanarak proteinin doğru bir şekilde katlanıp katlanmadığını görmek için salgılanan proteini kolayca test edebilecektir.

Bir düzenlemede, ilgilenilen protein immünolojik hastalıklar ve/veya otoimmün hastalıklar da dâhil olmak üzere hastalıkların veya rahatsızlıkların tedavisinde yararlıdır.

Bir düzenlemede otoimmün hastalık akut dissemine ansefalomyelit (ADEM), akut nekrotizan hemorajik lökoansefalit, addison hastalığı, agamaglobülinemi, alopesi areata (saçkıran), amiloidoz, ANCA'yla ilişkili vaskülit, ankilozan spondilit, anti-GMB/Anti-TBM nefrit, antifosfolipit sendromu (APS), otoimmün anjiyoödem, otoimmün aplastik anemi, otoimmün disotonomi, otoimmün hepatit, otoimmün hiperlipidemi, otoimmün bağışıklık yetmezliği, otoimmün iç kulak hastalığı (AIED), otoimmün miyokardit, otoimmün pankreatit, otoimmün retinopati, otoimmün trombositopenik purpura (ATP), otoimmün tiroit hastalığı, otoimmün ürtikaryal, aksonal ve nöronal nöropatiler, balo hastalığı, Behçet hastalığı, büllöz pemfigoid, kardiyomyopati, Castleman hastalığı, çölyak hastalığı, Chagas hastalığı, kronik yorgunluk sendromu, kronik enflamatuvar dimiyelinizan polinöropati (CIDP), kronik tekrarlayan multifokal osteomyelit (CRMO), Churg-Strauss sendromu, sikatrisyel pemfigoid/selim mukozal pemfigoid, Crohn hastalığı, Cogans sendromu, soğuk aglutinin hastalığı, konjenital kalp bloğu, Cocksackie miyokarditi, CREST hastalığı, esansiyel karma kriyoglobülinemi, demiyelinizan nöropatiler, dermatitis herpetiformis, dermatomiyozit, devic hastalığı (nöromiyelitis optika), dilate kardiyomyopati, diskoid lupus, Dressler sendromu, endometriyoz, eozinofilik anjiyosentrik fibroz, eozinofilik fasiit, eritema nodozum, deneysel alerjik ansefalomyelit, Evans sendromu, fibromiyalji, fibrozan alveolit, dev hücreli arterit (temporal arterit), glomerülonefrit, Goodpasture sendromu, polianjit gösteren granülomatoz, bkz. Wegener, Graves hastalığı, Guillain-Barre sendromu, Hashimoto ansefaliti, Hishimoto tiroiditi, hemolitik anemi, Henoch-Schonlein purpurası, herpes gestationis, hipogamaglobülinemi, idiyopatik hipokomplementemik tübulointerstisyel nefrit, idiyopatik trombositopenik purpura (ITP), IgA nefropatisi, IgG4'le ilişkili hastalık, IgG4'le ilişkili sklerozan hastalık, immünoregülatör lipoproteinler, enflamatuvar aort anevrizması, enflamatuvar psödötümör, inklüzyon cisimciği miyoziti, insüline bağımlı diyabet (tip 1), interstisyel sistit, juvenil artrit, juvenil diyabet, Kawasaki sendromu, Kuttner tümörü, Lambert-Eaton sendromu, lökositoklastik vaskülit, liken planus, liken sklerosus, lignöz

konjunktivit, lineer IgA hastalığı (LAD), Lupus (SLE), Lyme hastalığı, kronik mediastinal fibroz, Meniere hastalığı, mikroskopik polianjit, Mikulicz sendromu, karma bağ dokusu hastalığı (MCTD), Mooren ülseri, Mucha-Habermann hastalığı, multifokal fibroskleroz, multipl skleroz, miyastenia gravis, miyozit, narkolepsi, nöromiyelitis optika (Devic),

5 nötropeni, oküler sikatrisyel pemfigoid, optik nörit, Ormon hastalığı (retroperitoneal fibroz), palindromik romatizma, PANDAS (Streptokokla ilişkili Pediatrik Otoimmün nöropskiyatrik hastalıklar), paraneoplastik serebellar dejenerasyon, paraproteinemik polinöropatiler, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), Parry Romberg sendromu, Parsonnage-Turner sendromu, pars planitis (periferal üveit), pemfigus vulgaris, periaortit, periarterit, periferal

10 nöropati, perivenöz ansefalomyelit, kötüçül anemi, POEMS sendromu, polararteritis nodosa, Tip I, II ve III otoimmün poliglandüler sendromlar, romatizmal polimiyalji, polimiyozit, postmiyokardiyal enfarktüs sendromu, postperikardiyotomi sendromu, progesteron dermatiti, primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit, psoriasis (sedef hastalığı), psoriatik artrit, idiyopatik pulmoner fibroz, piyoderma gangrenosum, saf kırmızı hücre aplazisi, Raynauds

15 fenomeni, refleks sempatik distrofi, Reiter sendromu, tekrarlayan polikondrit, huzursuz bacak sendromu, retroperitoneal fibroz (Ormond hastalığı), romatizma ateşi, romatoid artrit, Riedel tiroiditi, sarkoidoz, Schmidt sendromu, sklerit, skleroderma, Sjogren sendromu, sperm ve testis otoimmünitesi, katı kişi sendromu, subakut bakteriyel endokardit (SBE), Susac sendromu, sempatik oftalmi, Takayasu arteriti, temporal arterit/dev hücreli arterit, trombotik

20 trombositopenik purpura (TTP), Tolosa-Hunt sendromu, transvers miyelit, ülseratif kolit, farklılaşmamış bağ dokusu hastalığı (UCTD), üveit, vaskülit, vezikülobüllöz dermatoz, vitiligo, Waldenstrom makroglobülinemisi, ılık idiyopatik hemolitik anemi ve Wegener granülomatozu (şimdi Polianjit gösteren Granülomatoz (GPA) olarak adlandırılmaktadır) arasından seçilir.

25 Bir düzenlemede, nörolojik hastalık kronik enflamatuvar demiyelinizan polinöropati (CIDP), Guillain-Barre sendromu, paraproteinemik polinöropatiler, nöromiyelitis optika (NMO, NMO spektrumu rahatsızlıklar veya NMO spektrumu hastalıklar) ve miyastenia gravis arasından seçilir.

30 Bir düzenlemede immünolojik hematolojik hastalık idiyopatik trombositopeni purpura (ITP), trombotik trombositopenik purpura (TTP), ılık idiyopatik hemolitik anemi, Goodpasture sendromu ve anti-HLA antikorlarına bağlı transplantasyon donör uyumsuzluğu arasından seçilir.

Bir düzenlemede hastalık miyastenia gravis, nöromiyelitis optika, CIDP, Guillaume-Barre

konjunktivit, lineer IgA hastalığı (LAD), Lupus (SLE), Lyme hastalığı, kronik mediastinal fibroz, Meniere hastalığı, mikroskopik polianjit, Mikulicz sendromu, karma bağ dokusu hastalığı (MCTD), Mooren ülseri, Mucha-Habermann hastalığı, multifokal fibroskleroz, multipl skleroz, miyastenia gravis, miyozit, narkolepsi, nöromiyelitis optika (Devic),

5 nötropeni, oküler sikatrisyel pemfigoid, optik nörit, Ormon hastalığı (retroperitoneal fibroz), palindromik romatizma, PANDAS (Streptokokla ilişkili Pediatrik Otoimmün nöropskiyatrik hastalıklar), paraneoplastik serebellar dejenerasyon, paraproteinemik polinöropatiler, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), Parry Romberg sendromu, Parsonnage-Turner sendromu, pars planitis (periferal üveit), pemfigus vulgaris, periaortit, periarterit, periferal

10 nöropati, perivenöz ansefalomyelit, kötüçül anemi, POEMS sendromu, polararteritis nodosa, Tip I, II ve III otoimmün poliglandüler sendromlar, romatizmal polimiyalji, polimiyozit, postmiyokardiyal enfarktüs sendromu, postperikardiyotomi sendromu, progesteron dermatiti, primer biliyer siroz, primer sklerozan kolanjit, psoriasis (sedef hastalığı), psoriatik artrit, idiyopatik pulmoner fibroz, piyoderma gangrenosum, saf kırmızı hücre aplazisi, Raynauds

15 fenomeni, refleks sempatik distrofi, Reiter sendromu, tekrarlayan polikondrit, huzursuz bacak sendromu, retroperitoneal fibroz (Ormond hastalığı), romatizma ateşi, romatoid artrit, Riedel tiroiditi, sarkoidoz, Schmidt sendromu, sklerit, skleroderma, Sjogren sendromu, sperm ve testis otoimmünitesi, katı kişi sendromu, subakut bakteriyel endokardit (SBE), Susac sendromu, sempatik oftalmi, Takayasu arteriti, temporal arterit/dev hücreli arterit, trombotik

20 trombositopenik purpura (TTP), Tolosa-Hunt sendromu, transvers miyelit, ülseratif kolit, farklılaşmamış bağ dokusu hastalığı (UCTD), üveit, vaskülit, vezikülobüllöz dermatoz, vitiligo, Waldenstrom makroglobülinemisi, ılık idiyopatik hemolitik anemi ve Wegener granülomatozu (şimdi Polianjit gösteren Granülomatoz (GPA) olarak adlandırılmaktadır) arasından seçilir.

25 Bir düzenlemede, nörolojik hastalık kronik enflamatuvar demiyelinizan polinöropati (CIDP), Guillain-Barre sendromu, paraproteinemik polinöropatiler, nöromiyelitis optika (NMO, NMO spektrumu rahatsızlıklar veya NMO spektrumu hastalıklar) ve miyastenia gravis arasından seçilir.

Bir düzenlemede immünolojik hematolojik hastalık idiyopatik trombositopeni purpura (ITP),

30 trombotik trombositopenik purpura (TTP), ılık idiyopatik hemolitik anemi, Goodpasture sendromu ve anti-HLA antikorlarına bağlı transplantasyon donör uyumsuzluğu arasından seçilir.

Bir düzenlemede hastalık miyastenia gravis, nöromiyelitis optika, CIDP, Guillaume-Barre

Sendromu, Paraproteinemik Polinöropati, Dirençli Epilepsi, ITP/TTP, hemolitik anemi, Goodpasture Sendromu, ABO uyumsuzluğu, Lupus nefriti, renal vaskülit, skleroderma, fibrozan alveolit, dilate kardiyomyopati, Graves Hastalığı, Tip 1 diyabet, otoimmün diyabet, pemfigus, skleroderma, lupus, ANCA vaskülit, dermatomyozit, Sjogren hastalığı ve romatoid artrit arasından seçilir.

Bir düzenlemede dermatolojik hastalık büllöz pemfidoid, pemfigus vulgaris, ANCA'yla ilişkili vaskülit ve dilate kardiyomyopati arasından seçilir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun antikolar veya fragmanları, allojenik organ veya doku transplantasyonu ile ilişkili alloimmün hastalıkların veya bazı yenidoğan hastalıklarının profilaksisi veya tedavisinde kullanılabilir.

Protein, proteolitik olarak duyarlı bir polipeptit, yani doğal durumda veya sekresyon sırasında bir veya daha fazla *E. coli* gibi gram negatif bakteriyel proteaz tarafından yarılmaya yatkın, yarılmaya eğilimli veya yarılmış olan proteinler olabilir. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein DegP, Proteaz III ve Tsp arasından seçilen bir proteaza proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteaz Tsp'ye proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar DegP ve Proteaz III'e proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar DegP ve Tsp'ye proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar Tsp ve Proteaz III'e proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar DegP, Proteaz III ve Tsp'ye proteolitik olarak duyarlıdır.

Tercihen protein bir ökaryotik polipeptittir.

Buluşa uygun hücreler tarafından eksprese edilen ilgilenilen protein örneğin bir immünojen, iki heterolog protein içeren bir füzyon proteini veya bir antikor olabilir. İlgilenilen protein olarak kullanıma yönelik antikolar arasında monoklonal, çok değerlikli, multispesifik, beşeri özellikler verilmiş, tamamen beşeri veya kimerik antikolar yer alır. Antikor herhangi bir türden olabilir, ama tercihen bir monoklonal antikor, bir beşeri antikor veya beşeri özellikler verilmiş bir fragmandan elde edilir. Antikor herhangi bir immüoglobülin sınıfından (örneğin IgG, IgE, IgM, IgD veya IgA) veya alt sınıfından elde edilebilir ve fare, sıçan, köpek balığı, tavşan, domuz, hamster, deve, lama, keçi veya insan da dâhil olmak üzere herhangi bir türden elde edilebilir. Antikor fragmanının bölümleri birden fazla türden elde edilebilir, örneğin antikor fragmanları kimerik olabilir. Bir örnekte, sabit bölgeler bir türdür ve değişken bölgeler başka bir türdür.

Sendromu, Paraproteinemik Polinöropati, Dirençli Epilepsi, ITP/TTP, hemolitik anemi, Goodpasture Sendromu, ABO uyumsuzluğu, Lupus nefriti, renal vaskülit, skleroderma, fibrozan alveolit, dilate kardiyomiyopati, Graves Hastalığı, Tip 1 diyabet, otoimmün diyabet, pemfigus, skleroderma, lupus, ANCA vasküliti, dermatomiyozit, Sjogren hastalığı ve romatoid artrit arasından seçilir.

Bir düzenlemede dermatolojik hastalık büllöz pemfidoid, pemfigus vulgaris, ANCA'yla ilişkili vaskülit ve dilate kardiyomiyopati arasından seçilir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun antikolar veya fragmanları, allojenik organ veya doku transplantasyonu ile ilişkili alloimmün hastalıkların veya bazı yenidoğan hastalıklarının profilaksisi veya tedavisinde kullanılabilir.

Protein, proteolitik olarak duyarlı bir polipeptit, yani doğal durumda veya sekresyon sırasında bir veya daha fazla *E. coli* gibi gram negatif bakteriyel proteaz tarafından yarılmaya yatkın, yarılmaya eğilimli veya yarılmış olan proteinler olabilir. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein DegP, Proteaz III ve Tsp arasından seçilen bir proteaza proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteaz Tsp'ye proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar DegP ve Proteaz III'e proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar DegP ve Tsp'ye proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar Tsp ve Proteaz III'e proteolitik olarak duyarlıdır. Bir düzenlemede, ilgilenilen protein proteazlar DegP, Proteaz III ve Tsp'ye proteolitik olarak duyarlıdır.

Tercihen protein bir ökaryotik polipeptittir.

Buluşa uygun hücreler tarafından eksprese edilen ilgilenilen protein örneğin bir immünojen, iki heterolog protein içeren bir füzyon proteini veya bir antikor olabilir. İlgilenilen protein olarak kullanıma yönelik antikolar arasında monoklonal, çok değerlikli, multispesifik, beşeri özellikler verilmiş, tamamen beşeri veya kimerik antikolar yer alır. Antikor herhangi bir türden olabilir, ama tercihen bir monoklonal antikor, bir beşeri antikor veya beşeri özellikler verilmiş bir fragmandan elde edilir. Antikor herhangi bir immüoglobülin sınıfından (örneğin IgG, IgE, IgM, IgD veya IgA) veya alt sınıfından elde edilebilir ve fare, sıçan, köpek balığı, tavşan, domuz, hamster, deve, lama, keçi veya insan da dâhil olmak üzere herhangi bir türden elde edilebilir. Antikor fragmanının bölümleri birden fazla türden elde edilebilir, örneğin antikor fragmanları kimerik olabilir. Bir örnekte, sabit bölgeler bir türdür ve değişken bölgeler başka bir türdür.

Antikor WO2009/040562 ve WO2010/035012’de açıklandığı gibi, tam uzunlukta ağır ve hafif zincirlere sahip tam bir antikor molekülü veya bunun bir fragmanı, örneğin VH, VL, VHH, Fab, modifiye Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv fragmanı veya çift spesifiteli bir antikor, örneğin bir Fab-dAb veya Fab-Fv olabilir.

5 Bir düzenlemede protein bir Fab’’dır.

Antikor herhangi bir antijen için spesifik olabilir. Antijen hücreyle ilişkili bir protein, örneğin bakteri hücreleri, maya hücreleri, T hücreleri, endotelyal hücreler veya tümör hücreleri gibi hücreler üzerindeki bir hücre yüzeyi proteini olabilir veya bir çözünen protein olabilir.

İlgilenilen antijenler hastalık veya enfeksiyon sırasında artan proteinler, örneğin reseptörler ve/veya karşılık gelen ligandlar gibi tıbbi olarak önem taşıyan herhangi bir protein de olabilir. Hücre yüzeyi proteinlerinin spesifik örnekleri arasında adhezyon molekülleri, örneğin β 1 integrinler gibi integrinler, örneğin VLA-4, E-selektin, P selektin veya L-selektin, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 veya CSF1-Reseptörü, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nektin-benzeri2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, karsinoembriyonik antijen (CEA), insan sütü yağ globülünü (HMFG1 ve 2), MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II antijenleri, KDR ve VEGF ve uygun olduğunda bunların reseptörleri yer alır.

Çözünen antijenler arasında IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 veya IL-17, örneğin IL17A ve/veya IL17F gibi interlökinler, viral antijenler, örneğin solunum sinsisyal virüsü veya sitomegalovirüs antijenleri, IgE gibi immüoglobülinler, interferon α , interferon β veya interferon γ gibi interferonlar, tümör nekroz faktörü TNF (önceden tümör nekroz faktörü- α olarak biliniyordu), tümör nekroz faktörü β , G-CSF veya GM-CSF gibi koloni stimüle edici faktörler ve PDGF- α ve PDGF- β gibi trombosit türevli büyüme faktörleri ve uygun olduğu durumda bunların reseptörleri yer alır. Diğer antijenler arasında bakteriyel hücre yüzeyi antijenleri, bakteriyel toksinler, influenza, EBV, HepA, B ve C gibi virüsler, biyoterörizm maddeleri, radyonüklitler ve ağır metaller ve yılan ve örümcek zehirleri ve toksinleri yer alır.

Bir düzenlemede antijen FcRn’dir.

Bu buluşta kullanıma yönelik antikorlar bu alanda bilinen herhangi bir uygun usul

Antikor WO2009/040562 ve WO2010/035012’de açıklandığı gibi, tam uzunlukta ağır ve hafif zincirlere sahip tam bir antikor molekülü veya bunun bir fragmanı, örneğin VH, VL, VHH, Fab, modifiye Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv fragmanı veya çift spesifiteli bir antikor, örneğin bir Fab-dAb veya Fab-Fv olabilir.

5 Bir düzenlemede protein bir Fab’’dır.

Antikor herhangi bir antijen için spesifik olabilir. Antijen hücreyle ilişkili bir protein, örneğin bakteri hücreleri, maya hücreleri, T hücreleri, endotelyal hücreler veya tümör hücreleri gibi hücreler üzerindeki bir hücre yüzeyi proteini olabilir veya bir çözünen protein olabilir.

İlgilenilen antijenler hastalık veya enfeksiyon sırasında artan proteinler, örneğin reseptörler ve/veya karşılık gelen ligandlar gibi tıbbi olarak önem taşıyan herhangi bir protein de olabilir. Hücre yüzeyi proteinlerinin spesifik örnekleri arasında adhezyon molekülleri, örneğin β 1 integrinler gibi integrinler, örneğin VLA-4, E-selektin, P selektin veya L-selektin, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CDCP1, CSF1 veya CSF1-Reseptörü, DPCR1, DPCR1, dudulin2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nektin-benzeri2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, karsinoembriyonik antijen (CEA), insan sütü yağ globülünü (HMFG1 ve 2), MHC Sınıf I ve MHC Sınıf II antijenleri, KDR ve VEGF ve uygun olduğunda bunların reseptörleri yer alır.

Çözünen antijenler arasında IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 veya IL-17, örneğin IL17A ve/veya IL17F gibi interlökinler, viral antijenler, örneğin solunum sinsisyal virüsü veya sitomegalovirüs antijenleri, IgE gibi immünoglobülinler, interferon α , interferon β veya interferon γ gibi interferonlar, tümör nekroz faktörü TNF (önceden tümör nekroz faktörü- α olarak biliniyordu), tümör nekroz faktörü β , G-CSF veya GM-CSF gibi koloni stimüle edici faktörler ve PDGF- α ve PDGF- β gibi trombosit türevli büyüme faktörleri ve uygun olduğu durumda bunların reseptörleri yer alır. Diğer antijenler arasında bakteriyel hücre yüzeyi antijenleri, bakteriyel toksinler, influenza, EBV, HepA, B ve C gibi virüsler, biyoterörizm maddeleri, radyonüklitler ve ağır metaller ve yılan ve örümcek zehirleri ve toksinleri yer alır.

Bir düzenlemede antijen FcRn’dir.

Bu buluşta kullanıma yönelik antikorlar bu alanda bilinen herhangi bir uygun usul

kullanılarak elde edilebilir. Polipeptidi eksprese eden (rekombinant yolla veya doğal olarak) hücreler (aktive olmuş T hücreleri gibi) dâhil olmak üzere, füzyon proteinleri ve bunların mutantlarını içeren FcRn polipeptidi/proteini, spesifik olarak FcRn'yi tanıyan antikorlar üretmek için kullanılabilir. Polipeptit “olgun” polipeptit veya bunun biyolojik olarak aktif bir fragmanı veya türevi olabilir. Beşeri protein Swiss-Prot'ta P55899 numarasıyla kayıtlıdır. Bir düzenlemede immünojen FcRn alfa zinciri veya bunun bir fragmanıdır.

Bir konakçıya bağışıklık kazandırmak için kullanılacak polipeptitler, bu alanda iyi bilinen işlemlerle ekspresyon sistemleri içeren genetik olarak tasarlanmış konakçı hücrelerinden hazırlanabilir veya doğal biyolojik kaynaklardan geri kazanılabilir. Bu buluşta, “polipeptitler” terimi peptitler, polipeptitler ve proteinleri kapsamaktadır. Bunlar aksi belirtilmedikçe alternatifli olarak kullanılmaktadır. FcRn polipeptidi bazı durumlarda örneğin bir afinite etiketine kaynaşmış bir füzyon proteini gibi daha büyük bir proteinin bir parçası olabilir.

İyi bilinen ve rutin protokoller kullanılarak bir hayvana, tercihen insan dışı bir hayvana polipeptitlerin uygulanmasıyla hayvana bağışıklık kazandırmanın gerekli olduğu, FcRn polipeptidine karşı üretilen antikorlar elde edilebilir, örneğin bakınız: Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Cilt 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, İngiltere, 1986). Tavşanlar, fareler, sıçanlar, koyunlar, inekler, develer veya domuzlar gibi birçok sıcakkanlı hayvana bağışıklık kazandırılabilir. Ancak genellikle en uygun olanlar fareler, tavşanlar, domuzlar ve sıçanlardır.

Bir düzenlemede, antikor ilgilenilen antijenin aktivitesini işlevsel olarak değiştirmek için kullanılabilir. Örneğin antikor sözü edilen antijenin aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak nötralize, antagonize veya agonize edebilir veya basitçe normal liganın buna bağlanmasını bloke edebilir.

Bu buluş ayrıca mutasyondan geçmiş bir Tsp geni (burada mutasyondan geçmiş Tsp geni proteaz aktivitesi azalmış bir Tsp proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp genidir), bir mutant spr'yi kodlayan bir mutant spr geni, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir gen ve FcRn için spesifik bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanını kodlayan bir polinükleotit dizisi içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi sunmaktadır.

Çeşitli anti-FcRn antikorları ve fragmanları dizi 36 ila 74'te gösterilmektedir.

Bir düzenlemede ağır zincir bağımsız bir şekilde DİZİ İD NO: 36, 37 ve 38'den seçilen 1, 2

kullanılarak elde edilebilir. Polipeptidi eksprese eden (rekombinant yolla veya doğal olarak) hücreler (aktive olmuş T hücreleri gibi) dâhil olmak üzere, füzyon proteinleri ve bunların mutantlarını içeren FcRn polipeptidi/proteini, spesifik olarak FcRn'yi tanıyan antikorlar üretmek için kullanılabilir. Polipeptit “olgun” polipeptit veya bunun biyolojik olarak aktif bir fragmanı veya türevi olabilir. Beşeri protein Swiss-Prot'ta P55899 numarasıyla kayıtlıdır. Bir düzenlemede immünojen FcRn alfa zinciri veya bunun bir fragmanıdır.

Bir konakçıya bağışıklık kazandırmak için kullanılacak polipeptitler, bu alanda iyi bilinen işlemlerle ekspresyon sistemleri içeren genetik olarak tasarlanmış konakçı hücrelerinden hazırlanabilir veya doğal biyolojik kaynaklardan geri kazanılabilir. Bu buluşta, “polipeptitler” terimi peptitler, polipeptitler ve proteinleri kapsamaktadır. Bunlar aksi belirtilmedikçe alternatifli olarak kullanılmaktadır. FcRn polipeptidi bazı durumlarda örneğin bir afinite etiketine kaynaşmış bir füzyon proteini gibi daha büyük bir proteinin bir parçası olabilir.

İyi bilinen ve rutin protokoller kullanılarak bir hayvana, tercihen insan dışı bir hayvana polipeptitlerin uygulanmasıyla hayvana bağışıklık kazandırmanın gerekli olduğu, FcRn polipeptidine karşı üretilen antikorlar elde edilebilir, örneğin bakınız: Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Cilt 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, İngiltere, 1986). Tavşanlar, fareler, sıçanlar, koyunlar, inekler, develer veya domuzlar gibi birçok sıcakkanlı hayvana bağışıklık kazandırılabilir. Ancak genellikle en uygun olanlar fareler, tavşanlar, domuzlar ve sıçanlardır.

Bir düzenlemede, antikor ilgilenilen antijenin aktivitesini işlevsel olarak değiştirmek için kullanılabilir. Örneğin antikor sözü edilen antijenin aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak nötralize, antagonize veya agonize edebilir veya basitçe normal liganın buna bağlanmasını bloke edebilir.

Bu buluş ayrıca mutasyondan geçmiş bir Tsp geni (burada mutasyondan geçmiş Tsp geni proteaz aktivitesi azalmış bir Tsp proteinini kodlar veya işlevi iptal edilmiş mutasyondan geçmiş bir Tsp genidir), bir mutant spr'yi kodlayan bir mutant spr geni, protein katlanmasını kolaylaştırabilen bir veya daha fazla proteini eksprese edebilen veya aşırı eksprese edebilen bir gen ve FcRn için spesifik bir antikor veya bunun antijen bağlayıcı bir fragmanını kodlayan bir polinükleotit dizisi içeren bir rekombinant gram negatif bakteri hücresi sunmaktadır.

Çeşitli anti-FcRn antikorları ve fragmanları dizi 36 ila 74'te gösterilmektedir.

Bir düzenlemede ağır zincir bağımsız bir şekilde DİZİ İD NO: 36, 37 ve 38'den seçilen 1, 2

veya 3 CDR içerir.

Bir düzenlemede hafif zincir bağımsız bir şekilde DİZİ İD NO: 39, 40 ve 41'den seçilen 1, 2 veya 3 CDR içerir.

5 Bir düzenlemede, antikor ağır zinciri CDR-H1 için DİZİ İD NO:36'da verilen diziyi, CDR-H2 için DİZİ İD NO:37'de verilen diziyi ve CDRH3 için DİZİ İD NO:38'de verilen diziyi içerir.

Bir düzenlemede, antikor hafif zinciri CDR-L1 için DİZİ İD NO:39'da verilen diziyi, CDR-L2 için DİZİ İD NO:40'ta verilen diziyi ve CDRL3 için DİZİ İD NO:41'de verilen diziyi içerir.

10 Bir düzenlemede, antikor ağır zinciri CDR-H1 için DİZİ İD NO:36'da verilen diziyi, CDR-H2 için DİZİ İD NO:37'de verilen diziyi, CDRH3 için DİZİ İD NO:38'de verilen diziyi, CDR-L1 için DİZİ İD NO:39'da verilen diziyi, CDR-L2 için DİZİ İD NO:40'ta verilen diziyi ve CDRL3 için DİZİ İD NO:41'de verilen diziyi içerir.

Bir düzenlemede, hücre burada açıklanan bir diziyi haiz bir antikor molekülü eksprese eder.

15 Antikor molekülü antikorları ve bunların bağlayıcı fragmanlarını içerir.

Uygun bir şekilde bu buluşa uygun beşeri özellikler verilmiş antikor burada spesifik olarak sunulan CDR'lerin birinin veya daha fazlasının yanı sıra beşeri akseptör çerçeve bölgeleri içeren bir değişken sahaya sahiptir. Dolayısıyla, bir düzenlemede, değişken sahaların beşeri akseptör çerçeve bölgeleri ve beşeri olmayan donör CDR'leri içerdiği, beşeri FcRn'yi

20 bağlayan beşeri özellikler verilmiş bir antikor sunulmaktadır. Bir düzenlemede, hafif zincir değişken sahası DİZİ İD NO:50'de verilen diziyi içerir ve ağır zincir değişken sahası DİZİ İD NO:58'de verilen diziyi içerir. Bir örnekte hafif zincir DİZİ İD NO:54'te verilen diziyi içerir ve ağır zincir DİZİ İD NO:62'de verilen diziyi içerir.

25 Ekspresyondan sonra antikor fragmanları örneğin bir efektör molekülü gibi başka bir yapıya konjugasyonla ayrıca işleminden geçirilebilir.

Efektör molekül terimi burada örneğin antineoplastik maddeler, ilaçlar, toksinler (bakteriyel veya bitkisel kökenli enzimatik olarak aktif toksinler ve bunların fragmanları, örneğin risin ve bunun fragmanları gibi), biyolojik olarak aktif proteinler, örneğin enzimler, başka antikor veya antikor fragmanları, sentetik veya doğal olarak oluşan polimerler, nükleik asitler ve 30 bunların fragmanları, örneğin DNA, RNA ve bunların fragmanları, radyonüklitler, özellikle radyoiodür, radyoizotoplar, şelatlanmış metaller, nanoparçacıklar ve raportör grupları,

veya 3 CDR içerir.

Bir düzenlemede hafif zincir bağımsız bir şekilde DİZİ İD NO: 39, 40 ve 41'den seçilen 1, 2 veya 3 CDR içerir.

5 Bir düzenlemede, antikor ağır zinciri CDR-H1 için DİZİ İD NO:36'da verilen diziyi, CDR-H2 için DİZİ İD NO:37'de verilen diziyi ve CDRH3 için DİZİ İD NO:38'de verilen diziyi içerir.

Bir düzenlemede, antikor hafif zinciri CDR-L1 için DİZİ İD NO:39'da verilen diziyi, CDR-L2 için DİZİ İD NO:40'ta verilen diziyi ve CDRL3 için DİZİ İD NO:41'de verilen diziyi içerir.

10 Bir düzenlemede, antikor ağır zinciri CDR-H1 için DİZİ İD NO:36'da verilen diziyi, CDR-H2 için DİZİ İD NO:37'de verilen diziyi, CDRH3 için DİZİ İD NO:38'de verilen diziyi, CDR-L1 için DİZİ İD NO:39'da verilen diziyi, CDR-L2 için DİZİ İD NO:40'ta verilen diziyi ve CDRL3 için DİZİ İD NO:41'de verilen diziyi içerir.

Bir düzenlemede, hücre burada açıklanan bir diziyi haiz bir antikor molekülü eksprese eder.

15 Antikor molekülü antikorları ve bunların bağlayıcı fragmanlarını içerir.

Uygun bir şekilde bu buluşa uygun beşeri özellikler verilmiş antikor burada spesifik olarak sunulan CDR'lerin birinin veya daha fazlasının yanı sıra beşeri akseptör çerçeve bölgeleri içeren bir değişken sahaya sahiptir. Dolayısıyla, bir düzenlemede, değişken sahaların beşeri akseptör çerçeve bölgeleri ve beşeri olmayan donör CDR'leri içerdiği, beşeri FcRn'yi

20 bağlayan beşeri özellikler verilmiş bir antikor sunulmaktadır. Bir düzenlemede, hafif zincir değişken sahası DİZİ İD NO:50'de verilen diziyi içerir ve ağır zincir değişken sahası DİZİ İD NO:58'de verilen diziyi içerir. Bir örnekte hafif zincir DİZİ İD NO:54'te verilen diziyi içerir ve ağır zincir DİZİ İD NO:62'de verilen diziyi içerir.

25 Ekspresyondan sonra antikor fragmanları örneğin bir efektör molekülü gibi başka bir yapıya konjugasyonla ayrıca işleminden geçirilebilir.

Efektör molekül terimi burada örneğin antineoplastik maddeler, ilaçlar, toksinler (bakteriyel veya bitkisel kökenli enzimatik olarak aktif toksinler ve bunların fragmanları, örneğin risin ve bunun fragmanları gibi), biyolojik olarak aktif proteinler, örneğin enzimler, başka antikor veya antikor fragmanları, sentetik veya doğal olarak oluşan polimerler, nükleik asitler ve 30 bunların fragmanları, örneğin DNA, RNA ve bunların fragmanları, radyonüklitler, özellikle radyoiodür, radyoizotoplar, şelatlanmış metaller, nanoparçacıklar ve raportör grupları,

örneğin floresan bileşikler veya NMR veya ESR spektroskopisiyle saptanabilen bileşikleri kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Efektör molekül antikora veya fragmanına herhangi bir uygun usulle bağlanabilir, örneğin bir antikor fragmanı WO05/003171 veya WO05/003170'te (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi en az bir efektör moleküle
5 bağlanmak üzere modifiye edilebilir. WO05/003171 veya WO05/003170'te uygun efektör molekül de açıklanmaktadır.

Bir düzenlemede antikor veya bir Fab gibi bunun bir fragmanı, gerekliyse, istenen özelliklere sahip, örneğin tam antikorlara benzer bir ürün elde etmek için PEGillenir. Örneğin antikor, tercihen ağır zincirin C-terminal ucunda sistein kalıntılarının birine bağlı olarak lizil-
10 maleimid türevli bir gruba sahip olan, WO01/094585'te açıklandığı gibi bir PEGillenmiş anti-TNF- α Fab' olabilir, burada lizil kalıntısının iki amino grubunun her birine, metoksipoli(etilenglikol) kalıntılarının toplam ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 40,000Da olacak şekilde molekül ağırlığı yaklaşık 20,000 Da olan bir metoksipoli(etilenglikol) kalıntısı kovalent olarak bağlıdır, daha tercihen lizil-maleimid türevli grup [1-[[[2-[[3-(2,5-diokso-1-
15 pirolidinil)-1-oksopropil]amino]etil]amino]-karbonil]-1,5-pentandiil]bis(iminokarbonil)'dir.

Bir düzenlemede bu buluşa uygun bir Fab veya Fab' bir beşeri serum albümini molekülüne veya bir nişasta molekülüne konjuge edilir.

Hücre ayrıca ilgilenilen bir veya daha fazla başka proteini kodlayan başka polinükleotit dizileri de içerebilir.

20 Burada ayrıca Humphreys ve diğerleri "Engineering of Escherichia coli to improve the purification of periplasmic Fab' fragments: changing the pI of the chromosomally encoded PhoS/PstS protein", Protein Expression and Purification 37 (2004) 109-118'de ve WO04/035792'de (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi, yabancı tipte, saflaştırma sırasında ilgilenilen rekombinant proteinle birlikte saflaştığı bilinen bir veya
25 daha fazla E. coli konakçı proteininin genetik modifikasyon için seçildiği hücreler açıklanmaktadır. Bu modifiye konakçı proteinlerinin kullanımı, seçilmiş E. coli proteinlerinin fiziksel özellikleri artık rekombinant antikorla birlikte saflaşmayacakları şekilde değiştirilerek E. coli'de üretilen ilgilenilen proteinler, özellikle antikorlar için saflaştırma işlemini geliştirmektedir. Tercihen değiştirilen E. coli proteini Fosfat bağlayıcı protein (PhoS/PstS),
30 Dipeptit bağlayıcı protein (DppA), Maltoz bağlayıcı protein (MBP) ve Tiorredoksinin biri veya daha fazlasından seçilir.

Bir örnekte, kontamine edici bir konakçı proteininin fiziksel bir özelliği C-terminale veya N-

örneğin floresan bileşikler veya NMR veya ESR spektroskopisiyle saptanabilen bileşikleri kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Efektör molekül antikora veya fragmanına herhangi bir uygun usulle bağlanabilir, örneğin bir antikor fragmanı WO05/003171 veya WO05/003170'te (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi en az bir efektör moleküle
5 bağlanmak üzere modifiye edilebilir. WO05/003171 veya WO05/003170'te uygun efektör molekül de açıklanmaktadır.

Bir düzenlemede antikor veya bir Fab gibi bunun bir fragmanı, gerekliyse, istenen özelliklere sahip, örneğin tam antikorlara benzer bir ürün elde etmek için PEGillenir. Örneğin antikor, tercihen ağır zincirin C-terminal ucunda sistein kalıntılarının birine bağlı olarak lizil-
10 maleimid türevli bir gruba sahip olan, WO01/094585'te açıklandığı gibi bir PEGillenmiş anti-TNF- α Fab' olabilir, burada lizil kalıntısının iki amino grubunun her birine, metoksipoli(etilenglikol) kalıntılarının toplam ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 40,000Da olacak şekilde molekül ağırlığı yaklaşık 20,000 Da olan bir metoksipoli(etilenglikol) kalıntısı kovalent olarak bağlıdır, daha tercihen lizil-maleimid türevli grup [1-[[[2-[[3-(2,5-diokso-1-
15 pirolidinil)-1-oksopropil]amino]etil]amino]-karbonil]-1,5-pentandiil]bis(iminokarbonil)'dir.

Bir düzenlemede bu buluşa uygun bir Fab veya Fab' bir beşeri serum albümini molekülüne veya bir nişasta molekülüne konjuge edilir.

Hücre ayrıca ilgilenilen bir veya daha fazla başka proteini kodlayan başka polinükleotit dizileri de içerebilir.

20 Burada ayrıca Humphreys ve diğerleri "Engineering of Escherichia coli to improve the purification of periplasmic Fab' fragments: changing the pI of the chromosomally encoded PhoS/PstS protein", Protein Expression and Purification 37 (2004) 109-118'de ve WO04/035792'de (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi, yabancı tipte, saflaştırma sırasında ilgilenilen rekombinant proteinle birlikte saflaştığı bilinen bir veya
25 daha fazla E. coli konakçı proteininin genetik modifikasyon için seçildiği hücreler açıklanmaktadır. Bu modifiye konakçı proteinlerinin kullanımı, seçilmiş E. coli proteinlerinin fiziksel özellikleri artık rekombinant antikorla birlikte saflaşmayacakları şekilde değiştirilerek E. coli'de üretilen ilgilenilen proteinler, özellikle antikorlar için saflaştırma işlemini geliştirmektedir. Tercihen değiştirilen E. coli proteini Fosfat bağlayıcı protein (PhoS/PstS),
30 Dipeptit bağlayıcı protein (DppA), Maltoz bağlayıcı protein (MBP) ve Tiorredoksinin biri veya daha fazlasından seçilir.

Bir örnekte, kontamine edici bir konakçı proteininin fiziksel bir özelliği C-terminale veya N-

terminale bir amino asit etiketi ilavesiyle değiştirilir. Tercih edilen bir düzenlemede değiştirilen fiziksel özellik izoelektrik noktadır ve amino asit etiketi C-terminale bağlı bir poli-aspartik asit etiketidir. Bir düzenlemede, sözü edilen etiketin ilave edilmesiyle değiştirilen E. coli proteinleri Dipeptit bağlayıcı protein (DppA), Maltoz bağlayıcı protein (MBP), Tioredoksin ve Fosfat bağlayıcı proteindir (PhoS/PstS). Spesifik bir düzenlemede, E. coli Fosfat bağlayıcı proteinin (PhoS/PstS) pI'si, C-terminale 6 aspartik asit kalıntısı içeren bir poliaspartik asit etiketinin (poliD) ilave edilmesiyle 7.2'den 5.1'e düşürülür.

Ayrıca tek başına veya N veya C terminal etiketler ilavesiyle kombinasyon halinde, fiziksel özelliklerini değiştirmek için kontamine edici E. coli proteininin spesifik kalıntılarının modifikasyonu açıklanmaktadır. Bu değişiklikler arasında protein büyüklüğünü değiştirmek için eklemeler veya silmeler veya pI veya hidrofobisiteyi değiştirmek için amino asit süstitüsyonları yer alır. Bu kalıntılar proteinin yüzeyinde bulunabilir. Özel bir düzenlemede PhoS proteininin yüzey kalıntıları proteinin pI'sini azaltmak için değiştirilir. Fosfat bağlanmasında önemli olduğu ima edilen kalıntılardan (Bass, US5,304,472), işlevsel bir PhoS proteinini korumak için kaçınılır. Tercihen proteinin yüzeyinden çok uzağa çıkıntı yapan veya bazik kalıntıların büyük grupları içinde veya yakınında olan lizin kalıntıları hedeflenir. Bir örnekte, PhoS proteini C-terminaline bağlı bir heksa poliaspartik asit etiketire sahiptir, molekülün karşı ucundaki yüzey kalıntıları ise süstitüsyon için hedeflenir. Doğal kalıntıların asidik olanlarla değiştirildiği duruma göre daha büyük bir potansiyel pI değişikliği sağlamak için glutamik asit veya aspartik asit yerine tercihen seçilmiş lizin kalıntıları süstitüe edilir. Buradaki bir süstitüsyon mutantının adlandırılması bir harf, ardından bir sayı ve ardından bir harften oluşur. İlk harf yabancı tip proteindeki amino asidi belirtir. Sayı, amino asit süstitüsyonunun yapılmakta olduğu amino asit pozisyonunu belirtir ve ikinci harf yabancı tip amino asidin yerini alan amino asidi belirtir. Bu buluşta tercih edilen PhoS mutasyonlarında lizin kalıntıları (K) 275, 107, 109, 110, 262, 265, 266, 309, 313 tek veya kombine mutasyonlar olarak glutamik asit (E) veya glutamin (Q) yerine süstitüe edilir, ayrıca lizin(K)318 tek veya kombine bir mutasyon olarak aspartik asit (D) yerine süstitüe edilebilir. Tercihen tek mutasyonlar K262E, K265E ve K266E'der. Tercihen kombine mutasyonlar K265/266E ve K110/265/266E'dir. Daha tercihen, bütün mutasyonlar C-terminale bağlı poliaspartik asit (poliD) etiketi ve isteğe bağlı olarak ayrıca K318D süstitüsyonuyla kombine edilir. Başka bir örnekte, mutasyonlar pI'de en az 2 birimlik bir azalmayla sonuçlanır. Tercihen mutasyonlar PhoS'nin pI'sini 7.2'den yaklaşık 4 ve yaklaşık 5.5 arasına indirir. Bir örnekte, E. coli'nin PhoS proteininin pI'si poliD K318D, poliD K265/266E ve poliD

terminale bir amino asit etiketi ilavesiyle değiştirilir. Tercih edilen bir düzenlemede değiştirilen fiziksel özellik izoelektrik noktadır ve amino asit etiketi C-terminale bağlı bir poli-aspartik asit etiketidir. Bir düzenlemede, sözü edilen etiketin ilave edilmesiyle değiştirilen E. coli proteinleri Dipeptit bağlayıcı protein (DppA), Maltoz bağlayıcı protein (MBP), Tioredoksin ve Fosfat bağlayıcı proteindir (PhoS/PstS). Spesifik bir düzenlemede, E. coli Fosfat bağlayıcı proteinin (PhoS/PstS) pI'si, C-terminale 6 aspartik asit kalıntısı içeren bir poliaspartik asit etiketinin (poliD) ilave edilmesiyle 7.2'den 5.1'e düşürülür.

Ayrıca tek başına veya N veya C terminal etiketler ilavesiyle kombinasyon halinde, fiziksel özelliklerini değiştirmek için kontamine edici E. coli proteininin spesifik kalıntılarının modifikasyonu açıklanmaktadır. Bu değişiklikler arasında protein büyüklüğünü değiştirmek için eklemeler veya silmeler veya pI veya hidrofobisiteyi değiştirmek için amino asit süstitüsyonları yer alır. Bu kalıntılar proteinin yüzeyinde bulunabilir. Özel bir düzenlemede PhoS proteininin yüzey kalıntıları proteinin pI'sini azaltmak için değiştirilir. Fosfat bağlanmasında önemli olduğu ima edilen kalıntılardan (Bass, US5,304,472), işlevsel bir PhoS proteinini korumak için kaçınılır. Tercihen proteinin yüzeyinden çok uzağa çıkıntı yapan veya bazik kalıntıların büyük grupları içinde veya yakınında olan lizin kalıntıları hedeflenir. Bir örnekte, PhoS proteini C-terminaline bağlı bir heksa poliaspartik asit etiketire sahiptir, molekülün karşı ucundaki yüzey kalıntıları ise süstitüsyon için hedeflenir. Doğal kalıntıların asidik olanlarla değiştirildiği duruma göre daha büyük bir potansiyel pI değişikliği sağlamak için glutamik asit veya aspartik asit yerine tercihen seçilmiş lizin kalıntıları süstitüe edilir. Buradaki bir süstitüsyon mutantının adlandırılması bir harf, ardından bir sayı ve ardından bir harften oluşur. İlk harf yabancı tip proteindeki amino asidi belirtir. Sayı, amino asit süstitüsyonunun yapılmakta olduğu amino asit pozisyonunu belirtir ve ikinci harf yabancı tip amino asidin yerini alan amino asidi belirtir. Bu buluşta tercih edilen PhoS mutasyonlarında lizin kalıntıları (K) 275, 107, 109, 110, 262, 265, 266, 309, 313 tek veya kombine mutasyonlar olarak glutamik asit (E) veya glutamin (Q) yerine süstitüe edilir, ayrıca lizin(K)318 tek veya kombine bir mutasyon olarak aspartik asit (D) yerine süstitüe edilebilir. Tercihen tek mutasyonlar K262E, K265E ve K266E'der. Tercihen kombine mutasyonlar K265/266E ve K110/265/266E'dir. Daha tercihen, bütün mutasyonlar C-terminale bağlı poliaspartik asit (poliD) etiketi ve isteğe bağlı olarak ayrıca K318D süstitüsyonuyla kombine edilir. Başka bir örnekte, mutasyonlar pI'de en az 2 birimlik bir azalmayla sonuçlanır. Tercihen mutasyonlar PhoS'nin pI'sini 7.2'den yaklaşık 4 ve yaklaşık 5.5 arasına indirir. Bir örnekte, E. coli'nin PhoS proteininin pI'si poliD K318D, poliD K265/266E ve poliD

K110/265/266E mutasyonları kullanılarak sırasıyla 7.2'den yaklaşık 4.9'a, yaklaşık 4.8'e ve yaklaşık 4.5'e düşürülür.

İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit başka bir polipeptitle, tercihen bir sinyal dizisiyle veya olgun polipeptidin N-terminalinde spesifik bir yarıma yerine sahip başka bir polipeptitle
5 bir füzyon olarak eksprese edilebilir. Seçilen heterolog sinyal dizisinin konakçı hücre tarafından tanınan ve işlemde geçirilen bir dizi olması gerekir. Doğal veya bir ökaryotik polipeptit sinyal dizisini tanımayan ve işlemde geçirmeyen prokaryotik konakçı hücreler için, sinyal dizisi prokaryotik bir sinyal dizisiyle süstitüe edilir. Uygun sinyal dizileri arasında OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA ve DsbC yer alır.

10 Yukarıda listelenen bileşenlerin birini veya daha fazlasını içeren uygun vektörlerin konstrüksiyonunda standart ligasyon teknikleri kullanılır. İzole edilmiş plazmitler veya DNA fragmanları yarılar, uygun hale getirilir ve gerekli plazmitleri oluşturmak için istenen formda yeniden bağlanır.

Bir düzenlemede, bu buluşta ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotidi taşımak üzere, tipik
15 olarak bir veya daha fazla ilgilenilen proteini kodlayan bir veya daha fazla protein kodlama dizisi ve bir veya daha fazla regülatör ekspresyon dizisi içeren bir ekspresyon kaseti kullanılır. Bir veya daha fazla regülatör ekspresyon dizisi bir promotör içerebilir. Bir veya daha fazla regülatör ekspresyon dizisi ayrıca bir sonlandırma dizisi gibi bir 3' translyasyondan geçmemiş bölge içerebilir. Uygun promotörler aşağıda daha ayrıntılı olarak ele alınmaktadır.

20 Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre plazmit gibi bir vektör içerir. Vektör tercihen yukarıda tanımlandığı gibi bir veya daha fazla ekspresyon kaseti içerir.

İlgilenilen proteinin hem ağır hem hafif zincirler içeren bir antikor olduğu düzenlemede, hücre hattı iki vektörle transfekte edilebilir, burada ilk vektör bir hafif zincir polipeptidini kodlar ve ikinci bir vektör bir ağır zincir polipeptidini kodlar. Alternatif olarak, tek bir vektör
25 kullanılabilir ve vektör hafif ve ağır zincir polipeptitlerini kodlayan diziler içerir.

Bu buluşta kullanılacak vektör, yukarıda tanımlandığı gibi bir ekspresyon kaseti uygun bir vektör içine eklenerek üretilebilir. Alternatif olarak, ilgilenilen bir proteini kodlayan polinükleotit dizisinin ekspresyonunu yönetmek için regülatör ekspresyon dizileri vektör içinde bulunabilir ve dolayısıyla vektörü tamamlamak için sadece polinükleotidin kodlama
30 bölgesi gerekli olabilir.

Konakçı hücreyi buluşa uygun bir polinükleotitle transforme etmek için kullanılabilen vektörlerin örnekleri arasında pBR322 veya pACYC184 gibi bir plazmit ve/veya bakteriyel

K110/265/266E mutasyonları kullanılarak sırasıyla 7.2'den yaklaşık 4.9'a, yaklaşık 4.8'e ve yaklaşık 4.5'e düşürülür.

İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit başka bir polipeptitle, tercihen bir sinyal dizisiyle veya olgun polipeptidin N-terminalinde spesifik bir yarıma yerine sahip başka bir polipeptitle
5 bir füzyon olarak eksprese edilebilir. Seçilen heterolog sinyal dizisinin konakçı hücre tarafından tanınan ve işlemde geçirilen bir dizi olması gerekir. Doğal veya bir ökaryotik polipeptit sinyal dizisini tanımayan ve işlemde geçirmeyen prokaryotik konakçı hücreler için, sinyal dizisi prokaryotik bir sinyal dizisiyle süstitüe edilir. Uygun sinyal dizileri arasında OmpA, PhoA, LamB, PelB, DsbA ve DsbC yer alır.

10 Yukarıda listelenen bileşenlerin birini veya daha fazlasını içeren uygun vektörlerin konstrüksiyonunda standart ligasyon teknikleri kullanılır. İzole edilmiş plazmitler veya DNA fragmanları yarılar, uygun hale getirilir ve gerekli plazmitleri oluşturmak için istenen formda yeniden bağlanır.

Bir düzenlemede, bu buluşta ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotidi taşımak üzere, tipik
15 olarak bir veya daha fazla ilgilenilen proteini kodlayan bir veya daha fazla protein kodlama dizisi ve bir veya daha fazla regülatör ekspresyon dizisi içeren bir ekspresyon kaseti kullanılır. Bir veya daha fazla regülatör ekspresyon dizisi bir promotör içerebilir. Bir veya daha fazla regülatör ekspresyon dizisi ayrıca bir sonlandırma dizisi gibi bir 3' translyasyondan geçmemiş bölge içerebilir. Uygun promotörler aşağıda daha ayrıntılı olarak ele alınmaktadır.

20 Bir düzenlemede, bu buluşa uygun hücre plazmit gibi bir vektör içerir. Vektör tercihen yukarıda tanımlandığı gibi bir veya daha fazla ekspresyon kaseti içerir.

İlgilenilen proteinin hem ağır hem hafif zincirler içeren bir antikor olduğu düzenlemede, hücre hattı iki vektörle transfekte edilebilir, burada ilk vektör bir hafif zincir polipeptidini kodlar ve ikinci bir vektör bir ağır zincir polipeptidini kodlar. Alternatif olarak, tek bir vektör
25 kullanılabilir ve vektör hafif ve ağır zincir polipeptitlerini kodlayan diziler içerir.

Bu buluşta kullanılacak vektör, yukarıda tanımlandığı gibi bir ekspresyon kaseti uygun bir vektör içine eklenerek üretilebilir. Alternatif olarak, ilgilenilen bir proteini kodlayan polinükleotit dizisinin ekspresyonunu yönetmek için regülatör ekspresyon dizileri vektör içinde bulunabilir ve dolayısıyla vektörü tamamlamak için sadece polinükleotidin kodlama
30 bölgesi gerekli olabilir.

Konakçı hücreyi buluşa uygun bir polinükleotitle transforme etmek için kullanılabilen vektörlerin örnekleri arasında pBR322 veya pACYC184 gibi bir plazmit ve/veya bakteriyel

faj gibi bir viral vektör, bir transpozon gibi transpoze edilebilir bir genetik öge yer alır.

Ekspresyon vektörünün birçok formu vardır. Bu ekspresyon vektörleri genellikle DNA replikasyonunun bir plazmit kaynağını, bir antibiyotik seçilebilir markörü, bir çoklu klonlama yeriyle (ekspresyon kaseti) ayrılan bir promotör ve transkripsiyon sonlandırıcı ve bir ribozom bağlama yerini kodlayan bir DNA dizisi içerir.

Bu buluşta kullanılan promotörler doğrudan ilgili polinükleotide bağlı olabilir veya uygun bir pozisyonda, örneğin ilgili polipeptit eklendiğinde ilgili promotörün onun üzerinde etki yapabileceği bir şekilde bir vektör içinde bulunabilir. Bir düzenlemede, promotör, üzerinde etki yaptığı polinükleotidin kodlayıcı bölümünün öncesinde bulunur, örneğin polinükleotidin her kodlayıcı bölümünden önce ilgili bir promotör bulunur. “Önce” burada promotörün, kodlayıcı polinükleotit bölümüne göre 5' ucunda bulunduğunu belirtmek için kullanılmaktadır.

Promotörler konakçı hücelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun promotörler arasında lac, tac, trp, phoA, lpp, Arab, tet ve T7 yer alır

Kullanılan bir veya daha fazla promotör uyarılabilir promotörler olabilir.

Bakteriyel sistemlerde kullanıma yönelik promotörler genellikle ilgilenilen polipeptidi kodlayan DNA'ya işlevsel olarak bağlı bir Shine-Dalgarno (S.D.) dizisi de içerir.

Ekspresyon vektörü tercihen WO03/048208 veya WO2007/039714'te (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi antikoru veya bunun antijen bağlayıcı

fragmanını üretmek için disistronik bir mesaj da içerir. Tercihen akış yukarı sistron antikorun hafif zincirini kodlayan DNA'yı içerir ve akış aşağı sistron karşılık gelen ağır zinciri kodlayan DNA'yı içerir ve disistronik interjenik dizi (IGS) tercihen IGS1 (DİZİ İD NO: 38), IGS2 (DİZİ İD NO: 39), IGS3 (DİZİ İD NO: 40) ve IGS4 (DİZİ İD NO: 41) arasından seçilen bir diziyi içerir.

Sonlandırıcılar konakçı hücelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun bir sonlandırıcı rrnB'dir.

Promotörler ve sonlandırıcılar da dâhil olmak üzere başka uygun transkripsiyon regülatörleri ve protein hedefleme usulleri “Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli” Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, Eylül 1996, sayfa 512-538'de bulunabilir.

Antikor molekülü hücreden salgılanabilir veya uygun sinyal dizileriyle periplazmaya

faj gibi bir viral vektör, bir transpozon gibi transpoze edilebilir bir genetik öge yer alır.

Ekspresyon vektörünün birçok formu vardır. Bu ekspresyon vektörleri genellikle DNA replikasyonunun bir plazmit kaynağını, bir antibiyotik seçilebilir markörü, bir çoklu klonlama yeriyle (ekspresyon kaseti) ayrılan bir promotör ve transkripsiyon sonlandırıcı ve bir ribozom
5 bağlama yerini kodlayan bir DNA dizisi içerir.

Bu buluşta kullanılan promotörler doğrudan ilgili polinükleotide bağlı olabilir veya uygun bir pozisyonda, örneğin ilgili polipeptit eklendiğinde ilgili promotörün onun üzerinde etki yapabileceği bir şekilde bir vektör içinde bulunabilir. Bir düzenlemede, promotör, üzerinde etki yaptığı polinükleotidin kodlayıcı bölümünün öncesinde bulunur, örneğin polinükleotidin
10 her kodlayıcı bölümünden önce ilgili bir promotör bulunur. “Önce” burada promotörün, kodlayıcı polinükleotit bölümüne göre 5' ucunda bulunduğunu belirtmek için kullanılmaktadır.

Promotörler konakçı hücelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun promotörler arasında lac, tac, trp, phoA, lpp, Arab, tet ve T7 yer alır

15 Kullanılan bir veya daha fazla promotör uyarılabilir promotörler olabilir.

Bakteriyel sistemlerde kullanıma yönelik promotörler genellikle ilgilenilen polipeptidi kodlayan DNA'ya işlevsel olarak bağlı bir Shine-Dalgarno (S.D.) dizisi de içerir.

Ekspresyon vektörü tercihen WO03/048208 veya WO2007/039714'te (içerikleri burada referans olarak zikredilmektedir) açıklandığı gibi antikoru veya bunun antijen bağlayıcı
20 fragmanını üretmek için disistronik bir mesaj da içerir. Tercihen akış yukarı sistron antikorun hafif zincirini kodlayan DNA'yı içerir ve akış aşağı sistron karşılık gelen ağır zinciri kodlayan DNA'yı içerir ve disistronik interjenik dizi (IGS) tercihen IGS1 (DİZİ İD NO: 38), IGS2 (DİZİ İD NO: 39), IGS3 (DİZİ İD NO: 40) ve IGS4 (DİZİ İD NO: 41) arasından seçilen bir diziyi içerir.

25 Sonlandırıcılar konakçı hücelere endojen veya eksojen olabilir. Uygun bir sonlandırıcı rrrB'dir.

Promotörler ve sonlandırıcılar da dâhil olmak üzere başka uygun transkripsiyon regülatörleri ve protein hedefleme usulleri “Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in Escherichia coli” Savvas C. Makrides, Microbiological Reviews, Eylül 1996, sayfa 512-
30 538'de bulunabilir.

Antikor molekülü hücreden salgılanabilir veya uygun sinyal dizileriyle periplazmaya

hedeflenebilir. Alternatif olarak, antikor molekülleri hücrenin sitoplazması içinde birikebilir. Tercihen antikor molekülü periplazmaya hedeflenir.

Buluşun burada polinükleotide referansla açıklanan düzenlemeleri, buluşun alternatif düzenlemeleri, örneğin ilgili yönün uygulanabilmesi koşuluyla, kullanılan bileşenleri içeren vektörler, ekspresyon kasetleri ve/veya konakçı hücreler için de geçerlidir.

Bu buluş ayrıca, ilgilenilen bir rekombinant proteini üretmek için, bu buluş için yukarıda açıklandığı gibi bir rekombinant gram negatif bakteri hücrelerinde ilgilenilen rekombinant proteinin eksprese edilmesini içeren bir usul sunmaktadır.

Bu buluşun usulünde tercihen kullanılan ilgilenilen gram negatif bakteri hücresi ve proteini yukarıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit eksojen olduğunda, polinükleotit konakçı hücreye bu alanda bilinen herhangi bir uygun yolla dâhil edilebilir. Tipik olarak, polinükleotit hücreye transforme edilen bir ekspresyon vektörünün parçası olarak dâhil edilir. Dolayısıyla, bir yöne göre bu buluşa uygun hücre ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotidi içeren bir ekspresyon kasetini haizdir.

Polinükleotit dizisi standart teknikler kullanılarak, örneğin rubidyum klorür, PEG veya elektroporasyon kullanılarak bir hücreye transforme edilebilir.

Burada açıklandığı gibi usulde ayrıca ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotitle başarıyla transforme edilmiş stabil hücrelerin seçimini kolaylaştırmak için bir seçim sistemi kullanılabilir. Seçim sisteminde tipik olarak bir seçim markörünü kodlayan bir polinükleotit dizisinin birlikte transformasyonu kullanılır. Bir örnekte, hücreye transforme edilen her polinükleotit ayrıca bir veya daha fazla seçim markörünü kodlayan bir polinükleotidi içerir. Dolayısıyla, ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotidin ve markörü kodlayan bir veya daha fazla polinükleotidin transformasyonu birlikte olur ve seçim sistemi istenen proteinleri üreten bu hücreleri seçmek için kullanılabilir.

Bir veya daha fazla markörü eksprese edebilen hücreler, dâhil edilen seçim sisteminin polipeptit/gen veya polipeptit bileşeninin sağladığı özellikler (örneğin antibiyotik direnci) nedeniyle, yapay olarak uygulanan koşullar, örneğin bir toksin veya antibiyotik ilavesi altında hayatta kalabilir/büyüyebilir/çoğalabilir. Bir veya daha fazla markörü eksprese edemeyen hücreler yapay olarak uygulanan koşullar altında hayatta kalamaz/büyüyemez/çoğalamaz. Yapay olarak uygulanan koşullar gerektiği şekilde daha etkili veya daha az etkili olacak şekilde seçilebilir.

hedeflenebilir. Alternatif olarak, antikor molekülleri hücrenin sitoplazması içinde birikebilir. Tercihen antikor molekülü periplazmaya hedeflenir.

Buluşun burada polinükleotide referansla açıklanan düzenlemeleri, buluşun alternatif düzenlemeleri, örneğin ilgili yönün uygulanabilmesi koşuluyla, kullanılan bileşenleri içeren vektörler, ekspresyon kasetleri ve/veya konakçı hücreler için de geçerlidir.

Bu buluş ayrıca, ilgilenilen bir rekombinant proteini üretmek için, bu buluş için yukarıda açıklandığı gibi bir rekombinant gram negatif bakteri hücrelerinde ilgilenilen rekombinant proteinin eksprese edilmesini içeren bir usul sunmaktadır.

Bu buluşun usulünde tercihen kullanılan ilgilenilen gram negatif bakteri hücresi ve proteini yukarıda ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

İlgilenilen proteini kodlayan polinükleotit eksojen olduğunda, polinükleotit konakçı hücreye bu alanda bilinen herhangi bir uygun yolla dâhil edilebilir. Tipik olarak, polinükleotit hücreye transforme edilen bir ekspresyon vektörünün parçası olarak dâhil edilir. Dolayısıyla, bir yöne göre bu buluşa uygun hücre ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotidi içeren bir ekspresyon kasetini haizdir.

Polinükleotit dizisi standart teknikler kullanılarak, örneğin rubidyum klorür, PEG veya elektroporasyon kullanılarak bir hücreye transforme edilebilir.

Burada açıklandığı gibi usulde ayrıca ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotitle başarıyla transforme edilmiş stabil hücrelerin seçimini kolaylaştırmak için bir seçim sistemi kullanılabilir. Seçim sisteminde tipik olarak bir seçim markörünü kodlayan bir polinükleotit dizisinin birlikte transformasyonu kullanılır. Bir örnekte, hücreye transforme edilen her polinükleotit ayrıca bir veya daha fazla seçim markörünü kodlayan bir polinükleotidi içerir. Dolayısıyla, ilgilenilen proteini kodlayan polinükleotidin ve markörü kodlayan bir veya daha fazla polinükleotidin transformasyonu birlikte olur ve seçim sistemi istenen proteinleri üreten bu hücreleri seçmek için kullanılabilir.

Bir veya daha fazla markörü eksprese edebilen hücreler, dâhil edilen seçim sisteminin polipeptit/gen veya polipeptit bileşeninin sağladığı özellikler (örneğin antibiyotik direnci) nedeniyle, yapay olarak uygulanan koşullar, örneğin bir toksin veya antibiyotik ilavesi altında hayatta kalabilir/büyüyebilir/çoğalabilir. Bir veya daha fazla markörü eksprese edemeyen hücreler yapay olarak uygulanan koşullar altında hayatta kalamaz/büyüyemez/çoğalamaz. Yapay olarak uygulanan koşullar gerektiği şekilde daha etkili veya daha az etkili olacak şekilde seçilebilir.

Bu buluşta herhangi bir uygun seçim sistemi kullanılabilir. Tipik olarak seçim sistemi vektöre bilinen bir antibiyotiğe direnç veren bir veya daha fazla gen, örneğin bir tetrasiklin, kloramfenikol, kanamisin veya ampisilin direnç geni dâhil edilmesine dayanabilir. İlgili bir antibiyotiğin varlığında büyüyen hücreler, hem antibiyotiğe direnç veren geni hem de istenen proteini eksprese etmek üzere seçilebilir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun usul ayrıca transforme edilmiş bir hücreyi bir ortamda kültürleyerek ilgilenilen proteini eksprese etme aşamasını içerir.

İlgilenilen proteini eksprese etmek için uyarılabilir bir ekspresyon sistemi veya yapısal bir promotör kullanılabilir. Uygun uyarılabilir ekspresyon sistemleri ve yapısal promotörler bu alanda iyi bilinmektedir.

Transforme edilmiş hücreyi kültürlemek için herhangi bir uygun ortam kullanılabilir. Ortam spesifik bir seçim sistemi için adapte edilebilir, örneğin ortam sadece başarıyla transforme olmuş hücrelerin ortamda büyümesine izin vermek için bir antibiyotik içerebilir.

Ortamdan elde edilen hücreler gerektiği şekilde başka tarama ve/veya saflaştırma işlemlerine tabi tutulabilir. Usul ayrıca gerektiği şekilde ilgilenilen proteini ekstrakte etmek ve saflaştırmak için bir veya daha fazla aşama içerebilir.

Polipeptit sitoplazma, periplazma veya üst faz da dâhil olmak üzere suştan geri kazanılabilir.

Bir düzenlemede antikor periplazmadan izole edilir.

Bir düzenlemede uyarım sonrası besleme hızı 5 ila 7.5 g/saat aralığında, örneğin yaklaşık 7 g/saattir.

Bir proteini saflaştırmak için kullanılan spesifik usul(ler) protein tipine bağlıdır. Uygun usuller arasında immüno-afinite veya iyon değişimi kolonları üzerinde fraksiyonlarına ayırma; etanolla çöktme; ters faz HPLC; hidrofobik etkileşim kromatografisi; silis üzerinde kromatografi; S-SEPHAROSE ve DEAE gibi bir iyon değişimi reçinesi üzerinde kromatografi; odaklama kromatografisi; amonyum sülfatla çöktme; ve jel filtrasyon yer alır.

Antikorlar örneğin protein A-Sepharose, protein G kromatografisi, protein L kromatografisi, tiofilik, karma kip reçineler, His etiketi, FLAG etiketi, hidroksilapatit kromatografisi, jel elektroforez, diyaliz, afinite kromatografisi, Amonyum sülfatla, etanolla veya PEG'le fraksiyonlarına ayırma/çöktme, iyon değişim membranları, genişletilmiş yatak adsorpsiyon kromatografisi (EBA) veya simüle edilmiş hareketli yatak kromatografisi gibi geleneksel antikor saflaştırma prosedürleriyle uygun bir şekilde kültür ortamından ve/veya sitoplazma

Bu buluşta herhangi bir uygun seçim sistemi kullanılabilir. Tipik olarak seçim sistemi vektöre bilinen bir antibiyotiğe direnç veren bir veya daha fazla gen, örneğin bir tetrasiklin, kloramfenikol, kanamisin veya ampisilin direnç geni dâhil edilmesine dayanabilir. İlgili bir antibiyotiğin varlığında büyüyen hücreler, hem antibiyotiğe direnç veren geni hem de istenen proteini eksprese etmek üzere seçilebilir.

Bir düzenlemede, bu buluşa uygun usul ayrıca transforme edilmiş bir hücreyi bir ortamda kültürleyerek ilgilenilen proteini eksprese etme aşamasını içerir.

İlgilenilen proteini eksprese etmek için uyarılabilir bir ekspresyon sistemi veya yapısal bir promotör kullanılabilir. Uygun uyarılabilir ekspresyon sistemleri ve yapısal promotörler bu alanda iyi bilinmektedir.

Transforme edilmiş hücreyi kültürlemek için herhangi bir uygun ortam kullanılabilir. Ortam spesifik bir seçim sistemi için adapte edilebilir, örneğin ortam sadece başarıyla transforme olmuş hücrelerin ortamda büyümesine izin vermek için bir antibiyotik içerebilir.

Ortamdan elde edilen hücreler gerektiği şekilde başka tarama ve/veya saflaştırma işlemlerine tabi tutulabilir. Usul ayrıca gerektiği şekilde ilgilenilen proteini ekstrakte etmek ve saflaştırmak için bir veya daha fazla aşama içerebilir.

Polipeptit sitoplazma, periplazma veya üst faz da dâhil olmak üzere suştan geri kazanılabilir.

Bir düzenlemede antikor periplazmadan izole edilir.

Bir düzenlemede uyarım sonrası besleme hızı 5 ila 7.5 g/saat aralığında, örneğin yaklaşık 7 g/saattir.

Bir proteini saflaştırmak için kullanılan spesifik usul(ler) protein tipine bağlıdır. Uygun usuller arasında immüno-afinite veya iyon değişimi kolonları üzerinde fraksiyonlarına ayırma; etanolla çöktme; ters faz HPLC; hidrofobik etkileşim kromatografisi; silis üzerinde kromatografi; S-SEPHAROSE ve DEAE gibi bir iyon değişimi reçinesi üzerinde kromatografi; odaklama kromatografisi; amonyum sülfatla çöktme; ve jel filtrasyon yer alır.

Antikorlar örneğin protein A-Sepharose, protein G kromatografisi, protein L kromatografisi, tiofilik, karma kip reçineler, His etiketi, FLAG etiketi, hidroksilapatit kromatografisi, jel elektroforez, diyaliz, afinite kromatografisi, Amonyum sülfatla, etanolla veya PEG'le fraksiyonlarına ayırma/çöktme, iyon değişim membranları, genişletilmiş yatak adsorpsiyon kromatografisi (EBA) veya simüle edilmiş hareketli yatak kromatografisi gibi geleneksel antikor saflaştırma prosedürleriyle uygun bir şekilde kültür ortamından ve/veya sitoplazma

ekstraktından ve/veya periplazma ekstraktından ayrılabilir.

Usul ayrıca ilgilenilen proteinin ekspresyon miktarını ölçme ve ilgilenilen proteini eksprese etme seviyeleri yüksek olan hücreleri seçme aşamasını içerebilir.

Usul ayrıca bir antikor veya antikor fragmanı gibi, ilgilenilen proteinin PEGilasyonu gibi bir veya daha fazla başka akış aşağı işlem aşaması içerebilir.

Burada açıklanan bir veya daha fazla aşama bir biyoreaktör gibi uygun bir kapta kombinasyon halinde uygulanabilir.

Bu buluşa uygun antikorlar ve fragmanları tedavide veya profilaksizde kullanılabilir.

Teknik olarak uygun olduğunda buluşun düzenlemeleri kombine edilebilir. Burada düzenlemelerin bazı özellikleri/öğeleri içerdiği açıklanmaktadır. Buluş ayrıca sözü edilen özelliklerden/öğelerden oluşan veya esas itibarıyla bunlardan oluşan ayrı düzenlemeler halinde genişletilebilir. Burada patentler ve başvurular gibi teknik referanslar referans olarak zikredilmektedir.

Bu buluş ayrıca ilişikteki Şekillere referansta bulunan aşağıdaki örneklerde sadece örnek yoluyla açıklanmaktadır.

ÖRNEKLER

Örnek 1: Hücre Hatlarının Oluşturulması

MXE016 ve MXE017'nin oluşturulması WO2011/086136'da açıklanmaktadır.

Anti-FcRn Fab' ekspresyonu ve FkpA ile birlikte anti-FcRn Fab', skp ile birlikte anti-FcRn Fab' ve hem FkpA hem skp ekspresyonuyla birlikte anti-FcRn Fab için plazmitlerin oluşturulması

Bir anti-FcRn Fab'ın hem ağır hem hafif zincir dizilerini (sırasıyla DİZİ İD NO: 63 ve 55) içeren bir plazmit oluşturuldu. Plazmit pTTOD 1519.g57 Fab', Sambrook ve diğerleri, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL press, N.Y.'de bulunabilen geleneksel kısıtlama klonlama metodolojileri kullanılarak oluşturuldu. Plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' aşağıdaki özellikleri içeriyordu: bir güçlü tac promotörü ve lac operatör dizisi. Plazmit, Fab' ağır zincirinin kodlama bölgesinden sonra benzersiz bir EcoRI kısıtlama yeri, ardından, güçlü bir ribozom bağlama yeri içeren kodlayıcı olmayan bir dizi ve sonra benzersiz bir NDeI kısıtlama yeri ihtiva ediyordu.

Fab hafif zincir, ağır zincir genleri tek bir polisistronik mesaj olarak transkribe edildi. E. coli OmpA proteininden sinyal peptidini kodlayan DNA, hem hafif hem ağır zincir gen dizilerinin

ekstraktından ve/veya periplazma ekstraktından ayrılabilir.

Usul ayrıca ilgilenilen proteinin ekspresyon miktarını ölçme ve ilgilenilen proteini eksprese etme seviyeleri yüksek olan hücreleri seçme aşamasını içerebilir.

Usul ayrıca bir antikor veya antikor fragmanı gibi, ilgilenilen proteinin PEGilasyonu gibi bir veya daha fazla başka akış aşağı işlem aşaması içerebilir.

Burada açıklanan bir veya daha fazla aşama bir biyoreaktör gibi uygun bir kapta kombinasyon halinde uygulanabilir.

Bu buluşa uygun antikorlar ve fragmanları tedavide veya profilaksizde kullanılabilir.

Teknik olarak uygun olduğunda buluşun düzenlemeleri kombine edilebilir. Burada düzenlemelerin bazı özellikleri/öğeleri içerdiği açıklanmaktadır. Buluş ayrıca sözü edilen özelliklerden/öğelerden oluşan veya esas itibarıyla bunlardan oluşan ayrı düzenlemeler halinde genişletilebilir. Burada patentler ve başvurular gibi teknik referanslar referans olarak zikredilmektedir.

Bu buluş ayrıca ilişikteki Şekillere referansta bulunan aşağıdaki örneklerde sadece örnek yoluyla açıklanmaktadır.

ÖRNEKLER

Örnek 1: Hücre Hatlarının Oluşturulması

MXE016 ve MXE017'nin oluşturulması WO2011/086136'da açıklanmaktadır.

Anti-FcRn Fab' ekspresyonu ve FkpA ile birlikte anti-FcRn Fab', skp ile birlikte anti-FcRn Fab' ve hem FkpA hem skp ekspresyonuyla birlikte anti-FcRn Fab için plazmitlerin oluşturulması

Bir anti-FcRn Fab'ın hem ağır hem hafif zincir dizilerini (sırasıyla DİZİ İD NO: 63 ve 55) içeren bir plazmit oluşturuldu. Plazmit pTTOD 1519.g57 Fab', Sambrook ve diğerleri, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. CSHL press, N.Y.'de bulunabilen geleneksel kısıtlama klonlama metodolojileri kullanılarak oluşturuldu. Plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' aşağıdaki özellikleri içeriyordu: bir güçlü tac promotörü ve lac operatör dizisi. Plazmit, Fab' ağır zincirinin kodlama bölgesinden sonra benzersiz bir EcoRI kısıtlama yeri, ardından, güçlü bir ribozom bağlama yeri içeren kodlayıcı olmayan bir dizi ve sonra benzersiz bir NDeI kısıtlama yeri ihtiva ediyordu.

Fab hafif zincir, ağır zincir genleri tek bir polisistronik mesaj olarak transkribe edildi. E. coli OmpA proteininden sinyal peptidini kodlayan DNA, hem hafif hem ağır zincir gen dizilerinin

5' ucuna kaynaştırdı, bu, polipeptitlerin translokasyonunu *E. coli* periplazmasına yöneltti. Transkripsiyon bir ikili transkripsiyon sonlandırıcısı *rrnB tlt2* kullanılarak sonlandırıldı. *lacIq* geni yapısal olarak eksprese olan Lac I represör proteinini kodluyordu. Bu, allolaktöz veya IPTG'nin varlığının baskısızlaşmaya (de-repression, bir represör genin etkisizleştirilmesi) yol açmasına kadar tac promotörden transkripsiyonu baskıladı. Kullanılan replikasyon kaynağı, düşük bir kopya sayısını koruyan p15A'ydı. Plazmit antibiyotik seçimi için bir tetrasiklin direnç geni içeriyordu.

Anti-FcRn Fab ve FkpA (bir periplazmik polipeptit) için bir ekspresyon vektörü olan plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, EcoRI ve NdeI yerleri kullanılarak FkpA pTTOD 1519.g57 Fab''ın Fab' dizisinin 3' ucuna bağlanarak oluşturuldu (Şekil 7d'ye bakınız). FkpA (DİZİ İD NO:30) 2 Puv II yeri, bir SfuI yeri, bir BamHI yeri ve bir EcoRI'yi uzaklaştırmak için sentetik olarak oluşturuldu, böylece yeni oluşum bir 5' EcoRI yerini kodluyor, bunu güçlü bir ribozom bağlama yeri, ardından doğal başlatma kodonu, sinyal dizisi ve olgun FkpA dizisi izliyor, bir C-terminal His etiketi ve son olarak bir güçlü ribozom bağlama yeri, ardından kodlayıcı olmayan bir NdeI yeriyle sona eriyordu. EcoRI-NdeI kısıtlama fragmanı, üç polipeptidin hepsinin - Fab' hafif zinciri, Fab' ağır zinciri ve FkpA - tek bir polisistronik mRNA üzerinde kodlanacağı şekilde kısıtlandı ve ekspresyon vektörü içine bağlandı.

Anti-FcRn Fab ve Skp (bir periplazmik polipeptit) için bir ekspresyon vektörü olan plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' Skp, EcoRI ve NdeI yerleri kullanılarak, skp plazmit pTTOD 1519.g57 Fab''ın Fab' dizisinin 3' ucuna bağlanarak oluşturuldu. 4 Pst I yerini ve bir EcoRV yerini uzaklaştırmak için skp (DİZİ İD NO: 34) sentetik olarak oluşturuldu, böylece yeni oluşum bir 5' EcoRI yerini kodluyor, onu bir güçlü ribozom bağlama yeri, ardından doğal başlatma kodonu, sinyal dizisi ve olgun Skp dizisi izliyor, bir C-terminal His etiketi ve son olarak bir güçlü ribozom bağlama yeri, ardından kodlayıcı olmayan bir NdeI yeriyle sona eriyordu. EcoRI-NdeI kısıtlama fragmanı üç polipeptidin hepsinin - Fab' hafif zinciri, Fab' ağır zinciri ve skp - tek bir polisistronik mRNA üzerinde kodlanacağı şekilde kısıtlandı ve ekspresyon vektörü içine bağlandı.

Anti-FcRn Fab, FkpA ve Skp (ikisi de periplazmik polipeptitler) için bir ekspresyon vektörü olan plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA Skp, NdeI yeri kullanılarak FkpA dizisinin 3' ucunda Skp plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA içine bağlanarak oluşturuldu. 4 Pst I yerini ve bir EcoRV yerini uzaklaştırmak için Skp (DİZİ İD NO:34) sentetik olarak oluşturuldu, böylece oluşum doğal başlatma kodonu, sinyal dizisi ve olgun skp dizisini içeren, bir C-terminal His etiketiyle ve son olarak kodlayıcı olmayan bir NdeI yeriyle sona eren bir 5' Ase I

5' ucuna kaynaştırdı, bu, polipeptitlerin translokasyonunu *E. coli* periplazmasına yöneltti. Transkripsiyon bir ikili transkripsiyon sonlandırıcısı *rrnB tlt2* kullanılarak sonlandırıldı. *lacIq* geni yapısal olarak eksprese olan Lac I represör proteinini kodluyordu. Bu, allolaktöz veya IPTG'nin varlığının baskısızlaşmaya (de-repression, bir represör genin etkisizleştirilmesi) yol
 5 açmasına kadar tac promotörden transkripsiyonu baskıladı. Kullanılan replikasyon kaynağı, düşük bir kopya sayısını koruyan p15A'ydı. Plazmit antibiyotik seçimi için bir tetrasiklin direnç geni içeriyordu.

Anti-FcRn Fab ve FkpA (bir periplazmik polipeptit) için bir ekspresyon vektörü olan plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, EcoRI ve NdeI yerleri kullanılarak FkpA pTTOD 1519.g57
 10 Fab''ın Fab' dizisinin 3' ucuna bağlanarak oluşturuldu (Şekil 7d'ye bakınız). FkpA (DİZİ İD NO:30) 2 Puv II yeri, bir SfuI yeri, bir BamHI yeri ve bir EcoRI'yi uzaklaştırmak için sentetik olarak oluşturuldu, böylece yeni oluşum bir 5' EcoRI yerini kodluyor, bunu güçlü bir ribozom bağlama yeri, ardından doğal başlatma kodonu, sinyal dizisi ve olgun FkpA dizisi izliyor, bir C-terminal His etiketi ve son olarak bir güçlü ribozom bağlama yeri, ardından kodlayıcı
 15 olmayan bir NdeI yeriyle sona eriyordu. EcoRI-NdeI kısıtlama fragmanı, üç polipeptidin hepsinin - Fab' hafif zinciri, Fab' ağır zinciri ve FkpA - tek bir polisistronik mRNA üzerinde kodlanacağı şekilde kısıtlandı ve ekspresyon vektörü içine bağlandı.

Anti-FcRn Fab ve Skp (bir periplazmik polipeptit) için bir ekspresyon vektörü olan plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' Skp, EcoRI ve NdeI yerleri kullanılarak, skp plazmit pTTOD
 20 1519.g57 Fab''ın Fab' dizisinin 3' ucuna bağlanarak oluşturuldu. 4 Pst I yerini ve bir EcoRV yerini uzaklaştırmak için skp (DİZİ İD NO: 34) sentetik olarak oluşturuldu, böylece yeni oluşum bir 5' EcoRI yerini kodluyor, onu bir güçlü ribozom bağlama yeri, ardından doğal başlatma kodonu, sinyal dizisi ve olgun Skp dizisi izliyor, bir C-terminal His etiketi ve son olarak bir güçlü ribozom bağlama yeri, ardından kodlayıcı olmayan bir NdeI yeriyle sona
 25 eriyordu. EcoRI-NdeI kısıtlama fragmanı üç polipeptidin hepsinin - Fab' hafif zinciri, Fab' ağır zinciri ve skp - tek bir polisistronik mRNA üzerinde kodlanacağı şekilde kısıtlandı ve ekspresyon vektörü içine bağlandı.

Anti-FcRn Fab, FkpA ve Skp (ikisi de periplazmik polipeptitler) için bir ekspresyon vektörü olan plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA Skp, NdeI yeri kullanılarak FkpA dizisinin 3'
 30 ucunda Skp plazmit pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA içine bağlanarak oluşturuldu. 4 Pst I yerini ve bir EcoRV yerini uzaklaştırmak için Skp (DİZİ İD NO:34) sentetik olarak oluşturuldu, böylece oluşum doğal başlatma kodonu, sinyal dizisi ve olgun skp dizisini içeren, bir C-terminal His etiketiyle ve son olarak kodlayıcı olmayan bir NdeI yeriyle sona eren bir 5' Ase I

yerini kodladı. AseI-NdeI kısıtlama fragmanı, dört polipeptidin hepsi - Fab' hafif zinciri, Fab' ağır zinciri, FkpA ve Skp - tek bir polisistronik mRNA üzerinde kodlanacak şekilde kısıtlandı ve ekspresyon vektörü içine bağlandı.

pTTOD 1519.g57 Fab', pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, pTTOD 1519.g57 Fab' Skp ve pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA skp'nin in E.coli W3110, MXE012 (E. coli W3110 spr H145A), MXE016 (E. coliW3110 ΔTsp, spr C94A) ve MXE017'de (E. coli W3110 ΔTsp, spr H145A) fermantasyonu. E. coli suşları W3110, MXE012, MXE016 ve MXE017 Örnek 1'de üretilen plazmitler pTTOD 1519.g57 Fab', pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, pTTOD 1519.g57 Fab' Skp ve pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA Skp'yle transforme edildi. Suşların transformasyonu Chung C.T ve diğerleri, Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. PNAS 86:2172-2175 (1989)'daki usul kullanılarak uygulandı. Transforme edilmiş bu suşlar fermantasyonla ekspresyon açısından test edildi.

Örnek 2: Şaperonların Fab' ekspresyonu üzerindeki etkisi. Şekil 1'de gösterilen suşlar Fab' ekspresyonunu karşılaştıran 1L ve 2.5L fermantasyon deneylerinde test edildi.

Büyüme ortamı, inokulum ve fermantasyon aşamaları. Fermantasyon işlemi, bir hücre bankası flakonundan bir inokulum hazırlanarak ve üretim fermantörünün tohumlanmasından önce birkaç ön kültür aşamasıyla (şişeler ve reaktörler) amplifiye edilerek başlatıldı. Üretim fermantöründe, hücreler tanımlı ortamda kesikli kipte ve beslemeli kesikli kipte yüksek yoğunluğa kadar üretildi. İstenen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, IPTG ilavesiyle Fab' ekspresyonu başlatıldı. Fab' ekspresyonu, Fab'ın uyarım fazı boyunca biriktiği E. coli periplazmik boşluğuna hedeflenir. Uyarım fazı sırasında ekspresyonu ve hücre büyümesini kontrol etmek için bir karbon kaynağı beslemesi uygulandı. Sıcaklık, erimiş oksijen (pO_2) ve pH, kültürü optimal kültür koşullarında tutmak için kontrol edildi.

Biyokütle konsantrasyonunun ve büyüme hızının ölçülmesi. Biyokütle konsantrasyonu 600 nm'de kültürlerin optik yoğunluğu ölçülerek belirlendi.

Periplazmik Ekstraksiyon. Hücreler santrifüjle kültür numunelerinden toplandı. Üst faz fraksiyonu sonraki analiz için tutuldu ($-20^{\circ}C$ 'de). Hücre peleti fraksiyonu ekstraksiyon tamponunda (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7.4) orijinal kültür hacmine kadar yeniden süspansiyon haline getirildi. Yaklaşık 10 ila 12 saat $60^{\circ}C$ 'de inkübasyonun ardından, ekstrakt santrifüjle berraklaştırıldı ve üst faz fraksiyonu analiz için taze halde kullanıldı veya muhafaza edildi ($-20^{\circ}C$ 'de).

Fab' nicelik tayini. Periplazmik ekstraktlardaki ve kültür üst fazlarındaki Fab'

yerini kodladı. AseI-NdeI kısıtlama fragmanı, dört polipeptidin hepsi - Fab' hafif zinciri, Fab' ağır zinciri, FkpA ve Skp - tek bir polisistronik mRNA üzerinde kodlanacak şekilde kısıtlandı ve ekspresyon vektörü içine bağlandı.

pTTOD 1519.g57 Fab', pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, pTTOD 1519.g57 Fab' Skp ve pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA skp'nin in E.coli W3110, MXE012 (E. coli W3110 spr H145A), MXE016 (E. coliW3110 ΔTsp, spr C94A) ve MXE017'de (E. coli W3110 ΔTsp, spr H145A) fermantasyonu. E. coli suşları W3110, MXE012, MXE016 ve MXE017 Örnek 1'de üretilen plazmitler pTTOD 1519.g57 Fab', pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA, pTTOD 1519.g57 Fab' Skp ve pTTOD 1519.g57 Fab' FkpA Skp'yle transforme edildi. Suşların transformasyonu Chung C.T ve diğerleri, Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. PNAS 86:2172-2175 (1989)'daki usul kullanılarak uygulandı. Transforme edilmiş bu suşlar fermantasyonla ekspresyon açısından test edildi.

Örnek 2: Şaperonların Fab' ekspresyonu üzerindeki etkisi. Şekil 1'de gösterilen suşlar Fab' ekspresyonunu karşılaştıran 1L ve 2.5L fermantasyon deneylerinde test edildi.

Büyüme ortamı, inokulum ve fermantasyon aşamaları. Fermantasyon işlemi, bir hücre bankası flakonundan bir inokulum hazırlanarak ve üretim fermantörünün tohumlanmasından önce birkaç ön kültür aşamasıyla (şişeler ve reaktörler) amplifiye edilerek başlatıldı. Üretim fermantöründe, hücreler tanımlı ortamda kesikli kipte ve beslemeli kesikli kipte yüksek yoğunluğa kadar üretildi. İstenen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, IPTG ilavesiyle Fab' ekspresyonu başlatıldı. Fab' ekspresyonu, Fab'ın uyarım fazı boyunca biriktiği E. coli periplazmik boşluğuna hedeflenir. Uyarım fazı sırasında ekspresyonu ve hücre büyümesini kontrol etmek için bir karbon kaynağı beslemesi uygulandı. Sıcaklık, erimiş oksijen (pO_2) ve pH, kültürü optimal kültür koşullarında tutmak için kontrol edildi.

Biyokütle konsantrasyonunun ve büyüme hızının ölçülmesi. Biyokütle konsantrasyonu 600 nm'de kültürlerin optik yoğunluğu ölçülerek belirlendi.

Periplazmik Ekstraksiyon. Hücreler santrifüjle kültür numunelerinden toplandı. Üst faz fraksiyonu sonraki analiz için tutuldu ($-20^{\circ}C$ 'de). Hücre peleti fraksiyonu ekstraksiyon tamponunda (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 7.4) orijinal kültür hacmine kadar yeniden süspansiyon haline getirildi. Yaklaşık 10 ila 12 saat $60^{\circ}C$ 'de inkübasyonun ardından, ekstrakt santrifüjle berraklaştırıldı ve üst faz fraksiyonu analiz için taze halde kullanıldı veya muhafaza edildi ($-20^{\circ}C$ 'de).

Fab' nicelik tayini. Periplazmik ekstraktlardaki ve kültür üst fazlarındaki Fab'

konsantrasyonları Protein G HPLC kullanılarak belirlendi. Bir HiTrap Protein-G HP 1ml kolonuna (GE-Healthcare veya eşdeğeri) 2 ml/dakikada analit (yaklaşık olarak nötr pH, 30°C, 0.2 µm filtreden geçirilmiş) yüklendi, kolon 20mM fosfat, 50mM NaCl pH 7.4'le yıkandı ve sonra 50mM Glisin/HCl pH 2.7 enjeksiyonu kullanılarak Fab' elute edildi. Elute edilmiş Fab' bir Agilent 1100 veya 11200 HPLC sistemi üzerinde A280'le ölçüldü ve konsantrasyonu bilinen saflaştırılmış bir Fab' proteininin standart bir eğrisine referansla miktarı belirlendi.

Şekil 1'de konakçı hücreler ve “şaperon”un çeşitli kombinasyonlarıyla uygulanan 5L ölçekte 46 fermantasyonun sonuçları gösterilmektedir. W3110 bir yabancı tip E. coli suşudur. Çeşitli kombinasyonlar şöyleydi: şaperon olmadan yabancı tip, FkpA ve Skp'yle birlikte yabancı tip, WO2011/086136'da yayımlanmış MXE016 mutant spr ve Δ Tsp, MXE016 ve FkpA, MXE016 ve Skp, MXE016 ve FkpA ve Skp, WO2011/086136'da açıklanan MXE017, MXE017 ve FkpA ve Skp.

Sonuçlar MXE016'nın, MXE016 ve FkpA'nın, MXE016 ve FkpA ve Skp'nin ve MXE017 ve FkpA ve Skp'nin en iyi ekspresyon seviyelerini gösterdiğini ortaya koymaktadır.

15 **Örnek 3: Uyarım sonrası besleme hızının etkisi**

Üç farklı uyarım sonrası besleme hızının -5.4, 6.0 ve 7.0 g/saat - etkisi MXE016 ve MXE016 + FkpA üzerinde test edildi.

Büyüme ortamı, inokulum ve fermantasyon aşamaları. Fermantasyon işlemi, bir hücre bankası flakonundan bir inokulum hazırlanarak ve üretim fermantörünün tohumlanmasıdan önce birkaç ön kültür aşamasıyla (şişeler ve reaktörler) amplifiye edilerek başlatıldı. Üretim fermantöründe, hücreler tanımlı ortamda kesikli kipte ve beslemeli kesikli kipte yüksek yoğunluğa kadar üretildi. İstenen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, IPTG ilavesiyle Fab' ekspresyonu başlatıldı. Fab' ekspresyonu, Fab'ın uyarım fazı boyunca biriktiği E. coli periplazmik boşluğuna hedeflenir. Uyarım fazı sırasında ekspresyonu ve hücre büyümesini kontrol etmek için bir karbon kaynağı beslemesi uygulandı, bu deneyde besleme hızı üç ayrı ayar noktasında (şekilde gösterilmektedir) ayarlandı. Sıcaklık, erimiş oksijen (pO₂) ve pH, kültürü optimal kültür koşullarında tutmak için kontrol edildi.

Şekil 2'de hiç şaperon veya FkpA eksprese etmeyen plazmitlerle transforme edilmiş MXE016 suşu gösterilmektedir. Şekilde uyarım sonrası besleme hızını arttırmanın Fab' üretimi ve FkpA ile birlikte ve FkpA olmadan periplazmada muhafaza etme üzerindeki etkisini göstermektedir. Veriler, FkpA ekspresyonu olmadan besleme hızı arttırıldığında, üretilen ek Fab'ın üst fazda kaybedildiğini göstermektedir. Daha yüksek besleme hızlarında üretilen ek Fab'ın periplazma

konsantrasyonları Protein G HPLC kullanılarak belirlendi. Bir HiTrap Protein-G HP 1ml kolonuna (GE-Healthcare veya eşdeğeri) 2 ml/dakikada analit (yaklaşık olarak nötr pH, 30°C, 0.2 µm filtreden geçirilmiş) yüklendi, kolon 20mM fosfat, 50mM NaCl pH 7.4'le yıkandı ve sonra 50mM Glisin/HCl pH 2.7 enjeksiyonu kullanılarak Fab' elute edildi. Elute edilmiş Fab' bir Agilent 1100 veya 11200 HPLC sistemi üzerinde A280'le ölçüldü ve konsantrasyonu bilinen saflaştırılmış bir Fab' proteininin standart bir eğrisine referansla miktarı belirlendi.

Şekil 1'de konakçı hücreler ve “şaperon”un çeşitli kombinasyonlarıyla uygulanan 5L ölçekte 46 fermentasyonun sonuçları gösterilmektedir. W3110 bir yabancı tip E. coli suşudur. Çeşitli kombinasyonlar şöyleydi: şaperon olmadan yabancı tip, FkpA ve Skp'yle birlikte yabancı tip, WO2011/086136'da yayımlanmış MXE016 mutant spr ve Δ Tsp, MXE016 ve FkpA, MXE016 ve Skp, MXE016 ve FkpA ve Skp, WO2011/086136'da açıklanan MXE017, MXE017 ve FkpA ve Skp.

Sonuçlar MXE016'nın, MXE016 ve FkpA'nın, MXE016 ve FkpA ve Skp'nin ve MXE017 ve FkpA ve Skp'nin en iyi ekspresyon seviyelerini gösterdiğini ortaya koymaktadır.

15 **Örnek 3: Uyarım sonrası besleme hızının etkisi**

Üç farklı uyarım sonrası besleme hızının -5.4, 6.0 ve 7.0 g/saat - etkisi MXE016 ve MXE016 + FkpA üzerinde test edildi.

Büyüme ortamı, inokulum ve fermentasyon aşamaları. Fermentasyon işlemi, bir hücre bankası flakonundan bir inokulum hazırlanarak ve üretim fermentörünün tohumlanmasıdan önce birkaç ön kültür aşamasıyla (şişeler ve reaktörler) amplifiye edilerek başlatıldı. Üretim fermentöründe, hücreler tanımlı ortamda kesikli kipte ve beslemeli kesikli kipte yüksek yoğunluğa kadar üretildi. İstenen hücre yoğunluğuna ulaşıldığında, IPTG ilavesiyle Fab' ekspresyonu başlatıldı. Fab' ekspresyonu, Fab'ın uyarım fazı boyunca biriktiği E. coli periplazmik boşluğuna hedeflenir. Uyarım fazı sırasında ekspresyonu ve hücre büyümesini kontrol etmek için bir karbon kaynağı beslemesi uygulandı, bu deneyde besleme hızı üç ayrı ayar noktasında (şekilde gösterilmektedir) ayarlandı. Sıcaklık, erimiş oksijen (pO₂) ve pH, kültürü optimal kültür koşullarında tutmak için kontrol edildi.

Şekil 2'de hiç şaperon veya FkpA eksprese etmeyen plazmitlerle transforme edilmiş MXE016 suşu gösterilmektedir. Şekilde uyarım sonrası besleme hızını arttırmanın Fab' üretimi ve FkpA ile birlikte ve FkpA olmadan periplazmada muhafaza etme üzerindeki etkisini göstermektedir. Veriler, FkpA ekspresyonu olmadan besleme hızı arttırıldığında, üretilen ek Fab'ın üst fazda kaybedildiğini göstermektedir. Daha yüksek besleme hızlarında üretilen ek Fab'ın periplazma

içinde muhafaza edilerek daha yüksek bir titreye yol açtığı FkpA ekspresyonuyla bu durum geçerli değildir.

Örnek 4: Verim ve hücre yaşayabilirliği analizi

5 Şekil 3A ve B’de 20L ölçekte şaperon veya FkpA eksprese etmeyen plazmitlerle transforme edilmiş MXE016’da hücre yaşayabilirliği ve Fab' titresi üzerindeki etki gösterilmektedir.

Şekil 3A’da FkpA bulunmadığında hücre yaşayabilirliğinin daha düşük olduğu gösterilmektedir. Şekil 3B’de MXE016 + FkpA için Fab' titrelerinin daha yüksek ve daha az değişken olduğu gösterilmektedir.

10 Şekil 4’te MXE016+FkpA’yla daha yüksek titrenin, birincil Fab ürünü geri kazanımının ardından %30 daha fazla Fab' ile sonuçlandığı gösterilmektedir.

Şekil 5 ve 6’da şaperon olmadan MXE016’nın ve FkpA ekspresyonuyla birlikte MXE916’nın birincil geri kazanımından numunelerin SDS-PAGE’i ve anti-his etiketi western blot’ları gösterilmektedir.

15 Numuneler şerit başına 1µg Fab' yüklemesi Fab' konsantrasyonuna göre yüklendi. Jeller %4-20 Tris-Glisin Novex’ti ve 2 saat 125V’de indirgeyici olmayan koşullarda uygulandı. Jeller Spyro ruby boyasıyla boyandı ve görüntülendi. Western blot’lar bir Invitrogen iBlot sistemi kullanılarak bir PVDF membrana aktarıldı ve sonra %1 kazein çözeltisiyle bloke edildi. Daha sonra membranlar bir anti-his HRP konjugat antikoruyla (Novagen) incelendi. Daha sonra blotlar ECL çözeltisiyle yıkandı ve bir Amersham Life Sciences HyperProcessor kullanılarak
20 görüntülendi.

içinde muhafaza edilerek daha yüksek bir titreye yol açtığı FkpA ekspresyonuyla bu durum geçerli değildir.

Örnek 4: Verim ve hücre yaşayabilirliği analizi

5 Şekil 3A ve B'de 20L ölçekte şaperon veya FkpA eksprese etmeyen plazmitlerle transforme edilmiş MXE016'da hücre yaşayabilirliği ve Fab' titresi üzerindeki etki gösterilmektedir.

Şekil 3A'da FkpA bulunmadığında hücre yaşayabilirliğinin daha düşük olduğu gösterilmektedir. Şekil 3B'de MXE016 + FkpA için Fab' titrelerinin daha yüksek ve daha az değişken olduğu gösterilmektedir.

10 Şekil 4'te MXE016+FkpA'yla daha yüksek titrenin, birincil Fab ürünü geri kazanımının ardından %30 daha fazla Fab' ile sonuçlandığı gösterilmektedir.

Şekil 5 ve 6'da şaperon olmadan MXE016'nın ve FkpA ekspresyonuyla birlikte MXE916'nın birincil geri kazanımından numunelerin SDS-PAGE'i ve anti-his etiketi western blot'ları gösterilmektedir.

15 Numuneler şerit başına 1µg Fab' yüklemesi Fab' konsantrasyonuna göre yüklendi. Jeller %4-20 Tris-Glisin Novex'ti ve 2 saat 125V'de indirgeyici olmayan koşullarda uygulandı. Jeller Spyro ruby boyasıyla boyandı ve görüntülendi. Western blot'lar bir Invitrogen iBlot sistemi kullanılarak bir PVDF membrana aktarıldı ve sonra %1 kazein çözeltisiyle bloke edildi. Daha sonra membranlar bir anti-his HRP konjugat antikoruyla (Novagen) incelendi. Daha sonra blotlar ECL çözeltisiyle yıkandı ve bir Amersham Life Sciences HyperProcessor kullanılarak
20 görüntülendi.

DİZİ LİSTESİ

- <110> UCB Pharma S.A
- <120> Protein Ekspresyonu için Rekombinant Bakteriyel Konakçı Hücre
- <130> G0164-WO
- 5 <150> GB1208367.1
- <151> 2012-05-14
- <160> 82
- <170> PatentIn versiyon 3.5
- <210> 1
- 10 <211> 2049
- <212> DNA
- <213> Escherichia coli
- <400> 1

DİZİ LİSTESİ

- <110> UCB Pharma S.A
- <120> Protein Ekspresyonu için Rekombinant Bakteriyel Konakçı Hücre
- <130> G0164-WO
- 5 <150> GB1208367.1
- <151> 2012-05-14
- <160> 82
- <170> PatentIn versiyon 3.5
- <210> 1
- 10 <211> 2049
- <212> DNA
- <213> Escherichia coli
- <400> 1

atgaacatgt tttttaggct tacccogtta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc	60
ttcgctgtag aagatatcac gcgtgctgat caaattccgg tattaagga agagacgcag	120
catgcgaogc taagtgaogc cgtaaogtgc cgtttacoc gttctcatta tcgccagttc	180
gacctcgatc aggcattttc ggccaaaatc tttgaccgct acctgaatct gctcgattac	240
agccacaacg tgctgctggc aagcgatggt gaacagttog cgaasaaga aacogagtta	300
ggcgatgaac tgcttcaag caaactcgac gttttctao atctctaca tctggcgcaa	360
aagcgccgtt ttgagcgta ccagtacgct ttgtoggtac tggaaaagcc gatggatttc	420
accggcaacg accttataa ccttgaccgc agcaaacgc octggccga aaaogaggct	480
gagttgaacg cgctgtggga cagtaaagtc aaattcgaog agttaagcct gaagctgaca	540
ggaaaaacgg ataaagaat cgtgaaacc ctgactcgc gctacaatt tgccattcgt	600
cgtctggcgc aaccacacg cgaagatggt ttctcgtgg caatgacggc gtttgcgcgt	660
gaatcgacc cgcatacca ctatctttcc cgcgtaata cgaacagtt caacactgaa	720
atgagtttgt cgctggaag tattggcgca gtgctgcaa tggatgatga ctacacggt	780
atcaattoga tgggtggcag tggtcoggca gogaagata aagctatcag cgttggtgac	840
aaaattgtcg gcttggta aacaggaag cogatggtg acgtgattgg ctggcgtct	900
gatgatgtgg ttgcctaat taaggggccg aagggcagta aagttcgtct ggaatttta	960
octgctggtc aagggaocaa gaoccgtact gtaacgttga cccgtgaacg tattcgtctc	1020
gaagacogcg oggttaaat gtoggtgaag aocgtoggtc aagagaagt cggogtgcg	1080
gatattccgg gcttctatgt ggtttgaca gaogatgtca aagtgcaact gcagaaactg	1140
gaaaaacaga atgtcagcag cgtcatcacc gaocctgcta gcaatggggg tggggcgtta	1200
actgaagocg tatoctctc cgtctggtt attcctgcgg gtcocattgt tcaggtccgc	1260
gataacaacg gcaaggttcg tgaagatagc gatacogacg gacaggtttt ctataaaggc	1320
cgcctggtgg tgctggtga ccgcttcagt gcttcggctt cagaatctt tgccggggca	1380
atgcaggatt accgtcgtgc gctggttgtg ggtgaacga cgtttggtaa aggcacogtt	1440
cagcaatacc gttcattgaa ccgtatttac gatcagatgt tacgtcctga atggocagcg	1500
ctgggttctg tgcagtacac gatccagaaa ttctatocgg ttaocggcg cagtacgcaa	1560
cgtaaaggcg taacgccaga catcatcctg ccgacgggta atgaagaaac ggaacoggt	1620
gagaattcag aagataacgc gctgccgtg gatagcattg atgcccgac ttatgtgaa	1680
tcaggagatt taacggcctt tgaaccggag ctgctgaagg aacataatgc gogtatcgg	1740
aaagatcctg agttccagaa catcatgaag gatatocgc gottcaacgc tatgaaggac	1800
aagcgcaata tcgtttctct gaattaogct gtgcgtgaga aagagaataa tgaagatgat	1860
gogacgcgic tggcgcttt gaaogaacgc tttaacgcg aaggtaaacc gtagttgaa	1920
aaactggatg atctaccgaa agattaocag gagccogato cttatctgga tgagaoggtg	1980
aatatcgcac tcgatctgc gaagcttgaa aaagccagac ccgcggaaca acccgtccc	2040
gtcaagtaa	2049

atgaacatgt tttttaggct tacccogtta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc	60
ttcgctgtag aagatatcac gcgtgctgat caaattccgg tattaagga agagacgcag	120
catgcgaogc taagtgaogc cgtaaogtgc cgtttacoc gttctcatta tcgccagttc	180
gacctcgatc aggcattttc ggccaaaatc tttgaccgct acctgaatct gctcgattac	240
agccacaacg tgctgctggc aagcgatggt gaacagttog cgaasaaga aacogagtta	300
ggcgatgaac tcgcttcagg caaactcgac gttttctaoq atctctacaa tctggcgcaa	360
aagcgccggt ttgagcgta ccagtacgct ttgtoggtac tggaaaagcc gatggatttc	420
accggcaacg accttataa ccttgaccgc agcaaaagcc octggccgaa aaacgaggct	480
gagttgaacg cgctgtggga cagtaaagtc aaattcgagc agttaagcct gaagctgaca	540
ggaaaaacgg ataaagaaat tcgtgaaacc ctgactcgcc gctacaatt tgccattcgt	600
cgtctggcgc aaccacacg cgaagatggt ttctcgctgg caatgacggc gtttgcgcgt	660
gaatcgacc cgcataocaa ctatctttcc ccgcgtaata ccgaacagtt caacactgaa	720
atgagtttgt cgctggaagg tattggcgca gtgctgcaa tggatgatga ctacacggt	780
atcaattoga tgggtggcagg tggtcoggca gogaagagta aagctatcag cgttggtgac	840
aaaattgtcg gctgtgtca aacaggcaag ccgatggtg acgtgattgg ctggcgtct	900
gatgatgtgg ttgccttaat taaggggccg aagggcagta aagttcgtct ggaatttta	960
octgctggtc aagggaocaa gaoccgtact gtaacgttga cccgtgaacg tattcgtctc	1020
gaagacogcg oggttaaat gtoggtgaag aocgtoggtc aagagaagc oggogtgcg	1080
gatattccgg gcttctatgt gggtttgaca gaogatgtca aagtgcaact gcagaaactg	1140
gaaaaacaga atgtcagcag cgtcatcacc gaocctgcgtc gcaatggogg tggggcgta	1200
actgaagocg tatoctctc cgytctgttt attcctgcgg gtcocattgt tcaggtccgc	1260
gataacaacg gcaaggttcg tgaagatagc gatacogacg gacaggtttt ctataaaggc	1320
ccgctggtgg tgctggtga ccgcttcagt gcttcggctt cagaatctt tgccogggca	1380
atgcaggatt accgtcgtgc gctggttgtg ggtgaacga cgtttggtaa aggcacogtt	1440
cagcaatacc gttcattgaa ccgtatttac gatcagatgt tacgtcctga atggocagcg	1500
ctgggttctg tgcagtacac gatccagaaa ttctatocgg ttaacggcgg cagtacgcaa	1560
cgtaaaggcg taacgcaga catcatcagc ccgacgggta atgaagaaac ggaacoggt	1620
gagaattcag aagataacgc gctgccgtgg gatagcattg atgcccgac ttatgtgaa	1680
tcaggagatt taacggcctt tgaaccggag ctgctgaagg aacataatgc gogtatcgg	1740
aaagatcctg agttccagaa catcatgaag gatatocgc gottcaacgc tatgaaggac	1800
aagcgcaata tcgtttctct gaattaocgt gtgcgtgaga aagagaataa tgaagatgat	1860
gogacgcgic tggcgcggtt gaacgaacgc tttaacgcg aaggtaaacc ggagttgaa	1920
aaactggatg atctaccgaa agattaocag gagccogato cttatctgga tgagaoggtg	1980
aatatcgcac tcgatctggc gaagcttgaa aaagccagac ccgcggaaca acccgctccc	2040
gtcaagtaa	2049

<210> 2

<211> 680

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5 <400> 2

```

Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly
 1           5           10           15

Gln Thr Phe Ala Val Glu Asp Ile Thr Arg Ala Asp Gln Ile Pro Val
          20           25           30

Leu Lys Glu Glu Thr Gln His Ala Thr Val Ser Glu Arg Val Thr Ser
 35           40           45

Arg Phe Thr Arg Ser His Tyr Arg Gln Phe Asp Leu Asp Gln Ala Phe
 50           55           60

Ser Ala Lys Ile Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Leu Leu Asp Tyr Ser His
 65           70           75           80

Asn Val Leu Leu Ala Ser Asp Val Glu Gln Phe Ala Lys Lys Lys Thr
 85           90           95

Glu Leu Gly Asp Glu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Asp Val Phe Tyr Asp
 100          105          110

```

<210> 2

<211> 680

<212> PRT

<213> Escherichia coli

5 <400> 2

```

Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly
 1           5           10           15

Gln Thr Phe Ala Val Glu Asp Ile Thr Arg Ala Asp Gln Ile Pro Val
      20           25           30

Leu Lys Glu Glu Thr Gln His Ala Thr Val Ser Glu Arg Val Thr Ser
 35           40           45

Arg Phe Thr Arg Ser His Tyr Arg Gln Phe Asp Leu Asp Gln Ala Phe
 50           55           60

Ser Ala Lys Ile Phe Asp Arg Tyr Leu Asn Leu Leu Asp Tyr Ser His
 65           70           75           80

Asn Val Leu Leu Ala Ser Asp Val Glu Gln Phe Ala Lys Lys Lys Thr
      85           90           95

Glu Leu Gly Asp Glu Leu Arg Ser Gly Lys Leu Asp Val Phe Tyr Asp
 100           105           110

```

Leu Tyr Asn Leu Ala Gln Lys Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Gln Tyr Ala
 115 120 125

Leu Ser Val Leu Glu Lys Pro Met Asp Phe Thr Gly Asn Asp Thr Tyr
 130 135 140

Asn Leu Asp Arg Ser Lys Ala Pro Trp Pro Lys Asn Glu Ala Glu Leu
 145 150 155 160

Asn Ala Leu Trp Asp Ser Lys Val Lys Phe Asp Glu Leu Ser Leu Lys
 165 170 175

Leu Thr Gly Lys Thr Asp Lys Glu Ile Arg Glu Thr Leu Thr Arg Arg
 180 185 190

Tyr Lys Phe Ala Ile Arg Arg Leu Ala Gln Thr Asn Ser Glu Asp Val
 195 200 205

Phe Ser Leu Ala Met Thr Ala Phe Ala Arg Glu Ile Asp Pro His Thr
 210 215 220

Asn Tyr Leu Ser Pro Arg Asn Thr Glu Gln Phe Asn Thr Glu Met Ser
 225 230 235 240

Leu Ser Leu Glu Gly Ile Gly Ala Val Leu Gln Met Asp Asp Asp Tyr
 245 250 255

Thr Val Ile Asn Ser Met Val Ala Gly Gly Pro Ala Ala Lys Ser Lys
 260 265 270

Ala Ile Ser Val Gly Asp Lys Ile Val Gly Val Gly Gln Thr Gly Lys
 275 280 285

Pro Met Val Asp Val Ile Gly Trp Arg Leu Asp Asp Val Val Ala Leu
 290 295 300

Ile Lys Gly Pro Lys Gly Ser Lys Val Arg Leu Glu Ile Leu Pro Ala
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Thr Lys Thr Arg Thr Val Thr Leu Thr Arg Glu Arg Ile
 325 330 335

Arg Leu Glu Asp Arg Ala Val Lys Met Ser Val Lys Thr Val Gly Lys
 340 345 350

Glu Lys Val Gly Val Leu Asp Ile Pro Gly Phe Tyr Val Gly Leu Thr
 355 360 365

Leu Tyr Asn Leu Ala Gln Lys Arg Arg Phe Glu Arg Tyr Gln Tyr Ala
 115 120 125

Leu Ser Val Leu Glu Lys Pro Met Asp Phe Thr Gly Asn Asp Thr Tyr
 130 135 140

Asn Leu Asp Arg Ser Lys Ala Pro Trp Pro Lys Asn Glu Ala Glu Leu
 145 150 155 160

Asn Ala Leu Trp Asp Ser Lys Val Lys Phe Asp Glu Leu Ser Leu Lys
 165 170 175

Leu Thr Gly Lys Thr Asp Lys Glu Ile Arg Glu Thr Leu Thr Arg Arg
 180 185 190

Tyr Lys Phe Ala Ile Arg Arg Leu Ala Gln Thr Asn Ser Glu Asp Val
 195 200 205

Phe Ser Leu Ala Met Thr Ala Phe Ala Arg Glu Ile Asp Pro His Thr
 210 215 220

Asn Tyr Leu Ser Pro Arg Asn Thr Glu Gln Phe Asn Thr Glu Met Ser
 225 230 235 240

Leu Ser Leu Glu Gly Ile Gly Ala Val Leu Gln Met Asp Asp Asp Tyr
 245 250 255

Thr Val Ile Asn Ser Met Val Ala Gly Gly Pro Ala Ala Lys Ser Lys
 260 265 270

Ala Ile Ser Val Gly Asp Lys Ile Val Gly Val Gly Gln Thr Gly Lys
 275 280 285

Pro Met Val Asp Val Ile Gly Trp Arg Leu Asp Asp Val Val Ala Leu
 290 295 300

Ile Lys Gly Pro Lys Gly Ser Lys Val Arg Leu Glu Ile Leu Pro Ala
 305 310 315 320

Gly Lys Gly Thr Lys Thr Arg Thr Val Thr Leu Thr Arg Glu Arg Ile
 325 330 335

Arg Leu Glu Asp Arg Ala Val Lys Met Ser Val Lys Thr Val Gly Lys
 340 345 350

Glu Lys Val Gly Val Leu Asp Ile Pro Gly Phe Tyr Val Gly Leu Thr
 355 360 365

Asp Asp Val Lys Val Gln Leu Gln Lys Leu Glu Lys Gln Asn Val Ser
 370 375 380

Ser Val Ile Ile Asp Leu Arg Ser Asn Gly Gly Gly Ala Leu Thr Glu
 385 390 395 400

Ala Val Ser Leu Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ala Gly Pro Ile Val Gln
 405 410 415

Val Arg Asp Asn Asn Gly Lys Val Arg Glu Asp Ser Asp Thr Asp Gly
 420 425 430

Gln Val Phe Tyr Lys Gly Pro Leu Val Val Leu Val Asp Arg Phe Ser
 435 440 445

Ala Ser Ala Ser Glu Ile Phe Ala Ala Ala Met Gln Asp Tyr Gly Arg
 450 455 460

Ala Leu Val Val Gly Glu Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Val Gln Gln
 465 470 475 480

Tyr Arg Ser Leu Asn Arg Ile Tyr Asp Gln Met Leu Arg Pro Glu Trp
 485 490 495

Pro Ala Leu Gly Ser Val Gln Tyr Thr Ile Gln Lys Phe Tyr Arg Val
 500 505 510

Asn Gly Gly Ser Thr Gln Arg Lys Gly Val Thr Pro Asp Ile Ile Met
 515 520 525

Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Asn
 530 535 540

Ala Leu Pro Trp Asp Ser Ile Asp Ala Ala Thr Tyr Val Lys Ser Gly
 545 550 555 560

Asp Leu Thr Ala Phe Glu Pro Glu Leu Leu Lys Glu His Asn Ala Arg
 565 570 575

Ile Ala Lys Asp Pro Glu Phe Gln Asn Ile Met Lys Asp Ile Ala Arg
 580 585 590

Phe Asn Ala Met Lys Asp Lys Arg Asn Ile Val Ser Leu Asn Tyr Ala
 595 600 605

Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Glu Asp Asp Ala Thr Arg Leu Ala Arg

Asp Asp Val Lys Val Gln Leu Gln Lys Leu Glu Lys Gln Asn Val Ser
 370 375 380

Ser Val Ile Ile Asp Leu Arg Ser Asn Gly Gly Gly Ala Leu Thr Glu
 385 390 395 400

Ala Val Ser Leu Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ala Gly Pro Ile Val Gln
 405 410 415

Val Arg Asp Asn Asn Gly Lys Val Arg Glu Asp Ser Asp Thr Asp Gly
 420 425 430

Gln Val Phe Tyr Lys Gly Pro Leu Val Val Leu Val Asp Arg Phe Ser
 435 440 445

Ala Ser Ala Ser Glu Ile Phe Ala Ala Ala Met Gln Asp Tyr Gly Arg
 450 455 460

Ala Leu Val Val Gly Glu Pro Thr Phe Gly Lys Gly Thr Val Gln Gln
 465 470 475 480

Tyr Arg Ser Leu Asn Arg Ile Tyr Asp Gln Met Leu Arg Pro Glu Trp
 485 490 495

Pro Ala Leu Gly Ser Val Gln Tyr Thr Ile Gln Lys Phe Tyr Arg Val
 500 505 510

Asn Gly Gly Ser Thr Gln Arg Lys Gly Val Thr Pro Asp Ile Ile Met
 515 520 525

Pro Thr Gly Asn Glu Glu Thr Glu Thr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Asn
 530 535 540

Ala Leu Pro Trp Asp Ser Ile Asp Ala Ala Thr Tyr Val Lys Ser Gly
 545 550 555 560

Asp Leu Thr Ala Phe Glu Pro Glu Leu Leu Lys Glu His Asn Ala Arg
 565 570 575

Ile Ala Lys Asp Pro Glu Phe Gln Asn Ile Met Lys Asp Ile Ala Arg
 580 585 590

Phe Asn Ala Met Lys Asp Lys Arg Asn Ile Val Ser Leu Asn Tyr Ala
 595 600 605

Val Arg Glu Lys Glu Asn Asn Glu Asp Asp Ala Thr Arg Leu Ala Arg

610 615 620
 Leu Asn Glu Arg Phe Lys Arg Glu Gly Lys Pro Glu Leu Lys Lys Leu
 625 630 635 640
 Asp Asp Leu Pro Lys Asp Tyr Gln Glu Pro Asp Pro Tyr Leu Asp Glu
 645 650 655
 Thr Val Asn Ile Ala Leu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Lys Ala Arg Pro
 660 665 670
 Ala Glu Gln Pro Ala Pro Val Lys
 675 680

<210> 3

<211> 2048

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş Tsp geni

<400> 3

```

atgaattcgt ttttaggctt accgcgcttag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat      60
taattgtaga agatatacag cgtgctgac aaattccggt attaaaggaa gagacgcagc      120
atgcgacggt aagtgagcgc gtaacgctgc gcttcaccog ttctcattat ogccagttcg      180
acctcgatca ggcattttcg gccaaaatct ttgaccgcta cctgaatctg ctogattaca      240
gccacaacgt gctgctggca agogatggtg aacagttcgc gaaaaagaaa accgagttag      300
gogatgaact gggttcaggc aaactogacg ttttctacga tctctacaat ctggcgcaaa      360
agcgcggttt tgagcgcttac cagtaogctt tgctcggtact ggaaaagccg atggatttca      420
ccggcaacga cactataaac cttgacgcga gcaaacgcgc ctggccgaaa aacgaggctg      480
agttgaaocg cctgtgggac agtaaatgca aattogacga gttaaagcctg aagctgacag      540
gaaaaacgga taagaatatt cgtgaaaccc tgactgcog ctacaatttt gccattogtc      600
gtctggcgca aaccaacagc gaagatggtt tctcgctgyc aatgacggcg ttgcgogtg      660
aatogaccc gcataccaac tatctttccc cggctaatac ogaacagttc aacactgaaa      720
tgagtttgtc gctggaaggt attggogcag tgctgcaaat ggatgatgac tacaccgtta      780
tcaattcgat ggtggcaggt ggtccggcag cgaagagtaa agctatcagc gttggtgaca      840
aaattgtogt tgttggtcaa acaggcaagc cgatggttga ogtgattggc tggogtcttg      900
atgatgtggt tgccttaatt aaagggccga agggcagtaa agttcgtctg gaaattttac      960
ctgctggtaa agggaccaag acccgtactg taacgttgac ccgtgaacgt attcgtctcg     1020
aagaccgocg ggttaaaatg tcggtgaaqa ccgtoggtaa agagaaagtc ggcgtgctgg     1080

```

610	615	620	
Leu Asn Glu Arg Phe	Lys Arg Glu Gly Lys	Pro Glu Leu Lys Lys Leu	
625	630	635	640
Asp Asp Leu Pro	Lys Asp Tyr Gln Glu	Pro Asp Pro Tyr Leu Asp Glu	
	645	650	655
Thr Val Asn Ile Ala	Leu Asp Leu Ala Lys Leu	Glu Lys Ala Arg Pro	
	660	665	670
Ala Glu Gln Pro Ala	Pro Val Lys		
	675	680	

<210> 3

<211> 2048

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş Tsp geni

<400> 3

atgaattcgt ttttaggctt accgcgcttag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat	60
taattgtaga agatatacag cgtgctgac aaattccggt attaaagga gagacgcagc	120
atgcgacggt aagtgagcgc gtaacgctgc gcttaccocg ttctcattat cgcagttcg	180
acctcgatca ggcatittcg gccaaaatct ttgaccgcta cctgaatctg ctogattaca	240
gccacaacgt gctgctggca agogatgttg aacagttcgc gaaaaagaaa accgagttag	300
gggatgaact gggttcaggc aaactogacg tttctacga tctctacaat ctggcgcaaa	360
agcgcggttt tgagcggtac cagtaogctt tgctcggtact ggaaaagccg atggatttca	420
ccggcaacga cactataaac cttgacgcga gcaaacgcgc ctggccgaaa aacgaggctg	480
agttgaacgc gctgtgggac agtaaacgca aattogacga gttaaagcctg aagctgacag	540
gaaaaacgga taagaaatt cgtgaaaccc tgactgcgcg ctacaatttt gccattogtc	600
gtctggcgca aaccaacagc gaagatgttt tctcgctgyc aatgacggcg ttgcgogtg	660
aatogaacc gcataccaac tatctttccc cgggtaaac cgaacagttc aacactgaaa	720
tgagtttgtc gctggaaggt attggogcag tgctgcaaat ggatgatgac tacaccgtta	780
tcaattcgat ggtggcaggt ggtccggcag cgaagagtaa agctatcagc gttggtgaca	840
aaattgtogt tgttgytcaa acaggcaagc cgatggttga cgtgattggc tggcgtcttg	900
atgatgtggt tgccttaatt aaagggccga agggcagtaa agttcgtctg gaatttttac	960
ctgctggtaa agggaccaag acccgtactg taacgttgac ccgtgaacgt attcgtctcg	1020
aagaccgocg ggttaaaatg tcggtgaaqa ccgtoggtaa agagaaagtc ggcgtgctgg	1080

```

atattcoggy ctctatgtg ggtttgacag aogatgtcaa agtgcaactg cagaaactgy 1140
aaaaacagaa tgtcagcagc gtcacatcog acctgogtag caatggcogt ggggcgttaa 1200
ctgaagcogt atcgetctcc ggtctgttta ttctgoggyg tcccattggt caggtcogcy 1260
ataacaacgy caaggttcgt gaagatagcy atacogacyg acaggttttc tataaaggcc 1320
ogctggtggt gctggttgac cgttcaagt cttcogcttc agaaatcttt gcocggcaa 1380
tgcaggatta cggctgtgcy ctggttggg gtgaaccgac gtttggtaa ggcaccgttc 1440
agcaatacog ttcattgaac cgtatttacg atcagatgtt acgtcctgaa tggccagocy 1500
tgggttctgt gcagtacacy atocagaat tctatogcgt taocggcgyt agtacgcaac 1560
gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaacg gaacgggty 1620
agaattoga agtaacogcy ctgocgtggg atagcattga tgcocgact tatgtgaat 1680
caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcy cgtatcogya 1740
aagatcctga gttccagAAC atcatgaagg atatogcogy cttcaacgct atgaaggaca 1800
agcacaatat ogtttctcgy aattaogctg tgoctgagaa agagaataat gaagatgatg 1860
cgacgcgtct ggcgcgtttg aacgaacgct ttaaacgcyg aggtaaacgy gagttgaaga 1920
aactggatga tctaccgaaa gattaccagy agccggatcc ttatctggat gagacggtga 1980
atatcgcact cgtctggyg aagcttgaaa aagccagacc ogcggaaaca cccgctcccy 2040
tcaagtaa 2048

```

<210> 4

<211> 2889

<212> DNA

5 <213> Escherichia coli

<400> 4

```

atgcccogca gcaoctggtt caaagcatta ttgttqttag ttgcoctttg ggcaccctta 60
agtcaggcag aaacgggatg gcagcogatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat 120
aacogccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat 180
ccgaggcag ttaaatcgtt ctogogcgtg gtggtgccoq ttgggtcgtt ggaagatccc 240
gagcgtacc agggcctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag 300
taccogcagg ctgacagctt ggcogaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc 360
agcactgogc cgtatcgac ggttttctat ctggaagtg agaacgagc cttgcctggt 420
gggttagacc gcctggcoga tgcattgctt gaacctttgc tcgacaagaa atatgcccga 480
cgtgagcgtg atgoggtgaa cgtgaatta accatggcgc gtaocgctga cgggatgocg 540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac cgggcacacc ccggttcaa gttttctggt 600
ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgy tgcagcaggc gctgaaagat 660

```

```

atattcoggy ctctatgtg ggtttgacag aogatgtcaa agtgcaactg cagaaactgy 1140
aaaaacagaa tgtcagcagc gtcacatcog acctgogtag caatggcggg ggggcgttaa 1200
ctgaagcogt atcgetctcc ggtctgttta ttctgogggg tcccattggt caggtcogcg 1260
ataacaacgg caaggttcgt gaagatagcg atacogacgg acaggttttc tataaaggcc 1320
ogctggtggt gctggttgac cgttcaagtg ctccggttc agaatcttt gcgcggcaa 1380
tgcaggatta cggctgtgcg ctggttgtag gtgaaccgac gtttggttaa ggcaccgttc 1440
agcaatacog ttcattgaac cgtatttacg atcagatggt acgtcctgaa tggccagcgc 1500
tgggttctgt gcagtacacg atccagaat tctatogcgt taacggcggc agtacgcaac 1560
gtaaaggcgt aacgccagac atcatcatgc cgacgggtaa tgaagaacg gaacggggtg 1620
agaattoga agtaacogcg ctgocgtggg atagcattga tgcgcgact tatgtgaat 1680
caggagattt aacggccttt gaaccggagc tgctgaagga acataatgcg cgtatcogga 1740
aagatcctga gttccagAAC atcatgaagg atatogcogc ctccaacgct atgaaggaca 1800
agcgaatat ogtttctcg aattaogctg tgoctgagaa agagaataat gaagatgatg 1860
cgacgcgtct ggcgcgtttg aacgaacgct ttaaacgcga aggtaaacgg gagttgaaga 1920
aactggatga tctaccgaaa gattaccagc agccggatcc ttatctggat gagacggtga 1980
atatcgcact cgtctgogcg aagcttgaaa aagccagacc ogcggaaaca cccgctcccg 2040
tcaagtaa 2048

```

<210> 4

<211> 2889

<212> DNA

5 <213> Escherichia coli

<400> 4

```

atgcccogca gcaoctggtt caaagcatta ttggtgttag ttgcoccttg ggcaccctta 60
agtcaggcag aaacgggatg gcagcogatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat 120
aacggccagt atcaggctat acgtctggat aacggtatgg tggctctgct ggtttctgat 180
ccgcaggcag ttaaatcgct ctogggogcg gtggtgcccg ttgggtcgct ggaagatccc 240
gagcgtacc agggcctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag 300
taccogcagg ctgacagctt ggocgaatat ctcaaatgc acggcggtag tcacaatgcc 360
agcactgogc cgtatcgac ggttttctat ctggaagtg agaacgagc ctgocctggt 420
gggttagacc gcctggcoga tgctattgct gaacctttgc tcgacaagaa atatgcccga 480
cgtgagcgtg atgoggtgaa cgtgaatta accatggcgc gtaocgctga cgggatgocg 540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaa gttttctggt 600
gtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaaagat 660

```

ttccaagaga agtactatlc ogccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaacog	720
ctgccggagt tggcaaaat ggcggggac acctttggtc gcgtgccga caaagagagc	780
aaaaaacggg aatcacccgt gccggtaglc accgagcgcg aaaaagggcat talcattcat	840
tacgtccctg ogctgcgcg taagtggtg cgcgttgagt ttogcatoga taadaactca	900
gcgaagtcc gtatgaaac cgtatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca	960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgcacaactc	1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcgggta ttagcgatct ctgogtcttt aaocgataaa	1080
ggcctggcta atgcgagca ggttggtggc gcaattttta gctatctca tctgtaagt	1140
gaaaaagca ttgataaca atacttogat gaactggcga atgtgctga tatogacttc	1200
ogttatcogt cgtaccccg tgatctgat tacgtogaat gctgcccaga taocctgatt	1260
ogcgttcctg ttgagcctac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgtgctaaa	1320
gcagtaaaag aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaatg ccgctatctg gtatatcagc	1380
cogaaagagc cgcacaaca aacggcttc tttgtogatg ccgctatca gytogataaa	1440
atcagcgcac aaacttlcgc ogactggcag aaaaaagcgg ccgacattgc gctctcttg	1500
ccagagctta acccttatat tcctgatgat ttctgctga ttaagtcaga gaagaatac	1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcggg tgggtgatgc gccaaagcgt	1620
tatlttgcca gcgagccaa agctgatgtc agcctgattt tgogtaatcc gaaagccatg	1680
gacagcggcc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctgcagg gctggcgtt	1740
gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggg ggcataagtt tttccacca cgttaacaac	1800
ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc ccgagctgtt ccaggcattg	1860
ctcgaggggt accttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg	1920
tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc	1980
gogcagatgc tctgcgaagt gccgtacttc tcgogagatg aaoggcgtaa aatlttgccc	2040
tccattacgt tgaagaggt gctggcctat cgcgagcct taaaatcagg ggtcagacca	2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gccacggcaa caacgctggc acgcgatgtg	2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtgcga acaagatgt agtggctgat	2220
aaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactcggc actggcagcg	2280
gtatltgtac ogactggcta ogatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttggg	2340
cagatgtac agccgtggtt ctacaatcag ttgogtacog aagaacaatt gggctatgoc	2400
gtgtttcgt tccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttctt tttgcaagc	2460
aatgataaac agccttcatt ctgtgggag cgttacaag cgtttttccc aaocgcagag	2520

ttccaagaga agtactatlc ogccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaacog	720
ctgccggagt tggcaaaat ggcggggac acctttggtc gcgtgccga caaagagagc	780
aaaaaacggg aatcaccct gccggtaglc accgagcgcg aaaaagggcat talcattcat	840
tacgtccctg ogctgcgcg taagtggtg cgcgttgagt ttogcatoga taadaactca	900
gcgaagttcc gtatgaaac cgtatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca	960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgcacaactc	1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcgggta ttagcgatct ctgogtcttt aaocgataaa	1080
ggcctggcta atgcgagca ggttggtggc gcaattttta gctatctca tctgtaagt	1140
gaaaaagcde ttgataaca atacttogat gaactggcga atgtgctgga tatogacttc	1200
ogttatccgt cgtaccctg tgatctggat tacgtogaat ggcctggcaga taocctgatt	1260
ogcgttccgt ttgagcctac gctggatgca gtcaatattg ccgatcggta cgtgctaaa	1320
gcagtaaggg aacgtctggc gatgatgacg ccgcagaaatg ccgctatctg gtatctcagc	1380
ccgaaagagc cgcacaaca aacggcttc tttgtogatg ccgctatca gytogataaa	1440
atcagcgcac aaacttlcgc ogactggcag aaaaaagccg ccgacattgc gctctcttg	1500
ccagagctta acccttatat tcctgatgat ttctgctga ttaagtcaga gaagaatac	1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgcgog tgggtgatgc gcaagccgt	1620
tatlttgcca gcgagccaa agctgatgic agcctgattt tgogtaatcc gaaagccatg	1680
gacagcgcgc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctgcagc gctggcgtt	1740
gatcagttaa gcaaccaggc gtcggttggg ggcataagtt tttccacca cgttaacaac	1800
ggccttatgg ttaatgctaa tggttacacc cagcgtctgc ccgagctgtt ccaggcattg	1860
ctcgaggggt accttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtcctgg	1920
tataaccaga tgatggattc ccgagaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc	1980
gogcagatgc tctcgcaagt gccgtacttc tcgogagatg aaoggcgtaa aatlttgccc	2040
tccattacgt tgaagaggt gctggcctat ccgagcgcct taaaatcagc ggcctgacca	2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gccacggcaa caacgctggc acgcgatgtg	2160
caaaaacagt tggcgcctga tggttcagag tgggtgcga acaagatgt agtggctgat	2220
aaaaacaat ccgtcatctt tgaaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg	2280
gtatltgtac ogactggcta ogatgaatac accagctcag cctatagctc tctgttggg	2340
cagatgtac agccgtggtt ctacaatcag ttgogtacog aagaacaatt ggcctatgoc	2400
gtgtttcgt ttcaatgag cgtgggcgt cagtgggcda tggcctcct tttgcaagc	2460
aatgataaac agccttcatt ctgtgggag cgttacaagc cgttttccc aacgcagag	2520

gcaaaattgc gagcgatgaa gccagatgag tttgocgaaa tccagcaggc ggttaattacc 2580
 cgatgctgc aggcacogca aacgctoggc gaagaagcat cgaagttaag taagatttc 2640
 gatcggcgca atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
 acgcogcaaa aacttgctga tttcttccat caggcggctg togagccgca aggcattgct 2760
 attctgtgc agatttcogg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca cctgaaggc 2820
 tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgctt cagcaacaaa tgcccctgat gagtgaaaag 2880
 aatgagtg

<210> 5

<211> 962

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 5

Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Leu Ser Gln Ala Glu Thr Gly Trp Gln Pro Ile Gln Glu
 20 25 30
 Thr Ile Arg Lys Ser Asp Lys Asp Asn Arg Gln Tyr Gln Ala Ile Arg
 35 40 45
 Leu Asp Asn Gly Met Val Val Leu Leu Val Ser Asp Pro Gln Ala Val
 50 55 60
 Lys Ser Leu Ser Ala Leu Val Val Pro Val Gly Ser Leu Glu Asp Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Ala His Tyr Leu Glu His Met Ser Leu Met
 85 90 95
 Gly Ser Lys Lys Tyr Pro Gln Ala Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Leu Lys
 100 105 110
 Met His Gly Gly Ser His Asn Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Arg Thr Ala
 115 120 125
 Phe Tyr Leu Glu Val Glu Asn Asp Ala Leu Pro Gly Ala Val Asp Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asp Ala Ile Ala Glu Pro Leu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Glu
 145 150 155 160
 Arg Glu Arg Asn Ala Val Asn Ala Glu Leu Thr Met Ala Arg Thr Arg

gcaaaattgc gagcgtatgaa gccagatgag tttgocgcaa tccagcaggc ggttaattacc 2580
 cagatgctgc aggcacogca aacgctoggc gaagaagcat cgaagttaag taagatttc 2640
 gatcogcgca atatgcgctt cgattcgcgt gataaaatcg tggcccagat aaaactgctg 2700
 acgcogcaaa aacttgctga tttcttccat caggcggctg togagccgca aggcattgct 2760
 attctgtgc agatttcogg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca cctgaaggc 2820
 tggaaagtgt gggagaacgt cagcgcgctt cagcaacaa tgcccctgat gagtgaag 2880
 aatgagtga 2889

<210> 5

<211> 962

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 5

Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15
 Trp Ala Pro Leu Ser Gln Ala Glu Thr Gly Trp Gln Pro Ile Gln Glu
 20 25 30
 Thr Ile Arg Lys Ser Asp Lys Asp Asn Arg Gln Tyr Gln Ala Ile Arg
 35 40 45
 Leu Asp Asn Gly Met Val Val Leu Leu Val Ser Asp Pro Gln Ala Val
 50 55 60
 Lys Ser Leu Ser Ala Leu Val Val Pro Val Gly Ser Leu Glu Asp Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Tyr Gln Gly Leu Ala His Tyr Leu Glu His Met Ser Leu Met
 85 90 95
 Gly Ser Lys Lys Tyr Pro Gln Ala Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Leu Lys
 100 105 110
 Met His Gly Gly Ser His Asn Ala Ser Thr Ala Pro Tyr Arg Thr Ala
 115 120 125
 Phe Tyr Leu Glu Val Glu Asn Asp Ala Leu Pro Gly Ala Val Asp Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asp Ala Ile Ala Glu Pro Leu Leu Asp Lys Lys Tyr Ala Glu
 145 150 155 160
 Arg Glu Arg Asn Ala Val Asn Ala Glu Leu Thr Met Ala Arg Thr Arg

	165	170	175	
Asp Gly Met	Arg Met Ala Gln Val Ser	Ala Glu Thr Ile	Asn Pro Ala	
	180	185	190	
His Pro Gly	Ser Lys Phe Ser Gly Gly	Asn Leu Glu Thr	Leu Ser Asp	
	195	200	205	
Lys Pro Gly	Asn Pro Val Gln Gln Ala	Leu Lys Asp Phe	His Glu Lys	
	210	215	220	
Tyr Tyr Ser	Ala Asn Leu Met Lys Ala	Val Ile Tyr Ser	Asn Lys Pro	
	225	230	235	240
Leu Pro Glu	Leu Ala Lys Met Ala Ala	Asp Thr Phe Gly	Arg Val Pro	
	245	250	255	
Asn Lys Glu	Ser Lys Lys Pro Glu Ile	Thr Val Pro Val	Val Thr Asp	
	260	265	270	
Ala Gln Lys	Gly Ile Ile Ile His Tyr	Val Pro Ala Leu	Pro Arg Lys	
	275	280	285	
Val Leu Arg	Val Glu Phe Arg Ile Asp	Asn Asn Ser Ala	Lys Phe Arg	
	290	295	300	
Ser Lys Thr	Asp Glu Leu Ile Thr Tyr	Leu Ile Gly Asn	Arg Ser Pro	
	305	310	315	320
Gly Thr Leu	Ser Asp Trp Leu Gln Lys	Gln Gly Leu Val	Glu Gly Ile	
	325	330	335	
Ser Ala Asn	Ser Asp Pro Ile Val Asn	Gly Asn Ser Gly	Val Leu Ala	
	340	345	350	
Ile Ser Ala	Ser Leu Thr Asp Lys Gly	Leu Ala Asn Arg	Asp Gln Val	
	355	360	365	
Val Ala Ala	Ile Phe Ser Tyr Leu Asn	Leu Leu Arg Glu	Lys Gly Ile	
	370	375	380	
Asp Lys Gln	Tyr Phe Asp Glu Leu Ala	Asn Val Leu Asp	Ile Asp Phe	
	385	390	395	400
Arg Tyr Pro	Ser Ile Thr Arg Asp Met	Asp Tyr Val Glu	Trp Leu Ala	
	405	410	415	

165												170			175			
Asp	Gly	Met	Arg	Met	Ala	Gln	Val	Ser	Ala	Glu	Thr	Ile	Asn	Pro	Ala			
			180					185					190					
His	Pro	Gly	Ser	Lys	Phe	Ser	Gly	Gly	Asn	Leu	Glu	Thr	Leu	Ser	Asp			
		195					200					205						
Lys	Pro	Gly	Asn	Pro	Val	Gln	Gln	Ala	Leu	Lys	Asp	Phe	His	Glu	Lys			
	210					215					220							
Tyr	Tyr	Ser	Ala	Asn	Leu	Met	Lys	Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Asn	Lys	Pro			
225					230					235					240			
Leu	Pro	Glu	Leu	Ala	Lys	Met	Ala	Ala	Asp	Thr	Phe	Gly	Arg	Val	Pro			
				245					250					255				
Asn	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Glu	Ile	Thr	Val	Pro	Val	Val	Thr	Asp			
			260					265					270					
Ala	Gln	Lys	Gly	Ile	Ile	Ile	His	Tyr	Val	Pro	Ala	Leu	Pro	Arg	Lys			
		275					280					285						
Val	Leu	Arg	Val	Glu	Phe	Arg	Ile	Asp	Asn	Asn	Ser	Ala	Lys	Phe	Arg			
	290					295					300							
Ser	Lys	Thr	Asp	Glu	Leu	Ile	Thr	Tyr	Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	Pro			
305					310					315					320			
Gly	Thr	Leu	Ser	Asp	Trp	Leu	Gln	Lys	Gln	Gly	Leu	Val	Glu	Gly	Ile			
				325					330					335				
Ser	Ala	Asn	Ser	Asp	Pro	Ile	Val	Asn	Gly	Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Ala			
			340					345					350					
Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Lys	Gly	Leu	Ala	Asn	Arg	Asp	Gln	Val			
		355					360					365						
Val	Ala	Ala	Ile	Phe	Ser	Tyr	Leu	Asn	Leu	Leu	Arg	Glu	Lys	Gly	Ile			
	370					375					380							
Asp	Lys	Gln	Tyr	Phe	Asp	Glu	Leu	Ala	Asn	Val	Leu	Asp	Ile	Asp	Phe			
385					390					395					400			
Arg	Tyr	Pro	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Met	Asp	Tyr	Val	Glu	Trp	Leu	Ala			
				405					410					415				

Asp Thr Met Ile Arg Val Pro Val Glu His Thr Leu Asp Ala Val Asn
 420 425 430

Ile Ala Asp Arg Tyr Asp Ala Lys Ala Val Lys Glu Arg Leu Ala Met
 435 440 445

Met Thr Pro Gln Asn Ala Arg Ile Trp Tyr Ile Ser Pro Lys Glu Pro
 450 455 460

His Asn Lys Thr Ala Tyr Phe Val Asp Ala Pro Tyr Gln Val Asp Lys
 465 470 475 480

Ile Ser Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gln Lys Lys Ala Ala Asp Ile
 485 490 495

Ala Leu Ser Leu Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Ile Pro Asp Asp Phe Ser
 500 505 510

Leu Ile Lys Ser Glu Lys Lys Tyr Asp His Pro Glu Leu Ile Val Asp
 515 520 525

Glu Ser Asn Leu Arg Val Val Tyr Ala Pro Ser Arg Tyr Phe Ala Ser
 530 535 540

Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Leu Ile Leu Arg Asn Pro Lys Ala Met
 545 550 555 560

Asp Ser Ala Arg Asn Gln Val Met Phe Ala Leu Asn Asp Tyr Leu Ala
 565 570 575

Gly Leu Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asn Gln Ala Ser Val Gly Gly Ile
 580 585 590

Ser Phe Ser Thr Asn Ala Asn Asn Gly Leu Met Val Asn Ala Asn Gly
 595 600 605

Tyr Thr Gln Arg Leu Pro Gln Leu Phe Gln Ala Leu Leu Glu Gly Tyr
 610 615 620

Phe Ser Tyr Thr Ala Thr Glu Asp Gln Leu Glu Gln Ala Lys Ser Trp
 625 630 635 640

Tyr Asn Gln Met Met Asp Ser Ala Glu Lys Gly Lys Ala Phe Glu Gln
 645 650 655

Ala Ile Met Pro Ala Gln Met Leu Ser Gln Val Pro Tyr Phe Ser Arg
 660 665 670

Asp Thr Met Ile Arg Val Pro Val Glu His Thr Leu Asp Ala Val Asn
 420 425 430

Ile Ala Asp Arg Tyr Asp Ala Lys Ala Val Lys Glu Arg Leu Ala Met
 435 440 445

Met Thr Pro Gln Asn Ala Arg Ile Trp Tyr Ile Ser Pro Lys Glu Pro
 450 455 460

His Asn Lys Thr Ala Tyr Phe Val Asp Ala Pro Tyr Gln Val Asp Lys
 465 470 475 480

Ile Ser Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gln Lys Lys Ala Ala Asp Ile
 485 490 495

Ala Leu Ser Leu Pro Glu Leu Asn Pro Tyr Ile Pro Asp Asp Phe Ser
 500 505 510

Leu Ile Lys Ser Glu Lys Lys Tyr Asp His Pro Glu Leu Ile Val Asp
 515 520 525

Glu Ser Asn Leu Arg Val Val Tyr Ala Pro Ser Arg Tyr Phe Ala Ser
 530 535 540

Glu Pro Lys Ala Asp Val Ser Leu Ile Leu Arg Asn Pro Lys Ala Met
 545 550 555 560

Asp Ser Ala Arg Asn Gln Val Met Phe Ala Leu Asn Asp Tyr Leu Ala
 565 570 575

Gly Leu Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asn Gln Ala Ser Val Gly Gly Ile
 580 585 590

Ser Phe Ser Thr Asn Ala Asn Asn Gly Leu Met Val Asn Ala Asn Gly
 595 600 605

Tyr Thr Gln Arg Leu Pro Gln Leu Phe Gln Ala Leu Leu Glu Gly Tyr
 610 615 620

Phe Ser Tyr Thr Ala Thr Glu Asp Gln Leu Glu Gln Ala Lys Ser Trp
 625 630 635 640

Tyr Asn Gln Met Met Asp Ser Ala Glu Lys Gly Lys Ala Phe Glu Gln
 645 650 655

Ala Ile Met Pro Ala Gln Met Leu Ser Gln Val Pro Tyr Phe Ser Arg
 660 665 670

Asp Glu Arg Arg Lys Ile Leu Pro Ser Ile Thr Leu Lys Glu Val Leu
675 680 685

Ala Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Ser Gly Ala Arg Pro Glu Phe Met Val
690 695 700

Ile Gly Asn Met Thr Glu Ala Gln Ala Thr Thr Leu Ala Arg Asp Val
705 710 715 720

Gln Lys Gln Leu Gly Ala Asp Gly Ser Glu Trp Cys Arg Asn Lys Asp
725 730 735

Val Val Val Asp Lys Lys Gln Ser Val Ile Phe Glu Lys Ala Gly Asn
740 745 750

Ser Thr Asp Ser Ala Leu Ala Ala Val Phe Val Pro Thr Gly Tyr Asp
755 760 765

Glu Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ile Val Gln
770 775 780

Pro Trp Phe Tyr Asn Gln Leu Arg Thr Glu Glu Gln Leu Gly Tyr Ala
785 790 795 800

Val Phe Ala Phe Pro Met Ser Val Gly Arg Gln Trp Gly Met Gly Phe
805 810 815

Leu Leu Gln Ser Asn Asp Lys Gln Pro Ser Phe Leu Trp Glu Arg Tyr
820 825 830

Lys Ala Phe Phe Pro Thr Ala Glu Ala Lys Leu Arg Ala Met Lys Pro
835 840 845

Asp Glu Phe Ala Gln Ile Gln Gln Ala Val Ile Thr Gln Met Leu Gln
850 855 860

Ala Pro Gln Thr Leu Gly Glu Glu Ala Ser Lys Leu Ser Lys Asp Phe
865 870 875 880

Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln
885 890 895

Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu Ala Asp Phe Phe His Gln Ala
900 905 910

Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser
915 920 925

Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp
930 935 940

Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr Met Pro Leu Met Ser Glu Lys
945 950 955 960

Asn Glu

Asp Glu Arg Arg Lys Ile Leu Pro Ser Ile Thr Leu Lys Glu Val Leu
 675 680 685
 Ala Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Ser Gly Ala Arg Pro Glu Phe Met Val
 690 695 700
 Ile Gly Asn Met Thr Glu Ala Gln Ala Thr Thr Leu Ala Arg Asp Val
 705 710 715 720
 Gln Lys Gln Leu Gly Ala Asp Gly Ser Glu Trp Cys Arg Asn Lys Asp
 725 730 735
 Val Val Val Asp Lys Lys Gln Ser Val Ile Phe Glu Lys Ala Gly Asn
 740 745 750
 Ser Thr Asp Ser Ala Leu Ala Ala Val Phe Val Pro Thr Gly Tyr Asp
 755 760 765
 Glu Tyr Thr Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Leu Leu Gly Gln Ile Val Gln
 770 775 780
 Pro Trp Phe Tyr Asn Gln Leu Arg Thr Glu Glu Gln Leu Gly Tyr Ala
 785 790 795 800
 Val Phe Ala Phe Pro Met Ser Val Gly Arg Gln Trp Gly Met Gly Phe
 805 810 815
 Leu Leu Gln Ser Asn Asp Lys Gln Pro Ser Phe Leu Trp Glu Arg Tyr
 820 825 830
 Lys Ala Phe Phe Pro Thr Ala Glu Ala Lys Leu Arg Ala Met Lys Pro
 835 840 845
 Asp Glu Phe Ala Gln Ile Gln Gln Ala Val Ile Thr Gln Met Leu Gln
 850 855 860
 Ala Pro Gln Thr Leu Gly Glu Glu Ala Ser Lys Leu Ser Lys Asp Phe
 865 870 875 880
 Asp Arg Gly Asn Met Arg Phe Asp Ser Arg Asp Lys Ile Val Ala Gln
 885 890 895
 Ile Lys Leu Leu Thr Pro Gln Lys Leu Ala Asp Phe Phe His Gln Ala
 900 905 910
 Val Val Glu Pro Gln Gly Met Ala Ile Leu Ser Gln Ile Ser Gly Ser
 915 920 925
 Gln Asn Gly Lys Ala Glu Tyr Val His Pro Glu Gly Trp Lys Val Trp
 930 935 940
 Glu Asn Val Ser Ala Leu Gln Gln Thr Met Pro Leu Met Ser Glu Lys
 945 950 955 960
 Asn Glu

<210> 6

<211> 2889

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş Proteaz III geni

<400> 6

```

attccccgca gcacctggtt caaagcatta ttggtgtag ttgocctttg ggcacattaa      60
tgtcaggcag aaacgggatg gcagcogatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat      120
aacggccagt atcaggctat acgtctggat aaoggtatgg ttggtcttgc ggtttctgat      180
ccgcaggcag ttaaactcgt ctogggcgtg gtgggtcccg ttgggtcgtt ggaagatccc      240
gaggcgtacc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag      300
taccgcaggg ctgcacgtct ggoogaatat ctcaaatgc sogggogtag tcacaatgoc      360
agcactgocg cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttg agaacgaogc cttgcctggt      420
goggtagacc gcctggocga tgcatttgcg gaacctttgc tcgacaaga atatgcogaa      480
cgtgagcgtg atgoggtgaa cgtgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgocg      540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaa gttttctggt      600
ggtaacctcg aaactttaag cgacaaacct ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaagat      660
ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaaccg      720
ctgcgggagt tggcaaaaat ggogggggac acctttggtc gcggtccgaa caaagagagc      780
aaaaaacccg aatcacccgt gcoggtagtc aocgacgcgc aaaagggcat taccattcat      840
tacgtccctg ogctgcocgg taagtgttg cgggttgagt ttgcgatoga taacaactca      900
gcgaagttcc gtatgaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca      960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc     1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcgggcta ttagogatct ctgogtcttt aacogataaa     1080
ggcctggcta atocgatca ggttggggc gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt     1140
gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga taccgacttc     1200

```

<210> 6

<211> 2889

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş Proteaz III geni

<400> 6

```

attccccgca gcacctggtt caaagcatta ttggtgtag ttgocctttg ggcacattaa      60
tgtcaggcag aaacgggatg gcagcogatt caggaaacca tccgtaaaag tgataaagat      120
aacggccagt atcaggctat acgtctggat aaoggtatgg ttggtcttgc ggtttctgat      180
ccgcaggcag ttaaactcgt ctogggcgtg gtgggtcccg ttgggtcgtt ggaagatccc      240
gaggcgtacc aggggctggc acattacctt gaacatatga gtctgatggg gtcgaaaaag      300
taccgcaggg ctgcacgtct ggoogaatat ctcaaatgc sogggogtag tcacaatgoc      360
agcactgocg cgtatcgcac ggctttctat ctggaagttg agaacgaogc cttgcctggt      420
goggtagacc gcctggocga tgcatttctt gaacctttgc tcgacaaga atatgcogaa      480
cgtgagcgtg atgoggtgaa cgttgaatta accatggcgc gtacgcgtga cgggatgocg      540
atggcacagg tcagcgcaga aaccattaac ccggcacacc ccggttcaa gttttctggt      600
ggtaacctcg aaactttaag cgacaacctt ggtaatccgg tgcagcaggc gctgaagat      660
ttccacgaga agtactattc cgccaatttg atgaaggcgg ttatttacag taataaacgg      720
ctgcgggagt tggcaaaaat ggogggggac acctttggtc gcggtccgaa caaagagagc      780
aaaaaacccg aatcaccogt gcoggtagtc aocgacgcgc aaaagggcat taccattcat      840
tacgtccctg ogctgcogcg taagtgttg cgggttgagt ttgcgatoga taacaactca      900
gcgaagttcc gtatgaaac cgatgaattg attacctatc tgattggcaa tcgcagccca      960
ggtacacttt ctgactggct gcaaaagcag ggattagttg agggcattag cgccaactcc     1020
gatcctatcg tcaacggcaa cagcgggcta ttagogatct ctgogtcttt aacogataaa     1080
ggcctggcta atocgatca ggttgtggcg gcaattttta gctatctcaa tctgttacgt     1140
gaaaaaggca ttgataaaca atacttcgat gaactggcga atgtgctgga taccgacttc     1200

```

```

cgttatccgt cgatcaccog tgatatggat taogtogaat ggctggcaga taccatgatt 1260
cgcgttcctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg cogatcggta ogatgctaaa 1320
gcagtaaaag aaogtctggc gatgatgacg ccgcagaatg ccogtatctg gtatatcagc 1380
ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtogatg cgcctatca ggtcgataaa 1440
atcagcgcac aaactttcgc cgaactggcag aaaaaagccg cogacattgc gctctctttg 1500
ccagagctta acccttatat tctgatgat ttctcogtga ttaagtcaga gaagaatac 1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgocg tggtgtatgc gccaaagcgt 1620
tattttgcca gcgagcccaa agctgatgac agcctgattt tgogtaatcc gaaagccatg 1680
gacagcgcoc gcaatcaggt gatgtttgoc ctcaatgatt atctcgcagg gctggcgtt 1740
gatcagttaa gcaaccaggc gtoggttggg ggcataagtt tttccacaa cgtcaaac 1800
ggccttatgg ttaattgcta tggttacacc cagcgtctgc ccgagctgtt ccaggcattg 1860
ctcagggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtctg 1920
tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc 1980
ggcagatgc tctogcaagt gcogtacttc togcgagatg aaogggtaa aattttgccc 2040
tccattacgt tgaagaggt gctggcctat cgcgcgcct taaatcagg ggctcgacca 2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gccagggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtctgaa acaasgatgt agtggctgat 2220
aaaaacaat ccgtcatctt tgaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
gtatttgtao cgaactgcta ogatgaatc accagctcag cctatagctc tctgttggg 2340
cagatogtac agcogtgggt ctacaatcag ttgcgtaccg aagaacaatt ggcttatgcc 2400
gtgtttgcyt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttctt ttgcaaac 2460
aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
gcaaaattgc gagogatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcaggc ggttaattac 2580
cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taagatttc 2640
gatcgcggca atatgcgctt ogattcoggt gataaactc tggccdagat aaaactgctg 2700
acgcgcgcaa aacttgctga tttcttccat caggcgggtg togagccgca aggcattgct 2760
attctgtocg agatttcogg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
tggaaagtgt gggagaaogt cagcgcgttg cagcaacaa tgcctctgat gagtgaasg 2880
aatgagtga 2889

```

<210> 7

<211> 1425

<212> DNA

5 <213> Escherichia coli

<400> 7

```

cgttatccgt cgatcaccog tgatatggat taogtogaat ggctggcaga taccatgatt 1260
cgcgttcctg ttgagcatac gctggatgca gtcaatattg cogatcggta ogatgctaaa 1320
gcagtaaaag aaogtctggc gatgatgacg ccgcagaatg ccogtatctg gtatatcagc 1380
ccgaaagagc cgcacaacaa aacggcttac tttgtogatg cgcctatca ggtcgataaa 1440
atcagcgcac aaactttcgc cgaactggcag aaaaaagccg cogacattgc gctctctttg 1500
ccagagctta acccttatat tctgatgat ttctcogtga ttaagtcaga gaagaatac 1560
gaccatccag agctgattgt tgatgagtcg aatctgocg tggtgtatgc gccaaagcgt 1620
tattttgcca gcgagcccaa agctgatgac agcctgattt tgogtaatcc gaaagccatg 1680
gacagcgcoc gcaatcaggt gatgtttgcg ctcaatgatt atctcgcagg gctggcgtt 1740
gatcagttaa gcaaccagc gtoggttggg ggcataagtt tttccacaa cgtcaaac 1800
ggccttatgg ttaattgctaa tggttacacc cagcgtctgc ccgagctgtt ccaggcattg 1860
ctcagggggt actttagcta taccgctacg gaagatcagc ttgagcaggc gaagtctcgg 1920
tataaccaga tgatggattc cgcagaaaag ggtaaagcgt ttgagcaggc gattatgccc 1980
ggcagatgc tctogcaagt gcogtacttc togcgagatg aaogggtaa aattttgccc 2040
tccattacgt tgaagaggt gctggcctat cgcgcgcct taaatcagg ggctcgacca 2100
gagtttatgg ttatcggcaa catgaccgag gccagggcaa caacgctggc acgcgatgtg 2160
caaaaacagt tgggcgctga tggttcagag tgggtctgaa acaasgatgt agtggtcgat 2220
aaaaacaat ccgtcatctt tgaaaagcc ggtaacagca ccgactccgc actggcagcg 2280
gtatttgtao cgaactggctc ogatgaatc accagctcag cctatagctc tctgttggg 2340
cagatogtac agcogtgggt ctacaatcag ttgcgtaccg aagaacaatt gggctatgcc 2400
gtgtttgcgt ttccaatgag cgtggggcgt cagtggggca tgggcttctt ttgcaaac 2460
aatgataaac agccttcatt cttgtgggag cgttacaagg cgtttttccc aaccgcagag 2520
gcaaaattgc gagogatgaa gccagatgag tttgcgcaaa tccagcaggc ggttaattacc 2580
cagatgctgc aggcaccgca aacgctcggc gaagaagcat cgaagttaag taagatttc 2640
gatcgcggca atatgcgctt ogattcoggt gataaaatc tggccdagat aaaactgctg 2700
acgcgcgcaa aacttgctga tttcttccat caggcgggtg togagccgca aggcattgct 2760
attctgtcgc agatttcogg cagccagaac gggaaagccg aatatgtaca ccctgaaggc 2820
tggaaagtgt gggagaaogt cagcgcgttg cagcaacaa tgcccotgat gagtgaasg 2880
aatgagtga 2889

```

<210> 7

<211> 1425

<212> DNA

5 <213> Escherichia coli

<400> 7

```

atgaaaaaaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct      60
ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaaagc      120
cttgacacga tgctogaaaa ggtgatgctt tcagtggtca gcattaaagt agaaggtagc      180
acaaccgtta atacgcgcgcg tatgccgcgt aatttccagc agttcttogg tgatgattct      240
ccgttctgcc aggaaggttc tcogttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc      300
ggtaatggtg ggggcacgca acagaaattc atggcgctgg gttcoggcgt catcattgat      360
gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cacgttgttg ataacgcgac ggtcattaaa      420
gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gogaagatgg ttggcaaga tccgcgctct      480
gatatcgggc tgatccaaat ccagaaccgc aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat      540
tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccggtt tggctctggc      600
gagacggtaa cttccgggat tgtctctgcg ctggggcgta ggcgcctgaa tgcgaaaaac      660
tacgaaaact tcattccagc cgatgcagcg atcaaccgtg gtaactcogg tgggtgcgctg      720
gttaacctga acggcgaact gatcggatc aacacogcga tcctogcacc ggaoggcggc      780
aacatcggta tcggttttgc tatcccgagt aacatggtga aaaacctgac ctgcgagatg      840
gtggaatacg gccaggtgaa acgoggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc      900
gaactggoga aagogatgaa agttgacgcc cagcggogtg ctttogtaag ccaggttctg      960
octaattcct ccgctgcaaa agogggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctcaactgaa      1020
ggtaaagcga tcagcagctt tgoogcactg cgtgctcagg tgggtactat gccogtaggc      1080
agcaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaaacagg ttaacgtgaa cctggaactg      1140
cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgtc      1200
gagatgagca acaaaaggca agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact      1260
ccggtcggc agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttgggcgcaa ccagcaggca      1320
gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcacagca aaccgtctgt gctggcactc      1380
aacattcagc ggggcgacag cccatctac ctgtaatgc agtaa      1425

```

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 8

```

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala

```

```

atgaaaaaaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct      60
ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaagc      120
cttgacoga tgctogaaa ggtgatgctt tcagtggtca gcattaacgt agaaggtagc      180
acaaccgtta atacgcgcgc tatgccgcgt aatttccagc agttcttogg tgatgattct      240
ccgttctgcc aggaaggttc tcogttccag agctctccgt tctgccaggg tggccagggc      300
ggtaatggtg ggggcacgca acagaaattc atggcgctgg gttcoggcgt catcattgat      360
gccgataaag gctatgtcgt caccaacaac cccgttgttg ataacgcgac ggtcattaaa      420
gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gogaagatgg ttggcaaga tccgcgctct      480
gatatcggc tgatccaaat ccagaacccg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat      540
tctgatgcac tgcgcgtggg tgattacacc gtagcgattg gtaaccggtt tggctctggc      600
gagacggtaa cttccgggat tgtctctgcg ctggggcgta ggcgcctgaa tgcgaaaac      660
tacgaaaact tcaccagac cgatgcagcg atcaaccgtg gtaactcogg tgggtgcgctg      720
gttaacctga accgcaact gatcggatc aacacgcga tcctgcacc ggaoggcggc      780
aacatcggta tcggttttgc tatcccgagt aacatggtga aaaacctgac ctgcagatg      840
gtggaatacg gccaggtgaa accgggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc      900
gaactggoga aagogatgaa agttgacgcc cagcgggtg ctttogaag ccaggttctg      960
octaattcct ccgctgcaa agogggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctcaactgaa      1020
ggtaaagcga tcagcagctt tgoogcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc      1080
agcaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaaacagg ttaacgtgaa cctggaactg      1140
cagcagagca gccagaatca ggtgatctc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgt      1200
gagatgagca acaaggccaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact      1260
ccgctgccc agatcggcct gaagaaaggt gatgtgatta ttgggcgaa ccagcaggca      1320
gtgaaaaaca tcgctgaact gcgtaaagtt ctgcacagca aaccgtctgt gctggcactc      1380
aacattcagc ggggcgacag cccatctac ctgtaatgc agtaa      1425

```

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 8

```

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala

```

			20						25									30
Thr	Thr	Ala	Gln	Gln	Met	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Glu	Lys	Val			
		35					40					45						
Met	Pro	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Asn			
	50					55					60							
Thr	Pro	Arg	Met	Pro	Arg	Asn	Phe	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Asp	Ser			
65					70					75					80			
Pro	Phe	Cys	Gln	Glu	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Ser	Ser	Pro	Phe	Cys	Gln			
			85						90					95				
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Lys	Phe	Met	Ala			
		100						105					110					
Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr			
		115					120					125						
Asn	Asn	His	Val	Val	Asp	Asn	Ala	Thr	Val	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser			
	130					135					140							
Asp	Gly	Arg	Lys	Phe	Asp	Ala	Lys	Met	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Arg	Ser			
145					150					155				160				
Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Ile	Gln	Asn	Pro	Lys	Asn	Leu	Thr	Ala	Ile			
			165						170					175				
Lys	Met	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Tyr	Thr	Val	Ala			
		180						185					190					
Ile	Gly	Asn	Pro	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ile	Val			
	195						200					205						
Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Phe			
	210					215					220							
Ile	Gln	Thr	Asp	Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu			
225					230					235					240			
Val	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala			
				245					250					255				
Pro	Asp	Gly	Gly	Asn	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Pro	Ser	Asn	Met			
		260						265						270				

	20		25		30												
Thr	Thr	Ala	Gln	Gln	Met	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Met	Leu	Glu	Lys	Val		
	35						40					45					
Met	Pro	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Thr	Thr	Val	Asn		
	50					55					60						
Thr	Pro	Arg	Met	Pro	Arg	Asn	Phe	Gln	Gln	Phe	Phe	Gly	Asp	Asp	Ser		
65					70					75					80		
Pro	Phe	Cys	Gln	Glu	Gly	Ser	Pro	Phe	Gln	Ser	Ser	Pro	Phe	Cys	Gln		
			85						90					95			
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Gly	Gln	Gln	Gln	Lys	Phe	Met	Ala		
			100						105					110			
Leu	Gly	Ser	Gly	Val	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Lys	Gly	Tyr	Val	Val	Thr		
		115					120					125					
Asn	Asn	Mis	Val	Val	Asp	Asn	Ala	Thr	Val	Ile	Lys	Val	Gln	Leu	Ser		
	130					135					140						
Asp	Gly	Arg	Lys	Phe	Asp	Ala	Lys	Met	Val	Gly	Lys	Asp	Pro	Arg	Ser		
145					150					155					160		
Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Ile	Gln	Asn	Pro	Lys	Asn	Leu	Thr	Ala	Ile		
			165						170					175			
Lys	Met	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Leu	Arg	Val	Gly	Asp	Tyr	Thr	Val	Ala		
			180					185					190				
Ile	Gly	Asn	Pro	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ile	Val		
	195						200						205				
Ser	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Gly	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn	Tyr	Glu	Asn	Phe		
	210					215					220						
Ile	Gln	Thr	Asp	Ala	Ala	Ile	Asn	Arg	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala	Leu		
225					230					235					240		
Val	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala		
				245					250					255			
Pro	Asp	Gly	Gly	Asn	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Ile	Pro	Ser	Asn	Met		
		260						265						270			

Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg
275 280 285

Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys
290 295 300

Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu
305 310 315 320

Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile
325 330 335

Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala
340 345 350

Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu
355 360 365

Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser
370 375 380

Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala
385 390 395 400

Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val
405 410 415

Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val
420 425 430

Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg
435 440 445

Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg
450 455 460

Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln
465 470

<210> 9

<211> 1425

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş DegP

<400> 9

atgaaasaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct

60

Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg
275 280 285

Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys
290 295 300

Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu
305 310 315 320

Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile
325 330 335

Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala
340 345 350

Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu
355 360 365

Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser
370 375 380

Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala
385 390 395 400

Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val
405 410 415

Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val
420 425 430

Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg
435 440 445

Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg
450 455 460

Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln
465 470

<210> 9

<211> 1425

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş DegP

<400> 9

atgaaasaaa ccacattagc actgagtgca ctggctctga gtttaggttt ggcgttatct

60

ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaaagc 120
 cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtggtca gcattaacgt agaaggtagc 180
 acaaccgta ataogccggg tatgccgctt aatttccagc agttcttogg tgatgattct 240
 cggttctgac aggaagggtc tcogttccag agctctccgt tctgocaggg tggccagggc 300
 ggtaatggtg ggggccagca acagaaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
 gccgataaag gctatgtogt caocaaacaac caogttgttg ataaogcgac ggtcattaaa 420
 gttcaactga gcgatggccg taagttccag gogaagatgg ttggcaasga tccggcctct 480
 gatatcggcg tgatcccaat ccagaaccgg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
 tctgatgcac tgcgggtggg tgattacacc gttagcgattg gtaaccggtt tggctctggc 600
 gagaoggtaa ottoogggat tgtctctgag ctgggggta ggggocgaa tgcggaaaac 660
 tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg attaatcgtg gtaacggcgg tggtagcgtg 720
 gttaacctga accggcaact gatcggatc aacaccgca tccctgcacc ggacggcggc 780
 aacatcggta tgggttttgc tatcccgagt aacatggtga aaaaacctgac ctccagatg 840
 gtggaataag gccaggtgaa acgggggtgag ctgggtatta tggggactga gctgaactcc 900
 gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgoggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
 octaattcct ccgctgcaaa agogggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctcaactgaa 1020
 ggtaaagcga tcagcagctt tgoogcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtaggc 1080
 agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcgt 1200
 gagatgagca acaaaagcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
 ccggctgccc agatcggcct gaagaaagggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tgcctgaact gcgtaaagtt ctgcagagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gggggacag caocatctac ctgtaaatgc agtaa 1425

<210> 10

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş DegP

<400> 10

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala
 20 25 30

ccgctctctg caacggcggc tgagacttct tcagcaacga cagcccagca gatgccaaagc 120
 cttgcaccga tgctcgaaaa ggtgatgcct tcagtggtca gcattaacgt agaaggtagc 180
 acaaccgta ataogccggg tatgccgct aatttccagc agttcttogg tgatgattct 240
 cggttctgac aggaagggtc tcogttccag agctctccgt tctgocaggg tggccagggc 300
 ggtaatggtg ggggccagca acagaattc atggcgctgg gttccggcgt catcattgat 360
 gccgataaag gctatgtogt caocaaacaac caogttgtg ataaogcgac ggtcattaa 420
 gttcaactga gcgatggccg taagttcgac gogaagatgg ttggcaaga tccggcctct 480
 gatatcggc tgatccaaat ccagaaccgg aaaaacctga ccgcaattaa gatggcggat 540
 tctgatgcac tgcgggtggg tgattacacc gttagcattg gtaaccggtt tggctcggc 600
 gagaogtaa ottooggat tgtctctgag ctgggggta ggggocgaa tggcgaaac 660
 tacgaaaact tcatccagac cgatgcagcg attaatcgtg gtaacggcgg tggtagcctg 720
 gttaacctga accggcaact gatcggatc aacaccgca tcttcgacc ggacggcggc 780
 aacatcggta tgggtttgc tatcccgagt aacatggtg aaaaacctgac ctccagatg 840
 gtggaataag gccaggtgaa acggggtag ctgggtatta tgggactga gctgaactcc 900
 gaactggcga aagcgatgaa agttgacgcc cagcgoggtg ctttcgtaag ccaggttctg 960
 octaattcct ccgctgcaaa agggggcatt aaagcgggtg atgtgatcac ctactgaa 1020
 ggtaaagcga tcagcagctt tgoogcactg cgtgctcagg tgggtactat gccggtagc 1080
 agcaaaactga ccctgggctt actgcgcgac ggtaagcagg ttaacgtgaa cctggaactg 1140
 cagcagagca gccagaatca ggttgattcc agctccatct tcaacggcat tgaaggcct 1200
 gagatgagca acaaaagcaa agatcagggc gtggtagtga acaacgtgaa aacgggcact 1260
 ccggctgccc agatcggcct gaagaaagggt gatgtgatta ttggcgcgaa ccagcaggca 1320
 gtgaaaaaca tgcctgaact gcgtaaagt ctgcagagca aaccgtctgt gctggcactc 1380
 aacattcagc gggggacag caocatctac ctgtaaatgc agtaa 1425

<210> 10

<211> 474

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş DegP

<400> 10

Met Lys Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala
 20 25 30

Thr Thr Ala Gln Gln Met Pro Ser Leu Ala Pro Met Leu Glu Lys Val
 35 40 45

Met Pro Ser Val Val Ser Ile Asn Val Glu Gly Ser Thr Thr Val Asn
 50 55 60

Thr Pro Arg Met Pro Arg Asn Phe Gln Gln Phe Phe Gly Asp Asp Ser
 65 70 75 80

Pro Phe Cys Gln Glu Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Phe Cys Gln
 85 90 95

Gly Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gln Gln Gln Lys Phe Met Ala
 100 105 110

Leu Gly Ser Gly Val Ile Ile Asp Ala Asp Lys Gly Tyr Val Val Thr
 115 120 125

Asn Asn His Val Val Asp Asn Ala Thr Val Ile Lys Val Gln Leu Ser
 130 135 140

Asp Gly Arg Lys Phe Asp Ala Lys Met Val Gly Lys Asp Pro Arg Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Leu Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile
 165 170 175

Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala
 180 185 190

Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val
 195 200 205

Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe
 210 215 220

Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ala Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240

Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala
 245 250 255

Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met
 260 265 270

Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg

Thr Thr Ala Gln Gln Met Pro Ser Leu Ala Pro Met Leu Glu Lys Val
 35 40 45

Met Pro Ser Val Val Ser Ile Asn Val Glu Gly Ser Thr Thr Val Asn
 50 55 60

Thr Pro Arg Met Pro Arg Asn Phe Gln Gln Phe Phe Gly Asp Asp Ser
 65 70 75 80

Pro Phe Cys Gln Glu Gly Ser Pro Phe Gln Ser Ser Pro Phe Cys Gln
 85 90 95

Gly Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Gly Gln Gln Gln Lys Phe Met Ala
 100 105 110

Leu Gly Ser Gly Val Ile Ile Asp Ala Asp Lys Gly Tyr Val Val Thr
 115 120 125

Asn Asn His Val Val Asp Asn Ala Thr Val Ile Lys Val Gln Leu Ser
 130 135 140

Asp Gly Arg Lys Phe Asp Ala Lys Met Val Gly Lys Asp Pro Arg Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Leu Ile Gln Ile Gln Asn Pro Lys Asn Leu Thr Ala Ile
 165 170 175

Lys Met Ala Asp Ser Asp Ala Leu Arg Val Gly Asp Tyr Thr Val Ala
 180 185 190

Ile Gly Asn Pro Phe Gly Leu Gly Glu Thr Val Thr Ser Gly Ile Val
 195 200 205

Ser Ala Leu Gly Arg Ser Gly Leu Asn Ala Glu Asn Tyr Glu Asn Phe
 210 215 220

Ile Gln Thr Asp Ala Ala Ile Asn Arg Gly Asn Ala Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240

Val Asn Leu Asn Gly Glu Leu Ile Gly Ile Asn Thr Ala Ile Leu Ala
 245 250 255

Pro Asp Gly Gly Asn Ile Gly Ile Gly Phe Ala Ile Pro Ser Asn Met
 260 265 270

Val Lys Asn Leu Thr Ser Gln Met Val Glu Tyr Gly Gln Val Lys Arg

275 280 285
 Gly Glu Leu Gly Ile Met Gly Thr Glu Leu Asn Ser Glu Leu Ala Lys
 290 295 300
 Ala Met Lys Val Asp Ala Gln Arg Gly Ala Phe Val Ser Gln Val Leu
 305 310 315 320
 Pro Asn Ser Ser Ala Ala Lys Ala Gly Ile Lys Ala Gly Asp Val Ile
 325 330 335
 Thr Ser Leu Asn Gly Lys Pro Ile Ser Ser Phe Ala Ala Leu Arg Ala
 340 345 350
 Gln Val Gly Thr Met Pro Val Gly Ser Lys Leu Thr Leu Gly Leu Leu
 355 360 365
 Arg Asp Gly Lys Gln Val Asn Val Asn Leu Glu Leu Gln Gln Ser Ser
 370 375 380
 Gln Asn Gln Val Asp Ser Ser Ser Ile Phe Asn Gly Ile Glu Gly Ala
 385 390 395 400
 Glu Met Ser Asn Lys Gly Lys Asp Gln Gly Val Val Val Asn Asn Val
 405 410 415
 Lys Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gln Ile Gly Leu Lys Lys Gly Asp Val
 420 425 430
 Ile Ile Gly Ala Asn Gln Gln Ala Val Lys Asn Ile Ala Glu Leu Arg
 435 440 445
 Lys Val Leu Asp Ser Lys Pro Ser Val Leu Ala Leu Asn Ile Gln Arg
 450 455 460
 Gly Asp Ser Thr Ile Tyr Leu Leu Met Gln
 465 470

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primeri

<400> 11

10 ctgctgcca ttttcgccg aacg 24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> mutasyondan geçmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primeri

<400> 12

cgcatggtac gtgccacgat atcc 24

<210> 13

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 5'

15 oligonükleotit primeri

<400> 13

gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24

<210> 14

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primeri

25 <400> 14

gggaaaggcg gcggaaccgc ctag 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

30 <213> Yapay Dizi

<220>

<211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> mutasyondan geçmiş DegP geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primeri

<400> 12

cgcatggtac gtgccacgat atcc 24

<210> 13

10 <211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primeri

15

<400> 13

gggaaatgaa cctgagcaaa acgc 24

<210> 14

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primeri

25 <400> 14

gggaaaggcg gcggaaccgc ctag 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

30 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primeri

<400> 15

ctactgtgcc agcgggtgga atgg 24

5 <210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> mutasyondan geçmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primeri

<400> 16

gcataataat tttcttttta cctc 24

<210> 17

15 <211> 564

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> yabancı tip spr geni

20 <400> 17

```

atggtcaaat ctcaacgat tttgagatat atcttgccgg ggattccogc gattgcagta 60
ggggttctgc tttctgcctg tagtgcaaat aacaccgcaa agaatatgca tcttgagaca 120
cgtgcagtggt gtagtgaaac atcatcactg caagcttctc aggatgaatt tgaaaaoctg 180
gttcgtaastg tcgacgtaaa atgcgcaatt atggatcagt atgctgactg gaaaggcgtg 240
ogttatcgtc tgggcggcag cactaaaaaa ggtatcgatt gttctggttt cgtacaoggt 300
acattccgtg agcaatttgg cttagaactt ccgcgttcga cttacgaaca gcaggaastg 360
ggtaaatctg tttcccgag taatttgcgt aoggytgatt tagttctgtt ccgtgcoggt 420
tcaacgggac gccatgtgg tatttatatc ggcaacaatc agtttgtoca tgettccacc 480
agcagtggtg ttattatttc cagcatgaat gaacogtact ggaagaagcg ttacaasogaa 540
gcacgcoggg ttctcaqccg cagc 564

```

<210> 18

<211> 188

<223> mutasyondan geçmiş Proteaz III geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 5' oligonükleotit primeri

<400> 15

ctactgtgcc agcgggtgga atgg 24

5 <210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> mutasyondan geçmiş Tsp geninin Ase I kısıtlama yeri içeren bölgesi için 3' oligonükleotit primeri

<400> 16

gcataataat tttcttttta cctc 24

<210> 17

15 <211> 564

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> yabancı tip spr geni

20 <400> 17

```

atggtcaaat ctcaacgat tttgagatat atcttgccgg ggattccogc gattgcagta 60
gggttctgc tttctgcatg tagtgcaat aacaccgcaa agaatatgca tcttgagaca 120
cgtgcagtgg gtagtgaac atcatcactg caagcttctc aggatgaatt tgaaaaoctg 180
gttcgtaatg tcgacgtaa atgcgcaat atggatcagt atgctgactg gaaaggcgtg 240
ogttatcgtc tgggcggcag cactaaaaaa ggtatcgatt gttctggttt cgtacaogt 300
acattccgtg agcaatttgg cttagaactt ccgcgttcga cttacgaaca gcaggaatg 360
ggtaaatctg tttcccgag taatttgcgt aoggytgatt tagttctgtt ccgtgcoggt 420
tcaacgggac gccatgtgg tatttatatc ggcaacaatc agtttgtoca tgettccacc 480
agcagtggtg ttattatttc cagcatgaat gaacogtact ggaagaagcg ttacaasogaa 540
gcacgcoggg ttctcaqccg cagc 564

```

<210> 18

<211> 188

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile Leu Arg Gly Ile Pro
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Cys Ser Ala Asn Asn Thr
 20 25 30

Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala Val Gly Ser Glu Thr Ser
 35 40 45

Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn Leu Val Arg Asn Val
 50 55 60

Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala Asp Trp Lys Gly Val
 65 70 75 80

Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys Gly Ile Asp Cys Ser Gly
 85 90 95

5

Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe Gly Leu Glu Leu Pro Arg
 100 105 110

Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser Val Ser Arg Ser Asn
 115 120 125

Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala Gly Ser Thr Gly Arg
 130 135 140

His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Val His Ala Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn Glu Pro Tyr Trp Lys Lys
 165 170 175

Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg Ser
 180 185

<210> 19

<211> 162

<212> PRT

10 <213> Escherichia coli

<400> 19

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Met Val Lys Ser Gln Pro Ile Leu Arg Tyr Ile Leu Arg Gly Ile Pro
 1 5 10 15

Ala Ile Ala Val Ala Val Leu Leu Ser Ala Cys Ser Ala Asn Asn Thr
 20 25 30

Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala Val Gly Ser Glu Thr Ser
 35 40 45

Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu Asn Leu Val Arg Asn Val
 50 55 60

Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr Ala Asp Trp Lys Gly Val
 65 70 75 80

Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys Gly Ile Asp Cys Ser Gly
 85 90 95

5

Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe Gly Leu Glu Leu Pro Arg
 100 105 110

Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys Ser Val Ser Arg Ser Asn
 115 120 125

Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg Ala Gly Ser Thr Gly Arg
 130 135 140

His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Val His Ala Ser Thr
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn Glu Pro Tyr Trp Lys Lys
 165 170 175

Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser Arg Ser
 180 185

<210> 19

<211> 162

<212> PRT

10 <213> Escherichia coli

<400> 19

Cys Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Ser Glu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu
 20 25 30
 Asn Leu Val Arg Asn Val Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr
 35 40 45
 Ala Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys
 50 55 60
 Gly Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe
 65 70 75 80
 Gly Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys
 85 90 95
 Ser Val Ser Arg Ser Asn Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg
 100 105 110
 Ala Gly Ser Thr Gly Arg His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln
 115 120 125
 Phe Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn
 130 135 140
 Glu Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser
 145 150 155 160
 Arg Ser

<210> 20

5 <211> 954

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçmiş bir OmpT dizisinin nükleotit dizisi

<400> 20

Cys Ser Ala Asn Asn Thr Ala Lys Asn Met His Pro Glu Thr Arg Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Ser Glu Thr Ser Ser Leu Gln Ala Ser Gln Asp Glu Phe Glu
 20 25 30
 Asn Leu Val Arg Asn Val Asp Val Lys Ser Arg Ile Met Asp Gln Tyr
 35 40 45
 Ala Asp Trp Lys Gly Val Arg Tyr Arg Leu Gly Gly Ser Thr Lys Lys
 50 55 60
 Gly Ile Asp Cys Ser Gly Phe Val Gln Arg Thr Phe Arg Glu Gln Phe
 65 70 75 80
 Gly Leu Glu Leu Pro Arg Ser Thr Tyr Glu Gln Gln Glu Met Gly Lys
 85 90 95
 Ser Val Ser Arg Ser Asn Leu Arg Thr Gly Asp Leu Val Leu Phe Arg
 100 105 110
 Ala Gly Ser Thr Gly Arg His Val Gly Ile Tyr Ile Gly Asn Asn Gln
 115 120 125
 Phe Val His Ala Ser Thr Ser Ser Gly Val Ile Ile Ser Ser Met Asn
 130 135 140
 Glu Pro Tyr Trp Lys Lys Arg Tyr Asn Glu Ala Arg Arg Val Leu Ser
 145 150 155 160

Arg Ser

<210> 20

5 <211> 954

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçmiş bir OmpT dizisinin nükleotit dizisi

<400> 20

atgogggcga aacttctggg aatagtcttg acaacccta ttgogatcag ctcttttgct 60
 tctaccgaga ctttatoggt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggact 120
 ctgagcggaa aaacaaaaga gcytgttat ctagoogaag aaggaggocg aaaagtoagt 180
 caactcgact ggaattcaa taacgctgca attattaag gtgcaattaa ttgggatttg 240
 atgccccaga tatctatogg gctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat 300
 atggtcgatc aggactggat ggattccagt aaccccgaa cctggacgga tgaagtga 360
 caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc 420
 ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggcoggat atcaggaag ccgttatagc 480
 tttacagocg gagtggctc ctatatctac agttctgagc agggattoag agatgatc 540
 ggctccttc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaac aacgttttaa aatgccctac 600
 attggcttga ctggaagta tegtatatga gattttgac tcggtggcac atttaatac 660
 agcggctggg tggatcatc tgataacgct gaagcttatg acccgggaa aagaatcact 720
 tatcgcagta aggtcaaaga ccaaatcacc tattctgttg cagtcaatgc aggttattac 780
 gtcacaccta acgcaaaagt ttatgttgaa ggogcatgga atcgggttac gaataaaaa 840
 ggttaactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagca aatggagca 900
 ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt ttaa 954

<210> 21

<211> 317

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçmiş OmpT dizisi

<400> 21

```

atgogggcga aacttctggg aatagtctg acaacccta ttgogatcag ctcttttgc 60
tctaccgaga ctttatogtt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggact 120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcytgttat ctagooaag aaggaggoog aaaagtoagt 180
caactcgact ggaattcaa taacgctgca attattaag gtgcaattaa ttgggatttg 240
atgccccaga tatctatggg ggctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat 300
atggtcgatc aggactggat ggattccagt aaccccgaa cctggacgga tgaagtga 360
caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggctggctc 420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggcoggat atcaggaag ccgttatagc 480
tttacagocg gagtggctc ctatatctac agttctgag agggattoag agatgatc 540
ggctccttc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaac aacgttttaa aatgccctac 600
attggcttga ctggaagta tegtatatga gattttgac tcggtggcac atttaatac 660
agcggctggg tggatcatc tgataacgct gaagcttatg accogggaa aagaatcact 720
tatcgcagta aggtcaaaga ccaaatc tattctgtg cagtcaatgc aggttattac 780
gtcacaccta acgcaaaagt ttatgttgaa ggogcatgga atcgggttac gaataaaaa 840
ggttaactt cactttatga tcacaataa aacacttcag actacagca aatggagca 900
ggtatagaaa actataactt catcactact gctggtctta agtacacatt ttaa 954

```

<210> 21

<211> 317

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> D210A ve H212A mutasyonlarını içeren mutasyondan geçmiş OmpT dizisi

<400> 21

Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
1 5 10 15
Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
20 25 30
Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
35 40 45
Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
50 55 60
Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
65 70 75 80
Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
85 90 95
Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
100 105 110
Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
115 120 125
Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
130 135 140
Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
145 150 155 160
Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
165 170 175
Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
180 185 190
Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
195 200 205
Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
210 215 220
Glu Ser Ser Asp Asn Ala Glu Ala Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
225 230 235 240

Met Arg Ala Lys Leu Leu Gly Ile Val Leu Thr Thr Pro Ile Ala Ile
 1 5 10 15

Ser Ser Phe Ala Ser Thr Glu Thr Leu Ser Phe Thr Pro Asp Asn Ile
 20 25 30

Asn Ala Asp Ile Ser Leu Gly Thr Leu Ser Gly Lys Thr Lys Glu Arg
 35 40 45

Val Tyr Leu Ala Glu Glu Gly Gly Arg Lys Val Ser Gln Leu Asp Trp
 50 55 60

Lys Phe Asn Asn Ala Ala Ile Ile Lys Gly Ala Ile Asn Trp Asp Leu
 65 70 75 80

Met Pro Gln Ile Ser Ile Gly Ala Ala Gly Trp Thr Thr Leu Gly Ser
 85 90 95

Arg Gly Gly Asn Met Val Asp Gln Asp Trp Met Asp Ser Ser Asn Pro
 100 105 110

Gly Thr Trp Thr Asp Glu Ser Arg His Pro Asp Thr Gln Leu Asn Tyr
 115 120 125

Ala Asn Glu Phe Asp Leu Asn Ile Lys Gly Trp Leu Leu Asn Glu Pro
 130 135 140

Asn Tyr Arg Leu Gly Leu Met Ala Gly Tyr Gln Glu Ser Arg Tyr Ser
 145 150 155 160

Phe Thr Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Ser Ser Glu Glu Gly Phe
 165 170 175

Arg Asp Asp Ile Gly Ser Phe Pro Asn Gly Glu Arg Ala Ile Gly Tyr
 180 185 190

Lys Gln Arg Phe Lys Met Pro Tyr Ile Gly Leu Thr Gly Ser Tyr Arg
 195 200 205

Tyr Glu Asp Phe Glu Leu Gly Gly Thr Phe Lys Tyr Ser Gly Trp Val
 210 215 220

Glu Ser Ser Asp Asn Ala Glu Ala Tyr Asp Pro Gly Lys Arg Ile Thr
 225 230 235 240

Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
245 250 255

Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
260 265 270

Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
275 280 285

Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
290 295 300

Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
305 310 315

<210> 22

<211> 954

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş OmpT dizisi

<400> 22

```

attcgggaga aacttctggg aatagtcctg acaacccta ttgogatcag ctcttttgct      60
tctaccgaga ctttateggt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggaact      120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcgtgtttat ctagcogaag agggaggocg aaaagtcagt      180
caactcgact ggaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg      240
atgccccaga tatctatcgg gcctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat      300
atggtcgatc aggactggat ggattccagt aaccccgaa cctggacoga tgaagtga      360
caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggttgctc      420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggcoggat atcaggaag ccgttatagc      480
tttacagoda gaggtggttc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatac      540
ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaac aacgttttaa aatgcctac      600
attggcttga ctggaagtta tegtatatga gattttgaac tcggtggcac atttaatac      660
agcggctggg tggatcattc tgataacgat gaacctatg acccgggaaa aagaatcact      720
tatcgcagta aggtcaaaga ccasaattac tattctgttg cagtcaatgc aggttattac      780
gtcacacctc acgcaaaagt ttatgttga ggcgatgga atcgggttac gaataaaaa      840
ggtaatactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aatggagca      900
ggtatagaaa actataactt catcctact gctggtctta agtacacatt ttaa      954

```

10 <210> 23

<211> 45

Tyr Arg Ser Lys Val Lys Asp Gln Asn Tyr Tyr Ser Val Ala Val Asn
245 250 255

Ala Gly Tyr Tyr Val Thr Pro Asn Ala Lys Val Tyr Val Glu Gly Ala
260 265 270

Trp Asn Arg Val Thr Asn Lys Lys Gly Asn Thr Ser Leu Tyr Asp His
275 280 285

Asn Asn Asn Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Asn Gly Ala Gly Ile Glu Asn
290 295 300

Tyr Asn Phe Ile Thr Thr Ala Gly Leu Lys Tyr Thr Phe
305 310 315

<210> 22

<211> 954

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> mutasyondan geçmiş işlevi iptal edilmiş OmpT dizisi

<400> 22

```

attcgggaga aacttctggg aatagtcctg acaacccta ttgogatcag ctcttttgct      60
tctaccgaga ctttctcgtt tactcctgac aacataaatg cggacattag tcttggaact      120
ctgagcggaa aaacaaaaga gcgtgtttat ctagcogaag agggaggocg aaaagtcagt      180
caactcgact ggaattcaa taacgctgca attattaaag gtgcaattaa ttgggatttg      240
atgccccaga tatctatcgg gcctgctggc tggacaactc tcggcagccg aggtggcaat      300
atggtcgatc aggactggat ggattccagt aaccccgaa cctggacoga tgaagtga      360
caccctgata cacaactcaa ttatgccaac gaatttgatc tgaatatcaa aggttgctc      420
ctcaacgaac ccaattaccg cctgggactc atggcoggat atcaggaag ccgttatagc      480
tttacagoda gaggtggttc ctatatctac agttctgagg agggattcag agatgatatc      540
ggctccttcc cgaatggaga aagagcaatc ggctacaac aacgttttaa aatgcctac      600
attggcttga ctggaagtta tegtatatga gattttgaac tcggtggcac atttaatatc      660
agcggctggg tggatcattc tgataacgat gaacctatg acccgggaaa aagaatcact      720
tatcgcagta aggtcaaaga ccasaattac tattctgttg cagtcaatgc aggttattac      780
gtcacacctc acgcaaaagt ttatggttga ggcgatgga atcgggttac gaataaaaa      840
ggtaatactt cactttatga tcacaataat aacacttcag actacagcaa aatggagca      900
ggtatagaaa actataactt catcctact gctggtcttc agtacacatt ttaa      954

```

10 <210> 23

<211> 45

- <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> OmpA oligonükleotit adaptörü
- 5 <400> 23
 cgattgaatg gagaactga atcggggcga aactctggg aatag 45
 <210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
- 10 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 1'i (IGS1) kodlayan oligonükleotit kaseti
 <400> 24
 aagttttaat agaggagagt gttaatgaag aag 33
- 15 <210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
- 20 <223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 2'yi (IGS2) kodlayan oligonükleotit kaseti
 <400> 25
 aagttttaat agaggggagt gttaaatga agaag 35
 <210> 26
 <211> 47
- 25 <212> DNA
 <213> Yapay Dizi
 <220>
 <223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 3'ü (IGS3) kodlayan oligonükleotit kaseti
 <400> 26
- 30 aagctttaat agaggagagt gttgaggagg aaaaaaaaaat gaagaaa 47

- <212> DNA
- <213> Yapay Dizi
- <220>
- <223> OmpA oligonükleotit adaptörü
- 5 <400> 23
cgattgaatg gagaactga atcggggcga aactctggg aatag 45
- <210> 24
- <211> 33
- <212> DNA
- 10 <213> Yapay Dizi
- <220>
- <223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 1'i (IGS1) kodlayan oligonükleotit kaseti
- <400> 24
aagttttaat agaggagagt gttaatgaag aag 33
- 15 <210> 25
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> Yapay Dizi
- <220>
- 20 <223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 2'yi (IGS2) kodlayan oligonükleotit kaseti
- <400> 25
aagttttaat agaggggagt gttaaatga agaag 35
- <210> 26
- <211> 47
- 25 <212> DNA
- <213> Yapay Dizi
- <220>
- <223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 3'ü (IGS3) kodlayan oligonükleotit kaseti
- <400> 26
aagctttaat agaggagagt gttgaggagg aaaaaaaaaat gaagaaa 47
- 30

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 4'ü (IGS4) kodlayan oligonükleotit kaseti

<400> 27

aagcttaaat agaggagagt gttgacgagg attatataat gaagaaa 47

<210> 28

10 <211> 810

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 28

```

atgaatcac tgtttaaagt aacgctgctg gogaccacaa tggccggtgc cctgcatgca      60
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctacag ctgctgacag caaagcagcg      120
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg ootogctggg tcgttacatg      180
gaaaactctc taaaagaaca agaaaactg ggcatacaac tggataaaga tcagctgac      240
gctgggtgtc aggatgcatt tgctgataag agcaactctc ccgaccaaga gatcgaacag      300
actctacaag cattcgaagc tcgogtgaag tottctgctc aggogaagat ggaaaaagac      360
gcggctgata acgaagcaaa agtaaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaggt      420
gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca      480
cogaagaca gogatactgt tgtagtgaac tacaaggtc ogctgatoga oggtaaaagag      540
ttcgacaact cttacaoccc tggtagaacg cttctcttcc gtctggacgg tgttatcccg      600
ggttgacacg aaggtctgaa gaacatcaag aaaggcggta agatcaact ggttattcca      660
ocagaactgg cttacggcaa agoggggtgt cgggggatoc cacogaattc taocctggtg      720
tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca ggcgogaagc ctgatgcaaa gccggaagct      780
gatgcgaaag ccgcagattc tgctaaaaaa      810

```

15 <210> 29

<211> 270

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

<210> 27

<211> 47

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> E. coli Fab ekspresyonu için interjenik dizi 4'ü (IGS4) kodlayan oligonükleotit kaseti

<400> 27

aagctttaat agaggagagt gttgacgagg attatataat gaagaaa 47

<210> 28

10 <211> 810

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 28

```

atgaatcac tgtttaaagt aacgctgctg gogaccacaa tggccggtgc cctgcatgca      60
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctacag ctgctgacag caaagcagcg      120
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg ootogctggg tcgttacatg      180
gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcatacaac tggataaaga tcagctgac      240
gctgggtgtc aggatgcatt tgctgataag agcaaaactc ccgaccaaga gatcgaacag      300
actctacaag cattcgaagc tcogtgaag tottctgctc aggogaagat ggaaaaagac      360
gcggctgata acgaagcaaa agtaaaagag taccgcgaga aatttgccaa agagaaggt      420
gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca      480
cogaagaca gogatactgt tgtagtgaac taaaaagta ogctgatoga ogtaaaagag      540
ttcgacaact cttacaoccc tggtagaacg cttctcttcc gtctggacgg tgttatcccg      600
ggttgacacg aaggtctgaa gaacatcaag aaaggcggta agatcaaaact ggttattcca      660
ccagaactgg cttacggcaa agoggggtgt cgggggatcc cacogaattc taacctggtg      720
tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca ggcgogaagc ctgatgcaaa gccggaagct      780
gatgcgaaag ccgcagattc tgctaaaaaa      810

```

15 <210> 29

<211> 270

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 29

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30
 Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60
 Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95
 Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110
 Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125
 Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140
 Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190
 Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
 195 200 205
 Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255
 Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
 260 265 270

<210> 30

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30
 Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60
 Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95
 Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110
 Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125
 Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140
 Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190
 Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
 195 200 205
 Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255
 Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
 260 265 270

<210> 30

<211> 828

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> FkpA etiketli gen

<400> 30

```

atgaaatcac tgtttaaagt aaogctgctg gogaccacaa tggocgttgc cctgcaogca      60
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctactg ctgctgacag caaagcagcg      120
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg octogctggg tcgttacatg      180
gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcatacaac tggataaaga tcaactgac      240

gctggtgttc aggatgcatt tgctgataag agcaaaactct ccgaccaaga gatogaacag      300
actctacaag catttgaagc tcgogtgaag tcttctgctc aggogaagat ggaaaaagac      360
gggctgata acgaagcaaa agytaaagag taccgagaga aatttgcaa agagaaaggt      420
gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca      480
ccgaagaca gcgatactgt tgtagtgaac tacaaggtta ogctgatoga oggtaaaagag      540
ttcgacaact cttacacccg tggtaaccg ctttcttcc gtctggacgg tgttatcccg      600
ggttggacag aaggtctgaa gaacatcaag aaaggoggtta agataaaact ggttattcca      660
ccagaactgg cttacggcaa agoggtgtt ccggggattc caccaattc taccctggtg      720
tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca gogcogaagg ctgatgcaaa gccggaagct      780
gatgogaaag ccgacagattc tgctaaaaaa ccccatcacc atcaccac      828

```

10 <210> 31

<211> 276

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> FkpA his etiketli gen

<400> 31

<211> 828

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> FkpA etiketli gen

<400> 30

```

atgaaatcac tgtttaaagt aaogctgctg gogaccacaa tggocgttgc cctgcaogca      60
ccaatcactt ttgctgctga agctgcaaaa cctgctactg ctgctgacag caaagcagcg      120
ttcaaaaatg acgatcagaa atcagcttat gcactgggtg octogctggg tcgttacatg      180
gaaaactctc taaaagaaca agaaaaactg ggcataaac tgataaaga tcaactgac      240

gctggtgttc aggatgcatt tgctgataag agcaaaactct ccgaccaaga gatogaacag      300
actctacaag catttgaagc tcgogtgaag tcttctgctc aggogaagat ggaaaaagac      360
gggctgata acgaagcaaa agttaaagag taccgagaga aatttgccaa agagaaggt      420
gtgaaaacct cttcaactgg tctggtttat caggtagtag aagccggtaa aggcgaagca      480
ccgaagaca gcgatactgt tgtagtgaac tacaaggtta ogctgatoga oggtaaaagag      540
ttcgacaact cttacacccg tggtaaccg ctttctttcc gtctggacgg tgttatcccg      600
ggttgacag aaggtctgaa gaacatcaag aaaggoggtta agataaaact ggttattcca      660
ccagaactgg cttacggcaa agoggtgtt ccggggattc caccaattc taccctggtg      720
tttgacgtag agctgctgga tgtgaaacca gogcogaagg ctgatgcaaa gccggaagct      780
gatgogaaag ccgacagattc tgctaaaaaa ccccatcacc atcaccac      828

```

10 <210> 31

<211> 276

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> FkpA his etiketli gen

<400> 31

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30
 Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60
 Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95
 Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110
 Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125
 Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140
 Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190
 Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
 195 200 205
 Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255
 Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 32

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
 1 5 10 15
 Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
 20 25 30
 Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
 35 40 45
 Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
 50 55 60
 Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
 85 90 95
 Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
 100 105 110
 Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
 115 120 125
 Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
 130 135 140
 Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
 165 170 175
 Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
 180 185 190
 Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
 195 200 205
 Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
 245 250 255
 Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys His His
 260 265 270
 His His His His
 275

<210> 32

<211> 486

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 32

```

gtgaaaaagt gggtattagc tgcaggcttc ggtttagcac tggcaacttc tgctcaggcg      60
gctgacsaas ttgcaatcgt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaacc      120
ggtgtttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact gcagcgtatg      180
gaaaccgatc tgcaggctaa aatgaaaaag ctgcagtcga tgaagcggg cagcगतgc      240
actaagctgy aaaaagacgt gatggctcag cggcagactt ttgctcagaa agcgcaggct      300
tttgagcagg atcgcgcacg tcgttccaac gaagaacgog gcaaaactggt tactcgtatc      360
cagactgctg tgaatcogt tgcdaacagc caggatatog atctggttgt tgatgcaaac      420
5 gccgttgcctt acaacagcag cgatgtaaaa gacatcactg ccgacgtact gaaacaggtt      480

aaataa                                         486

```

<210> 33

<211> 161

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 33

<211> 486

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 32

```

gtgaaaaagt ggttattagc tgcaggtctc ggtttagcac tggcaacttc tgctcaggcg      60
gctgacsaas ttgcaatcgt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaacc      120
ggtgtttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact gcagcgtatg      180
gaaaccgatc tgcaggctaa aatgaaaaag ctgcagtcga tgaagcggg cagcगतgc      240
actaagctgy aaaaagacgt gatggctcag cggcagactt ttgctcagaa agcgcaggct      300
tttgagcagg atcgcgcacg tcgttccaac gaagaacgog gcaaaactggt tactcgtatc      360
cagactgctg tgaatcogt tgcdaacagc caggatatog atctggttgt tgatgcaaac      420
5 gccgttgcct acaacagcag cgatgtaaaa gacatcactg ccgacgtact gaaacaggtt      480

aaataa                                         486

```

<210> 33

<211> 161

10 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 33

Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
 20 25 30
 Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
 35 40 45
 Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
 50 55 60
 Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
 65 70 75 80
 Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
 85 90 95
 Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
 115 120 125
 Asn Ser Gln Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
 130 135 140
 Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
 145 150 155 160

Lys

<210> 34

<211> 501

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> skp his etiketli gen

<400> 34

Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
 20 25 30
 Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
 35 40 45
 Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
 50 55 60
 Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
 65 70 75 80
 Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
 85 90 95
 Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
 115 120 125
 Asn Ser Gln Asp Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
 130 135 140
 Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
 145 150 155 160

Lys

<210> 34

<211> 501

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> skp his etiketli gen

<400> 34

```

atgaaaaagt ggttattagc cgcaggcttc ggtttagcac tggcaacttc tgctcaggcg      60
gctgacaaaa ttgcaatogt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaaacc      120
ggtgtttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact ccagcgtatg      180
gaaaccgatc tccaggctaa aatgaaaaag ctgcaatcca tgaagcggg cagcogatgc      240
actaagctgg aaaaagacgt gatggctcag cgccagactt ttgctcagaa agcgcaggct      300
tttgagcagg atcgcgcacg tcgttocaac gaagacgog gcaaaactggt tactcgtatc      360
cagactgctg tgaatccgt tgccaacagc caggaaatcg atctggttgt tgatgcaaac      420
gccgttgctt acaacagcag ccatgtaaaa gaatcactg oagacgtact gaaacaggtt      480
aaacaccatc accatcacca c                                          501

```

<210> 35

<211> 167

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> skp his etiketli gen

<400> 35

```

Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
1           5           10           15

Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
20           25           30

Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
35           40           45

Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
50           55           60

Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
65           70           75           80

Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
85           90           95

Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
100          105          110

Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
115          120          125

Asn Ser Gln Glu Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
130          135          140

```

```

atgaaaaagt ggttattagc cgcaggtctc ggtttagcac tggcaacttc tgctcaggcg      60
gctgacaaaa ttgcaatogt caacatgggc agcctgttcc agcaggtagc gcagaaaacc      120
ggtgtttcta acacgctgga aatgagttc aaaggccgtg ccagcgaact ccagcgtatg      180
gaaaccgatc tccaggctaa aatgaaaaag ctgcaatcca tgaagcggg cagcogatgc      240
actaagctgg aaaaagacgt gatggctcag cgccagactt ttgctcagaa agcgcaggct      300
tttgagcagg atcgcgcacg tcgttocaac gaagaacgog gcaaaactggt tactcgtatc      360
cagactgctg tgaatccgt tgccaacagc caggaaatog atctggttgt tgatgcaaac      420
gccgttgctt acaacagcag cgatgtaaaa gaatcactg oagcgtact gaaacaggtt      480
aaacaccatc accatcacca c                                          501

```

<210> 35

<211> 167

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> skp his etiketli gen

<400> 35

```

Met Lys Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Leu Gly Leu Ala Leu Ala Thr
1           5           10           15

Ser Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile Ala Ile Val Asn Met Gly Ser Leu
20           25           30

Phe Gln Gln Val Ala Gln Lys Thr Gly Val Ser Asn Thr Leu Glu Asn
35           40           45

Glu Phe Lys Gly Arg Ala Ser Glu Leu Gln Arg Met Glu Thr Asp Leu
50           55           60

Gln Ala Lys Met Lys Lys Leu Gln Ser Met Lys Ala Gly Ser Asp Arg
65           70           75           80

Thr Lys Leu Glu Lys Asp Val Met Ala Gln Arg Gln Thr Phe Ala Gln
85           90           95

Lys Ala Gln Ala Phe Glu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ser Asn Glu Glu
100          105          110

Arg Gly Lys Leu Val Thr Arg Ile Gln Thr Ala Val Lys Ser Val Ala
115          120          125

Asn Ser Gln Glu Ile Asp Leu Val Val Asp Ala Asn Ala Val Ala Tyr
130          135          140

```

Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
145 150 155 160

Lys His His His His His His
165

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRH1

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val
1 5 10

10 <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> CA170_1519 Ab CDRH2

<400> 37

Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRH3

<400> 38

Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr
1 5

25

<210> 39

Asn Ser Ser Asp Val Lys Asp Ile Thr Ala Asp Val Leu Lys Gln Val
145 150 155 160

Lys His His His His His His
165

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRH1

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val
1 5 10

10 <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> CA170_1519 Ab CDRH2

<400> 37

Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRH3

<400> 38

Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr
1 5

25

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> CA170_1519 Ab CDRL1

<400> 39

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL2

<400> 40

15 **Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser**
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

20 <220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL3

<400> 41

Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 42

25 <211> 112

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

30 <400> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> CA170_1519 Ab CDRL1

<400> 39

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL2

<400> 40

15 **Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser**
1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

20 <220>

<223> CA170_1519 Ab CDRL3

<400> 41

Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 42

25 <211> 112

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

30 <400> 42

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg Ser Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 43

5 <211> 336

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

10 <400> 43

gatgttqtga tgaocccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttggaca accagcctcc	60
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtg gaaagacata ttgtattgg	120
ttatttcaga ggtcoggcca gtctccaaag cgactaatct atctggtgtc cacactggac	180
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaatc	240
ogcagagtgg aagcogatga ttggggagtt tattaactgt tgcagggtac acattttoct	300
cacacgtttg gagctgggac caagctgga ttgaaa	336

<210> 44

<211> 132

<212> PRT

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

<400> 44

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
20 25 30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg Ser Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 43

5 <211> 336

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

10 <400> 43

gatgttqtga tgaocccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttggaca accagcctcc	60
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgta ggtgctagtq gaaagacata ttgtattgg	120
ttatttcaga ggtcoggcca gtctccaaag cgactaatct atctggtgtc cacactggac	180
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaatc	240
ogcagagtgg aagcogatga ttgagggtt tattaactgtc tgcaaggtac acattttcct	300
cacacgtttg gagctgggac caagctgga ttgaaa	336

<210> 44

<211> 132

<212> PRT

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

<400> 44

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln
 1 5 10 15
 Gly Thr Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30
 Val Ala Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg
 50 55 60
 Ser Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Leu Lys
 130

<210> 45

5 <211> 396

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

10 <400> 45

```

atgatgagtc ctgoccaagt cctgtttctg ctgatgctct ggatcaggg aaccagtgtt      60
gatgttgta tgaccagac tccactgtct ttgtcgttg cccttgaca accagcctcc      120
atctcttgca agtcaagtc gagcctcgtt ggtgctagt gaaagacata ttgtattgg      180
ttatttcaga ggtoaggaca gtctcaaaag cgaactaatct atctggtgtc cacactggac      240
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tctaaatc      300
cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtag acattttcct      360
cacacgtttg gagctgggac caagctgga ttgaaa      396
  
```

<210> 46

<211> 116

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln
 1 5 10 15

Gly Thr Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 20 25 30

Val Ala Leu Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Arg
 50 55 60

Ser Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Glu Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Leu Lys
 130

<210> 45

5 <211> 396

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VL bölgesi

10 <400> 45

atgatgagtc ctgoccaqgt cctgtttctg ctgatgctct ggattoaggg aaccaqtggt	60
gatgttgta tgaccagac tccactgtct ttgtcggttg cccttgaca accagcctcc	120
atctcttgca agtcaagtca gagcctcgtg ggtgctagtq gaaagacata ttgtattgg	180
ttatttcaga ggtoaggaca gtctocaaag cgaactaatct atctggtgta cacactggac	240
tctggaattc ctgataggtt cagtggcagt ggagcagaga cagattttac tcttaaatc	300
cgcagagtgg aagccgatga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtag acattttcct	360
cacacgtttg gagctgggac caagctggaa ttgaaa	396

<210> 46

<211> 116

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

5 <400> 46

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser
115

<210> 47

10 <211> 348

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

15 <400> 47

gagggtgccgc tgggtggagtc tggggggcgc tcagtgcagc ctgggaggtc catgaaactc 60
tctgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca tggctctggg ccgccagget 120
ccaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat attgattctg atggtgatas tacttactac 180
cgagattcog tgaagggccg attcactatc tocagaata atgcaaaag caccctatat 240
ttgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggtatt 300
gtccggccct tctctattg gggccaagga accaoggtca ccgtctcg 348

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

5 <400> 46

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser
115

<210> 47

10 <211> 348

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

15 <400> 47

gagggtgccgc tgggtggagtc tggggggcgc tcaqgtgcagc ctgggaggtc catgaaactc 60
tctgtgtag tctcaggatt cactttcagt aattatggca tggctctggg ccgocagget 120
ocaaagaagg gtctggagtg ggtcgcatat attgattctg atggtgatas tacttactac 180
cgagattcog tgaagggccg attcactatc tocagaata atgcaaaag caccctatat 240
ttgcaaatgg acagctctgag gtctgaggac acggccactt attactgtac aacagggatt 300
gtccggccct tctctattg gggccaagga accaoggtca ccgtctcg 348

<210> 48

<211> 135

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

<400> 48

Met Asp Ile Ser Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Arg Cys Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

10

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
130 135

<210> 49

<211> 405

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

<400> 49

<210> 48

<211> 135

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

<400> 48

Met Asp Ile Ser Leu Ser Leu Ala Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Arg Cys Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

10

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
130 135

<210> 49

<211> 405

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> Sıçan Ab 1519 VH bölgesi

<400> 49

atggacatca gtctcagatt ggctttctctt gtctctttca taaaagggtgt ccggtgtgag 60
 gtgcogctgg tggagtctgg gggggggtca gtgcagoctg ggaggtccat gaaactctcc 120
 tgtgtagtct caggattcac tttcagtaat tatggcatgg tctgggtocg ccaggctcca 180
 aagaagggtc tggagtgggt cgcataatatt gattctgatg gtgataatac ttactacoga 240
 gattccgtga agggccgatt cactatctcc agaataatg caaaaagcac cctatatttg 300
 caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac agggattgtc 360
 cggcctttc tctattgggg ccaaggaacc acggtcacog tctcg 405

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30

10

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 51

<211> 336

<212> DNA

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

atggacatca gtctcagatt ggctttcctt gtctttttca taaaagggtgt ccggtgtgag 60
 gtgcogctgg tggagtctgg gggggotca gtgcagoctg ggaggtccat gaaactctcc 120
 tgtgtagtct caggattcac tttcagtaat tatggcatgg tctgggtocg ccaggctcca 180
 aagaagggtc tggagtgggt cgcataatatt gattctgatg gtgataatac ttactacoga 240
 gattccgtga agggccgatt cactatctcc agaataatg caaaaagcac cctatatttg 300
 caaatggaca gtctgaggtc tgaggacacg gccacttatt actgtacaac agggattgtc 360
 cggcctttc tctattgggg ccaaggaacc acggtcacog tctcg 405

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30

10

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 51

<211> 336

<212> DNA

15 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

<400> 51
gatatccaga tgaccacagag tccaagcagt ctctcogcca gcgtaggoga tctgtgtact 60
attaocctgta aaagctocca gtocctgggq ggtgcaagcg gcaaaccta cctgtactgg 120
ctcttcacaga aaccgggcaa agctccgaaa cgcctgatct atctgggtgc tacocctggat 180
agcggtatte cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt 240
agctocctac agcgggagga ctttgctaco tattactgoc tccagggcac tcattttcog 300
cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaa 336

<210> 52

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

<400> 52

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20 25 30

10 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln

35 40 45

Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu
65 70 75 80

Asp Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
100 105 110

Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys
130

<210> 53

<211> 399

<400> 51
 gatatccaga tgaccacagag tccaagcagt ctctcogcca gcgtaggoga tctgtgtact 60
 attacctgta aaagctocca gtocctggg ggtgcaagcg gcaaaccta cctgtactgg 120
 ctcttcacaga aaccgggcaa agctccgaaa cgcctgatct atctgggtgc tacctggat 180
 agcggtatte cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt 240
 agctocctac agcgggagga ctttgctaco tattactgoc tccagggcac tcattttcog 300
 cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaa 336

<210> 52

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

<400> 52

Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala
1				5					10					15	
Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu
			20					25					30		
Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln
			35				40					45			
Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Leu	Phe	Gln
	50					55				60					
Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Thr	Leu
65					70					75					80
Asp	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu
				85					90					95	
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr
			100					105						110	
Tyr	Cys	Leu	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr
		115					120						125		
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys											
		130													

<210> 53

<211> 399

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

5 <400> 53

```

atgaaaaaga cagctatogc aattgcagtg gcottggctg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg      120
actattacct gtaaaagctc ccagtcocctg gtgggtgcaa gggcacaac ctacctgtac      180
tggctcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg      240
gatagcggta ttccgtctcg ttctccgggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc      300
attagctocc tcacgcggga ggaatttgc t acotattact gctccaggg cactcatttt      360
ccgcacactt tggccaggg taccaactg gaatcaaa      399

```

<210> 54

<211> 219

<212> PRT

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir (V + sabit)

<400> 54

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

15

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 V-bölgesi

5 <400> 53

```

atgaaaaaga cagctatogc aattgcagtg gcottggctg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg      120
actattacct gtaaaagctc ccagtcocctg gtgggtgcaa gggcacaac ctacctgtac      180
tggctcttcc agaaaccggg caaagctccg aaacgcctga tctatctggt gtctaccctg      240
gatagcggta ttccgtctcg ttctccgggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc      300
attagctocc tcacgcogga ggaatttgc t acotattact gctccaggg cactcatttt      360
ccgcacactt tggccaggg taccaactg gaatcaaa      399

```

<210> 54

<211> 219

<212> PRT

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir (V + sabit)

<400> 54

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 55

<211> 657

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir (V + sabit)

<400> 55

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
 20 25 30
 Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 55

<211> 657

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir (V + sabit)

<400> 55

```

gatatacaga tgaccacagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggoga tcgtgtgact      60
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaacctc cctgtactgg      120
ctcttcacaga aaccgggcaa agctccgaaa cgcctgatct atctggtgtc taccttggat      180
agcgggtattc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt      240
agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgoc tccagggcac tcattttccg      300
cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaacgta ccgtagcggc cccatctgtc      360
ttcatcttcc cggcatctga tgagcagttg aaactctgaa ctgacctctgt tgtgtgacct      420
ctgaataact tctatcccag agagggocaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagocctc      540
agcagcacc ctagcctgag caagcagac tacgagaaac acaagctca cgcctcgcaa      600
gtcaccctac agggcctgag ctaccagta acaaaaagt ttaatagagg ggagtgt      657

```

<210> 56

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir

<400> 56

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1          5          10          15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20          25          30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln
35          40          45

Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln
50          55          60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu
65          70          75          80

Asp Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
85          90          95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
100         105         110

Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115         120         125

```

```

gatatacaga tgaccacagag tccaagcagt ctctccgccg gcgtaggoga tcgtgtgact      60
attacctgta aaagctccca gtccctggtg ggtgcaagcg gcaaaacctc cctgtactgg      120
ctcttcacaga aaccgggcaa agctccgaaa cgcctgatct atctggtgtc taccttggat      180
agcggatttc cgtctcgttt ctccggtagc ggtagcggta ccgaattcac gctgaccatt      240
agctccctcc agccggagga ctttgctacc tattactgoc tccagggcac tcattttccg      300
cacactttcg gccagggtag caaactggaa atcaaacgta ccgtagcggc cccatctgtc      360
ttcatcttcc cggcatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgacctctg tgtgtgacct      420
ctgaataact tctatcccag agagggccaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagocctc      540
agcagcacc ctagcctgag caagcagac tacgagaaac acaagctca cgcctggcaa      600
gtcaccctac agggcctgag ctcaccagta acaaaaagt ttaatagagg ggagtgt      657

```

<210> 56

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir

<400> 56

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1           5           10           15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
20           25           30

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln
35           40           45

Ser Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln
50           55           60

Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu
65           70           75           80

Asp Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
85           90           95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
100          105          110

Tyr Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr
115          120          125

```

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 57

<211> 720

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir

<400> 57

```

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gocttggtcg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaocca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgtatcgtgt      120
actattaact gtaaaaagctc ccagtccectg gtgggtgcaa gggcacaac ctacctgtac      180
tggctcttcc agaaacoggg caaagctccg aaacgcctga tctatctcgt gtctaccctg      240
gatagcggtg ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc      300
attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt      360
ccgcacactt tcggccaggg taocaaactg gaatcaaac gtacggtagc ggcoccatct      420
gtcttcatct tccggccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      480
ctgctgaata acttctatcc cagagagccc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcoctc      540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca ggcaggaca gcaaggacag caactacagc      600
ctcagcagca cctgacgct gagcaagca gactaogaga aacacaaagt ctaogcctgc      660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtgt      720
    
```

10 <210> 58

<211> 116

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 57

<211> 720

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gL20 hafif zincir

<400> 57

```

atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gocttggtcg gtttcgctac cgtagcgcaa      60
gctgatatcc agatgaocca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg      120
actattaact gtaaaaagctc ccagtccectg gtgggtgcaa gggcaaaac ctacctgtac      180
tggtcttcc agaaacoggg caaagctccg aaacgcctga tctatctcgt gtctaccctg      240
gatagcggtg ttccgtctcg tttctccggt agcggtagcg gtaccgaatt cacgctgacc      300
attagctccc tccagccgga ggactttgct acctattact gcctccaggg cactcatttt      360
ccgcacactt tcggccaggg taocaaactg gaatcaaac gtacggtagc ggcoccatct      420
gtcttcatct tccggccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      480
ctgctgaata acttctatcc cagagagggc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcoctc      540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca ggcaggaca gcaaggacag cacctacagc      600
ctcagcagca cctgacgct gagcaagca gactaogaga aacacaaagt ctaogcctgc      660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcacca gtaacaaaaa gttttaatag aggggagtgt      720
    
```

10 <210> 58

<211> 116

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

5 <400> 58

```

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
                20           25           30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100          105          110

Val Thr Val Ser
115
    
```

<210> 59

<211> 348

<212> DNA

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

<400> 59

```

gaggttccgc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc      60
tcttgtgcag tatctggctt caogttctcc aactacggta tgggtgaggc tcgtcaggct      120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactcog acggcgacaa cacctactat      180
cgcgactctg tgaaggctcg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctcgg tgcgaaagt actgoggtgt actattgcac cactggcacc      300
gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgtta ctgtctcg      348
    
```

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

5 <400> 58

```

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
                20           25           30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100          105          110

Val Thr Val Ser
115
    
```

<210> 59

<211> 348

<212> DNA

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

<400> 59

```

gaggttccgc tggtcgagtc tggaggcggg cttgtccagc ctggaggag cctgcgtctc      60
tcttgtgcag tatctggctt caogttctcc aactacggtc tgggtgaggc tcgtcaggct      120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggcgtat attgactcog acggcgacaa cacctactat      180
cgcgactctg tgaaggctcg cttcaccatt tcccgcgata acgccaatc cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctcgg tgcctgaagat actgoggtgt actattgcac cactggcacc      300
gtgcgtccgt ttctgtattg gggtcagggt accctcgtta ctgtctcg      348
    
```

<210> 60

<211> 137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

<400> 60

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1          5          10          15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20          25          30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35          40          45

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50          55          60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
65          70          75          80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85          90          95

Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100         105         110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
115         120         125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130         135
    
```

<210> 61

10 <211> 411

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

15 <400> 61

```

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa      60
gctgaggttc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgccc agcctggagg gagcctgcgt      120
ctctcttggt cagtatctgg cttcaogttc tocaactaog gtatggtgtg ggttcgtcag      180
    
```

<210> 60

<211> 137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

5 <220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

<400> 60

```

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1           5           10           15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
                20           25           30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
                35           40           45

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                50           55           60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
65           70           75           80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
                85           90           95

Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
                100           105           110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
                115           120           125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130           135

```

<210> 61

10 <211> 411

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 V-bölgesi

15 <400> 61

```

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gcgctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa      60
gctgaggttc cgctggtcga gtctggaggc gggcttgccc agcctggagg gagcctgcgt      120
ctctcttggt cagtatctgg cttcaogttc tocaactaog gtatggtgtg ggttcgtcag      180

```

gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggoga caacacctac 240
 tatecgact ctgtgaaagg tggattcacc atttcccgog ataacgcaa atccagoctg 300
 tacctgcaga tgaacagact gctgtgtgaa gatactgcgg tgtactattg caacactggc 360
 atcgtgcgtc ogtttctgta ttggggtcag ggtacocctog ttactgtctc g 411

<210> 62

<211> 228

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 Fab' ağır zincir (V + beşeri gama-1 CH1 + menteşe)

<400> 62

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

10

gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact ccgacggoga caacacctac 240
 tatecgact ctgtgaaagg tggattcacc atttcccgog ataacgcaa atccagoctg 300
 tacctgcaga tgaacagact gctgtgtgaa gatattgocg tgtactattg caacctggc 360
 atcgtgcgtc ogtttctgta ttggggtcag ggtacocctog ttactgtctc g 411

<210> 62

<211> 228

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 Fab' ağır zincir (V + beşeri gama-1 CH1 + menteşe)

<400> 62

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

10

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Ala Ala
 225

<210> 63

<211> 684

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 Fab' ağır zincir (V + beşeri gama-I CH1 + menteşe)

<400> 63

```

gaggttccgc tggtcgagtc tggagggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgogtctc      60
tcttgtgcag tatctggcctt caogttotcc aactaoggtc tgggtgtgggt tqgtcaggct      120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggogtat attgactcog acggcgacaa cacctactat      180
cgcgactctg tgaaggttcg cttcaccatt tcccgcgata acgccaaatc cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg tqctgaagat actgoggtgt actattgcac cactggcctc      300
gtgogtccogt tctgtattg ggtcagggt accctcgtta ctgtctcgag cgcttctaca      360
aagggcccat oggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcaoctctgg gggcacagcg      420
gocctgggct gcctggtcaa ggactacttc coogaaccgg tgacgggtgc gtggaactca      480
ggggcctga ccagcggogt gcadaoottc coggctgtoc tacagtcctc aggactotac      540
tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaocccagc ctacatctgc      600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtgcacaaga aagttgagcc caaatcttgt      660
gacaaaactc acacatgccc cggg

```

10 <210> 64

<211> 249

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> 1519 gH20 Fab' ağır zincir

<400> 64

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Ala Ala
 225

<210> 63

<211> 684

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 Fab' ağır zincir (V + beşeri gama-I CH1 + menteşe)

<400> 63

```

gaggttccgc tggtcgagtc tggagggcggg cttgtccagc ctggagggag cctgogtctc      60
tcttgtgcag tatctggctt caogttotcc aactaoggtc tgggtgoggt tggtcaggct      120
ccaggtaaag gtctggaatg ggtggogtat attgactcog acggcgacaa cacctactat      180
cgcgactctg tgaaggtcgg cttcaccatt tcccgcgata acgccaaatc cagcctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg tgcctgaagat actgoggtgt actattgcac cactggcctc      300
gtgogtccogt tctgtattg ggtcagggt accctcgtta ctgtctcgag cgcttctaca      360
aagggcccat oggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcaoctctgg gggcacagcg      420
gocctgggct gcctggtcaa ggactacttc coogaaccgg tgaoggtgtc gtggaactca      480
ggggcctga ccagcggogt gcadaoottc coggtgtoc tacagtcctc aggactotac      540
tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaocccagc ctacatctgc      600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtgcacaaga aagttgagcc caaatcttgt      660
gacaaaactc acacatgccc cggg

```

10 <210> 64

<211> 249

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> 1519 gH20 Fab' ağır zincir

<400> 64

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
245

<210> 65

5 <211> 747

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe
35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Arg Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
85 90 95

Lys Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
245

<210> 65

5 <211> 747

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519 gH20 Fab' ağır zincir

<400> 65

```

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gogctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa      60
gctgagggttc ogctggtoga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgogt    120
ctctcttctg cagtatctgg cttcacgttc tccaactacg gtatggtgtg ggttcgtcag    180
gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact oogaaggoga caacacctac    240
tatcgcgact ctgtgaaagg togettcacc atttcccggc ataacgocaa atccagcctg    300
taoctgcaga tgaacagcct gogtgotgaa gatactgogc tgtactattg caccactggc    360
atcgtgogtc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc gagcgcttct    420
aaaaggggc catoggtctt ccooctggca coototcca agagcaacctc tgggggcaca    480
gcgccctggy gctgctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac    540
tcaggcgccc tgaccagogg cgtgcacacc ttccoggtc tcttacagtc ctcaggactc    600
tactcctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc    660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaatct    720
tgtgacaaaa ctcacacatg cgcgcg          747

```

5 <210> 66

<211> 444

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> 1519gH20 IgG4 ağır zincir (V + beşeri gama-4P sabit)

<400> 66

```

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
          20          25          30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65          70          75          80

```

<220>

<223> 1519 gH20 Fab' ağır zincir

<400> 65

```

atgaagaaga ctgctatagc aattgcagtg gogctagctg gtttcgccac cgtggcgcaa      60
gctgagggtc ogctggtoga gtctggaggc gggcttgctc agcctggagg gagcctgogt      120
ctctcttggt cagtatctgg cttcacgttc tccaactaag gtatggtgtg ggttcgtcag      180
gctccaggta aaggtctgga atgggtggcg tatattgact oogaaggoga caacacctac      240
tatcgcgact ctgtgaaagg togettcacc atttcccggc ataacgocaa atccagcctg      300
taoctgcaga tgaacagcct gogtgotgaa gatactgogc tgtactattg caccactggc      360
atcgtgogtc cgtttctgta ttggggtcag ggtaccctcg ttactgtctc gagcgcttct      420
aaaaggggc catoggtctt ccooctggca coototcca agagcaacctc tgggggcaca      480
gaggccctgg gctgacctgt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac      540
tcaggcgccc tgaccagogg cgtgcacacc ttccoggtcg tcttacagtc ctcaggactc      600
tactcctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc      660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtcgaca agaaagttga gcccaaatct      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cgcgcgqg      747

```

5 <210> 66

<211> 444

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

10 <223> 1519gH20 IgG4 ağır zincir (V + beşeri gama-4P sabit)

<400> 66

```

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20           25           30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
65           70           75           80

```

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 210 215 220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 67

<211> 1939

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 IgG4 ağır zincir (V + beşeri gama-4P sabit, eksonlar)

<400> 67

```

gaggtaccac ttgtggaag cggaggagg cttgtgcagc ctggaggaag tttacgtctc      60
tcttgtgctg tgtctggctt caocttctcc aattaaggaa tggctctgggt cagacaagca      120
octggaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat      180
ogggatloog tgaaggagc cttcacaatc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac      240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgcccgtg actattgcac aacgggaatc      300
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggta ctgtctcgag cgcttctaca      360
aagggcccat ccgtcttccc cctgggccc tgcctcagga gcacctcoga gagcacagcc      420
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgaoggtgtc gtggaactca      480
ggcgccctga ccagcgggt gcacaacttc cggctgtcc tacagtcttc aggactctac      540
tccctcagca gctggtgtac cgtgcccctc agcagcttg gcaogaagac ctacacctgc      600
aacgtagatc acsagcccag caacacccag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca      660
cagggaggga ggtgtctgc tgaagccag gctcagccct cctgcttga cgcaccccgg      720
    
```

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
 405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 67

<211> 1939

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 IgG4 ağır zincir (V + beşeri gama-4P sabit, eksonlar)

<400> 67

```

gagggtaccac ttgtggaag cggaggagggt cttgtgcagc ctggaggaag tttacgtctc      60
tcttgtgctg tgtctggctt caocttctcc aattaaggaa tggctctgggt cagacaagca      120
octggaagg gtcttgaatg ggtggcctat attgactctg acggggacaa cacctactat      180
ogggatloog tgaaggagc cttcacaatc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac      240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgocgtgt actattgcac aacgggaatc      300
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc accttggta ctgtctcgag cgcttctaca      360
aagggcccat ccgtcttccc cctggogccc tgcctcagga gcacctcoga gagcacagcc      420
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgaoggtgtc gtggaactca      480
ggcgccctga ccagcgggt gcacaacttc cggctgtcc tacagtcttc aggactctac      540
tccctcagca gctggtgtac cgtgcccctcc agcagcttg gcaogaagac ctacacctgc      600
aacgtagatc acsagcccag caacacccag gtggacaaga gagttggtga gaggccagca      660
cagggaggga ggtgtctgc tgaagccag gctcagccct cctgcttga cgcaccccgg      720
    
```

```

ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggg atgcccacac tgtctctca cccggaggcc      780
tctgaccacc ccactcatgc ccagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctcogg      840
gcagocacag gctggtatgcc cctaccocag gcoctgogca tacaggggca ggtgctgogc      900
tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcccc tgacctaaac ccaccccaa      960
ggccaaactc tccactccct cagctcagac accttctctc ctcccagato tgagtaactc     1020
ccaatcttct ctctgcagag tccaaatag gtcccacatg cccaccatgc ccaggtaaac     1080
caaccacagg ctcgccctcc agctcaagg gggacaggtg ccctagagta gcctgcaccc     1140
agggacaggc cccagccggg tgtgagocca tccacctcca tctcttctc agcaoctgag     1200
ttcctggggg gaocatcagt ctctctgttc ccccacaaac ccaaggacac tctcatgatc     1260
tcccggacc ctagggtcac gtgogtggg gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc     1320
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgogggag     1380
gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg     1440
ctgacccgca aggagtcaca gtgcaaggtc tccacaaaag gctcccgtc ctccatcagag     1500
aaaaccatct ccaaaagcaa aggtgggacc cacgggggtc gagggccaca tggacagagg     1560
tcagctoggc ccaacctctg cctggggagt gaocgotgtg ccaacctctg tccctacagg     1620
gcagcccoga gagocacagg tgtacacct gcccccaccc caggaggaga tgaccaagaa     1680
ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctaccccc agcagacatg ccgtggagtg     1740
ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactcoga     1800
cggctccttc ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa     1860
tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggg tctgcacaa cactacacac agaagagocct     1920
ctccctgtct ctgggtaaa

```

<210> 68

<211> 347

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gL20 FabFv hafif zincir

<400> 68

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
          20           25           30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
          35           40           45

```

```

ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggg atgcccacac tgtctctca cccggaggcc      780
tctgaccacc ccactcatgc ccagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctcogg      840
gcagocacag gctgqatgcc cctaccocag gcocctgocca tacaggggca ggtgctgoc  900
tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcccc tgacctaac ccaccccaa      960
ggccaaactc tccactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc     1020
ccaatcttct ctctgcagag tccaaatag gtcccacatg cccaccatgc ccaggtaac     1080
caaccacagg ctcgccctcc agctcaagg gggacaggtg ccctagagta gcctgcaccc     1140
agggacaggg cccagccggg tctgtagcca tccacotcca tctcttctc agcaoctgag     1200
ttcctggggg gaocatcagt ctctctgttc ccccacaaac ccaaggacac tctcatgatc     1260
tcccggacc ctagaggtcac gtgogtggg gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc     1320
cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaa gccgcggggag     1380
gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg     1440
ctgaacggca aggagtcaca gtgcaaggtc tccacacaaq gctcccgtc ctccatcag     1500
aaaaccatct ccaaaagcaa aggtgggacc cacgggggtc gagggccaca tggacagagg     1560
tcagctoggc ccaacctctg cctggggagt gaocgotgtg ccaacctctg tccctacagg     1620
gcagcccoga gagocacagg tgtacacct gcccccaccc caggaggaga tgaccaaga     1680
ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg ctctaccccc agcagacatg ccgtggagt     1740
ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactcoga     1800
cggctcttct tctctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa     1860
tgtcttctca tctctcctga tgcattgagg tctgcacac cactacacac agaagagcct     1920
ctccctgtct ctgggtaaa
    
```

<210> 68

<211> 347

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gL20 FabFv hafif zincir

<400> 68

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Val Gly Ala
          20           25           30

Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys Pro Gly Lys Ala
          35           40           45
    
```

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 225 230 235 240

Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 245 250 255

Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr
 260 265 270

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser
 275 280 285

Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 225 230 235 240

Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 245 250 255

Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe Leu Ser Trp Tyr
 260 265 270

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser
 275 280 285

Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

290 295 300

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 305 310 315 320

Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser Asp Thr Thr Phe
 325 330 335

Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 340 345

- <210> 69
- <211> 1041
- <212> DNA
- 5 <213> Yapay Dizi
- <220>
- <223> 1519gL20 FabFv hafif zincir

<400> 69

gatataccaga tgaocccagag ccoatatagc ttatcooqctt oogttggtga tcgogtgaca	60
attacgtgta agagctccca atctctcgtg ggtgcaagtg gcaagacctt tctgtactgg	120
ctctttcaga agcctggcaa ggcaccasaa cggctgatct atctggtgtc tacocctgac	180
tctgggatac ogtoacgatt ttooggatct gggagoggaa ctgagttcac actcacgatt	240
tcacgctgc aacccgagga ctttgctacc tactactgcc tgcaaggcac tcatttcocct	300
cacacttrog gccaggggac aaaactogaa ataaaagtta oggtagcggc cccatctgtc	360
ttcatcttc cgcoactcga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgocctg	420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcocctcaa	480
tgggtaact cccaggagag tgtocagag caggacagca aggacagcac ctacagocctg	540
agcagcaacc tgaocgtgtc taaagocagc taogagaaac acaaagtga ogcctgogaa	600
gtcaccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc	660
ggtggcggtg gcagtggtgg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc	720
cagagtcctt catcgtatc cggtoogtt ggogatatgg tgactattac atgtcaagc	780
tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggtatcaac agaaccgggg gaaggctcca	840
aaacttctga tttatgaagc ctogsaactc accagtgag ttcogtcaag attcagtgcc	900
tctggatcag ggacagaact caogttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggaactttgcg	960
acctactatt gtggtggagg ttacagttagc ataagtgata ogacatttgg gtgcggtact	1020
aaggtggaaa tcaaacgtac c	1041

- 10 <210> 70
- <211> 367
- <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gL20 FabFv haff zincir

<400> 70

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

5

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gL20 FabFv haffif zincir

<400> 70

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Val Gly Ala Ser Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Phe Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Thr Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Leu Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

5

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 245 250 255

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp
 260 265 270

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe
 275 280 285

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 290 295 300

Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 325 330 335

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser
 340 345 350

Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 355 360 365

<210> 71

<211> 1101

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gL20 FabFv hafif zincir

<400> 71

```

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgcagatgc      60
gatatecaga tgacccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttggtga tcgcgtgaca      120
attacgtgta agagctocca atctctogtg ggtgcaagtg gcaagacctc tctgtactgg      180
ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac      240
tctgggatac cgtcacgatt ttcoggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt      300
tcatoqctgc aacocgagga ctttgotacc tactactgoc tgcaaggcac tcatttooct      360
cacactttcg gccaggggac aaaactcga aatcaacgta cggtagcggc cccatctgtc      420
ttcatcttcc cgcacatcga tgagcagttg aaatctgga ctgcctctgt tgtgtgocctg      480
ctgaataact tctatccag agagggccaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa      540
    
```

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 245 250 255

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp
 260 265 270

Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Trp Ser Asn Phe
 275 280 285

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 290 295 300

Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Thr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 325 330 335

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gly Gly Tyr Ser Ser Ile Ser
 340 345 350

Asp Thr Thr Phe Gly Cys Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 355 360 365

<210> 71

<211> 1101

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gL20 FabFv hafif zincir

<400> 71

```

atgtctgtcc ccacccaagt cctcggactc ctgctactct ggcttacaga tgcagatgc      60
gatatecaga tgacccagag cccatctagc ttatccgctt ccgttggtga tcgcgtgaca      120
attacgtgta agagctocca atctctogtg ggtgcaagtq gcaagacctc tctgtactgg      180
ctctttcaga agcctggcaa ggcacaaaaa cggctgatct atctggtgtc tacccttgac      240
tctgggatac cgtcacgatt ttcoggatct gggagcggaa ctgagttcac actcacgatt      300
tcatoqctgc aacocgagga ctttgotacc tactactgoc tgcaaggcac tcatttooct      360
cacactttcg gccaggggac aaaactcga aatcaacgta cggtagcggc cccatctgtc      420
ttcatcttcc cgcacatcga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgocctg      480
ctgaataact tctatccag agagggccaa gtacagtqga aggtggataa cgcctccaa      540
    
```

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagoctg 600
 agcagcacc tgcgctgtc taaagcagac taogagaaac acaaagtga cgctgogaa 660
 gtcaccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc 720
 ggtggcggtg gcagtgggtg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc 780
 cagatcctt catoggtatc cggctccgtt ggcgatagg tgactattac atgtcaaagc 840
 tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaccggg gaaggctcca 900
 aaacttctga tttatgaagc ctogaactc accagtggag ttcogtcaag attcagtggc 960
 tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgog 1020
 acctactatt gtggtggagg ttacagttagc ataagtgata ogacatttgg gtgoggtact 1080
 aaggtgaaa tcaaacgtac c 1101

<210> 72

<211> 357

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 FabFv ağır zincir

<400> 72

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

10

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagoctg 600
 agcagcacc tgcgctgtc taaagcagac taogagaaac acaaagtga cgctgogaa 660
 gtcaccatc agggcctgag ctcaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgtagc 720
 ggtggcggtg gcagtgggtg gggaggctcc ggaggtggcg gttcagacat acaaatgacc 780
 cagatcctt catoggtatc cggctccgtt ggcgatagg tgactattac atgtcaaagc 840
 tctcctagcg tctggagcaa ttttctatcc tggatcaac agaaccggg gaaggctcca 900
 aaacttctga tttatgaagc ctogaactc accagtggag ttcogtcaag attcagtggc 960
 tctggatcag ggacagactt cacgttgaca atcagttcgc tgcaaccaga ggactttgog 1020
 acctactatt gtggtggagg ttacagttagc ataagtgata ogacatttgg gtgoggtact 1080
 aaggtgaaa tcaaacgtac c 1101

<210> 72

<211> 357

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 FabFv ağır zincir

<400> 72

Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Gly Ile Val Arg Pro Phe Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
355

<210> 73

<211> 1071

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 FabFv ağır zincir

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ser Gly Gly Gly
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu
225 230 235 240

Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu
245 250 255

Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Tyr Ala Ile Asn Trp
260 265 270

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly Ile Ile Trp
275 280 285

Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr
290 295 300

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Val Pro
325 330 335

Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
340 345 350

Val Thr Val Ser Ser
355

<210> 73

<211> 1071

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 FabFv ağır zincir

<400> 73

```

gaggtaaccac ttgtggaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag ttacgtctc      60
tcttgctctg tgtctggctt caocttctcc aattacggaa tggctctgggt cagacaagca    120
octggaaagq gtcttgaatg ggtggocctat attgactctg aoggggacaa caoctactat    180
cgggattccg tgaagagacg cttcacantc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac    240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgcccgtgt actattgcac aacgggaatc    300
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc aocctggtta ctgtctcgag ogcgtccaca    360
aagggcccat cggctctccc cctggcaccc tectccaaga gcacctctgg gggcacagcg    420
gccctgggct gcctggctca ggaactactc cccgaaccag tgacgggtgc gtggaactca    480
ggtgcctga ccagcggcgt tcacacctc cggctctcc tacagtcttc aggactctac    540
tccctgagca gogtggtagc cgtgcootcc agcagottg gacocagac ctacatctgc    600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtogataaga aagttgagcc caaatcttgt    660
agtggaggtg ggggtctcag tggagggggg aocgggtggg gtggcagoga ggttcaactg    720
cttgagtctg gaggagcct agtcagcct gggagggagc tgcgtctctc ttgtgcagta    780
agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt    840
ttagaatgga tccgtataat atgggocagt ggaagacct tttatgctac atgggcaaa    900
ggaaggttta caattagccg ggaacaatagc aaaaacacog tgtatctoca aatgaactcc    960
ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact   1020
gcaccctact tccatctgtg gggacaaggg aocctggtsa ctgtttcaag t           1071

```

<210> 74

<211> 376

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 FabFv ağır zincir

<400> 74

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
10

```

<400> 73

```

gaggtaaccac ttgtggaag cggaggaggt cttgtgcagc ctggaggaag ttacgtctc      60
tcttgctctg tgtctggctt caocttctcc aattacggaa tggctctgggt cagacaagca    120
octggaaagq gtcttgaatg ggtggocctat attgactctg aoggggacaa caoctactat    180
cgggattccg tgaagagacg cttcacantc tcccgagata acgccaagag ctcaactgtac    240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggat actgcccgtgt actattgcac aacgggaatc    300
gttaggcctt ttctgtactg gggacagggc aocctggtta ctgtctcgag ogcgtccaca    360
aagggcccat cggctctccc cctggcaccc tectccaaga gcacctctgg gggcacagcg    420
gccctgggct gcctggctca ggaactactc cccgaaccag tgacgggtgc gtggaactca    480
ggtgccttga ccagcggcgt tcacaccttc cggctctctc tacagtcttc aggactctac    540
tccctgagca gogtggtagc cgtgcocctc agcagcttg gacocagac ctacatctgc    600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtogataaga aagttgagcc caaatcttgt    660
agtggaggtg ggggtctcag tggagggggg aocgggtggg gtggcagoga ggttcaactg    720
cttgagtctg gaggagcct agtcagcct gggagggagc tgcgtctctc ttgtgcagta    780
agcggcatcg acctgagcaa ttacgccatc aactgggtga gacaagctcc ggggaagtgt    840
ttagaatgga tccgtataat atgggocagt ggaagacct tttatgctac atgggcaaa    900
ggaaggttta caattagccg ggacaatagc aaaaacacog tgtatctoca aatgaactcc    960
ttgcgagcag aggacacggc ggtgtactat tgtgctcgca ctgtcccagg ttatagcact   1020
gcaccctact tccctctgtg gggacaaggg aocctggtsa ctgtttcaag t           1071
    
```

<210> 74

<211> 376

5 <212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> 1519gH20 FabFv ağır zincir

<400> 74

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1          5          10          15

Val His Ser Glu Val Pro Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30

10 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe
    
```


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

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly
 290 295 300

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 325 330 335

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 340 345 350

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Yabani tip Tsp 5'

<400> 75

Met Asn Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Gly Gln Thr Phe Ala
 20

10 <210> 76

<211> 66

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> Yabani tip Tsp 5'

<400> 76

atgaacatgt tttttaggct taccgcgcta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc 60

ttcgct 66

<210> 77

<211> 19

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Ile Gly
 290 295 300

Ile Ile Trp Ala Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 305 310 315 320

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 325 330 335

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 340 345 350

Thr Val Pro Gly Tyr Ser Thr Ala Pro Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln
 355 360 365

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375

<210> 75

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Yabani tip Tsp 5'

<400> 75

Met Asn Met Phe Phe Arg Leu Thr Ala Leu Ala Gly Leu Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Gly Gln Thr Phe Ala
 20

10 <210> 76

<211> 66

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> Yabani tip Tsp 5'

<400> 76

atgaacatgt tttttaggct taccgcgcta gctggcctgc ttgcaatagc aggccagacc 60

ttcgct 66

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Mutasyondan geçmiş Tsp 5' fragmanı

5 <400> 77

Met Asn Ser Phe Leu Gly Leu Pro Arg Leu Ala Cys Leu Gln Gln Ala
1 5 10 15

Arg His Leu

<210> 78

<211> 66

<212> DNA

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Mutasyondan geçmiş Tsp 5' fragmanı

<400> 78

atgaattcgt ttttaggctt acgcgcttag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat 60

taattg 66

15 <210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Mutasyondan geçmiş delta ptr (proteaz III) 5'

<400> 79

Ile Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Trp Ala His Cys
20

<210> 80

<211> 66

25 <212> DNA

<213> Yapay

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> Mutasyondan geçmiş Tsp 5' fragmanı

5 <400> 77

Met Asn Ser Phe Leu Gly Leu Pro Arg Leu Ala Cys Leu Gln Gln Ala
1 5 10 15

Arg His Leu

<210> 78

<211> 66

<212> DNA

10 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> Mutasyondan geçmiş Tsp 5' fragmanı

<400> 78

atgaattcgt ttttaggctt acgcgcttag ctggcctgct tgcaatagca ggccagacat 60

taattg 66

15 <210> 79

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Mutasyondan geçmiş delta ptr (proteaz III) 5'

<400> 79

Ile Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
1 5 10 15

Trp Ala His Cys
20

<210> 80

<211> 66

25 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> Mutasyondan geçmiş delta ptr (proteaz III) 5'

<400> 80

```
tgaattcccc gcagcacctg gttcaaaagca ttattgttgt tagttgccct ttgggcacat      60
tattgt                                           66
```

5 <210> 81

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Yabani tip ptr (proteaz III) 5'

<400> 81

```
Met Pro Arg Ser Thr Trp Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1           5           10           15
```

```
Trp Ala Pro Leu Ser
           20
```

<210> 82

<211> 66

15 <212> DNA

<213> Yapay

<220>

<223> Yabani tip ptr (proteaz III) 5'

<400> 82

```
tgaatgcccc gcagcacctg gttcaaaagca ttattgttgt tagttgccct ttgggcaccc      60
ttaagt                                           66
```

20

Figure 1

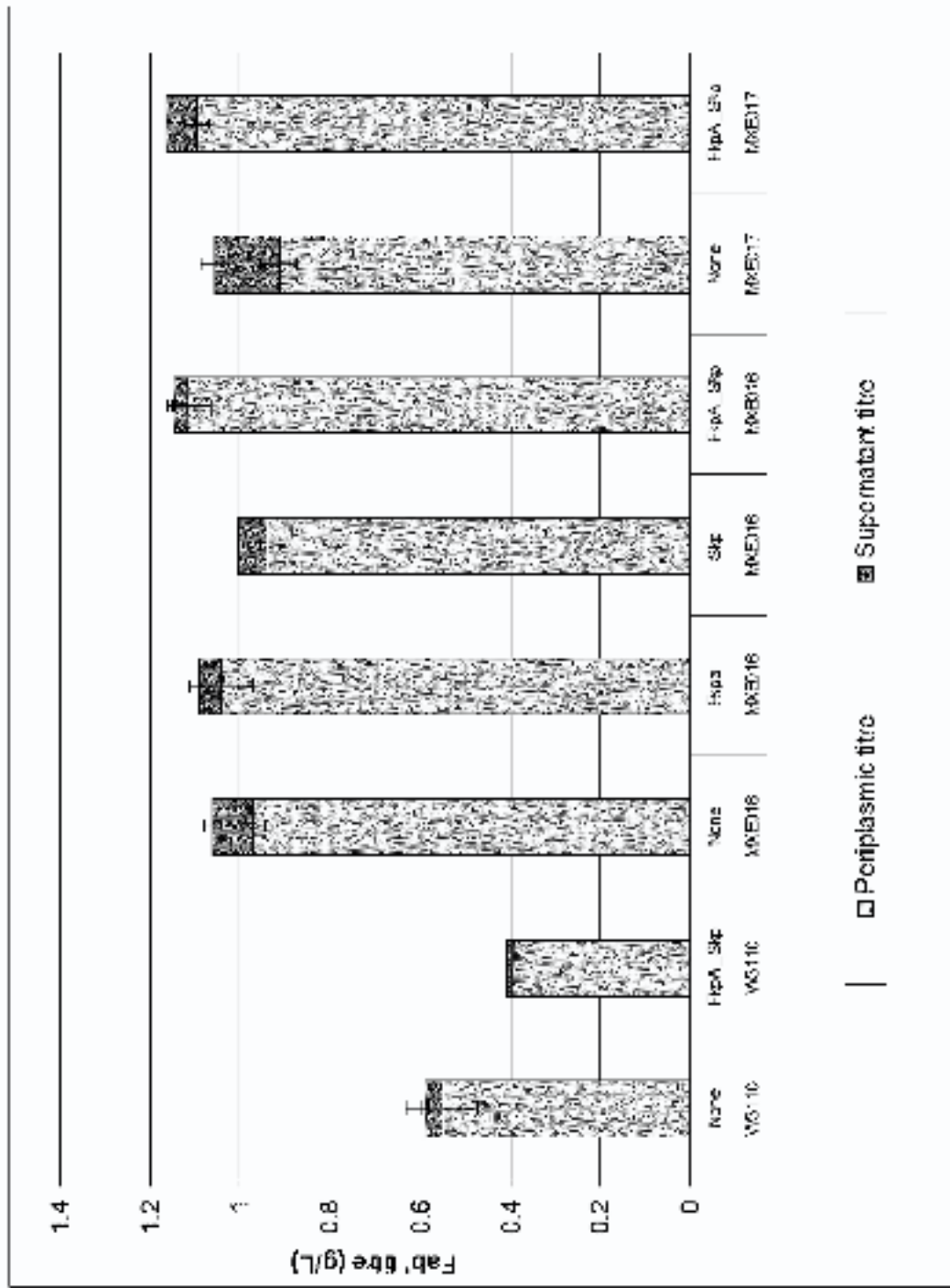


Figure 1

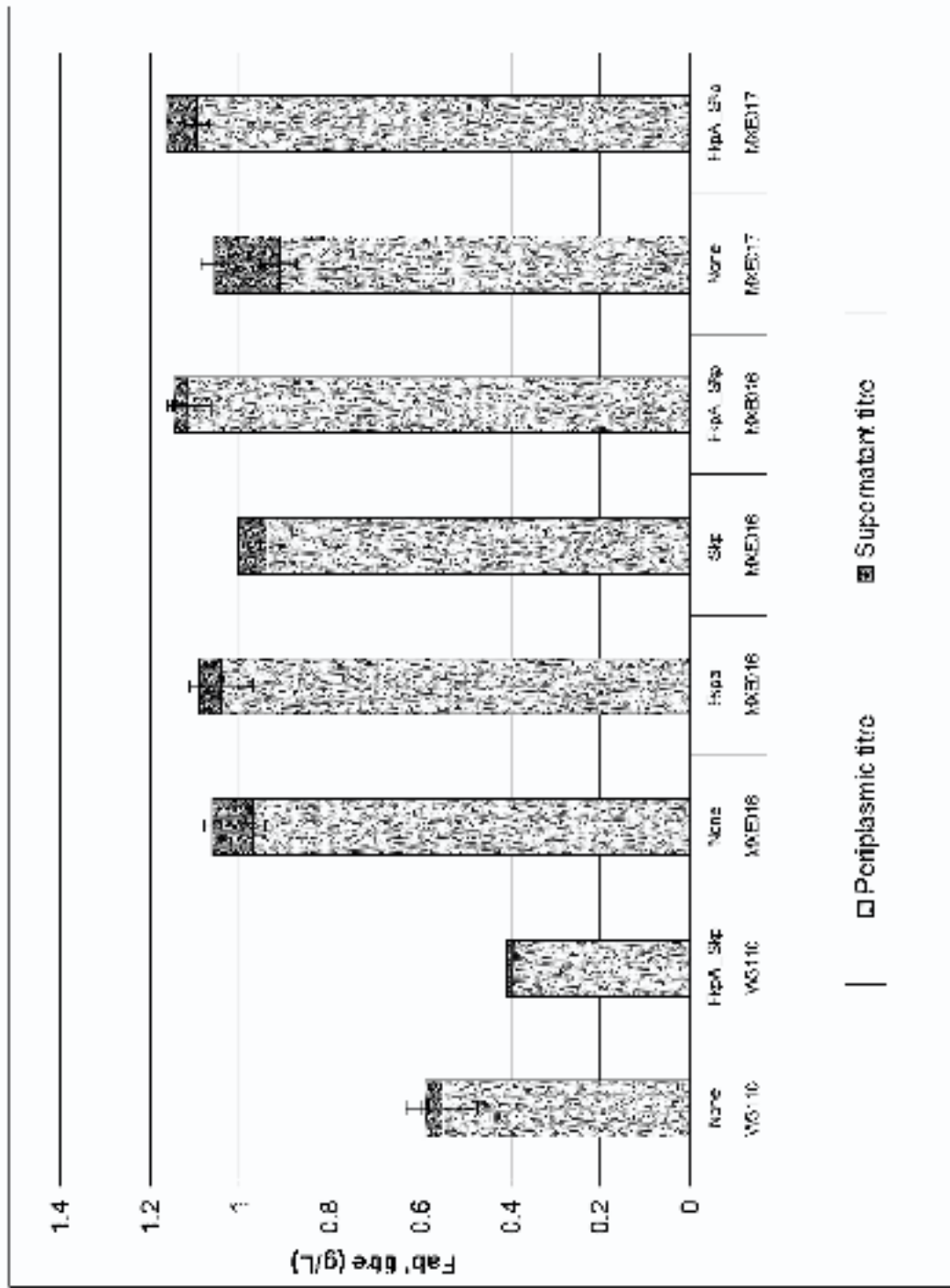


Figure 2 Feed Rate Variation Experiments

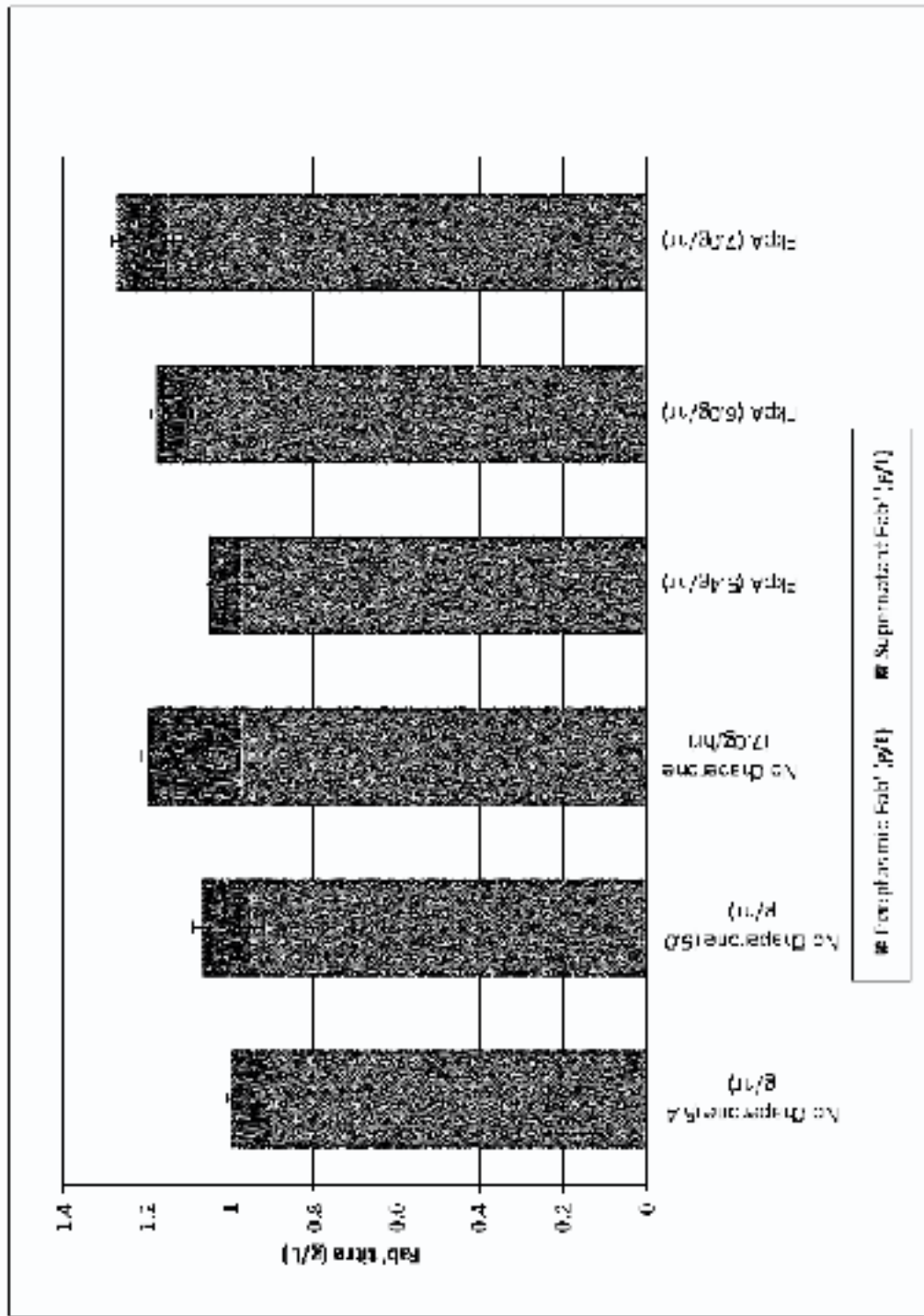


Figure 2 Feed Rate Variation Experiments

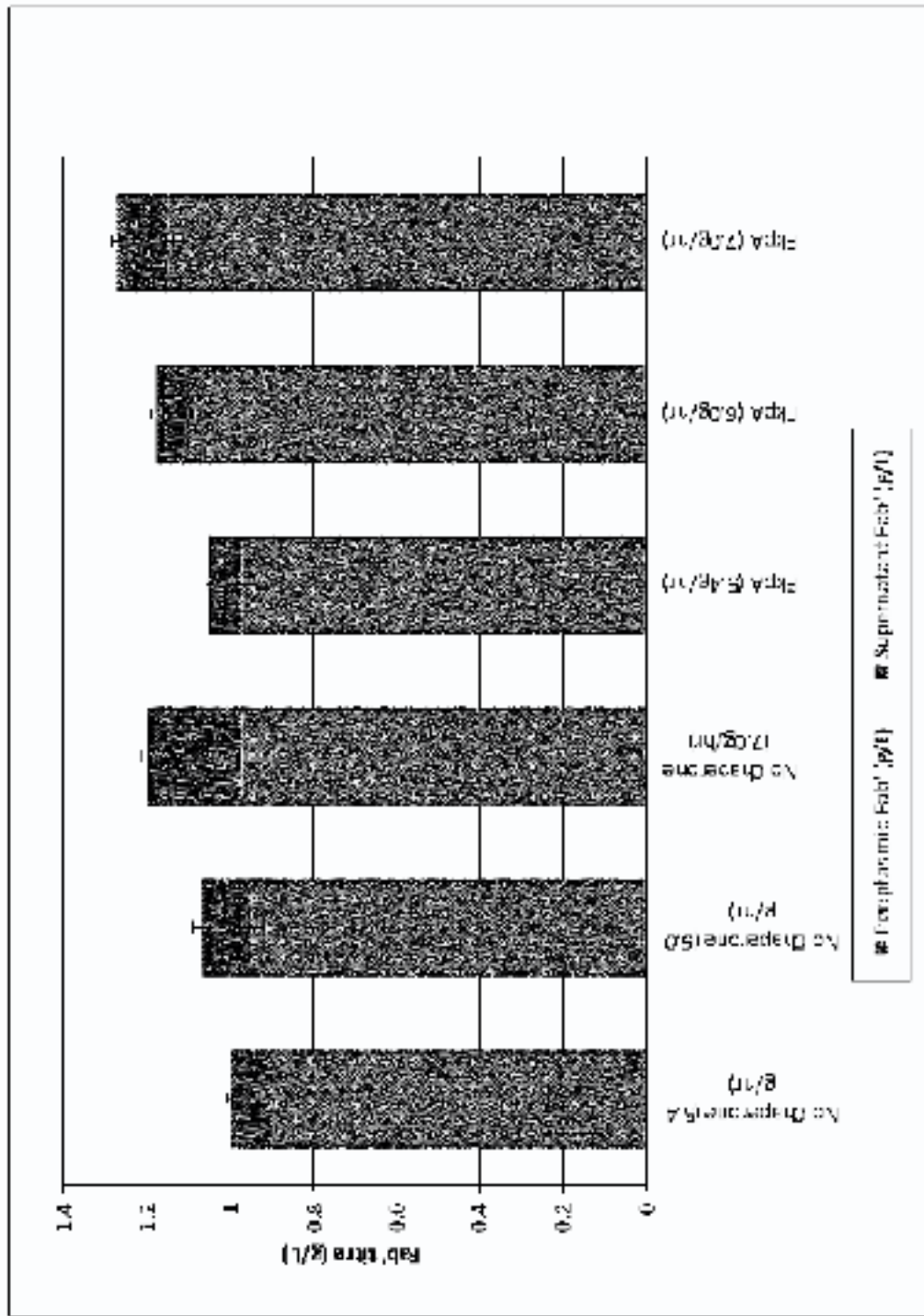


Figure 3A Cell Viability

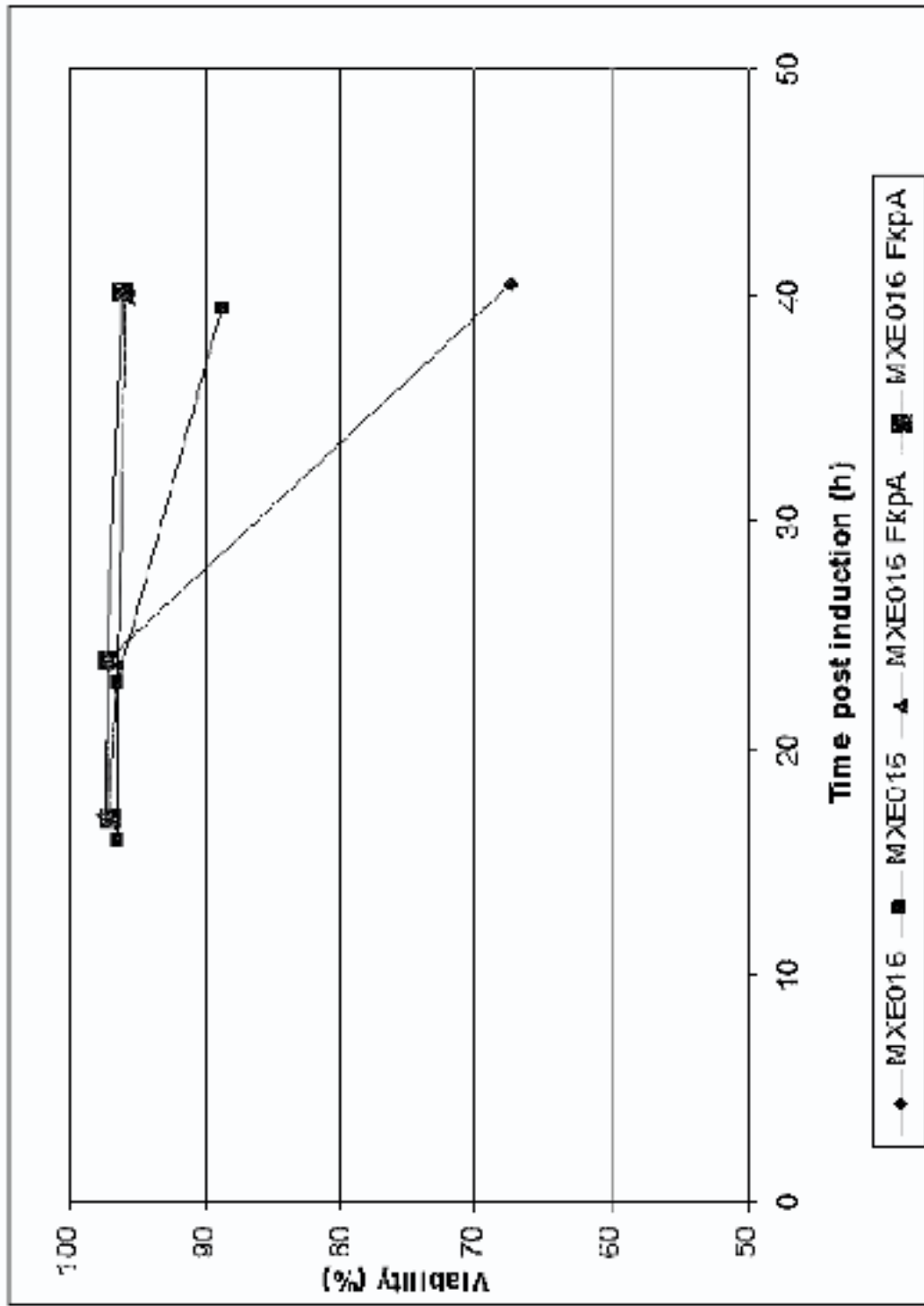


Figure 3A Cell Viability

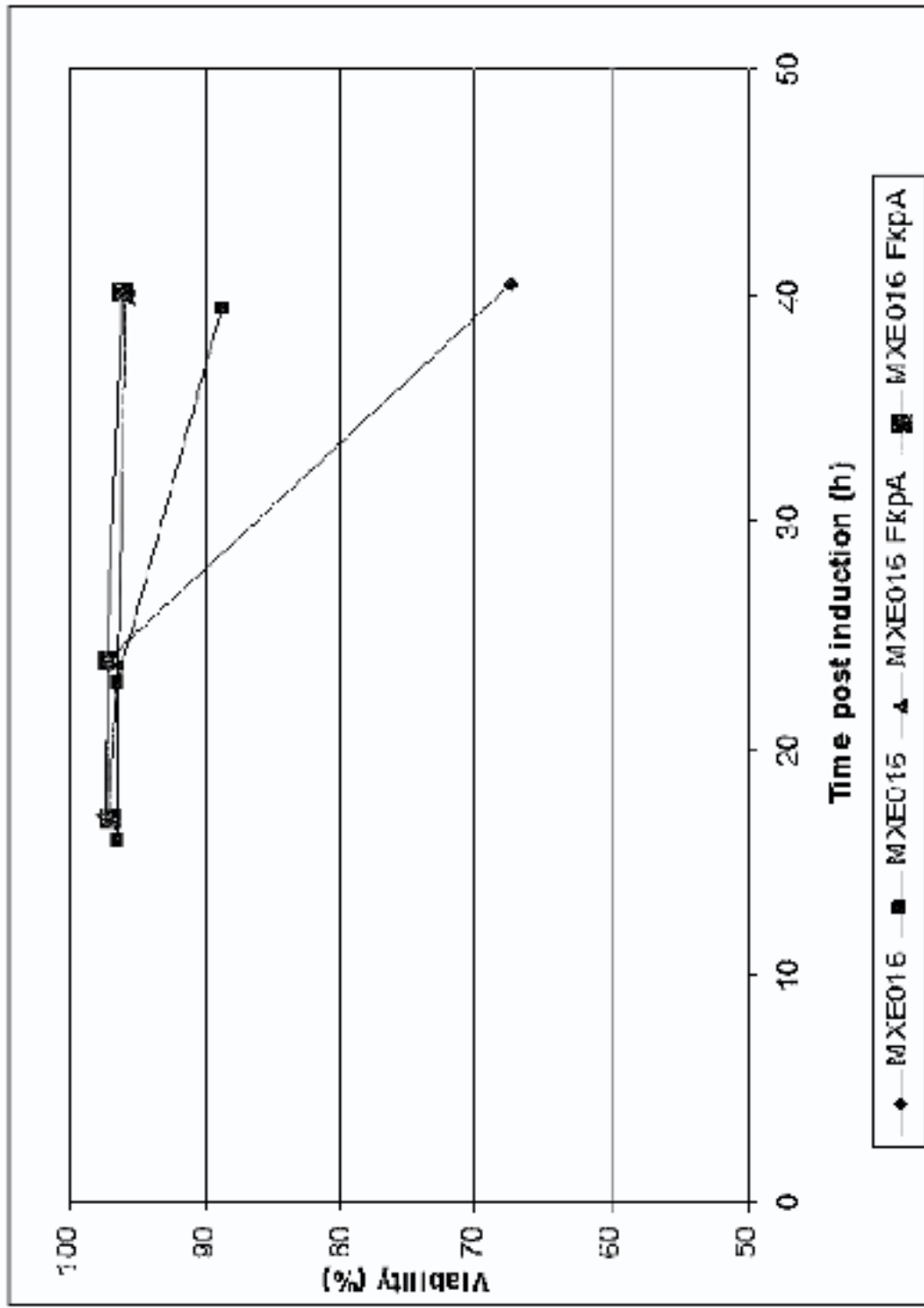


Figure 3B

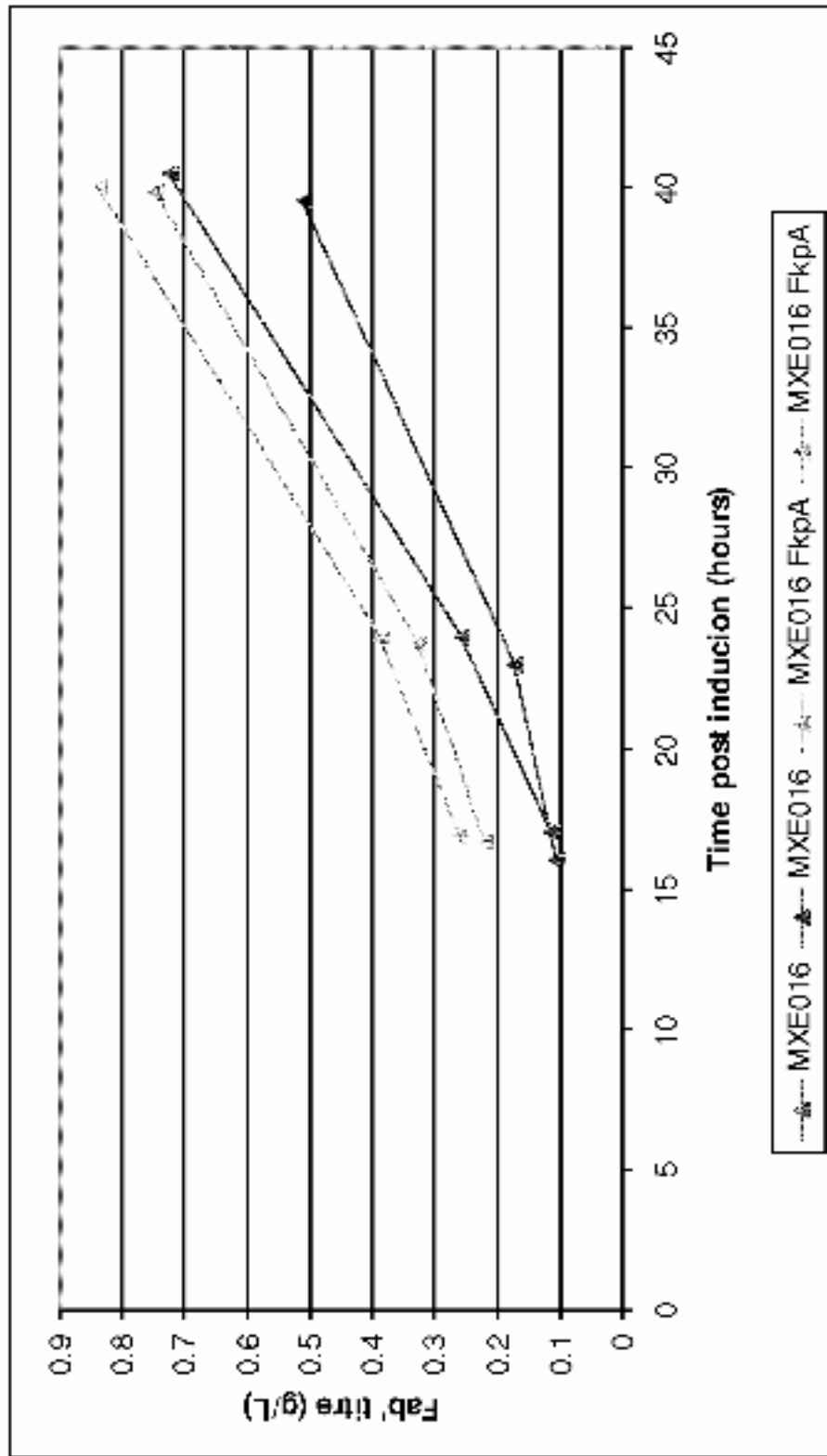


Figure 3B

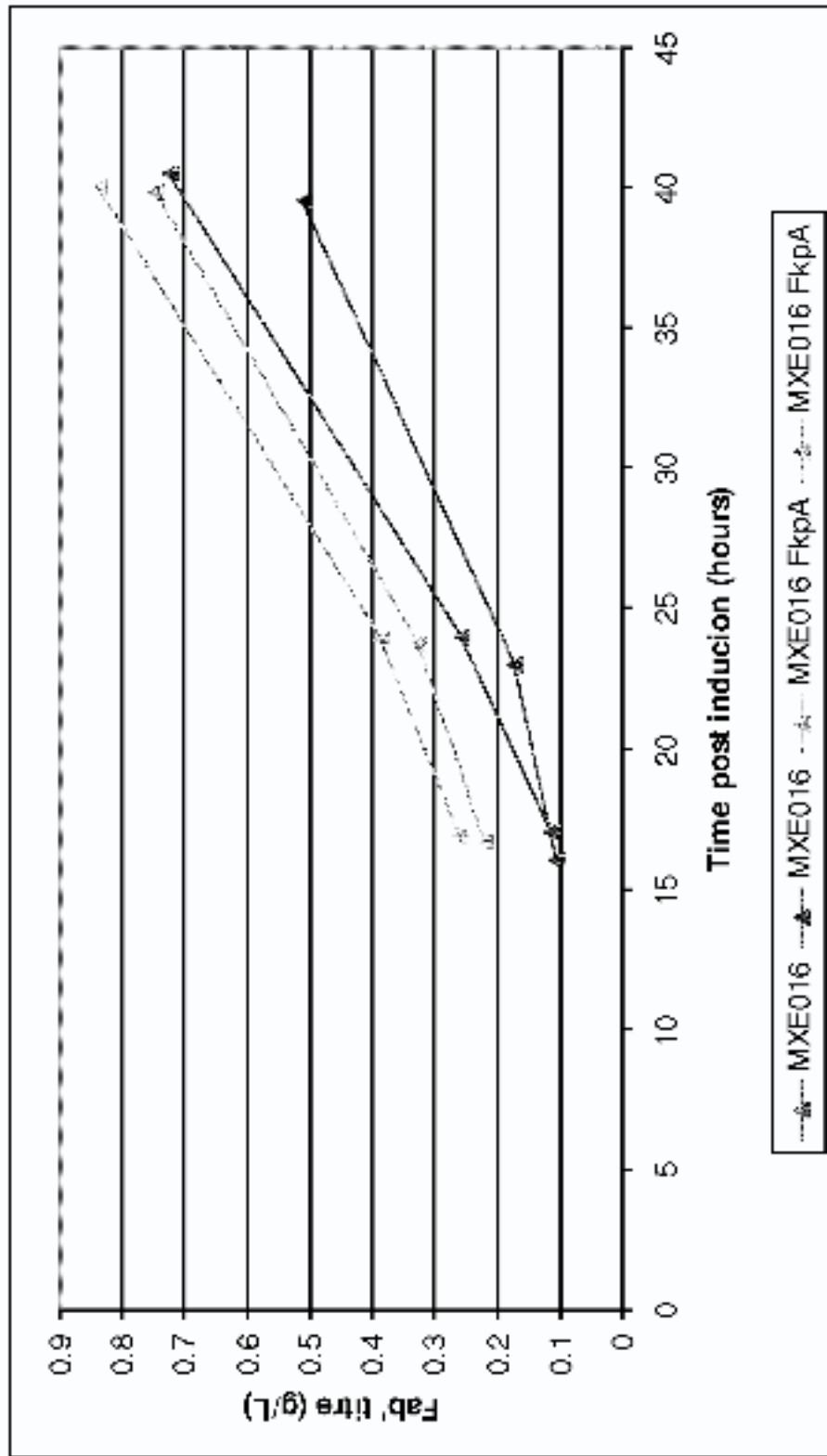


Figure 4 Harvest from 20 Litre Pilot Scale Productions and Primary Recovery for “MXE016” Cell Lines

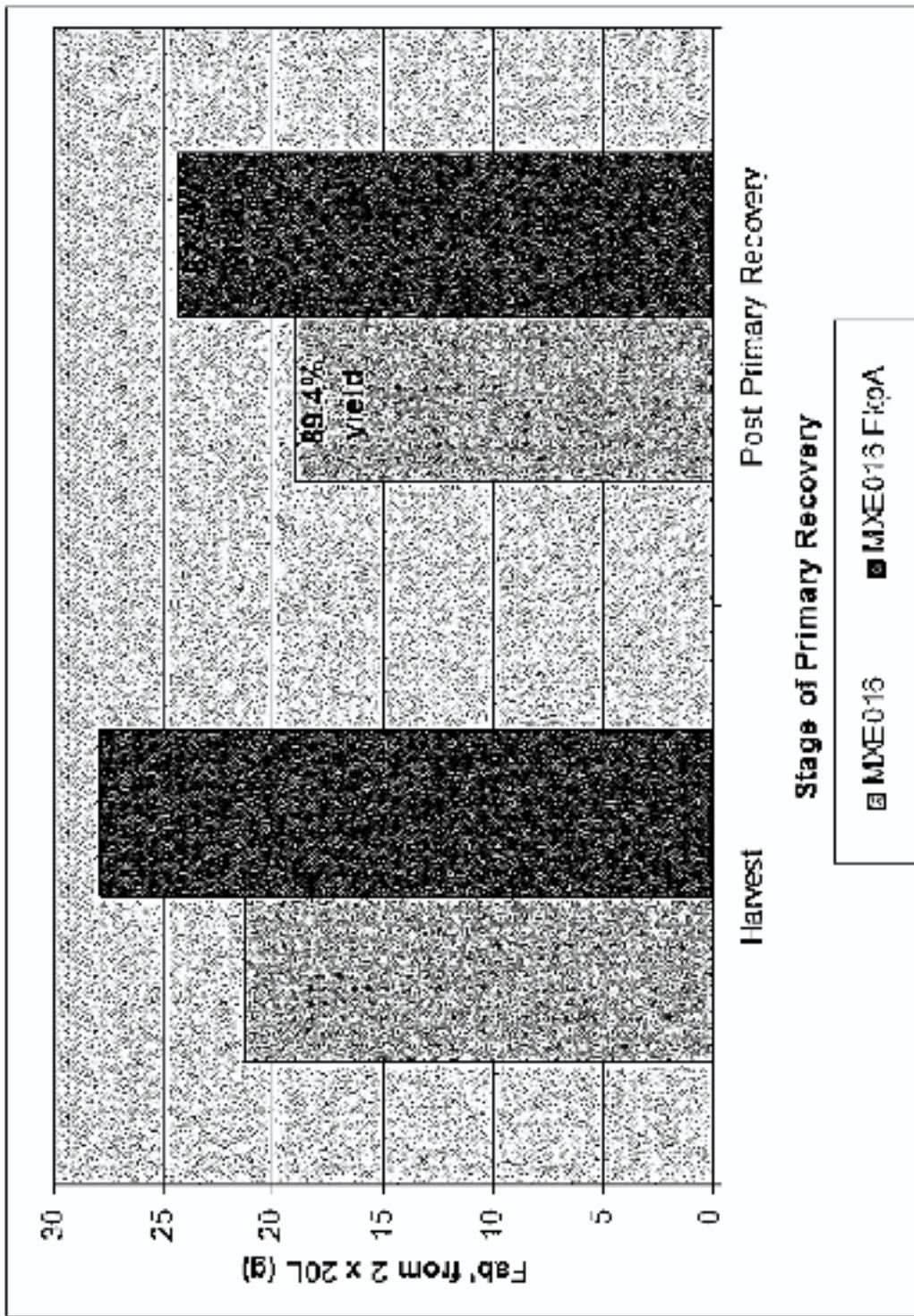


Figure 4 Harvest from 20 Litre Pilot Scale Productions and Primary Recovery for “MXE016” Cell Lines

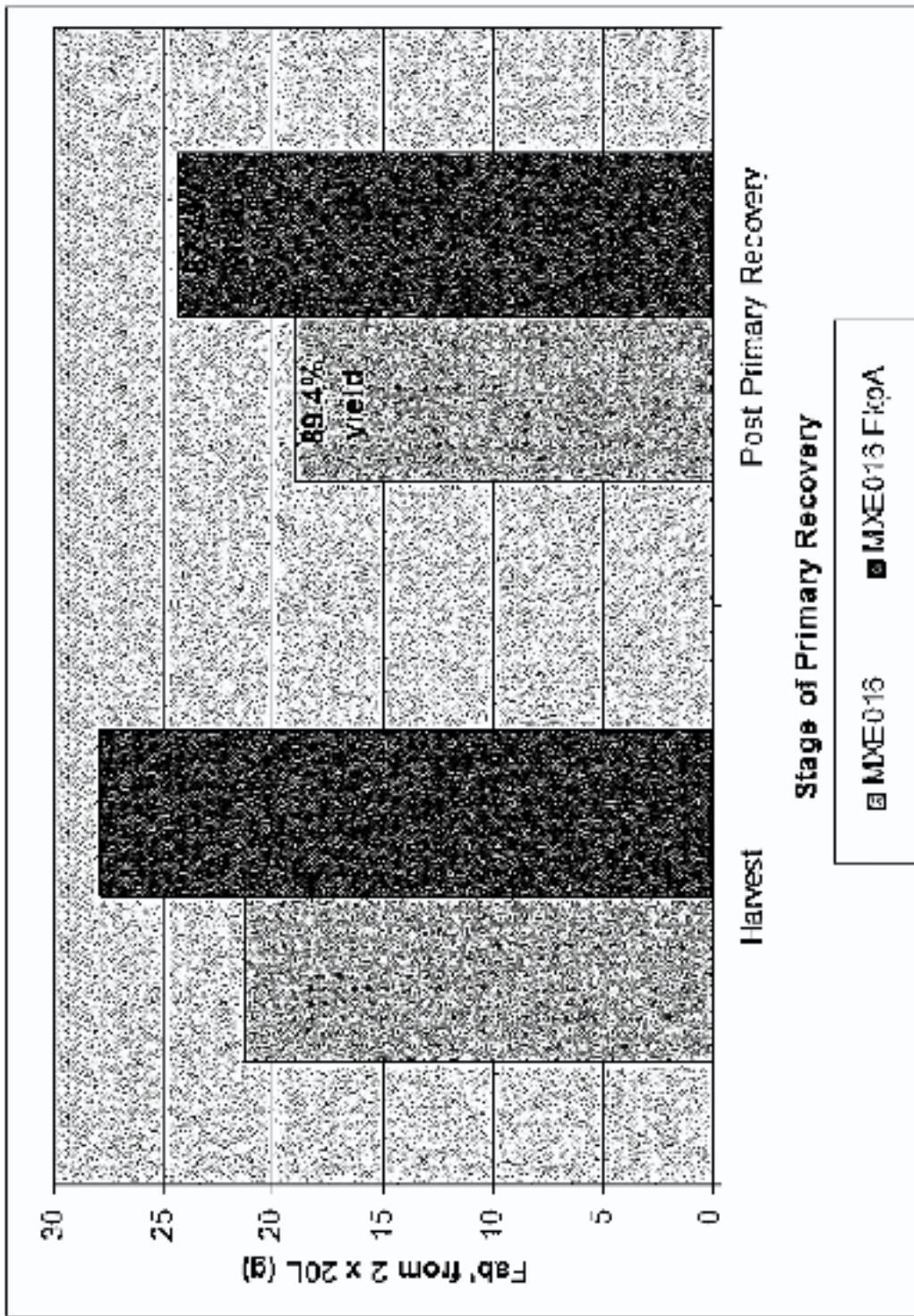
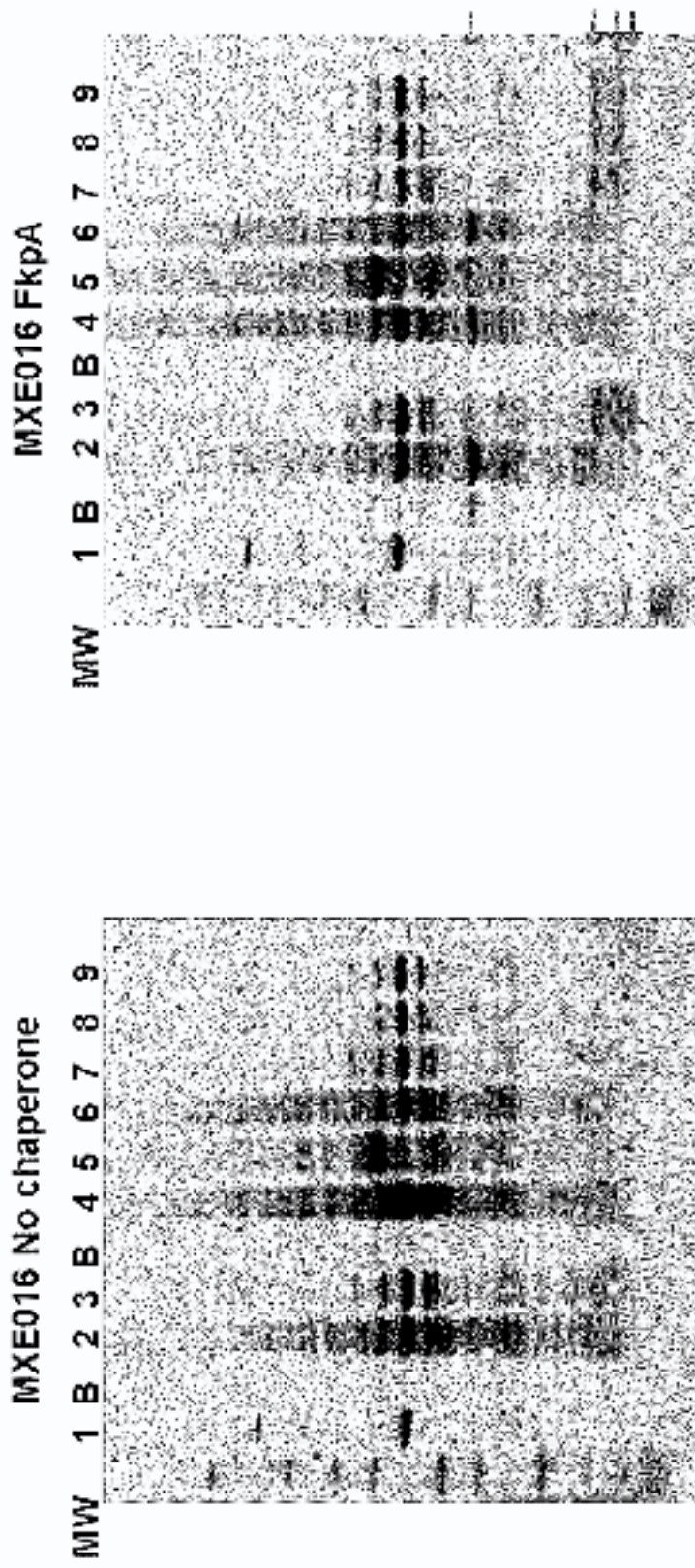
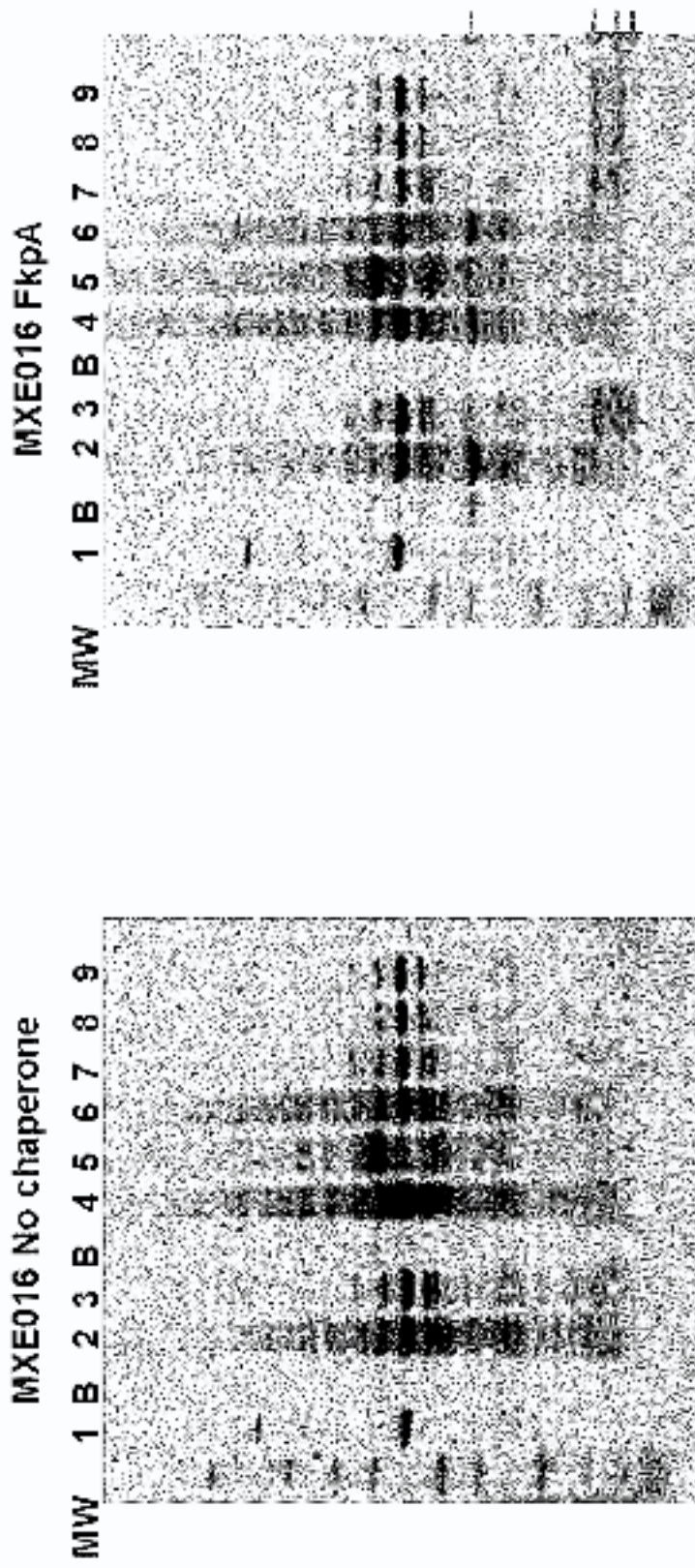


Figure 5 Primary Recovery From 20 Litre Batch Run on SDS-PAGE Stained Gel Under Non-Reducing Conditions

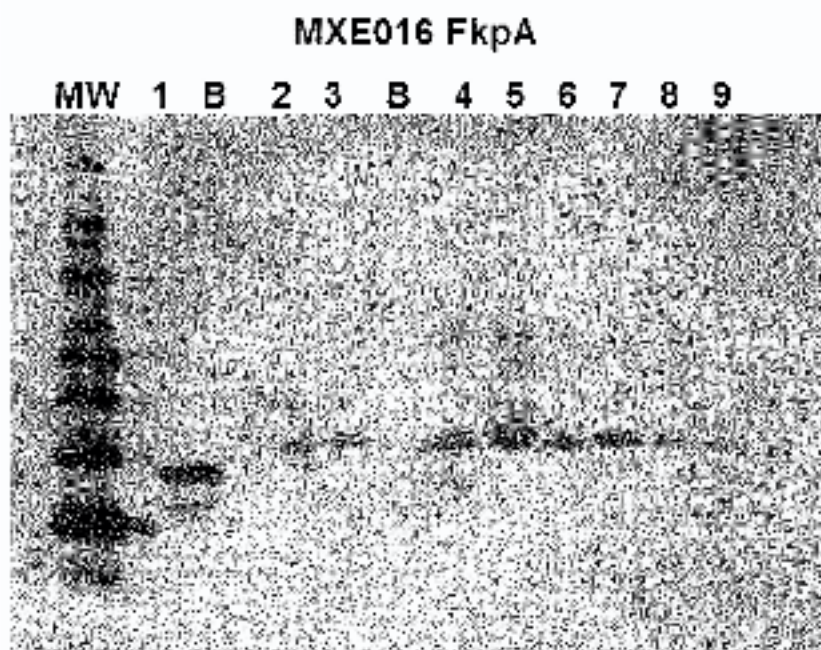


- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 – X Fab' Standard; | 2 - 30°C small scale extract; |
| 3 - 60°C small scale extract; | 4 – Supernatant of heavy phase; |
| 5 – Light phase | 6 – Post buffer addition; |
| 7 – Post extraction; | 8 – Post extract centrifugation |
| 9 – Post filtration | |

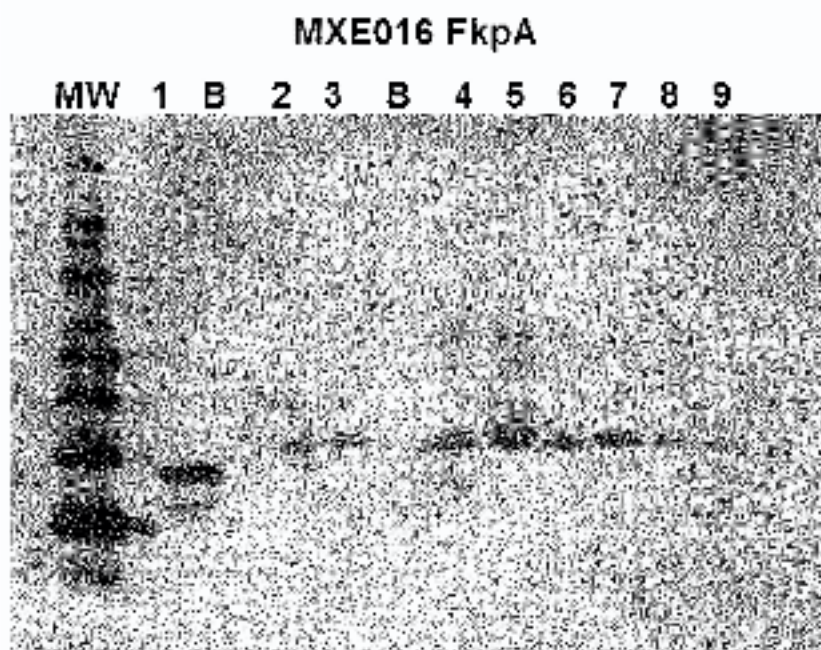
Figure 5 Primary Recovery From 20 Litre Batch Run on SDS-PAGE Stained Gel Under Non-Reducing Conditions



- | | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 – X Fab' Standard; | 2 - 30°C small scale extract; |
| 3 - 60°C small scale extract; | 4 – Supernatant of heavy phase; |
| 5 – Light phase | 6 – Post buffer addition; |
| 7 – Post extraction; | 8 – Post extract centrifugation |
| 9 – Post filtration | |

Figure 6 Western Blot Under Non-Reducing Conditions for a 20 L Pilot Scale Batch

- 1 – His-tag positive control (DsbC)
- 2 - 30°C small scale extract
- 3 - 60°C small scale extract
- 4 – Supernatant of heavy phase
- 5 – Light phase
- 6 – Post buffer addition
- 7 – Post extraction
- 8 – Post extract centrifugation
- 9 – Post filtration

Figure 6 Western Blot Under Non-Reducing Conditions for a 20 L Pilot Scale Batch

- 1 – His-tag positive control (DsbC)
- 2 - 30°C small scale extract
- 3 - 60°C small scale extract
- 4 – Supernatant of heavy phase
- 5 – Light phase
- 6 – Post buffer addition
- 7 – Post extraction
- 8 – Post extract centrifugation
- 9 – Post filtration

Figure 7A Mutation in Various Genes**Wild type ptr (protease III) 5' (SEQ ID NOs 81 and 82)**

```

* M P R S T W F K A L L L L V
TGA ATG CCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

A L W A P L S
GCC CTT TGG GCA CCC TTA AGT

```

Mutated Δ ptr (protease III) 5' (SEQ ID NOs 79 and 80)

```

EcoR I
-----
* I P R S T W F K A L L L L V
TGA ATT CCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

A L W A H * G
GCC CTT TGG GCA CAT TAA TG-
Ase I
-----

```

Figure 7B**Wild type Tsp 5' (SEQ ID NOs 75 and 76)**

```

M N M F F R L T A L A G L L A
ATG AAC ATG TTT TTT AGG CTT ACC GCG TTA GCT GGC CTG CTT GCA

I A G Q T F A
ATA GCA GGC CAG ACC TTC CCT

```

Mutated Δ Tsp 5' (SEQ ID NOs 77 and 78)

```

EcoR I
-----
M N S F L G L P R * L A C L Q
ATG AAT TCG TTT TTA GGC TTA CCG CGT TAG CTG GCC TGC TTG CAA

A S I
-----
* Q A R H * I
TAG CAG GCC AGA CAT TAA TTG
Ase I
-----

```

Figure 7A Mutation in Various Genes**Wild type ptr (protease III) 5' (SEQ ID NOs 81 and 82)**

```

* M P R S T W F K A L L L L V
TGA ATG CCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

A L W A P L S
GCC CTT TGG GCA CCC TTA AGT

```

Mutated Δ ptr (protease III) 5' (SEQ ID NOs 79 and 80)

```

EcoR I
-----
* I P R S T W F K A L L L L V
TGA ATT CCC CGC AGC ACC TGG TTC AAA GCA TTA TTG TTG TTA GTT

A L W A H * G
GCC CTT TGG GCA CAT TAA TG

```

Figure 7B**Wild type Tsp 5' (SEQ ID NOs 75 and 76)**

```

M N M F F R L T A L A G L L A
ATG AAC ATG TTT TTT AGG CTT ACC GCG TTA GCT GGC CTG CTT GCA

I A G G T F A
ATA GCA GGC CAG ACC TTC CCT

```

Mutated Δ Tsp 5' (SEQ ID NOs 77 and 78)

```

EcoR I
-----
M N S F L G L P R * L A C L Q
ATG AAT TCG TTT TTA GGC TTA CCG CGT TAG CTG GCC TGC TTG CAA

A S E I
-----
* Q A R H * I
TAG CAG GCC AGA CAT TAA TTG

```

Figure 7C

Wild type DegP

202 D A A I N R G N S G G
 348 GAT GCA GCG ATC AAC CGT GGT AAC TCC GGT GT

Mutated DegP S210A

Ase I

202 D A A I N R G N A G G
 348 GAT GCA GCG **ATT AAT** CGT GGT AAC **GCC** GGT GT

Figure 7D Gene Insertion

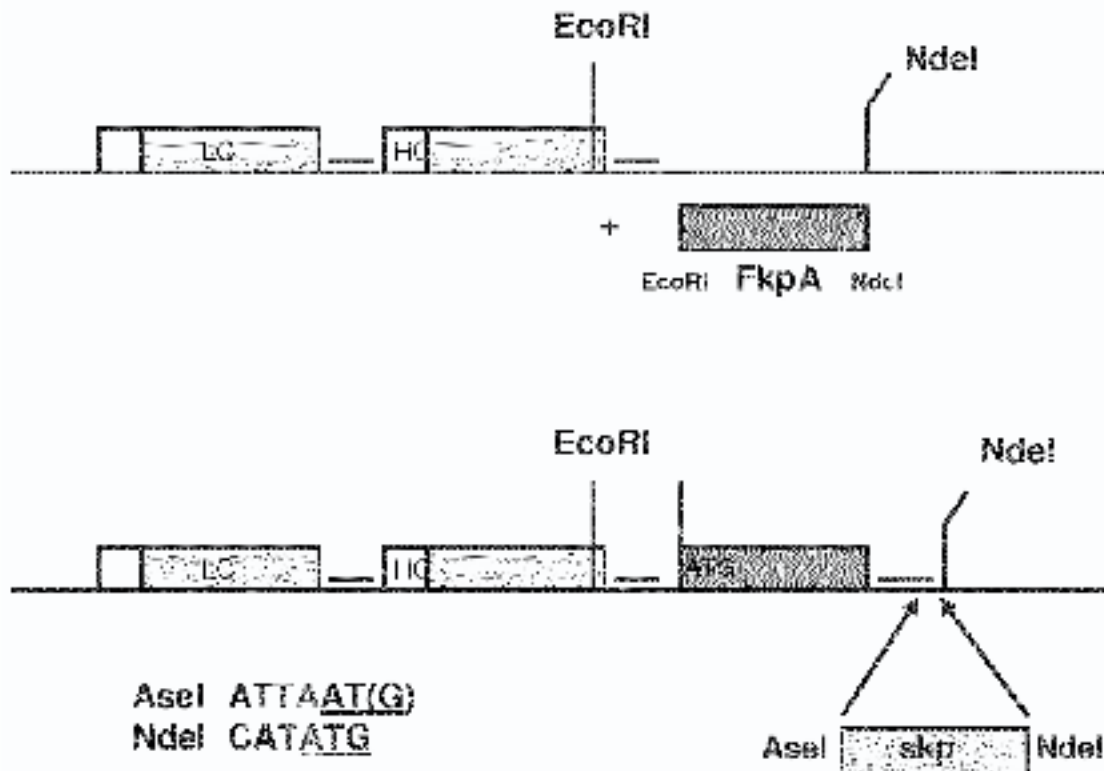


Figure 7C

Wild type DegP

202 D A A I N R G N S G G
 348 GAT GCA GCG ATC AAC CGT GGT AAC TCC GGT GT

Mutated DegP S210A

Ase I

202 D A A I N R G N A G G
 348 GAT GCA GCG **ATT AAT** CGT GGT AAC **GCC** GGT GT

Figure 7D Gene Insertion

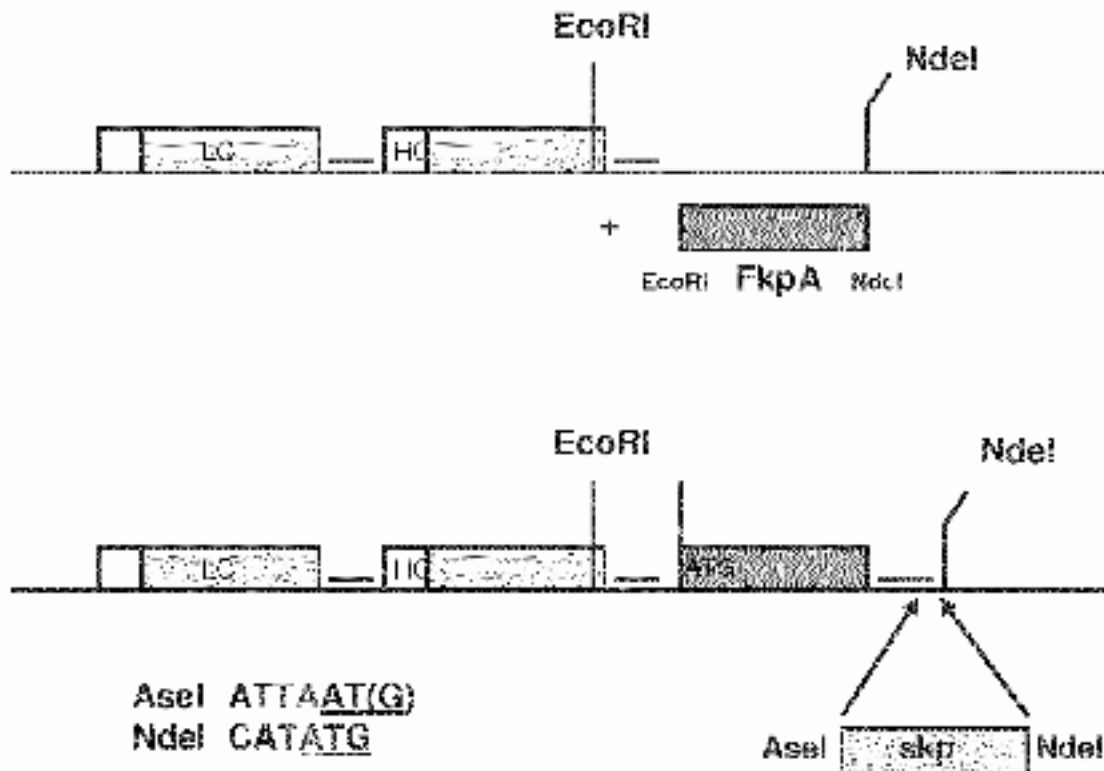


FIGURE 8A SEQ ID NO:1 is the DNA sequence of the wild type Tsp gene including the 6 nucleotides ATGAAC upstream of the start codon.

ATGAANRIGETTTTPEAGGSCITACCGGCTPLAGITGGGCTGGHTTNCARATAGTAGGCUAABRNTTGGCTGTAGAA
 SATATCAGGGGTSCGTGATCAAAATTCGGSTATTAAGGAABAGACSCAGCATCGGACGGTAASTGAGGGGTA
 AGSTCCGGCTTCACCGCTTCGCATTCACCGCASTTCGACCTGATCGAGCATTTCCGGCAGAAATCCTTGGAC
 CGTACCTGATSTGCTGATTCAGGCGACAACTGCTGCTGCGCAAGCGATCTTGAACASTTCCCGAAGAAAG
 AAAACCGACTTACCGGATCGACTCCCTTCAGCCAAACTCGACTTTTCTACCGCTCTACCAATCTCCGGCAA
 AACCGCCCTTTCAGCCCTTACCGAGAACCCCTTCTCGCTACTCGAAGAACCGCATCGATTCAGCCCGCAGCCAC
 ACTTATAACCTTCAGCCCGACCAAGCCCGCTTCCGGCAAAAGCGAGCCCTTACTTCAGCCCGCTCTCGACACT
 AAAGTCAAALTCAGCGACTTAAAGCTCGAGCTGACACGAAAAAGCGATAAACCAATTCGTCAAAACCTGACT
 CGCGGCTACAAAATTCGCGACTGCTGCTCTCGGGCGAAAAAGCGAGCGAGGATGTTTCTCGCGCTGGCAATGAGG
 GCTPLTGGGCTTAAALGACCCGAGLACCAACTATCTTCCGCGGCTAATACCGAACAATTCAGCACTGAA
 ATAGTTCTGCGGTGAAAGGATATTCGCGGCACTGCTGCAAAATGATGATGACCGCAGCCTTATCAATTCAGAG
 CTGGGAGCTGGTTCGGGACGAGAGGASTAAAGCTATCGAGCTTGGTGGCAAAATCTCTGGGTATTGCTCAACA
 CGGCAAGCGATGGTTCAGCTGATTGGCTGGGCTCTTCACTGATCTGGTTCCCTTAAATTAAGGCGCCGAGGGCC
 AGTAAAGTTCCTCTGGAATCTTACCTGCTGGTAAAGCGAGCGAGAGCCCTACTCTAAGCTTCAACCGCTGAA
 CGTACTCCCTCCGAGAGCCCGCCCTTAAAGCTCTCGCTTCAGACCGCTCTCTAAGGAGAAACTCCCGCTGCTC
 GATLTCGCGCTTCGATCTCGCTTTCAGAGAGCATTCGAAAGTCGAGCTCGCAAACTCCGCAAACTCCAAAAAGAAAT
 CTGAGCGAGCTTCATGATCGAGCTTCGCGAGCAATGGCGGCTTAACTGAAAGCGGATCGCTCGCTTCGCGG
 CTPLTALTCCTCGGGCTCGAATTCGCTGAGCTCCGCGALAAAGGCAAGCTTGGTGAAGATAGCGGAGCTC
 GAGGACAGGCTTTCATTAAGGCGGCTGAGCTGGTGGCTGCTTAAAGCTTCAGCTTCGCGCTTCAAAALCT
 TTTCGCGGCAATTCAGAGATTAAGCTTCGCGGCTTGGCTGGCTGAGCGGAGCTTTCGTAAGGCGAAGCT
 CAAGAAATACCTTCATTCAGAGCTTTCAGAGATGAGCTTAAAGCTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 TAATTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 ATGATTCGCGGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 ATGATTCGCGGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 CGGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 AACCGCAATTCGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 CGGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 TACAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC
 AGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTCAGAGCTTTC

FIGURE 8B SEQ ID NO:2 is the amino acid sequence of the wild-type Tsp protein.

MEFRRLTALAGLLAAGQIFAVTEGICRADQIEVLKESIQMIVSIEKVIKRETEKSHYRQTDLDGAPSAKIGRY
 INLIDYBNVLLASDVEGFAXKKTELCDELRSGXLDVFDLYNLAQKRREPEYQYALSVLEKFMDEFTCKDY
 NLDREKAPWPKNBAELNALKLSKVKDELEKLTGKLDRELRSLTRKRYKPAIRLAQUNSELDVSLAMTAF
 AKLIDPHLHLSLAKTEQFNTEMSLSLGLGAVLQKDDDETVINSRVAGGPAKSKAISVGDALVGVGQTKR
 LENDVIGKLLDVALKGGSGSVALELIFANKSTKPLVLLIHERIRLEDKAVKSNVKTGKREKVVLDI
 PGPYVLLDVKVQLQKLEKQVSSVLLLNHNGGGLLAVNLSGLSLPASPVGVRDNGKVPEDSDTDG
 DVPKHFLVVLVDKPKAAALVPAAMQDGRALVGRKPLKGLVQDPRHNRLYDMLRPLKPAIRKVOY
 TIQKPYRNGGISTORRKYTPCTTPTAKTEFTTGRKPEKNALEKSDTCAATVYKSGDIQAPFEELKHNAR
 TAKDPRPQNTMKDTRPKAMKDKNTVSTNYAVRKYFNEDDARLRLRNTDPRKRTSKPRLKGLDLEKDYQ
 RDPYLDFTVNTAIDIAKLEKARPAQPAWK*

FIGURE 8C

SEQ ID NO:3 is the DNA sequence of a mutated knockout Tsp gene including the 6 nucleotides ATGAAT upstream of the start codon.

```

ATCAAT TCCCTT TTAGCC TTAGCCCGT TACTCCCGTCCCTTCGATACGACGCGCCAGACATTAATTC TACAC
ATAICAGCGGTCTCATCAAAATCCGC TACTAGACAAACACAGCCAGCATCCGAGCC TAACTCAGCCGCCTAA
CGTCCGCGCTCAGCCCTTCTCATTCATCCGAGCTCCAGCCCTCCATCAGCCGATTTCCGCGAATACTCTTCCGC
GCTACC TGAATC TGC TCGATTACAGGCCAGAGCTGCTGCTGGCAGAGCGATGTTGAAACAGTTCGCGNAANAG
AAACCGAGTAGAGCGATGAACTGCTGTTCAGGCGAACTCCAGCTTCTCCAGATCTCTACAAATC TGGCGCAAA
AGGCGCTTCTTGAGCTTACCAATAGCTTCTCTCGTATCTGGAAAGGCTGATGATTTCCAGCGCAACACACA
CTATAAGCTTGAGCCGCAAGCAAAAGCGCTCTGCGAAAGAGGAGCTGAGCTGAAACCGCTCTGCGACANTA
AAATCAAACTCCGAGCGATTAAGCC TGAAGCTGATGAGCAAAAACGGATAAAGAAA TTCTGTAAACCCCTGACTC
KXKXCTACAAATTTCCCATTCCTCTCTCTGGCGCAAAACCAACAGCGCAAAATGTTTCTCCGCTGGCGAATGAGCG
GCTTTAGGCTGTGAAACCGACCTGGCATAACCAAGCTATCTTCCCGCGCTAATAACGAAACAGTTCAGCACTGAAA
TGAATTTCTGGCTGGCAAGTATTGGCGGAGTCTGTGCAAAATGGATGATGACTACACCCCTTATCAACTCCGATCG
TCTCAAGTCTCTCCGCGCAAGAGATAAGCTATCAAGCTTGGTGCAGAAAATCTCTCGTCTTCTCAAAACAG
KXKXAGCGATGGTTGACCTGATTTGCTTGGCTCTTCTGATGATGTTGCTTCCCTTAATTAAGAGCGCTGAAAGGCA
GTAAAGTCTCTCGCAAAATTTACTCTGCTGCTAAAGAGGCAAGAGCCCTACTCTAAAGCTTGAGCCCTGAACT
GTATCTCTCTCGCAAGCGCTGCTGCTTAAAGTCTGATGAGAGCCCTGCTGCTAAAGAGAAAGTCCGCTGCTCTCG
AATTCGCGGCTCTCATC TCCCTT TGAACAGCACTC TCAAAAC TCGAAC TCGAGAAAC TCCAAAGACAGAAAC
TCAACAGCCCTCACTCAACCGAGCTAGCAATCCGCTCTCCCGCTCAACTGAAAGCCCTCACTCCCTCCCTCCCT
TCTTTAATTCCTCCCGCTCCCTTCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
ACCACAGCTTCTCATAAACCTCCCGCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
TTCGCGCGCTCAATCCAGCTATCCGCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
ACCAATACCGCTCCCTCCAGCCCTATTTAGCATCAGATCTTACCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
ACTACAGCATCCAGAAATCTATCCGCTTAAAGCGCCAGTACCGCAAGCTAAAGCCCTTAAAGCCAGCACTCA
TCACTCCGAGCCCTCAATCAACCAAGCCAGAGCCCTCCAGAAATCCAACTATAAGCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
TTCATCCGCGCGCTCAATCCAGCTTCAAGCTCCGCTTCAAGCCGAGCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
CGCTTATCCGCGCGCTCAATCCAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCT
AGCCCAATATCCCTCTCCAGTACCGCTTCCCTCCAGAAACAGATATCCAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCT
CGCTTTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCT
AGCCAGAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCTTCAAGCCGAGCT
SACCGCGGAGCAAGCCGCTCCGCTCAGTAA

```

SEQ ID NO:4 is the DNA sequence of the wild-type Protease III gene.

```

ATATCCCGGAGCAACTGGATTCAAGCAATATTGATGTTTATGTTGCGCTTGGGCAACCTTAAAGTCAAGCAAAA
AATGGAAGGATGAGCAATTCAGCAAGCAATCTTAAAAGGAAAGAAAGAAAGGAGGAGATCAAGCTATATG
CTGAAATAAGGATATGATGATCTTGGCTGATCTCTGATGAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCA
GAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAG
AGCAGTGGCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAG
CTCCCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
GATTAAGCATCCCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
GAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
GAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
CGCTCCAGAGCTTCCAGCGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
CTCCCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
ATCAGCTTCCCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAG
GCTTCCCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAG
TACTCTCATCTCCAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCT
AGCCCGAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAG
CGCTTCCCGGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAGCTGAGCAAG

```


FIGURE 8D

SEQ ID NO:6 is the DNA sequence of a mutated knockout Protease III gene.

ATTCGCCCCAGCACCPCCTLCAAGCCAFLATLSTTGLFASFLGCGGCTPLGCCCCAGATTAATCTCAGCCAGAA
 ACCGGATGGCAGCCGALTCAGGAACCCATCGGTAAAGLSELEAAGAFAACCGCCAGTATCAGGCCATATAGGT
 CTGATAAAGGATATGALGALCLRRTPTPTTCTGATCGGCGACAGI PAALGRTCTGCGGGGCTGTCGGLG
 CCGCTTGGGCTGGTGGAAAGATCCCGAAGGCTACGAGGGGCTGACACATLACCTTGAACATATGASTGTGATG
 AGFTCGAARAAGTACMLPCAAGGCTGACAGCTCTGGCCGAAATCTTAAATTCGACGGCGGTASTCACAAATGCC
 AGSACTGCGCCGCTATCCACGGCTTCTATCTCGAAGTTGAGAACGAGCGGCTTCGCTGCTGCGGCTAGCGCCG
 CTGCGCATGCTATGCTGAGCCTCTCTCGACACAGAAADTCCCGAGCCTGAGCGGTATCCCGCTGAGCCT
 GAATTAACCATCCCGCTACCGCTGACCCGATCCCGATCCGACAGCTCAGCCGAGAAACCATTAACCGCCCA
 CAGCCCGCTLCAAGCPITCTCTCTGCLAACCLCAAACTLTAACCGACAAACCLCGTAAACCGCCPCGAGGAC
 GCGCLGAAGATTTCCAGCAGAAAGLACIATTCGCGCAALTTGATGAAGGGGFLATTTACAGTAAI AAAGCG
 CTGKXNGAAL TGGCAAAAALGGGAGGAGACCTTTGKLDGKATLGGGAAAGAAAGAGUAAAAAAGGAA
 ATACAGTGGCGGHTAATLACGGAGGAGGAAAAAGGCAFLATLALPGAFLACGTCGCTGKXNIGCGGKFLAAA
 KTFPLGCGGCTTAAATLTCGCAFGALAAACAATCAGGAGATLCCGTAATAAAACGNAFGAALGATLAVIC
 FALFLNATGGCAALGGAGGCGGAGSLACALPTCTGACLGGATLCCAAAAGLGGGGAFLAGTTGAGKGGALF
 AGGGCAACTCCGATCTATCGTCAAGGCAACAGCGGCTATTAGCGATCTCTGCTGTTTAAACGATAA
 GCGCTGGCTAATCCGATCAGGTTGATGCGCGCAATTTAGCTATCTCAATCTGTTAGCTGAAAGAGGCTT
 GATTAACATACTTGGATGAACTGGCGAATGTGCTGGATATGACTTCCCTTATCCCTGATCAGCCGAT
 ATCGATTACTCCGATCCGTCAGATACCATGATTCGCGCTCTCTGCTTACCGATACCCGCTCATCAGTCAAT
 ATTCGCAATCGGTCGATCCGTAAGCCATLAAAGCAACCLCTCGCGATGATCAGCCCGCGGAACTCCCGLALC
 GGTATLACAGCCGGAAGAGCCGCGACAAAGCGCLLACPLTGTGGATGGCGCTATCAGGTCGKALAA
 ATGAGGCGCAAAALPLCGCGACLGGGCAAAAAAAGCGCGCAALTCGCGCTGCTPLTGGCAGAGCTLAA
 CCLTATLCTGCTGATLAACTCTGCTGATLAAAGGAAATAAGGAGGCTGAGAGCTGALPLTGNALF
 GATCGAATCTGCGCTGCTGATGCGCTCAAGGCTTATTTGCGCAGCGAGCCCAAGGCTGATGCTGAGCTG
 ATTTGCTAATCCGAAAGGCTATGAGGAGGCGCGCAATGAGTGAATTTGCGCTCAATGATATCTGCA
 GGGCTGGCGCTTCACTCACTTAAAGCAAGGCGCTGCGTTGGTGGCATAAATTTTCCAGCCATCGCTACCAAC
 GGGCTTATGCTAATGCTAATGCTTACCGCCAGGCTTTCGCGCAGCTGTCCAGGCAATGCTCGAGGGHTAC
 TTAGCTATAACCGCTACGAGATCAGCTTGAGCGAGCGGAGTCCCTGGTATACGASATGATGGATTCGCA
 CAAAGCTTAAAGCCTTTCAGCGCCCLATLACGCCCCOGLMRTGCTCTCCGACTCCGCTACTCTCGCLA
 CATCAAGCCGCTAAATLTLGCCCCCATLACCTTGAAGAGCTCTGCTCGCLLGGCGAGCCCLTAAATCA
 GGGCTCGACCAAGPLTALGGTATCGCGCAACATGACCGAGCGCGAGCAACCTLGGCAGCGGATLGG
 CAAAAACGLTGGKXNIGATGNTLCAAACTGNTLTCAAAALAAAGATGPACTGNTGATAAAAAACAATTC
 NTCAITLGGAAAAAGCTGPTAACAGACGNAITTCGCACTGACAGGCPALTTNTAKNACTGNCIACNAF
 GAATACAGCAGCTCAGCTATAGCTCTCTGTTGGGGAGATGNTACAGGCTGCTTCTACATCACTTGGCT
 ACCGAGGACAAATGSGCTATGCGGCTTTGGCTTTCCAAATGAGCGTGGCGGCTCAGTGGGCAATGSGCTC
 CTTTGCGAGGCAATGATACAGGCTTCATCTTGTGGAGGCTTACAGGCTTTTCCCAACCGCAGAG
 CGCAATTCGAGCGCTCAGCCCGCTGACTTCCCAATTCAGCCAGCCCTAATTACCCAGCTCTCCAG
 CGAGCCAGAGCGCTCGCCAGCAAGCAATCGCACTTAACTAAAGATTTCATCCGCGCATATCCGCTTCGAT
 TCCCTTCATAAATGCTCCCGCCGATAAACTCTGAGCCCLCAAAAGCTTCCGATTCCTTCCATCAGCCG
 CTCTCGACCCCGAGCCAGCGCTATPLCTCTCGAGATTCGCGCGAGCCAGCGCGAAGCCGCAATGCTGA
 CAGCTCAGCGCTCGAAAGCTGGCGAAGCTCAGCCCGCTCGAGCAAGCAATCCCGCTGATCAGTGAAG
 AATGATCA

FIGURE 8D

SEQ ID NO:6 is the DNA sequence of a mutated knockout Protease III gene.

ATTCGCCCCAGCACCPCCTLCAAGCCAFLATLGTGFLPASTLSCDCCIPLGCCACATTAATCTCACCCAGAA
 ACCGGATGGCAGCCGALTCAGGAACCCALCCGTAAGAGLSELEAAGAFAACCCGCCAGTATCAGGCCATATAGGT
 CTGATAAAGGTAFAAGLGAFLCLPRTPTPTLTCGATCCGGGACAGCAGTAAALGGTCTPGGAGCCPNTGAGLH
 CCNTTGGGFLGGTGGAAAGATCCCGAAGGHTACCCAGGGGHTAGCACAFLACCTTGAACATATAGASTGTGATLH
 AGFTCGAARAAGTACCLPCAAGGCTGACAGCTCTGGCCGAAATCTTAAAAATCCACCGGGGCTASTCACAAATGCC
 AGSACTGCCCCGCTATGCCACGGCTTTCTATCTCGAAGTTGAGAACGACCCGCTTCCCTGCTGCCCTAGCCGCC
 CTGGCCGATGCTATGCTGAGACCTCTCTCCGACACAGGAADRTCCCGAACCTGAGCGGTATCCGCCGAGCCCT
 GAATTAACCATCCGCCCTACCCCTCACCCTCATCCGCAATCCGACACGCTCAGCCGACAAACCATTAACCCGCCA
 CAGCCGCCCTLCAAACTPLTCTCTCTGLAACTLCAAACTLTAACCGACAAACCTLGGTAAACCCCTCCAGGCAG
 GGGTGAAGATTTCCACCGAGAAGLACFALTCCGCCAALTTGATGAAGGGGFLATTTACAGTAAATAAAGCG
 CTGKXNGAALTVKRAAAALGGKRSUWAGACCTTTWFLDGNFLGKNAACAAANAHAGUAAAAAAKXNGAA
 ATLACNGHGGUGHFASLWAGUGAGKSWFAAANGGCAFLATLALPCAFLACGFTGCCPKNHIGGKGNFLAAA
 NTPFLNGCGFTYRSLPLTGGCAFGALAAACAATCAGCGRSLPLCGTASTAAAACUNAPGAALPGATLAVIC
 FALFLNALTGGCALNGWAGUCUAGSLACALPLCTGACLGGATLNCAAAAGLWAGGATFLAGITGAGKRWALF
 RGGKCAACTCCSRTCTATCGTCAALRCHAAACAGCGGCTATTTAGCGATCTCTGCTSTTTTAAACGRTAA
 GGGCTNGCTAATCCGATCAAGTTGTGCGGGCAATTTTAGCTATCTCAATCTGTTTAGGTGAAAAGGGTAT
 SATTAACAACTCTTCSATGAACTGGCCGATGTGCTGGCATCTGACTTCCCTTATCCCTGATCCAGCCGTAT
 ATCGATTAATCCGATNCCCTGCAGATACCAATGATTCGCGCTCTCTGCTTACCGATACCCCTCATCCACTCAT
 ATTCGCATCCGTCGATCCGTAAGCCATLAAACCAACCTCTCCGCAIATGATCCAGCCGCGCGAATCCGCGLALC
 PGGTALALCAGCCCGAAGCAGCCGCGACAAACAGGCGCLLACPLTGTCCGATGGCGCTATACAGGTCGKALAA
 ATWAGKGCAGAAALPLTGGGACLWAGAAAAAAAGCGGCAACATPCKGCTGCPCTPLGKAGAGCTLAAAC
 NCTFAATTCCTKAWHAFTLCTGRTFAATLAAFLTAGAGAAHAAATAGGACCAWTCAGANCTGAPLRTINAFL
 SASTCGAATCTGGKSTSGTGTATGGCTCAAGGCTTACTTTGCGACGCGAGCCCAAGGTGATGTCAGKNTS
 ATTTGCHTAATCCGAAAHGCAWAGMWHGKCCGCAATCAKNTSATSFTTACGCTCAATGATATCTGWA
 GGGCTGGCGCTTSATCASTTAAGCAACGAGGCGTGGCTTGGTGGCATAASTTTTCCAGCCATCCCTACCAAC
 GGGCTTATGTTAATGCTAATGCTTACCGCCAGGCTVTCGCGCAGCTGTTCGAGGCATTSCTCGAGGGHTAC
 TTTAGCTATAACCCCTACGGAGATCAGCTTGAGCGAGGCGAAGTCCCTGGTATACCAAGTSAATGGATTCGCA
 CAAAGCCATAAACCTTTLRGCGGCCLATLRTCCGCCCCMMLTCCCTCCCACTCCGCTACTCTCCGCLA
 CATCAACCCCTAAALTTLLGCCCTCCATLACCTTGAAGAGCTTCCCTCCCLRLGGCGCCCLTAAALPCA
 GGGCTCCAGCCAGPLTALGGTTATCCGCAACATGACCGAGCCCGAGCAACCTLGGCAGCCGAGTLLS
 CAAAAACAGLTKKXNGLGATGNTLCAASPTNLTGNAALAAAGATGFACTGNTXIAAAAAACAAFTCC
 NTCALTTLTGAAAAANCTGPTAACANACDAAFLTCXNACTKACAGTNGPALTNTAKXNACTGNCFAANAFL
 NAATAACAGGCTCAGCTATAGCTCTCTGTTGGGGAGATGNTACAGGNTGGTTCTACAAATCACTTNGHT
 ACCGAGAACAAATTSSECTATGCCGTTGTTGGCTTTCCAAATGAGCGTGGGGCGTCASTGGGCAATGGGTTCT
 CTTTGCAAGCAATGATAAACAGGCTTCATCTTGTGGAGGCTTACAGGCGTTTTCGCAACCCGAGAG
 CCARATTCGACCCGCTCAGCCCGCTCAGTTTCGCAATCCAGCCAGCCCTAATTAACCCMCTCTCCAG
 CCAGCCCAAGCCCTCCGCAACCAACCAATCCAGCTTAACAAAGATTTCATCCGCGCATATCCGCTTCGAT
 TCCCTTCATAAATGCTCCGCCCCATTAAGCTCTTGAACCCGCAAAAGCTTCCCTATTCCTTCCMTCCGCGC
 CTCTCCAGCCCGCAGCCAGCCGCTATPLCTCTCCAGATPCCGCGCAGCCGCAAGCCGAAACCCCAATAGCLA
 CAGCTTCAGCGTCCAAACCTGCGGCAAGCTCAGCCCGCTCCAGCAAGCAATCCGCGCTATCAGTGAAG
 AATGATCA

FIGURE 8E

SEQ ID NO:7 is the DNA sequence of the wild-type DegP gene.

ATCAAAAACCAACATACCCACTCACCTCCACTCCCTCCACCTTACCTTTACCTTTCCCTTTATCTCCCTCCCTCCCTCCCA
 ACCGCGCTCAGACTTCCTTCAGCAACCAACAGCCAGCCAGATCCCAAACTCTCCACCCGALCCCTCCAAAAGCTCC
 ATCCCTCAGTGGTCCAGCCATAAGCTAAGAAAGTAGCAAAACCCCTAATAACCCGCGGIALCCCGCCCTAACTTCC
 TAAAGCTCCCTCCCTTGAIGATTTCTCCCTTCTTACCCAGCAAGCTCTCCCTTCCAGAGCTCTCCCTCTCTTAAAG
 CGTGGCCAGGGCCCTAATGGTGGCCGCTTACCAACAGAAACTTCAATGGCGCTCCCTTCCTCCCTGTCATCTTAT
 CCGGATAAAGGCATCTCTCCCTCACCAAACACCACTTGTCTTGAATACCGCGAGCTCCCTTAAAGTTCACCTGAGC
 GATGGCCGTAAGTTCCAGCTCCGAGGATGCTTGGCAAAAGCTCCGCGCTCTGATATCCGCTCTATCCAAATCCAG
 AACCCCAAAAACCTCCACCTCCAAATTAAAGTGGCGGATTTCTGATCCACTCCCGCTGGTGGTGAATTACCCCTAGCG
 ATTCCTAACCCCTTCCCTCCCTCCCAACCCCTTAACTCCCTCCCTATCTCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 AATCCCAAAAACCTCCAAACTTCATCCACACCCATCCAGCCCTCAACCCCTCCCTTAACTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CTAACTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 GGTTTCCCTATCCCTCCCTCAACAATCCCTCAAAAACCTCCACCCCTCAGATCCCTCCCAATACCCCTCCCTCCCT
 GGTAAGCTCCCTATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 GGTCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 ACCCTCACTGAACCTTAAAGCCGATCAGGAGCTTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 AGTAAACTGACCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CAGATCCAGGTTGATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CAGCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 ATATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT

SEQ ID NO:8 is the amino acid sequence of the wild-type DegP protein.

MEHTTALSAIALSITSTATSPISATTAARTSSAATTACQMPSTAPMLRIVMPBIVSTIVTGGSTIVNTEFMPRNT
 DQTTGDDSEFPQFSSRPQSSPFCGGGGGCGVGGGGGGCTHATGSCVITRADKGVWTHINIVVDNATVTKVQTS
 DGRKFDANKVGGDFRSDIALIQIQNPKELDAIKMAGSDALRVDYTVLIGNPFDIGETVTSCTVSGALGRGCL
 NAENYENFIQTDAANTNRNCCALVNLNCELICINTAILAPDQNICICFALPENMVKXNLTSGMVEYQQVNR
 GELSTMGTEILNSELAKMKVDRGRGKLVQVLPNSSNAAGCTKAGDVITGLNRPISGPAALRAQVSTHPVS
 SKLTLGLLRDQXQVWVNLLEQQSSQVQVDSSTIFNCTECCAEKSNKCKDQCVTQVNVKTCFRAQITLAKQDV
 IICAAQCAVKNLALSLKVLDSKPSVLAHLQKQDSTLYLLEQ

SEQ ID NO:9 is the DNA sequence of a mutated DegP gene.

ATCAAAAACCAACATACCCACTCACCTCCACTCCCTCCACCTTACCTTTACCTTTCCCTTTATCTCCCTCCCTCCCTCCCA
 ACCGCGCTCAGACTTCCTTCAGCAACCAACAGCCAGCCAGATCCCAAACTCTCCACCCGALCCCTCCAAAAGCTCC
 ATCCCTCAGTGGTCCAGCCATAAGCTAAGAAAGTAGCAAAACCCCTAATAACCCGCGGIALCCCGCCCTAACTTCC
 TAAAGCTCCCTCCCTTGAIGATTTCTCCCTTCTTACCCAGCAAGCTCTCCCTTCCAGAGCTCTCCCTCTCTTAAAG
 CGTGGCCAGGGCCCTAATGGTGGCCGCTTACCAACAGAAACTTCAATGGCGCTCCCTTCCTCCCTGTCATCTTAT
 CCGGATAAAGGCATCTCTCCCTCACCAAACACCACTTGTCTTGAATACCGCGAGCTCCCTTAAAGTTCACCTGAGC
 GATGGCCGTAAGTTCCAGCTCCGAGGATGCTTGGCAAAAGCTCCGCGCTCTGATATCCGCTCTATCCAAATCCAG
 AACCCCAAAAACCTCCACCTCCAAATTAAAGTGGCGGATTTCTGATCCACTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 ATTCCTAACCCCTTCCCTCCCTCCCAACCCCTTAACTCCCTCCCTCCCTATCTCTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 AATCCCAAAAACCTCCAAACTTCATCCACACCCATCCAGCCCTCAACCCCTCCCTTAACTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CTAACTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 GGTTTCCCTATCCCTCCCTCAACAATCCCTCAAAAACCTCCACCCCTCAGATCCCTCCCAATACCCCTCCCTCCCT
 GGTAAGCTCCCTATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 GGTCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 ACCCTCACTGAACCTTAAAGCCGATCAGGAGCTTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 AGTAAACTGACCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CAGATCCAGGTTGATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CAGCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 ATATCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT
 CTCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT

FIGURE 8G

SEQ ID NO: 18 is the amino acid sequence of the wild-type *spr* gene including the signal sequence which is the first 26 amino acid residues.

MFRSQPILRYILLGCPDAIYAVVLLSACSANETAKNMEPEIRAVGSEETSELQASQDEFFENLVRNVDVKSRVD
QYADGKQVRYRLGGSEKNOIDGSGCFVQETFERBQFQLELFRSTYBQQSNKXSVSRGNLRTGGLVLFRAQSDOR
LVCYIYIGNQFVILSDGSDVLLSMMNEPYSKPKRYNDEARVLSG

SEQ ID NO: 19 the non-mutated *spr* gene without the signal sequence.

QSAETLAKNMEPEIRAVGSEETSELQASQDEFFENLVRNVDVARRIMDQFASPKKGVRYRLGGSEPKKGLDNGGFV
QRLFRFQGLLELFAHLYEQQEMGKQVRRGNLELSDVLFRAQSDORAVSLFLNNEQFVASTPSSGLIHKKN
EPEAKRYNEARVLSG

SEQ ID NO: 20 a mutated OmpT sequence comprising D210A and H212A mutations.

ATPFGGHRUGAAATLCTPFRGAATAGTCCTTGAAUAANCULATTGCGATCGANLAILTFLDCLTFLAUCGAGAAIT
TTAICGTTLACTCCLGACAAACATAAALGGGAAVATLALNTTIGNAACTLTPGAGCGGAAAAAFAAAAGAGNLL
NPLTALDTAGUCGAAAGAAAGAGGCGGAAAAATPAAVCGAATCGAAGLGGAAAATCAALAAAGGCLGAAATLAL
AAAGGIGAAATLAAALGGGELTTCATGCGGCGAATAATLATTGCGGCGTGGLLGGLGAGTGGACAACTLPTGSGAAG
CGAAGGIGGCAALATPSPGGLGACGAGACGGATPAGALTCGAGTAAAGCGCGGAACTGGACGAAALGAAATLAA
GAGGCTGALACGAAAGTCAALTALGCGAAGGAAATLALDTGCAALATCGAAAGCTGGCTGCTCGAAGGAAAGC
AALTACGCGCTGCGAAGTCAATGCGGAAALGACGAGGAAAGCGGTTALAGCTTLAAGAGGAGAGGCTGGTGGGAL
ATCTACAACTLCTGAGGAGGAAATTCAGAAALGALATCGAGCTCCCTGCGGAAALGAGGAAAGAGGAAATCGAGLAC
AAGCAAGCTLTLAAGATCGGCTACATLCCCTTCGAGTGGAGCTTALCGTALGAGCALTTTGGATCGGCTCGC
AGATTLAAGATCGAGCGGCTGCTCGAGTCAATLALAGAGCGCTGGAGCTLALGAGCGGCTGAGAAAGGAAATCGAL
PCTGGAGTGAAGCTCGAAGGAGCAAAATGACGATGCTGCTGCGAGTCAATGGAGCTTATGAGCTCGAGAGCTAAC
CGAAAGCTTGTGCTGAGAGCGGCTGCTGAGCTGCTGAGCTGAGTAAAGAGGCTTATGAGCTGAGCTGAGCTGAG
AGTAAATAGAGCTTGTGAGTACAGGAAAGAGCGAGAGCTGATAGAGAGTATGAGCTGAGTACAGCTGAGCTGAG
CTGAGTACAGCTTGTGAA

SEQ ID NO: 21 a mutated OmpT sequence comprising D210A and H212A mutations.

MRAKLLGIVLTPFALSSPFGTETLGFPPDNIHADISLCLTSGKIKERVYLAECGPRKVSQLDWZELNRAILL
KQATNKRIHQGTSTGAGCTTGLGSGCGEMVVDGDMVYSSNPGTATDFSRHPDGTKYAKRPHLYTKWLCRPF
NRYLGTMACYQPSRYSTTARCSYTYSSRSTPDTGSPRNCERRATGKQRPKMPYCTCTGSMYRDTTGGC
TTEYSQWVTSSDNATAYDQKPLTYRSEKWDQNYYSVAVKACVYVTPNAKXWVTGAKKRVVTHKGNVSTNCH
NNVTSVYSGKAGCTPKYVPTTACTLKYTF

SEQ ID NO: 22 is the nucleotide sequence of a mutated knockout OmpT sequence.

ATGCGCGCCAAAGCTGCTCGGATAGTCCGACGAAAGCGGATTCGCAATCGAGCTGCTTTCCTTCTAGCGGCACT
TTATGCTTACTCGCTCGCAGCATAAAGCGGCGCATTAAGCTGTTGGAGCTGTCAGCGGAAAAACGAGAGGCGCT
GTTTATCTACCGCGAGCGAGCGGCGCGGAAAGTCAAGTCAACTCGAGCTGAGCTGCGAATTCAGTACAGGCTCGAATATT
AAAGCTCGAATTAAGTCCGATTTCCATCCCGCGCATATGATCCCGCGCTGCTGCGTCCGACAAAGCTGCGGCGAGC
CGAGCTGCGAATATCCTCGATCACGACGCGATCGATTCGAGTACCCCGGAGCGTCCAGCGCTCGAAGTACA
CGGCTGATACAGAGCTGATATGCGGAGCGAATTCGATGCTGAGTATGAAAGCGTCCCTGCTGAGCGAGCGG
AATTACCGGCTCGGAGTCAAGCGCGGATTAAGGAAAGCGGTTATGAGCTTACAGCGGAGAGGTTGGTTCCTAT
ATCTACAGTTCTGAGGAGGATTCAGAGATGATATCGGCTCCCTTCCGAGTGGAGAGAGAGCATCGGCTAC
AAAGAGCGTTTAAATGCGGCTACATGGGCTTGAAGTGGAGTATCGGTTATGAGATTTGAGCTCGGTTGGC
AGATTTAAATACAGCGGCTGAGGAGAGTCAATGATGATAGGATGAGACGATGAGCGGAGAAAGGAAATCACT
TATGCGAGTAAAGTCAAAAGCGAAAGTACATGCTGTTGCAATGAGGATGAGGATTAAGCTGCACTTATGATGAC
GAAAGATTTATGTTGAAAGCGCATGGAATCGGATTAAGATAAAGAGGTAATAGCTGCACTTATGATGAC
AALAAIAGCACTTAAAGTACAGCAAAAGGAAAGAGTATAGAAAGTAAAGCTTCAATCACTAATGATGATGAT
CTAAGTACAGATTTGAA

FIGURE 8II

SEQ ID NO: 23 shows the sequence of the OmpA oligonucleotide adapter.

CGATTGAACTGGAGAACTTGGATTTCGGCGGAACTTCTCTGGGAAATAG

SEQ ID NO: 24 shows a cassette encoding intergenic sequence 1 (IGS1) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCCAGASTCTTAATCAACAAG

SEQ ID NO: 25 shows the oligonucleotide cassette encoding intergenic sequence 2 (IGS2) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCCAGASTCTTAAAAATCAAGAAC

SEQ ID NO: 26 shows a cassette encoding intergenic sequence 3 (IGS3) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCCAGASTCTTCAAGGACGAAAAAATAAATCAAGAAA

SEQ ID NO: 27 shows a cassette encoding intergenic sequence 4 (IGS4) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCCAGASTCTTCAAGCCACTTATATATATCAAGAAA

SEQ ID NO: 28 is the DNA sequence of the wild-type FkpA gene.

ATGAAA TCAATGCTT AAASTAACGTTTCT GAGCAGCAGCAATGGCTT TGGCTTTRIA TGGACCAAT TACCTTCT
 TCT GCT HAARCT TGA AAAATC TCT ACAGCT GC GACAGTAAAGGACAGCTT TAAAAA TTAGGA TTAGAAA TCA
 TCT TAT GUAATGAGT GCT TCGTGGG TCGT TATATGGA AAACTCT T TAAAAAATUAAA AAAAAAT GGGTATCT
 AAATCGA LAAGAC TACCTCATCGCTCGCTGT TCAAGGATGCATT TCGCTGATAGAGCCAAACT CTCCGACCAA
 GAGATCGAAGCAACT CTACAGGCA TTCGAAAG TCGCTCAACTC TCGCTG TCAAGCCGAACAT GGAAAAAGAC
 CGCCCT GAAACGAAATCAAAGG LAAGAG TCGCCGCAAAAT TCGCAAGAGAAAGCTCT GAAAACTCT
 TCAACT GGTCTGCT TAT CAGCTAGTAGAAGCCGGLAAAGCCGAAAGCCGCGAAGAGACAGCGA TAC GGT TGLA
 GTCGAC TACAAAGG LAAGCTCATCGACGGLAAAGAG TTCGACAACTCGTACAGCCCG TCGTGAAGCCGCT TTCCT
 TTCGCT CTGCAAGGCT TATCTCGCCGCT TCGACAGAAAGCTCT GAAAGACT GAGAGAAAGCCCG TAAAGT GAAA
 CTGCTTATCTGACAGAACTCGCT TACCGCAAGAGCCGCTCT TCGCCGCTTCCGACCGAATTC TACCGCTCGCTG
 TCTCAGCTAGCTCTCTGCACTCTCAAGCCAGCCCGCCAGCCGCT GATCGAAGCCCGAAGCTTGA TCGCAAGCC
 CGACAT TCGCTAAAAA

SEQ ID NO: 29 is the protein sequence of the wild-type FkpA gene.

MKSLKQVTL IAT TMAVAT IAPIT TFAAF AAKPA TAADEKKAAPKN TDKHAYALGAAI GNYMTNSEL KEGTII GY
 FLKEDQL IAHVQDAPY TKKXLEKGET EQCT QAPFRARYKSEGAQAKMEKDAADHTA GGERSEK TAKERGAVKES
 STGLVYQVVEAGDGEAFKDSDTVVVNERGGL IDGKEFDKSYT DGEPLHFRLDGVI FHWEEGLRNKKGAKKIK
 LVLPFLAYHKAVVSEIF PNH TLVTEVELLQV KPAKADAKKPEADAKARDNAKK

SEQ ID NO: 30 is the DNA sequence of the FkpA his tagged gene.

ATGAAATCACTGTTTAAASTAAGCTGCTGCTGGGCAACCAATGCGCCTTGCCTTGCCTGCAGGCAACCAATCACTTCT
 CCTGCTGAAAGCTGCAAAAAGCTGCTACTGCTGCTGCTGACAGGCAAAAGCAAGCTTCAAAAATGACGATCAGAAATCA
 GCTTATGCACTGCGTGGCTGCGCTGCGTGGT TACTTGGAAAAC TCTTAAAGAAACAAGAAAAGCTGGGCTC
 AAATCGA TAAAGATCAACTGATCGCTGGTGT TCAAGGATGCATT TCGTGA TAAAGACCAACTCTCGACCAA
 GAGTCCAGCAGACTCTAGAAAGCA TTTGAAAGCTGCGCTGAAGTCTTCTGCTGAGGCGAAGATGGAAAAGAG
 CGCGCTGATTAACGAAAGCAAAAGGTAAAGAGTACCGCAGAAATTTCCGAAAGAGAAAGCTGTGAAACCTCT
 TCAACTGGCTGCTGCTTATCAGCTAGTAGAAGCCGCTTAAAGCCGAAAGCAAGCAAGACAGCGATAC TGT TGT
 ATAAAC TAAAGAGTACGCTTATCGAGCTTAAAGAGTTTCAAGCAATCTTACAGCTGCTGCTGAAAGCTTCT
 TTCTGCTCTGAGCGCTGCTATTCGCGCTTGGGCAAGAGTCTGAAAGCACTTCAAGAAAAGCGCTGTAAGATAAA
 CTAGTTATTCGACCAAGAACTGCTTACCGCAAGAGCGTGTCTCCGCGCTTCCGCAAAATTC TACCGCTGCTG
 TTGACCTAAGCTGCTGAT TGTAAAACGAGCGCGAAGCTTGA TCGAAAAGCGCAAGCTTGA TCGAAAAGCT
 CGAGCTCTGCTAAAAACAGCAATCAAGCTGAGGAC

FIGURE 8II

SEQ ID NO: 23 shows the sequence of the OmpA oligonucleotide adapter.

CGATTGAACTGGAGAACTTGGATTTCGGCGGAACTTCTCGGAAATAG

SEQ ID NO: 24 shows a cassette encoding intergenic sequence 1 (IGS1) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCAGAGATCTTAATCAACAAG

SEQ ID NO: 25 shows the oligonucleotide cassette encoding intergenic sequence 2 (IGS2) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCAGATCTTAAAAATCAAGAAC

SEQ ID NO: 26 shows a cassette encoding intergenic sequence 3 (IGS3) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCAGAGATCTTTGAGGACGAAAAAATCAAGAAA

SEQ ID NO: 27 shows a cassette encoding intergenic sequence 4 (IGS4) for E. coli Fab expression.

AACCTTCTAAATACAGCAGATCTTTCAGCCACCTATATATATCAAGAAA

SEQ ID NO: 28 is the DNA sequence of the wild-type FkpA gene.

ATGAAA TCAATG CTT AAASTAACGCTTCT GAGCAGCAGCAATGGCTT TGGCTTTRIA TGGACCAAT TAC CTT TT
 KTT GCT HAARCT GAAAAAATC GCT ACAGCT GC GACAGTAAAGGAGAGCTT TAAAAA TTAGGA TTAGAAA TCA
 KTT TAT GUAATGGAGT GCT TCGCTGGG TGGT TATATGGAAGAACTCT TAAAAAATAAAGAAAAAT GGGTATCT
 AAATCGAALAAAGAT CAGCTCATCGCTGGCTGT TCAAGGATGCATT TCGCTGATAGAGCCAAACT CTCGGACCAA
 GAGATCGAAGCAACT CTACAGGCAATTCGAAGC TCGCTCAACTC TCGCTG TCAAGCCGAACAT GAAAAAGAC
 CGCTCT GATACCGAAGCAAAAGGCLAAGAG TCGCTCGAAGAAAT TCGCAAGAGAAAGCTCT GAAAACTCT
 TCAACT GCTCTGCT TAT CAGCTAGTAGAAGCCGGTAAAGCCGAAAGCAGC GAAAGACAGCGA TAC GGT TGLA
 GTCGAC TACAAAGCLACCTCATCGACCGTAAAGAG TCGACAACTCGTACACCGCT TCGTGAAGCCCT TTCCT
 TTCCTCTCGACCGCTCTTATCGCTGGT TCGACAGAAAGCTCT GAAAGACT GAAAGAAAGCCCGT TAAAGT GAAA
 CTCTCTATCGACAGAACTCGCT TACCGCAAGAGCCCGCTCT TCGCTGCTTCCAGCTGAACTC TACCGCTGGCT
 TTTACCTAGACTCTCTGCACTCTCAAGCCAGC GCGCAAGCCCT GATCGAAGCCCGAAGCTTGA TCGCAAGCC
 CGAAT TCGCTAAAAA

SEQ ID NO: 29 is the protein sequence of the wild-type FkpA gene.

MKSLKQVTL IAT TMAVAT IAPIT TPAFAAKPA TAADEKKAAPKN DDKHAYALGAAI GNYMTNBI KEGTII GY
 ELKEDQL IAHVQDAPY TKKX LKXGET EQCT QAPFRARYKSEGAQKMEKDAADHTA GGERSEK TAKERGVKCY
 STGLVY QVVEAGDGEAFKDSDTVVVNERGEL IDGKEFDKSYT DGEPLHFRLDGVI FHWEEGLRNKKKAKKII
 LVDPFLAYHKAVVSEI FPHITLVTEVELLQVKPAPKADAKKPEADAKARDNAKK

SEQ ID NO: 30 is the DNA sequence of the FkpA his tagged gene.

ATGAAATCACTGTTTAAASTAAGCTGCTGCTGGCAGCCCAATGCGCTT GCGCTGCGCTGCGAGCCACCAATCACTTCT
 GCTGCTGAAAGCTGCAAAAAGCTGCTACTGCTGCTGCTGACAGCGCAAGCGAGCTTCAAAAATGACGATCGAAGATCA
 GCTTATGCACTGCGTGGCTGCGCTGCGTGGT TACTGGAAGAAC TCTTAAAGAGAACAAAGAAAGCTGGCGCTC
 AAATCGAALAAAGATCACTGATCGCTGGTGT TCAAGGATGCATT TCGCTGATAGAGCCAAACTCTCGACCAA
 GAGATCGAAGCAACTCTACAGGCAATTCGAAGC TCGCTCAACTC TCGCTG TCAAGCCGAACAT GAAAAAGAC
 CGCTCT GATACCGAAGCAAAAGGCLAAGAG TCGCTCGAAGAAAT TCGCAAGAGAAAGCTCT GAAAACTCT
 TCAACT GCTCTGCT TAT CAGCTAGTAGAAGCCGGTAAAGCCGAAAGCAGC GAAAGACAGCGA TAC GGT TGLA
 GTCGAC TACAAAGCLACCTCATCGACCGTAAAGAG TCGACAACTCGTACACCGCT TCGTGAAGCCCT TTCCT
 TTCCTCTCGACCGCTCTTATCGCTGGT TCGACAGAAAGCTCT GAAAGACT GAAAGAAAGCCCGT TAAAGT GAAA
 CTCTCTATCGACAGAACTCGCT TACCGCAAGAGCCCGCTCT TCGCTGCTTCCAGCTGAACTC TACCGCTGGCT
 TTTACCTAGACTCTCTGCACTCTCAAGCCAGC GCGCAAGCCCT GATCGAAGCCCGAAGCTTGA TCGCAAGCC
 CGAAT TCGCTAAAAA

FIGURE 8I

SEQ ID NO: 31 is the protein sequence of the HkpA his tagged gene.

MKSLFKVILLATTYVALHAPITFAMLEAKPATAADSKAAFKNDGQKGAVALGASLGRYMEKSLKEDQKLCI
KLDKDKQLIACVQURFADKSKLSDQELIQTLQAFEARVKSQAQAQMERKDAADNEAKOKEYREKFAKERQVKS
STGLVYQVVEACKGEAPKDSCTVVVNZKCLLDCKEFDNSYTRCEPLSEFLDGVIFQWDECLNINIKKQKIK
LWIFPELAYCKACVPSGIFPNSCLVPTVVELLDVKKFAFKADAKFSAKAKGADGAKREHHHE

SEQ ID NO: 32 is the DNA sequence of the wild-type *skp* gene.

CTCAAAAACCTGCTTATTACCTCCAGCTCTGCTTTTACCACTCCCAACTCTCTCTCCAGCCCTCCCAAAAAT
GCATLCCLCACCAATGCGCACCCCTCTCCAGCAGCTTACCCGCAAAAACCCCTCTCTCTCTCTCAACACCCCTCAAAAAT
GAGTCCAAAGGCGCTGCCAGCGAAGCTGCAAGGATATGGAAACCGATCTCCAGGCTAAAAAGAAAAGCTGCAG
TCCALGAAAGGCGKVAAGGATGCAACLAAGALGAAAAAAGAGTGAATGCTGAGGAGCAAACTCTCTCTCAAG
AAAGGCGAGGCTTTGAGCAGGATGCGGCAAGTCCCTCCAGAGAAAGAGCGGCGCAAACTGGTTACTCTGALC
CAACTGCTGTGAAAACCTCTCCCAAGCGCAGGATATGATCTGCTGTCTCTCTCAAGACCCCTCTCTCTCA
AAGAGCAGCGATGTAAAAGACATCACTCCGAGCTACTGAAAACAGGTTAAATAA

SEQ ID NO: 33 is the protein sequence of the wild-type *skp* gene.

MKHTLAAGLITMATAACAADITAVMKATTCQVAQKQVSNITLENEKQKASELQRMETLQAKYKALQ
SKRAGEIRTKLERQVSAQCGTFAKKAQAFEQDRAKLSPEELKGLVTRIQAVKSVLSQELDLVVDANAVAY
NSEDVKDITADVLSQVKEHHHE

SEQ ID NO: 34 is the DNA sequence of the *skp* his tagged gene.

ATGAAAAGTGGTATTATAGCCGCGAGGCTCTGGTTTACCACTGCAACTCTCTCTCCAGCCCTCAAAAAT
GCATCTCTCAACATGCGCACCCCTCTCCAGCAGCTTACCCGCAAAAACCCCTCTCTCTCTCAACACCCCTCAAAAAT
GAGTCCAAAGGCGCTGCCAGCGAAGCTGCAAGGATATGGAAACCGATCTCCAGGCTAAAAAGAAAAGCTGCAG
TCCALGAAAGGCGKVAAGGATGCAACLAAGALGAAAAAAGAGTGAATGCTGAGGAGCAAACTCTCTCTCAAG
AAAGGCGAGGCTTTGAGCAGGATGCGGCAAGTCCCTCCAGAGAAAGAGCGGCGCAAACTGGTTACTCTGALC
CAACTGCTGTGAAAACCTCTCCCAAGCGCAGGATATGATCTGCTGTCTCTCTCAAGACCCCTCTCTCTCA
AAGAGCAGCGATGTAAAAGACATCACTCCGAGCTACTGAAAACAGGTTAAATAA

SEQ ID NO: 35 is the protein sequence of the *skp* his tagged gene.

MKRLLAAGLGLALATSAQAADKLAIVMKSLEQVAQKQVSNITLENEKQKASELQRMETLQAKYKALQ
SKRAGEIRTKLERQVSAQCGTFAKKAQAFEQDRAKLSPEELKGLVTRIQAVKSVLSQELDLVVDANAVAY
NSEDVKDITADVLSQVKEHHHE

CA170-1519 Ab sequences**CDRH1**

STTTRKYGVV SEQ ID NO: 36

CDRH2

YIDSQDNTYYRDSVKC SEQ ID NO: 37

CDRI3

SLVDFELY SEQ ID NO: 38

CDRI1

RSSDHLVGRAGKTYTY SEQ ID NO: 39

CDRI2

LVSFLSS SEQ ID NO: 40

CDRI3

LQCTHFFIT SEQ ID NO: 41

FIGURE 8I

SEQ ID NO: 31 is the protein sequence of the HkpA his tagged gene.

MKSLFKVILLAMTYVALHAPITFAMLEAKPATAADSKAAFKNDGQKGAVALGASLGRYMEKSLKEQKLCI
KLDKDQLIACVQDAEPADKSKLSDQELIQTLQAFEARVKSQAQAQMEKDAADNEAKCKEYKREKFAKERKQVKS
STGLVYQVVEACKGEAPKDSCTVVVNZKCLLDCKEFDNSYLRCEPLSEFLDGVIFQWDECLKNIKKQKIK
LWIFPELAYCKACVPGIPEFNSCLVFTVVELLDVKFAFKADAKFSAKAKGADGAKREHHHE

SEQ ID NO: 32 is the DNA sequence of the wild-type *skp* gene.

GTCAAAAAGCTGCTTATTACCTCCAGCCTCTGCTTTTACCACTCCCAACTCTCTCCACGCCCCCTCACAAAAT
GCATLCCGCAACATGCGCACGCTGCTTCCGAGCAGCTTACCGCGCAAAAACCGCTCTCTCTCTCAACAGCCCTCAAAAAT
GAGTCCAAAGGCGCGTCCGAGCGCAACTCCAGCGGTATGGAAACCGATCTCCAGGCTAAAATGAAAAGCGTGCAG
TCCALGAAAGGCGKGAAGGATGCAACLAAGALGAAAAAAGCAATGATNGCTGKGGGCAAGACTCTCTCTGAG
AAAGGCGAGGCTTTGAGCAGGATCGGCGCAAGTCCCTCCAAAGCAAGACGCGGCAAACTGGTTACTCTGALC
CAACTGCTGTGAAAACGCTCCCAACCGKCGCAGGATATCGATCTGNGTCTCTTCACTGCAGAGCGCGTCTCTTAC
AAGAGCAGCGGATGTAAAAGCATCACTCCGAGCGTACTGAAAACAGGTTAAATAA

SEQ ID NO: 33 is the protein sequence of the wild-type *skp* gene.

MKHTLAAAGLGTATATSAQAADITAVMKATTCQVAQKCGVSNITLNEEIKKASELQRMETLQAKYKALQ
SKRAGSERIKLERQVSAQCGTFAKKAQAFEGQWALRSEELKGLVTRIQAVKSEVALSQELDLVVDANAVAY
NSEDVKDITADVLKQVKE

SEQ ID NO: 34 is the DNA sequence of the *skp* his tagged gene.

ATGAAAAGTGGTTATTAGCCGCGAGGCTCTGGGTTTACCACTCCCAACTCTCTCTCAAGCGCGCTGACAAAAT
GCATCTCTCAACATGCGCACGCTGCTTCCGAGCAGCTTACCGCGCAAAAACCGCTCTCTCTCTCAACAGCCCTCAAAAAT
GAGTCCAAAGGCGCGTCCGAGCGCAACTCCAGCGGTATGGAAACCGATCTCCAGGCTAAAATGAAAAGCGTGCAG
TCCALGAAAGGCGKGAAGGATGCAACLAAGALGAAAAAAGCAATGATNGCTGKGGGCAAGACTCTCTCTGAG
AAAGGCGAGGCTTTGAGCAGGATCGGCGCAAGTCCCTCCAAAGCAAGACGCGGCAAACTGGTTACTCTGALC
CAACTGCTGTGAAAACGCTCCCAACCGKCGCAGGATATCGATCTGNGTCTCTTCACTGCAGAGCGCGTCTCTTAC
AAGAGCAGCGGATGTAAAAGCATCACTCCGAGCGTACTGAAAAGGTTAAAGCAATCAACAG

SEQ ID NO: 35 is the protein sequence of the *skp* his tagged gene.

MKRLLAAGLGLALATSAQAADKLAIVMKGSLFCQVAQKCGVSNITLNEEIKKASELQRMETLQAKYKALQ
SKRAGSERIKLERQVSAQCGTFAKKAQAFEGQWALRSEELKGLVTRIQAVKSEVALSQELDLVVDANAVAY
NSEDVKDITADVLKQVKEHHHE

CA170-1519 Ab sequences**CDRH1**

STTTRKYGVV SEQ ID NO: 36

CDRH2

YIDSQDNTYYRDSVKC SEQ ID NO: 37

CDRI3

SLRDELEY SEQ ID NO: 38

CDRI1

RSSDHLVGRAGKTYTY SEQ ID NO: 39

CDRI2

LVSFLSS SEQ ID NO: 40

CDRI3

IQCTHFFIT SEQ ID NO: 41

FIGURE 8J

Rat Ab 1519 VL region SEQ ID NO: 42
 DVVMCQQLPS LSVALCQPAE ISCKSEQSILV GASCKTYLYW LFQRSCQSPK RLILYLVSTLD
 SSTPDRFSSB GATTDPTLIT RVTADDTLEV YVCLQSTLFF TTPGASTKLR LL

Rat Ab 1519 VL region SEQ ID NO: 43
 gatgtatgta tgaaccagaa caaacatgac atgtatggatg caacttggaa accagactac
 a.c.c.c.l.gae agtcaagtaa gagactcglc ggtag.c.gtg gaagacata UUGLALGG
 ttaactaaga gttccaggca gtctccaaag caactaacct atctgggtgc caacttggac
 tcttgaatcc ctgataggat caatggcagt ggagcagaga cagatattac tcttataaac
 ccagagctgg aagccgatga U.gggagtl lal.aatgcl tgaagglac acattllccl
 caaactgttg gagctggaa caagctggaa atgaaa

Rat Ab 1519 VL region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 44
*MSPAQFLFLMLNIQSTSCDVMCQQLPS*LSVALCQPAEISCKSEQSILVCA~~SC~~CKTYLYWLFQRSCQSPK
 RLILYLVSTLDSTPDRFSSBGAETDPTLITRVTADDTLEVYVCLQSTLFFTPGASTKLRLL

Rat Ab 1519 VL region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 45
atgtatggtc atgtatggtt caacttctctg atgtatgctt *ggatccaggy aaccaggtgt*
 gatgtatgta tgaaccagaa caaacatgac atgtatggatg caacttggaa accagactac
 a.c.c.c.l.gae agtcaagtaa gagactcglc ggtag.c.gtg gaagacata UUGLALGG
 ttaactaaga gttccaggca gtctccaaag caactaacct atctgggtgc caacttggac
 tcttgaatcc ctgataggat caatggcagt ggagcagaga cagatattac tcttataaac
 ccagagctgg aagccgatga U.gggagtl lal.aatgcl tgaagglac acattllccl
 caaactgttg gagctggaa caagctggaa atgaaa

Rat Ab 1519 VII region SEQ ID NO: 46
 EVPLVEBQCC SVQFQRSMKL SCVVSCTFFS NYCMVWRQA FKKCLEWVAY IDSDCDNTYY
 KSRVKGRTPL RKNNAKSTLY QMDSLRSED ATPTCTTGI VRPELYWGGI TVLVS

Rat Ab 1519 VII region SEQ ID NO: 47
 gaggtgcage tggatggatc tggggggggg caagtgcage ctggtgagtc catgaaactc
 lccclqqqlaq lclcaqaact caclllcaql aal.la.gga lqq.c.cqqql ccpccaqqcl
 caaagaaag gttctggatg ggtccatct attgactctg ctggtgatcc taacttctac
 ccagatctcg tgaagggcag atcaactatc caagaaata ctgcaaaag caactatct
 l.cqaatlaq acaqctcaq ctctcagga accqaactt al.lacqlac aacagqqact
 g.cggg.cct ttctctatg gggcaagga uccagggca ccgtctcg

Rat Ab 1519 VH region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 48
*NDSTGLAFI VLRKGVRCF*VELMRSQGS VQFQRSMKL CVVSCCTTSH YCMVWRQAP
 KKCLEWVAYI DSDCDNTYYR GSVKGRFDI RNNAKSTLYL QMDSLRSED ATPTCTCTIV
 KPELYWGGI TVLVS

Rat Ab 1519 VII region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 49
agggaatca gtctcagctt *gacttctctt* *gacttcttca* *taaaaggtgt* *ccgttggag*
 qqccclclaq l.cqacl.c.laq qqccclca ql.c.cagcl.c qqaaqqal qaactcl.c
 tcttctatct caggatctcc atcaagtat catggatgg totggtctcg ccaggtctca
 aqaagggc tcaagtggct cgaatata gatctcagc gtgataatac ttaactaaga
 gal.c.cglga eggccga.l caclal.c.c agaa.la.lg caaaagca cclal.c.l.g
 caaatggaa gtctcaggtc agaggacag gcaactatc actgtatac aggatctga
 ccgccc.l.c lala.l.ggg caaaggaac accgclccc lclcg

FIGURE 8J

Rat Ab 1519 VL region SEQ ID NO: 42
 DVVMCQQLPLS LSVVALCQPAE ISCKSEQQLV GASCKTYLYW LFQRSCQSPK RLILYLVSTLD
 SSTPDRFSSB GATTDPTLIT RVTADDTLEV YVCLQSTLFF TTPGASTKLR LL

Rat Ab 1519 VL region SEQ ID NO: 43
 gatgtatgta tgacccagaa cccactgctc atgtcgggtg cccctggaca accagctctc
 a.c.c.c.l.gse agtcaagtaa gagcctcglg ggtag.c.gtg gaaagacata UUGLALGG
 ttaactaaga gctccggaca gtctccaaag cgaataactc ctctgggtgc caccctggac
 tctgqaatac ctgataagct ccgtcgcagt ggagcagaga cagatattac tcttataaac
 ccagagctgg aagccgatga U.gggagtl lal.lactgcl tgaagglac acattllccl
 cacactgttg gagctggaa caagctggaa atgaaa

Rat Ab 1519 VL region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 44
*MSPAQFLFLMLNIQSTSCDVMCQQLPLSV*VALCQPAEISCKSEQQLV GASCKTYLYWLFQRSCQSPK
 RLILYLVSTLD SSTPDRFSSB GATTDPTLIT RVTADDTLEV YVCLQSTLFF TTPGASTKLR LL

Rat Ab 1519 VL region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 45
atgtatgctc atgtccagct cccctttctg ctatctgctc ggatccaggy aaccagctgt
 gatgtatgta tgacccagaa cccactgctc atgtcgggtg cccctggaca accagctctc
 a.c.c.c.l.gse agtcaagtaa gagcctcglg ggtag.c.gtg gaaagacata UUGLALGG
 ttaactaaga gctccggaca gtctccaaag cgaataactc ctctgggtgc caccctggac
 tctgqaatac ctgataagct ccgtcgcagt ggagcagaga cagatattac tcttataaac
 ccagagctgg aagccgatga U.gggagtl lal.lactgcl tgaagglac acattllccl
 cacactgttg gagctggaa caagctggaa atgaaa

Rat Ab 1519 VII region SEQ ID NO: 46
 EVPLVEBQCC SVQFQRSMKL SCVVSCTFFS NYCMVWRQA FKKCLEWVAY IDSDCDNTYY
 KSRVKGRTPL RKNNAKSTLY QMDSLRSED ATPTCTTCI VRPELYWGGI TVLVS

Rat Ab 1519 VII region SEQ ID NO: 47
 gaggtgcage tggctggagt tggggggggg ccagtgcage ctggygagtc catgaaactc
 lcc.lqq.laq lcl.cagqact cact.l.cagtl aal.la.lgga lqq.l.cagql ccgcccagql
 ccagagaaag gtctggagtg ggtccgatat attgactctg ctggytataa taacttctac
 ccagactccg tgacgggycg atccactatc ccagaaata ctgpaaaag caccctatat
 l.cqaal.laq a.aq.c.cag qf.ct.cagga accgcaactt al.l.caglac aacagqqacl
 g.cggg.cct ttctctatg gggccagga uccagggca ccgtccg

Rat Ab 1519 VH region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 48
NDTSLGAFI VLRTRKVRCT VFIMRSGGGS VQFQRSMKL CVVSGTDTSN YCMVWRQAP
 FKKCLEWVAYI DSDCDNTYYR GSVKGRFDI RNNAKSTLYL QMDSLRSED ATPTCTTCIV
 KPELYWGGI TVLVS

Rat Ab 1519 VII region with signal sequence underlined and italicised SEQ ID NO: 49
agggaactca gtctcagctt gctttctctt gctctctca taagaggtgt ccggtggag
 qqccccl.laq l.cagql.l.laq qqccccl.ca qf.ct.cagql qqaqqccal qaactcl.ccl
 tctgtatgt ctggatctcc atccagtaat catggatgg totggytccg ccaggtctca
 aqaagggac t.caggtggct cgaatatat gattccagtc gtgataatac ttaactaaga
 gal.l.cagtg agggccgcl cact.l.c.c agaa.l.a.lg caaaagcac ccl.l.l.l.g
 caatggaca gtctcaggtc agaggacag gcaactatc actgtataac agggatggac
 ccgccc.l.ccl lcl.l.l.ggg ccagggaacc accgllccc lclg

FIGURE 8K

1519 gL20 V-region SEQ ID NO: 50

DQGRFQSPFS LQASVQDRVL TLCKSSQSLV GASSGKTYLW LFQKPKKPK KLIYLVSTLL
 SIFSRFSSG GGRFTRFLTL SLLQPEDFAI FYCLQGTHTF HTFGQTKLE LK

1519 gL20 V-region SEQ ID NO: 51

qala lcaaga laacccaaqa lcaaaagaa clclccqca gcltaagqa lcaqlcacl
 clclccqca aaagccca qclccclqclq qcltaagqa gcaaaacclla cclqtaclqg
 clclccqca aaagccca qcltaagaa cclclqclcl clclqclcl lccclqcl
 agccltclcc ccltclclcl clccclqca gcltaagqa cclclclcc ccltclclcl
 agclccclcc agclccclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc
 cclclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc

1519 gL20 V-region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 52

MKYTAFAFAVALASFA *TVQADTQMTQGRSRLQASVQDRV* *TTCRKSQSLV* *QASGKTYLW* *LFQKPKKPK* *KLIYLVSTLL*
LVTVVATLDSGTRFRFSRSGSGTTELTLSLLQPEDFAI *FYCLQGTHTF* *HTFGQTKLE*

1519 gL20 V region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 53

argaaaaaga *cagctatogo* *aattgcagtg* *gcoctgcyng* *gtttccgca* *gcltagcga*
gcltagatcc *agatgaccca* *gactcaagc* *agclclclcl* *ccagccltag* *agclclclcl*
actallacc *qlaaaaqcl* *ccagclclcl* *qlccclclcl* *gclcccaaaa* *clclclclcl*
lccclclcl *agaaacclcc* *caaaqclcl* *aaacclclcl* *lclclclcl* *qlclclclcl*
qclclclcl *lclclclcl* *lclclclcl* *agclclclcl* *qlclclclcl* *agclclclcl*
clclclclcl *agclclclcl* *agclclclcl* *agclclclcl* *agclclclcl* *agclclclcl*
agclclclcl *agclclclcl* *agclclclcl* *agclclclcl* *agclclclcl* *agclclclcl*

1519 gL20 light chain (V + constant) SEQ ID NO: 54

DQGRFQSPFS LQASVQDRVL TLCKSSQSLV GASSGKTYLW LFQKPKKPK KLIYLVSTLL
 SIFSRFSSG GGRFTRFLTL SLLQPEDFAI FYCLQGTHTF HTFGQTKLE IKRVAATRV
 PTFPRDQQL KSGTASVVC LLNNEYPRRAI VQKIVDHALG SGNSSQSRVTT QGSKDSTYSL
 SST TL SKAD YRNTKVVYACT VTIQGI SGFV TRGTRRGTG

1519 gL20 light chain (V + constant) SEQ ID NO: 55

gata lcaaga laacccaaqa lcaaaagaa clclccqca gcltaagqa lcaqlcacl
 actaaccqca aaagccca qclccclqclq qcltaagqa gcaaaacclla cclqtaclqg
 clclccqca aaagccca agcltaagaa cclclqclcl clclqclcl lccclqcl
 agclclclcl cclclclclcl clclclclcl qcltaagqa cclclclclcc clclclclcl
 agclccclcc agclccclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc
 cclclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc
 clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc
 cclclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc
 cclclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc
 gclccclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc clclclclcc

1519 gL20 light chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 56

MKYTAFAFAV *ALASVATVQ* *ADIQMTQSPS* *FLQASVQDRV* *TTCRKSQSLV* *QASGKTYLW*
LFQKPKKPK *KLIYLVSTLL* *DQGRFQSPFS* *QGRFTRFLTL* *TLCKSSQSLV* *QASGKTYLW*
HTFGQTKLE *IKRVAATRV* *VTFPRDQQL* *KSGTASVVC* *LLNNEYPRRAI* *VQKIVDHALG*
SGNSQSRVTT *QGSKDSTYSL* *SST TL SKAD* *YRNTKVVYACT* *VTIQGI SGFV* *TRGTRRGTG*

FIGURE 8K

1519 gL20 V-region SEQ ID NO: 50

DQGRFQSPFS LQASVQDRVL TLCKSSQSLV GASSGKYLYW LFQKPKKPK KLIYLVSTLL
 SRIFSRFSGS GGRFTRFLTL SRIQPEDFAI FYCLQGTHTF HTFGQTKLE LK

1519 gL20 V-region SEQ ID NO: 51

qala lcaaga laaccccaqaa lcaaaagaaq clclcccaaa gcaaaagaaa lcaqlcaact
 a lcaaaagaa aaagcccaaa qlcaaaagaa qclcaaaagaa gcaaaaccaa caqlcaactg
 clclcccaaa aaagcccaaa aqclcaaaagaa caclcaaaagaa clclcaaaagaa lcaaaagaaa
 aqcaaaagaa aqcaaaagaa clcaaaagaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa
 aqcaaaagaa aqcaaaagaa clcaaaagaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa

1519 gL20 V-region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 52

MKYTAFAFAVALASFA TVQADTQMTQGRSRI LAASVQDRV TLCKSSQSLV GASSGKYLYW LFQKPKKPK KLIYLVSTLL
LTFTVRI VSRLDGR TRRFSRFS GRFTRFLTL SRIQPEDFAI FYCLQGTHTF HTFGQTKLE LK

1519 gL20 V region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 53

argaaaaaga cagctatogo aattgcaagt gcaatgcaag gtttccgaaa gctagagaaa
gatgatatac agatgaccca gactcaaaag actctcaaaag caagcctagc agatcctagc
 actallaacl qlaaaaagcl caagcaaaag clcaaaagaa caaaagaaa caaaagaaa
 lcaaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 qalcaaaagaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa

1519 gL20 light chain (V + constant) SEQ ID NO: 54

DQGRFQSPFS LQASVQDRVL TLCKSSQSLV GASSGKYLYW LFQKPKKPK KLIYLVSTLL
 SRIFSRFSGS GGRFTRFLTL SRIQPEDFAI FYCLQGTHTF HTFGQTKLE IKRIVAAATSV
 PTFPRDRQL KGRTASVVC LLNNEYPRRAI VQKIVDMALQ SGRSGRNVTT QGSKDSTYSL
 SST TL SKAD YRNTKVVYACT VTIQGI SGFV TRKTRRGTG

1519 gL20 light chain (V + constant) SEQ ID NO: 55

gata lcaaga laaccccaqaa lcaaaagaaq clclcccaaa gcaaaagaaa lcaqlcaact
 a lcaaaagaa aaagcccaaa qlcaaaagaa qclcaaaagaa gcaaaaccaa caqlcaactg
 clclcccaaa aaagcccaaa aqclcaaaagaa caclcaaaagaa clclcaaaagaa lcaaaagaaa
 aqcaaaagaa aqcaaaagaa clcaaaagaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa
 aqcaaaagaa aqcaaaagaa clcaaaagaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa gcaaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa
 caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa caaaagaaa

1519 gL20 light chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 56

MKYTAFAFAV ALASFAFAV ADIQMTQSPS FLASVQDRV TTLCKSSQSL VSASSGKYLY
WLFQKPKKPK KKLIYLVSTL DQGRFQSPFS QGRFTRFLTL ISRIQPEDFA FYCLQGTHTF
HTFGQTKLE IKRIVAAAPS VRIFSRFSGS LRGRTASVVC LLNNEYPRRAI RVQKIVDMAL
QGRSGRNVTT EQDSKLSLYS LSRULTLSKA DYKAKVYAC SVTRQGLSSP VTKSFRGEC

FIGURE 8L

1519 gL20 light chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 57

a.gaaaaaga *ca*gclatagc *a*allgcaglg *gc*lllggclg *gl*lllgeclac *cg*lgeggca
*g*atyatatec *ag*atgaccca *g*agtecaagc *g*ytetctccg *cc*agcgtagg *cg*atcgggtg
*a*clallaaccl *gl*aaaagclc *cc*aglcocclg *g*lggglgca *gg*ggcaaaac *cl*acclglac
*t*ggetctcc *ag*aaaocggg *ca*agytccg *aa*ccgctga *cc*tatatcgt *gt*tatccctg
*g*atagcggta *ct*ccgctccg *ct*cccccggc *ag*ccgtagg *gt*accgaant *cc*gctgacc
*a*llagclccc *cc*agccggg *gg*accllgec *ac*clalact *gc*clccaggg *cc*clactcl
*cc*gacacact *cc*ggccagcg *ta*ccaaactg *ga*aatcaaac *gt*accgtagc *gc*cccacac
*g*clclalcl *cc*ggccclc *lg*alggccg *lg*aaaclcg *gc*clggclc *lg*lllglygc
*cc*gctgaata *ac*cccacac *ca*gagagcc *aa*actacagc *gg*aggtgga *ta*agccctc
*ca*lccggla *ac*lccggg *g*aglylcaa *g*agcaggca *gc*agggagc *cc*clccagc
*cc*agcagca *cc*ctgacct *g*agcaaacg *g*actacaga *aa*caaaaagt *ct*agccctg
*ga*aglcaccc *at*ccgggcl *g*agclccca *g*lcccaaaa *gl*lllclag *gg*ggagclg

1519 gH20 V-region SEQ ID NO: 58

EVPLVSSGGG *LV*QVGGSLRL *SC*AVSGCLFS *NY*GVVVRQA *LG*GLELVAY *LD*SLGNLYY
 RDGVKGRFTI *SR*DNKSSLY *LQ*MNSLRAD *TV*VYCTCTI *VR*PFLYWQQ *TL*VTVE

1519 gH20 V-region SEQ ID NO: 59

gaggllccgc *lg*glccagcl *lg*gagggcg *cl*lclccagc *cl*ggagggag *cl*gggclcl
 tctagtccg *ta*cttgctt *ca*gctctcc *aa*ctacggta *tg*ctgggggt *tg*ctaggtc
 ccagglacag *gl*clggagcl *gg*lccggcl *cl*lccclccg *ag*ggcgacac *cc*claccl
 ccgacactg *ta*aaaagctg *cc*ccaccatc *ta*cccgaca *ac*cccacac *ca*gctctac
 clgagatga *ac*agcclcg *lg*clgagcl *cl*lccgglyl *ac*cllgac *cc*clggclc
 gggctccgt *ct*ctgcttg *gg*gtccgggt *ac*ctctgta *ct*gtctcg

1519 gH20 V region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 60

NYKTAIAIAV *ALAGTATVQ* *AEVPLVSSGG* *CLVQPGSLR* *LSCAVSCTCT* *SNYGVVVRQ*
*LG*GLELVAY *LD*SLGNLYY *RDGVKGRFTI* *SR*DNKSSLY *LQ*MNSLRAD *TV*VYCTCTI
*VR*PFLYWQQ *TL*VTVE

1519 gH20 V-region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 61

a.gaaagaa *ca*gclatagc *a*allgcaglg *gc*gclagclg *gl*lllgeccac *cg*lggggca
*g*atyaagttc *ag*atcgtcga *g*atcggaggc *g*gctctctcc *ag*ctcggagg *g*agctcgtc
*a*clclclclg *ca*glalclcg *cl*lccacclc *cc*caacclag *cl*clclclg *gl*lllccclg
*g*atcaggtta *aa*ggtctcga *at*gggtcggc *ta*tattgact *cc*gacgggca *ca*acacctac
*ta*lccgact *cl*clgaaag *lg*ccclccac *cl*lccclgg *al*aacccaa *al*ccagcclg
*ta*ctcggca *ta*gacugct *g*gctcctgca *g*atcctcgg *tg*tactattg *cc*ccactggc
*a*clclcccl *cc*clclcl *lg*gggclcc *gl*lccclcg *cl*clclclc

1519gH20 Fab' heavy chain (V + human gamma-1 CII + hinge) SEQ ID NO: 62

EVPLVSSGGG *LV*QVGGSLRL *SC*AVSGCLFS *NY*GVVVRQA *LG*GLELVAY *LD*SLGNLYY
 RDGVKGRFTI *SR*DNKSSLY *LQ*MNSLRAD *TV*VYCTCTI *VR*PFLYWQQ *TL*VTVESSST
SGPSVPLAP *SR*KSTGGGLA *AL*GCLVRDYF *PE*PVLVSNNS *GAL*LSGVLLS *PA*VLQSSGLY
*SL*SSVTVRS *SL*ETQTYS *FN*NKFSNTR *WR*KVTRKSC *RT*HTQAA

FIGURE 8L

1519 gL20 light chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 57

a.gaaaaaga *ca*gclatagc *a*allgcaglg *gc*lllggclg *gl*lllgeclac *cg*lgegcga
*g*atyatatec *ag*atgaccca *g*agtecaagc *g*ytetctccg *cc*agcgtagg *cg*atcgtgty
*a*clallaaccl *gl*aaaagclc *cc*aglcocclg *g*lggglgca *gg*ggcaaaac *cl*acclglac
*tg*getentec *ag*aaaocggg *ca*agytccg *aa*ccgctga *cc*tatctggt *gt*ctacccy
*g*atagcggta *ct*ccgctccg *ct*cccccggc *ag*ccgtagg *gt*accgaant *cc*gctgacc
*a*tlagclccc *cc*agccggg *gg*accllgec *ac*clatlacl *gc*clccaggg *cc*claccll
*cc*gacacact *cc*ggccagcg *ta*ccaaactg *ga*aatcaaac *gt*accgtagc *gc*cccccac
*g*clcllatcl *cc*ggcccllc *lg*alggccg *lg*aaaclcg *gc*clggclc *lg*lllglygc
*cc*gctgaata *ac*cccatacc *ca*gagagccc *aa*acttaagt *gg*aggtgga *ta*agccctc
*ca*lcgggla *ac*lccggg *g*aglylcaa *g*agcaggca *gc*agggagc *cc*clccagc
*cc*agcagca *cc*ctgacct *g*agcaaaag *g*actacaga *aa*caaaaagt *ct*acgcccgc
*ga*aglcaccc *at*ccgggcl *g*agclccca *g*lcccaaaa *gl*lllaclag *ag*gggaglc

1519 gH20 V-region SEQ ID NO: 58

EVPLVSSGGG *LV*QVGGSLRL *SC*AVSGFLFS *NY*GVVWVQA *LG*GLELVAY *LD*SLGNLYY
 RDGVKGRFTI *SR*DNKSSLY *LQ*MNSLRAD *TV*VYCTTGI *VR*PFLWQQG *TL*VTVE

1519 gH20 V-region SEQ ID NO: 59

gaggllccgc *lg*glccaglc *lg*gaggggg *cl*lglccagc *cl*ggggggag *cl*gggclcc
 tctagtccg *ta*cttgctt *ca*gctctcc *aa*ctacggta *tg*gtggtggt *tg*ctaggtc
 ccagglacag *gl*clggaglc *gg*lgggcll *cl*lccclccg *ag*ggcgaaa *cc*claccll
 ccgacactg *ta*aaaagctg *cc*ccaccatc *ta*cccgaaa *ac*cccacac *ca*gctctac
 clgagatga *ac*agcclgg *lg*clgagcl *cl*lpggglyl *ac*cllgaa *cc*clggccl
 ggggtccgt *ct*ctgtattg *gg*gtccgggt *ac*ctctgta *ct*gtctcg

1519 gH20 V region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 60

NYKTAIAIAV *ALAGTATVAG* *AEVPLVSSGG* *GLVQPGGSLR* *LSCAVSCTTF* *SNYGVVWVRQ*
LDGGLLVVA *YLDSEGNLY* *YRDGVKGRFT* *LSRDNKSSL* *YLQMNLSRAD* *TVAVVYCTTGI*
IVRPFLLWQQ *TLVTVE*

1519 gH20 V-region with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 61

a.gaaagaa *ca*gclatagc *a*allgcaglg *gc*gclagclg *gl*lllgeccac *cg*lgggcgca
*g*atyaagttc *ag*atggtgca *g*atgagagg *g*gctctctcc *ag*ctggagg *g*agctgctg
*a*clclclclg *ca*gclclclg *cl*lccclcll *cc*caclccg *cl*clclclclg *gl*llclclcc
*g*atcaagta *aa*ggtctgca *at*gggtggc *ta*tattgact *cc*gagggca *ca*caacctac
*la*lccclcl *cl*clgaaag *lg*ccclcc *a*cllccclg *al*aaagca *a*lccclcl
*ta*ctgca *ta*caugct *g*gctgctgca *g*atctggy *tg*taactatg *cc*caactggc
*a*clclclcl *cc*clclclcl *lg*gggclcc *gl*lccclcl *cl*clclclcl

1519gH20 Fab' heavy chain (V + human gamma-1 CIII + hinge) SEQ ID NO: 62

EVPLVSSGGG *LV*QVGGSLRL *SC*AVSGFLFS *NY*GVVWVQA *LG*GLELVAY *LD*SLGNLYY
 RDGVKGRFTI *SR*DNKSSLY *LQ*MNSLRAD *TV*VYCTTGI *VR*PFLWQQG *TL*VTVESSAGT
SGPSVPLAP *SRKSTGGSLA* *ALGCLVVDYF* *PEPVLVSNNS* *GALLSGVELS* *PAVLQSSGLY*
SLSSVTVRS *SLLETQTYIC* *FNHKEFSNK* *WRKVVPRKSC* *DKTHTQAA*

FIGURE 8M

1519gH20 Fab' heavy chain (V + human gamma-1 CIII + hinge) SEQ ID NO: 63

```

gaggtacagc  tggteagagc  tggaggcggg  atagtcacagc  caggagggag  cctcagctcc
lcllgggag  lclclggcll  caagllclcc  aadlaagglc  lggclclggg  lclclggcll
ccaggtaaag  gtctygaatg  ggttyggtat  atagactcag  aaggcgassa  caactactat
cggagclclg  lgaaaag  lcg  clcaacccll  lccggagala  aagcaaalcl  cagccclglc
ctgcaagatg  acagcctgg  tyccgaagat  acggcggtgt  actactyca  caagggcacc
ctgagcagct  ttctgtactc  ggtccagct  acctcagta  cagctcagag  cagctctaca
cagggcacal  cggclclcc  cclggcaacc  lccclcaagc  gcaclclclg  gggcaaggg
ccctyggct  cctcgttcaa  gactactcc  ccgaaccag  tgaaggtctc  gtcgaactca
ggcgccclg  ccagcgggl  gcaaacclcl  ccggclglcc  lacgclctc  aggcclclc
ccctcagca  cctcgttca  cgtgcctcc  agcagctcag  gcaaccagac  ctacactcgc
caagclgac  clcagccag  caaacccag  glggccagc  aagclggcc  caaalclclt
cacaacaacc  acactcggc  cggc

```

1519gH20 Fab' heavy chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 64

```

HKKTAIAIAV ALAGPATAAG AEVPLVEGGG GLVQGGGLR LCAVVGDF SNKGVAVRQ ADKGLKVA
YDSDCKDNTY YRDSVECRPT YRDKAESST YIQYKSTRNF DVAVYVCTTC TVRPTVYKQ CTWTVSSAS
LKCPSTPLAF PSSKSLSCCL AALCKLVKDY EPEPLVSAK SCALLSCVHL EPAVLQSSCL ESLSSVVLV
ESLSDGQYD SNVHKDSEK KVDSVECKK CKKHLCKAA

```

1519gH20 Fab' heavy chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 65

```

atgaagaaqa  clqlclaleg  aalclggclg  gggclagclg  glclggcaac  cclggccca
gctgaggtcc  cgttygtcga  gtcgggaggc  ggyctcgtcc  agcctggagc  gagcctgctt
clclclclg  caqlalclcg  clcaaclcl  caaclclcg  qalclclclg  cclclclclg
gctcaaggtc  aaggtctyga  atgygttygg  tacatcgact  ccgaagggca  caaacclctc
talclqaact  clclgaaag  lcgcltcaac  alclclclcg  aaaacclcaa  atcaagcclg
lccclggcga  lgaacagccl  gclgclgaa  gclclclgg  lglclclclg  caaacclggc
atcgtcagcc  cgttactcga  tggggccag  ggaaccclcg  tcaactctc  gacagcttct
caaacggccc  caclggclcl  ccclclgca  ccclclclcc  agaacclcl  lggggccca
ggggcctgg  gctgcttgg  caaggaactc  ctccclgca  cggctcaggt  gctcggca
lccggccccc  lgaacagcgg  cclgcaacc  clccclclg  lccclcaglc  clcaggccl
tactccctca  gcagcgttgt  gacgttccc  tccagcagct  tyggcaacca  gacclactc
lcaaacclga  alcaaacccc  caqaacccc  aagclcaacc  aqaacclga  ccccaalcl
tgtgacaaa  ctcaacutg  cgcgcgc

```

1519gH20 IgG4 heavy chain (V - human gamma 4P constant) SEQ ID NO: 66

```

EVLVEEGCC  LVQPCCLRL  SCVVEGTTT  NYCHVAVRQA  FCKLEWVAY  IDSDCNTYY
RDSVGRKFT  SRDKAESLY  LQNSLRKED  MAVYCTPLI  VHSFLYWGQ  FLVTVSSASL
KCPSTPLAF  CSRSTESTA  ALCKLVKDY  PEPVTVSWK  CALTSCVHL  PAVLQSSCLY
SLSSVVLVLS  SLGKTKFTC  NYDKKPKPK  VDKKVEKSK  PCLPCPAPE  FLGGPSTPLF
PSPKCLMT  SRDFEYTCV  VDSQEDFEV  QENNYVDGV  VNKTKKRE  EQNSTYRVV
SVLLVLRQK  LNKKEKCKV  SKSLPSSIE  KLSKAKGQF  KLVQVYLPF  SQSKTKNQV
SLTCLVKGTY  PSDAVVWDS  NQSPENNYK  EPVLDSDGS  PLYSPCLVD  KRKQKRVV
SCSVREALH  NHEIQKSLSL  SLCK

```

FIGURE 8M

1519gH20 Fab' heavy chain (V + human gamma-1 CIII + hinge) SEQ ID NO: 63

```

gaggtacagc  tggtegagtc  tggaggcggg  atagtcacagc  caggagggag  cctcgcctcc
lcllgggag  lclclggcll  caegllclcc  aadlaaggle  lggclclggg  lclclggcll
ccaggtaaag  gtctygaatg  ggttyggtat  atagactcag  aaggcgassa  cactactat
cgcgactclg  lgaaaqg  lcg  cltaacccll  lccggcgale  aqgcaaalcl  cagccclglc
ctgcaagatga  acagcctggc  tgcgcaagat  acggcggtgt  actactyca  caagggcacc
ctgcaagcgt  ttctgtactc  ggttcaagct  acctcgtta  cagtctcag  cgtctctaca
cagggtccat  cggclclcc  ccltgcacc  lccclcaaga  gcaclcltgg  gggcaaggg
cccttggct  ccttggctca  gactacttc  ccgaacagg  tgaaggtta  gtcgaactca
ggcgccclga  ccggcggtl  gcaaacclcl  ccggclglcc  laccglccl  aggaclclac
ccctcagca  ccttggctga  cgtgcctcc  agcagcttgg  gcaaccagac  ctacactcgc
caagtlgac  clcggcgag  caaacccag  gltgcacag  aagtlggag  caaatcltlt
cacaacaacc  acactcggc  cggc

```

1519gH20 Fab' heavy chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 64

```

MKKTAIAIAV ALAGPATAAG AEVPLVEGGG GLVQGGGLR LCAVVGDF SNKGVAVRQ ADKGLKVA
MTDSKDKTY VRDSVECRPT SRDKAESST VIQVSTRNF DVAVYCTTC TVRPTVXCO CIWTVSSAS
LKCPSTPLA PSSKLSCL AALCLVKDY EPEPLVSAK SCALLSCVH EPAVLQSSCL ESLSSVLV
SSLGQGGY GNVHKDSK KVDSVECRS GRKHLCA

```

1519gH20 Fab' heavy chain with signal sequence underlined and italicized SEQ ID NO: 65

```

atgaagaaqa  clqclalegc  aatlgcgglc  ggcclagclg  gllclggca  cclggccca
gctgaggttc  cgttygttga  gtcgggggg  ggyctgttc  agcctggag  gagcctgct
clclclclg  caqlalclgg  clclcaagcl  lcaaacclag  qalclclclg  gclclclclg
gctcaaggtc  aaggtcttga  atgggttgg  tacatggat  ccgcaaggg  caaacclct
talclqaat  clclgaaag  lclclclcc  alclclclcc  aaaacclca  atcaagcclg
lccclggag  lgaacagccl  gclclclga  gclclclgg  lclclclclg  caccclclgg
atcgttggc  cgttacttga  tggggcag  ggaacclag  tcaacttct  gagccttct
caaacggcc  caclggclcl  ccclclclga  ccclclclcc  agaacclcl  lggggccca
ggggccttg  gctgcttgg  caaggactac  tclclclgg  cgttcaaggt  gcttggac
lccggccgc  lgaacaggg  cclclclcc  lclclclclg  lclclclclg  clcaggccl
tactcctca  gcagccttgg  gacgttgc  tcaagcagct  tggccacca  gactaacct
lcaaacclga  alcaaacgc  caaacclcc  aagclclca  caaacclga  ccccaatcl
tgtgacaaa  ctcaacutg  cgcgcg

```

1519gH20 IgG4 heavy chain (V - human gamma 4P constant) SEQ ID NO: 66

```

EVLVEEGCC  LVQPCCLRL  SCVSGCTTS  NYCHVAVRQA  FCKLEWVAY  IDSCCNTYY
RDSVGRSFL  SRDKAESLY  LQNSLRKED  MAVYCTTGL  VRDLYWGGG  ILVTVSSASL
KCPSTPLAF  CSRSTESTA  ALCCLVKDY  PEPVTVSWS  CALTSCVHT  PAVLQSSCLY
SLSSVVLVLS  SLGKTKTYC  NDEKFSRDK  VDKRVEKSG  PCLPCPAPE  PLGGPSVLEF
PXPKCLMT  SRDFEYTCV  VDSQGGFEV  QENNYVDGV  VNKTKPRE  EQNSTYRVV
SVLLVLRQW  LNKREKQAV  SAKSLPSSIE  KLISSAKGQF  KLVQVYILP  SQSKTKNQV
SLTCLVKGTY  PSDAVVWDS  NQSPENNYK  EPVLDSDGS  PLYSRLVMD  KRKQGRNVF
SCSVREALH  NHEIQKSLSL  SLCK

```