

OZET**E. COLI'DE ENZİMATİK KONJUGASYONLA
REKOMBİNANT AŞI ÜRETİMİ**

5

Burada, in vivo glikokonjugatlar üretmede uzman prokaryotik hücreler ve ayrıca bu hücreleri üretme yöntemleri ve bu hücrelerin, glikokonjugatlar üretmek için kullanılmalarına yönelik yöntemler sunulur. Adı geçen glikokonjugatların kompozisyonları ve ayrıca
10 bunların farklı kullanımları da dahil edilmiştir.

İSTEMLER

1. Bir polisakaridin üretilmesi için değiştirilmiş bir Gram-negatif bakteri; burada Gram-negatif bakteri, (a) *S. pneumoniae* kapsüler polisakarid gen kümesi CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B,C), CPS8, CPS9 (A,L,N,V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A,B,C,D,F), CPS12 (A,B,F), CPS13, CPS14, CPS15 (A,B,C,F), CPS16 (A,F), CPS17 (A,F), CPS18 (A,B,C,F), CPS19 (A,B,C,F), CPS20, CPS21, CPS22 (A,F), CPS23 (A,B,F), CPS24 (A,B,F), CPS25 (A,F), CPS26, CPS27, CPS28 (A,F), CPS29, CPS31, CPS32 (A,F), CPS33 (A,B,C,D,F), CPS34, CPS35 (A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41 (A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47 (A,F), veya CPS48'in bir regülatör geni *wzg*, *wzh*, *wzd* veya *wze*'yi şifreleyen bir nükleik asit; veya (b) *Staphylococcus aureus* kapsüler polisakarid gen kümesi CPS5 veya CPS8'in bir regülatör geni *capA*, *capB* veya *capC*'yi şifreleyen bir nükleik asit; veya (c) *Streptococcus agalactiae* (grup B, GBS) kapsüler polisakarid gen kümesi CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII veya CPSEVIII'in bir regülatör geni *CpsA*, *CpsB*, *CpsC* veya *CpsD*'yi şifreleyen bir nükleik asit içerir; burada Gram-negatif bakteri ayrıca Gram-negatif bakteri için heterolog olan bir oligosakaril transferaz da içerir.

2. İstem 1'e ait Gram-negatif bakteri olup, burada Gram-negatif bakteri, kapsüler polisakarid gen kümesinin açık okuma çerçevelerinin en az %25, %50, %75, %85, %90 veya en az %95'ini içerir.

3. İstem 1'e ait Gram-negatif bakteri olup, burada adı geçen Gram-negatif bakteri, *Escherichia* türleri, *E. coli*, *Shigella* türleri, *Klebsiella* türleri, *Salmonella* türleri, *Yersinia* türleri, *Neisseria* türleri, *Vibrio* türleri ve *Pseudomonas* türlerinin oluşturduğu gruptan seçilir.

5

4. Önceki istemlerden herhangi birine ait Gram-negatif bakteri olup, burada adı geçen regülatör gen, isteğe göre *S. pneumoniae* Tip 1 veya *S. pneumoniae* Tip 4'ten olmak üzere bir *S. pneumoniae* regülatör genidir.

10

5. Önceki istemlerden herhangi birine ait Gram-negatif bakteri olup, burada adı geçen regülatör gen, bir *Staphylococcus aureus* regülatör genidir.

15

6. Önceki istemlerden herhangi birine ait Gram-negatif bakteri olup, burada adı geçen regülatör gen, *Streptococcus agalactiae* regülatör genidir.

20

7. Önceki istemlerden herhangi birine ait Gram-negatif bakteri olup, burada Gram-negatif bakteri için fitri olan bir veya daha fazla gen delete edilmiş veya eylemsizleştirilmiştir.

8. İstem 8'e ait Gram negatif bakteri olup burada *waaL* geni delete edilmiştir.

25

9. Önceki istemlerden herhangi birine ait Gram-negatif bakteri olup, burada adı geçen regülatör gen, *S. pneumoniae* kapsüler gen kümesi CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B,C),

CPS8, CPS9 (A,L,N,V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A,B,C,D,F), CPS12 (A,B,F), CPS13, CPS14, CPS15 (A,B,C,F), CPS16 (A,F), CPS17 (A,F), CPS18 (A,B,C,F), CPS19 (A,B,C,F), CPS20, CPS21, CPS22 (A,F), CPS23 (A,B,F), CPS24 (A,B,F), CPS25 (A,F), CPS26, 5 CPS27, CPS28 (A,F), CPS29, CPS31, CPS32 (A,F), CPS33 (A,B,C,D,F), CPS34, CPS35 (A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41 (A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47 (A,F) veya CPS48'e ait wzg, wzh, wzd, wze; veya *Staphylococcus aureus* kapsüler polisakarid gen kümesi CPS5 veya 10 CPS8'e ait capA, capB veya capC'dir.

10. Önceki istemlerden herhangi birine göre Gram-negatif bakteri olup, ayrıca glikosilasyon için bir konsensüs sekansı içeren bir taşıyıcı proteini şifreleyen bir nükleik asit de içermektedir, sözkonusu nükleik 15 asit isteğe göre *P. aeruginosa*'dan detoksifiye eksotoksin A, *S. aureus*'a ait CRM197, Difteri toksoidi, tetanos toksoidi, detoksifiye hemolisin A, kümelenme faktörü A, kümelenme faktörü B, *E. coli* FimH, *E. coli* FimHC, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksini, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksininin detoksifiye varyantları, Kolera toksini 20 B alt birimi(CTB), kolera toksini, kolera toksininin detoksifiye varyantları, *E. coli* sat proteini, *E. coli* sat proteininin yolcu alanı, *C. jejuni* AcrA, *C. jejuni* doğal glikoproteinleri, *S. pneumoniae* pnömolisini, *S. pneumoniae* NOX, *S. pneumoniae* PspA, *S. pneumoniae* PcpA, *S. pneumoniae* PhtD, *S. pneumoniae* PhtE, *S. pneumoniae* Ply veya *S. pneumoniae* LytB dir. 25

11. Bir rekombinant glikoprotein üretilmesine yönelik yöntem olup, istem 1-10'dan herhangi birine ait Gram-negatif bakterinin,

rekombinant glikoprotein üretimi için uygun koşullar altında kültürlenmesini kapsar; burada rekombinant glikoprotein, *S. pneumoniae* CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B,C), CPS8, CPS9 (A,L,N,V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A,B,C,D,F), CPS12 (A,B,F), CPS13, CPS14, CPS15 (A,B,C,F), CPS16 (A,F), CPS17 (A,F), CPS18 (A,B,C,F), CPS19 (A,B,C,F), CPS20, CPS21, CPS22 (A,F), CPS23 (A,B,F), CPS24 (A,B,F), CPS25 (A,F), CPS26, CPS27, CPS28 (A,F), CPS29, CPS31, CPS32 (A,F), CPS33 (A,B,C,D,F), CPS34, CPS35 (A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41 (A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47 (A,F) veya CPS48; veya *Staphylococcus aureus* CPS5 veya CPS8; veya *Streptococcus agalactiae* (grup B, GBS) CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII veya CPSVIII arasından seçilen bir kapsüle polisakarid içerir.

15

12. İstem 11'e göre bir rekombinant glikoprotein üretilmesine yönelik yöntem olup ayrıca rekombinant glikoproteinin saflaştırılmasını da kapsar.

13. İstem 11 veya istem 12'ye ait bir rekombinant glikoprotein üretilmesine yönelik yöntem olup, burada rekombinant glikoprotein, *S. pneumoniae* CPS1, CPS4 ve CPS14 arasından seçilen bir kapsüler polisakarid içerir.

14. Pnömonokok polisakaridler içeren bir glikokonjugat aşı üretilmesine yönelik yöntem olup, istem 1-4 veya 7-10'dan herhangi birine ait Gram-negatif bakterinin, rekombinant glikoproteinlerin üretimi için uygun koşullar altında kültürlenmesiyle rekombinant glikoproteinler

üretilmesini kapsar; burada rekombinant glikoproteinler, *S. pneumoniae* CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B,C), CPS8, CPS9 (A,L,N,V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A,B,C,D,F), CPS12 (A,B,F), CPS13, CPS14, CPS15 (A,B,C,F),
 5 CPS16 (A,F), CPS17 (A,F), CPS18 (A,B,C,F), CPS19 (A,B,C,F), CPS20, CPS21, CPS22 (A,F), CPS23 (A,B,F), CPS24 (A,B,F), CPS25 (A,F), CPS26, CPS27, CPS28 (A,F), CPS29, CPS31, CPS32 (A,F), CPS33 (A,B,C,D,F), CPS34, CPS35 (A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41 (A,F), CPS42, CPS43, CPS44,
 10 CPS45, CPS46, CPS47 (A,F) veya CPS48 arasından seçilen kapsüle polisakaridler içerir.

15. İstem 14'e göre bir glikokonjugat aşısı üretilmesine yönelik yöntem olup ayrıca rekombinant glikoproteinlerin saflaştırılmasını da kapsar.
 15

16. İstem 14 veya istem 15'e ait bir glikokonjugat aşısı üretilmesine yönelik yöntem olup, burada rekombinant glikoproteinler, *S. pneumoniae* CPS1, CPS4 ve CPS14 arasından seçilen kapsüller polisakaridler içerir.
 20

25167

TARİFNAME

E. COLI'DE ENZİMATİK KONJUGASYONLA
REKOMBİNANT AŞI ÜRETİMİ

5

1- GİRİŞ

Burada, in vivo glikokonjugatlar üretmede uzman prokaryotik hücreler
10 ve ayrıca bu hücreleri üretme yöntemleri ve bu hücrelerin,
glikokonjugatlar üretmek için kullanılmalarına yönelik yöntemler
sunulur. Adı geçen glikokonjugatların kompozisyonları ve ayrıca
bunların farklı kullanımları da dahil edilmiştir.

15 2- ALT YAPI

Glikosilasyon, karbohidrat moleküllerinin veya şekerlerin
(monosakaridler, disakaridler, oligosakaridler veya polisakaridler), bir
protein veya polipeptit içerisindeki farklı amino asit tortularının yan
20 zincirlerine eklenmesiyle bir glikoprotein üretilmesini sağlayan bir
prosestir.

Glikoproteinler, hücresel etkileşim ve hücre sinyalleme gibi birkaç
proseste yer alır; bunlar, sekretuar ve membran proteinlerinin protein
25 katlanması, oligomerizasyonu, stabilitesi, kalite kontrolü, sıralanması
ve taşınmasına iştirak ederler. Protein glikosilasyonu, bir proteinin

antijenikliği, stabilitesi ve yarı ömrü üzerinde çarpıcı şekilde uygun bir etkiye sahiptir.

Protein taşıyıcı içerisinde karbohidrat molekülleri ile amino asit
5 tortusu arasındaki bağlantının tipine bağlı olarak farklı glikoprotein türleri vardır.

N bağlantılı protein glikosilasyonu -karbohidrat moleküllerinin, hedef proteinin polipeptit zincirindeki bir asparagin tortusuna eklenmesi-,
10 ökaryotik organizmaların endoplazmik retikulumunda meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonun en yaygın tipidir. Proses, Endoplazmik retikulumda konserve sekans Asn-X-Ser/Thr (buradaki X, prolin dışında herhangi bir amino asittir) içerisinde önceden birleştirilmiş bir oligosakaridin bir lipid taşıyıcıdan (dolikol fosfat) bir
15 nasent proteinin bir asparagin tortusuna taşınmasından sorumlu enzimatik oligosakariltransferaz kompleksi (OST) tarafından gerçekleştirilir. Sakarid zinciri daha sonra Golgi aparatında başka modifikasyonlara tabi olur. N bağlantılı glikosilasyon prosesi, ökaryotlarda ve yaygın şekilde arkelerde ve çok nadir olarak da
20 bakterilerde meydana gelir (aşağı bakınız).

O bağlantılı glikosilasyon, ökaryotlarda, arkelerde ve bakterilerde meydana gelen bir glikosilasyon formudur. Bu, protein hedefi içerisindeki bir amino asit tortusunda bir şeker molekülünün bir
25 oksijen atomuna eklenmesini kapsar.

Bir bakterinin, yani gıda kaynaklı patojen *Campylobacter jejuni*'nin de kendi proteinlerini N-glikosile edebileceği (Wacker ve arkadaşları,

Science. 2002; 298(5599):1790-3), kendi glikosilasyon mekanizmasına sahip olduğu gerçeği sayesinde gösterilmiştir. Bu reaksiyondan sorumlu mekanizma, pgl (protein glikosilasyonu için) adıyla bilinen bir küme tarafından şifrelenir.

5

C. jejuni glikosilasyon mekanizması, E. coli'ye aktarılarak E. coli hücreleri tarafından eksprese edilmiş rekombinant proteinlerin glikosile olması sağlanabilir. Önceki çalışmalar, N-glikosilasyon yapabilen E. coli suşlarının nasıl üretileceğini göstermiştir (bakınız
10 örn., Wacker ve arkadaşları, Science. 2002; 298 (5599): 1790-3; Nita-Lazar ve arkadaşları, Glycobiology. 2005; 15(4):361-7; Feldman ve arkadaşları, Proc Natl Acad Sci ABD 2005; 102(8):3016-21; Kowarik ve arkadaşları, EMBO J. 2006; 25(9):1957-66; Wacker ve arkadaşları, Proc Natl Acad Sci ABD 2006; 103(18):7088-93; Uluslararası Patent
15 Başvurusu Yayınları No. WO2003/074687, WO2006/119987, WO 2009/104074 ve WO/2011/06261 ve WO2011/138361).

Bakteriler, sıklıkla kapsüler polisakaridlerin çevrelediği tek yada çift kılıflı hücre membranına sahip olmalarına bağlı olarak Gram-pozitif
20 ve Gram-negatif olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Bu tür bakterilerin örnekleri arasında Streptococcus ssp., Pseudomonas ssp., Neisseria ssp., Salmonella ssp., Escherichia ssp., Staphylococcus ssp., Campylobacter ssp., vb. yer alır. Tıbbi ve ticari açıdan en alakalı enfeksiyöz ajanlardan biri, bir Gram-pozitif patojen olan
25 Streptococcus pneumoniae'dir.

S. pneumoniae, dünya çapında hem hafif hem de şiddetli enfeksiyonların başlıca sebebidir. Pnömonok enfeksiyonları ile ilişkili

birincil klinik sendromlar, pnömoni, menenjit, kan dolaşımı enfeksiyonları ve akut otitis media'dır; bunların, morbidite ve mortalite bakımından en önemli olanı, pnömonidir. *S. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonlar, özellikle çok genç ve yaşlılardaki ciddi hastalık yükünden sorumludur (Isaacman DJ, M. E., Reinert RR. 2010. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis.* 14:197-209).

Pnömonokoklar, kimyasal ve serolojik açıdan farklı kapsüller polisakaridleri bazında birçok serotip (~93) halinde gruplandırılır. Bazı serotipler, diğerlerinden daha bol miktardadır, klinik olarak görünür enfeksiyonlar ile ilişkilidir, ciddi envazif enfeksiyonlara neden olur ve bir veya daha fazla antibakteriyel ajan sınıfına karşı direnç kazanır (Rueda, A. M. M., MSc; Serpa, José A. MD; Matloobi, Mahsa MD; Mushtaq, Mahwish MD; Musher, Daniel M. MD. 2010. The spectrum of invasive pneumococcal disease at an adult tertiary care hospital in the early 21st century. *Medicine (Baltimore)* 89:331-336). Polisakarid kapsülü içerisindeki yapısal farklılıklara dayanarak farklı *S. pneumoniae* serotipleri tanımlanmıştır. Önceki analizlere göre yaklaşık olarak 10 veya 11 serotip, dünyadaki tüm bölgelerde envazif pediatrik enfeksiyonların %70'ten fazlasının sebebidir (Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR: Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*

2000, 30(1):100-121). Hastalığa neden olan serotiplerin dağılımı, yaşa, hastalık sendromuna, hastalığın şiddetine, coğrafi bölgeye ve fazla çalışmaya bağlı olarak değişkenlik gösterir. Penisilin, eritromisin, ko-trimoksazol veya çoklu ilaçlara dirençli pnömokoklar, birçok bölgede yaygındır (Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. Jones RN, Jacobs MR, Sader HS. *Int J Antimicrob Agents*. Eylül 2010;36(3):197-204).

- 10 Pnömokok kapsülü, temel bakteriyel virülans faktörlerden biridir ve çeşitli aşılarda antijen olarak başarılı şekilde kullanılmaktadır. Kapsüler polisakaride karşı antikorların, pnömokok enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Musher DM PH, Watson DA, Baughn RE: Antibody to capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* at the time of hospital admission for Pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2000, 182(1):158-167, Isaacman DJ ME, Reinert RR: Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis* 2010, 14(3):197-209)

Pnömokok kapsüler polisakaridlerin (CPS) sentez yolları, serotipe (~ 93) bağlı olarak farklılık gösterir. Sintaz yolağıyla sentezlenen tip 3 ve 37 haricinde (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabbino-witsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA ve arkadaşları: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS genetics* 2006, 2(3):e31)

pnömokok CPSler genellikle O-Antijen-Flippaz (Wzx)/Polimeraza (Wzy) bağılı olarak sentezlenir (ŞEKİL 1).

CPSler, ortak öncülerden (örn. nükleotitle aktifleştirilen monosakaridler) taşıyıcı lipitler üzerinde aşamalı bir yaklaşımla birleştirilir. İlk önce tekrar birimi, taşıyıcı üzerinde membranın sitoplazmik tarafında farklı glikosiltransferazlar tarafından birleştirilir. Daha sonra lipit bağlantılı oligosakaride hafifçe vurularak bu, membranın, tekrar birimlerinin polimerize edildiği dış tarafına yönlendirilir. CPS'nin tamamı, taşıyıcı lipitten salınır ve yüzeye gönderilir.

Bakteriyel polisakaridler, insanlarda, T hücre epitopları ihtiva eden bir protein taşıyıcıya bağlanmaları durumunda uzun süre kalıcı immün tepkisi ortaya çıkarabilirler. Bu konsept, hemen hemen 100 yıl önce detaylandırıldı (Avery, O. T. ve W. F. Goebel, 1929. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. Immunological specificity of synthetic sugar-proteins. J. Exp. Med. 50:521-533) ve sonra protein taşıyıcı difteri toksinine bağlanmış Haemophilus influenza tip B (HIB) polisakaridi için kanıtlandı (Anderson, P. 1983. Antibody responses to Haemophilus influenzae type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. Infect Immun 39:233-8; Schneerson, R., O. Barrera, A. Sutton ve J. B. Robbins. 1980. Preparation, characterization, and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide-protein conjugates. J Exp Med 152:361-76). Bu glikokonjugat ayrıca 1987 yılında ABD'de lisans alan ilk konjuge aşı oldu ve kısa süre sonra Birleşik Devletlerin

bebek immünizasyon programına dahil edildi. HIB'nin yanı sıra kapsüle edilmiş insan patojenleri *Neisseria meningitidis* ve *S. pneumoniae*'ye karşı konjuge aşılar da başarılı şekilde geliştirilmiştir. Aşıların rutin kullanımı, nazofarenjyal kolonizasyon ve ayrıca enfeksiyonda azalmaya neden olmuştur. Halen global aşı piyasasının ~%25'i, konjuge aşıları kapsar.

Konjugat aşılar, bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma sağlamak için başarılı şekilde kullanılmaktadır. Bir antijenik polisakaridin bir protein taşıyıcıya konjugasyonu, koruyucu hafıza tepkisi için gereklidir, çünkü polisakaridler, T hücrelerinden bağımsız antijenlerdir. Polisakaridler, protein taşıyıcılara, farklı kimyasal yöntemlerle, polisakarid ve ayrıca protein taşıyıcı içerisindeki aktifleşmeyle reaktif gruplar kullanılarak konjuge edilmiştir (Pawlowski, A., G. Kallenius ve S. B. Svenson. 2000. Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugates vaccines utilizing new fragmentation and conjugation technologies. *Vaccine* 18:1873-1885; Robbins, J. B., J. Kubler-Kielb, E. Vinogradov, C. Mocca, V. Pozsgay, J. Shiloach ve R. Schneerson. 2009. Synthesis, characterization, and immunogenicity in mice of *Shigella sonnei* O-specific oligosaccharide-core-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci ABD* 106:7974-7978).

Konjugat aşılar, çocuklara, onları bakteriyel enfeksiyonlara karşı korumak için uygulanabilir ve yetişkinler için uzun süre kalıcı bir immün tepkisi sağlayabilir. Buluşa ait yapıların, hayvanlarda bir IgG tepkisi ürettiği bulunmuştur. Polisakaridin (yani şeker tortusunun), şekere özel kısa süreli bir immün tepkisi tetiklediğine inanılır.

Gerçekten insan immün sistemi, bakterilerin spesifik polisakarid yüzey yapılarına, örn., O-antijenlere ve kapsüler polisakaridlere karşı güçlü bir tepki üretir. Bununla birlikte polisakaridlere yönelik immün tepkisi, IgM'ye bağlı olduğundan immün sistemi, hiç hafıza geliştirmez. Bununla birlikte polisakaridi taşıyan protein taşıyıcı, T hücrelerine bağlı olan ve immün sistem hafıza geliştirdiğinden uzun süre kalıcı koruma sağlayan bir IgG tepkisini tetikler. Bu nedenle bir aşının, bir protein taşıyıcı-polisakarid konjugatı şeklinde geliştirilmesi avantajlıdır.

10

Saf pnömokok polisakarid aşılarının küçük çocuklarda önemli serotipler için koruyucu bir immün tepkisi indükleyememesi, bunların bebek immünizasyonunda değerlendirilmesini engeller.

15 Bugüne kadar pnömokok hastalığına karşı aşılar, iyice oturmuş bir kimyasal konjugasyon teknolojisiyle in vitro sentezlenmiştir. Antijenik kapsüler polisakaridler, patojenik organizmalardan özümolenir, saflaştırılır, kimyasal olarak aktifleştirilir ve uygun bir protein taşıyıcıya konjuge edilir. Halen glikokonjugatlar üretmek için 20 farklı protein taşıyıcılar, örn., CRM197 (difteri toksoidi), tetanos toksoidi ve Hemophilus influenzae protein D kullanılmaktadır.

Birkaç yıl önce 7 valanslı bir pnömokok konjugat aşısına (PCV7) lisans verilmiş ve bunun, WHO'nun Stratejik Uzman Danışman 25 Grubu (SAGE) tarafından hastalık yükünün yüksek olduğu gelişmekte olan ülkelerde kullanılması tavsiye edilmiştir (Vaccine 6 Temmuz 2012;30(32):4717-8. Epub 20 Mayıs 2012. Pneumococcal vaccines WHO position paper - 2012 - recommendations. WHO Publication).

Çeşitli ülkelerde 10 valanslı (PCV10) ve 13 valanslı (PCV13) bir konjugat aşırıya da lisans verilmiştir. Farklı geliştirme evrelerinde olan ilave konjugat aşılar da vardır (Jiang SM, Wang L ve Reeves PR: Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. Infect Immun 2001, 69(3):1244-1255).

Kimyasal konjugat aşılarda üretimi bağlamında bir takım problemler tanımlanmıştır. Polisakaridlerin konjugasyon için kimyasal işleme tabi tutulmasının, polisakaridin doğal konformasyonunu bozarak antijenlerin kalitesini etkilediği, sonuç itibariyle son ürünün antijenikliğini ve immünojenikliğini etkilediği gösterilmiştir (Impact of the conjugation method on the immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F polysaccharide in conjugate vaccines (Poolman J, Frasch C, Nurkka A, Käyhty H, Biemans R, Schuerman L.Clin Vaccine Immunol. Şubat 2011;18(2):327-36. Epub 1 Aralık 2010).

3- BULUŞUN ÖZETİ

20

Bu buluş, pnömokok hücrelerinden polisakaridler ihtiva eden glikokonjugat aşılar üretmeye yönelik yeni bir yöntemi tarif eder. Bu yenilikçi pnömokok aşısı, bir Gram-pozitif bakterinin oligo- veya polisakarid biyosentezinde yer alan regülatör genlerin, bir Gram-negatif konakçı suşu içerisinde oligo- ve polisakaridlerin verimli şekilde sentezlenmesi için kullanılabileceği ve bu yolla üretilen oligo- veya polisakaridin, Gram-negatif konakçı hücrelerinde bir glikokonjugat aşısı yapmak için kullanılabileceği keşfine dayanır.

Buluşun diğer yeni ve beklenmedik özellikleri, sınırlama olmaksızın, aşağıda verilen düzenekleri içerir.

Sunulan buluş, pnömokok polisakaridi bazlı konjugat aşılarda
5 üretimine yönelik orijinal bir prosedürü tarif eder. Prosedür, çeşitli adımlara dayanır:

i) Pnömokok polisakaridlerin, polisakaridlerin üretim verimliliğini
arttıran regülatör genler kullanılarak *E. coli*'de undekaprenil-
10 pirofosfat (Und-PP) bağlantılı O antijen benzeri polisakaridler
şeklinde rekombinant üretimi.

ii) Polisakarid üretimini daha verimli hale getirmek için başlangıçtaki
suştan spesifik fonksiyonları delete etmek suretiyle uygun bir üretim
15 suşu geliştirilmesi.

iii) Pnömokok polisakaridlerin *E. coli* içinde verimli, rekombinant
sentezine olanak tanıyan uygun DNA yapıları tasarlanması.

iv) Polisakaridlerin bir oligosakariltransferaz tarafından bir akseptör
20 proteine verimli in vivo konjugasyonu için bir yöntem.

4- ŞEKİLLERİN KISA TARİFİ

25 **ŞEKİL 1**, *S. pneumoniae*'nin Kapsüler Polisakarid Biyosentetik
Yolağının genetik organizasyonunu gösterir. *Streptococcus*
pneumoniae suşlarının, in vivo konjugasyon için kullanılan kapsüller

polisakarid biyosentetik yolağının genel genetik organizasyonunun şematik diyagramı.

ŞEKİL 2, CPS 1 biyosentezi ile ilgili genetik organizasyonu gösterir. CPS1 genetik organizasyonu, wzg ila rmlD, kapsüler polisakaridin biyosentezinde yer alan genlerdir.

ŞEKİL 3, bir CPS 1 alt birimini gösterir. Bir CPS1 alt biriminin şematik diyagramı.

ŞEKİL 4, *S. sonnei* ve *P. shigelloides*'ten bir O antijen alt birimini gösterir. *S. sonnei* ve *P. shigelloides* tekrar biriminin şematik diyagramı.

ŞEKİL 5, *P. shigelloides* 017 antijen grubunu gösterir. *Plesiomonas shigelloides* 017 0 antijen grubu.

ŞEKİL 6, *S. pneumoniae* CPS 1 polisakaridinin *E. coli*'de üretimini gösterir. *S. pneumoniae* CPS1 polisakaridinin *E. coli*'de üretimi. Tam CPS1 biyosentetik genleri wzg-ugd'yi ihtiva eden, plazmid pGVX767 ile transforme edilmiş farklı *E. coli* suşlarından proteinaz K ile işleme tabi tutulmuş bütün hücre özütlerinin Westen-blot analizi. Şerit 1, protein markeri; şerit 2, *E. coli* GVX2174 ($W3110 \Delta waaL \Delta wecAwzzECA \Delta rfbO16::rfbP. shigelloidesO17-clmR$); şerit 3, pGVX767 ile transforme edilmiş *E. coli* GVX2174 (CPS tip 1 bir promoteri, bir RBS'yi ve wzg-ugd'yi şifreleyen pLAFR); şerit 4 ve 5, pGVX767 ile transforme edilmiş *E. coli* GVX3329 (=GVX2174 wbgW::clmR= $W3110 \Delta waaL \Delta wecAwzzECA \Delta rfbO16::(rfbP.shigelloidesO17 \Delta wbgW::clmR)$)). Örnekler, 200V'de

35 dakika süreyle MES'li %12 Bis-Tris jel (invitrogen) üzerinde yürütüldü ve sonra iBlot'ta blotlandı ve primer antikor olarak anti-CPI antikor (1:250) tarafından geliştirildi. clmR, kloramfenikol (clm)

direnci kazandıran bir DNA segmentini, yani bir *clm* direnç kasetini işaret eder.

FIG. 7, *E. coli*'de üretilen CPS1 polisakaridinin asitle işlemeye duyarlılığını gösterir. pGVX767 plazmidi (tam CPS1 biyosentetik genleri, *wzg-ugd*'yi ihtiva eden) ile transforme edilmiş *E. coli* GVX3329'un *E. coli* Western-blot analizi. Şerit 1, 3, iki farklı koloninin bütün hücre özütlerinin proteinaz K ile işleme tabi tutulmuş hali; şerit 2 ve 4, ilgili özütlerin TFA ile işleme tutulmuş hali; şerit 5, protein markeri. Örnekler, 200V'de 35 dakika süreyle MES tamponlu %12'lik bir Bis-Tris Page jel (invitrogen) üzerinde yürütüldü ve sonra elektroblotlandı ve primer antikor olarak anti-CPI antikor (1:250) tarafından geliştirildi.

ŞEKİL 8, *S. pneumoniae* CPS1'de taşıyıcı genlerin delesyonlarının etkisini gösterir. Kapsüler polisakarid taşıyıcı genler *wzg*, *wzh*, *wzd* ve *wze*'nin delesyonunun, *E. coli*'de *S. pneumoniae* CPS1 polisakaridinin biyosentezi üzerindeki etkisi. Plazmid pGVX808 (=pGVX767 Δ *wzg-wze::clmR*), şerit 2-5 ve pGVX767 (tam CPS1 grubu), şerit 6 ile transforme edilmiş dört farklı *E. coli* GVX3329 kolonisinin bütün hücre özütlerinin (proteinaz K ile dijest edilmiş) Western-blot analizi. Örnekler, 200V'de 35 dakika süreyle MES'li %12 Bis-Tris jel (invitrogen) üzerinde yürütüldü ve sonra iBlot'ta blotlandı ve primer antikor olarak anti- CPI antikor (1:250) tarafından geliştirildi.

ŞEKİL 9, N-glikosile edilmiş EPA'nın, değiştirilmiş *E. coli*'den *S. pneumoniae* CPS tip 1 ile His-Trap saflaştırma adımları. N-glikosile edilmiş EPA'nın, değiştirilmiş *E. coli*'den *S. pneumoniae* kapsüler polisakarid grup 1 ile HisTrap saflaştırma adımları. Panel A ve B, ayrı ayrı anti-His ve anti-CPI ile geliştirilmiş EPA-CPI konjugatlarının saflaştırma adımlarından gelen protein örneklerinin western-blot'unu

gösterir. Protein örneklerini ayırtırmak için %4-12 Bis-Tris PAGE-jel kullanılır. pGVX767, pGVX114 ve pGVX150 ile transforme edilmiş *E. coli* suşu GVX3329 (=GVX2174 wbgW::clmR= W3110 Δ waaL Δ wecAwzzECA Δ rfbO16::(rfbP.shigelloidesO17 Δ wbgW::clmR)),
5 kullanıldı.

ŞEKİL 10, Bir CPS4 alt biriminin şematik diyagramı.

ŞEKİL 11, CPS4'ün genetik organizasyonu. CPS4 genetik organizasyonu, wzg ile fnlC, kapsüler polisakaridin biyosentezinde yer alan genlerdir.

10 **ŞEKİL 12**, *E. coli*'de *S. pneumoniae* CPS4 polisakaridinin üretimini gösterir. Farklı *E. coli* suşlarından proteinaz K ile işleme tabi tutulmuş bütün hücre özütlerinin Western-blot analizi. Şerit 1, protein markeri; şerit 2-4, pGVX803 (CPS4 grubunun tamamını eksprese eden) ve pGVX238 (Z3206, epimeraz) ile transforme edilmiş *E. coli* W3110
15 Δ waaL; şerit 5-7, pGVX803 ve pGVX207 (galE, epimeraz) ile transforme edilmiş *E. coli* W3110 Δ waaL; şerit 8-10, pGVX753 (kısmi CPS4 grubu, wcj-fnlc, regülatör genler ve wciI olmadan) ve pGVX238 ile transforme edilmiş *E. coli* W3110 Δ waaL *E. coli*. İndükleme için kullanıldığı gibi %0.1 Arabinoz. Kültürlenmiş biyo-
20 kütlenin 0.1 OD'sine muadiller, 200V'de 35 dakika süreyle MES'li %12 Bis-Tris jel (invitrogen) üzerinde yürütüldü ve sonra iBlot'ta blotlandı ve primer antikor olarak anti- CPS4 antikor (1:100) tarafından geliştirildi.

ŞEKİL 13, *E. coli* SCM6'da üretilen *S. pneumoniae* CPS4'ün analiz
25 sonuçlarını gösterir. *E. coli*'de üretilen *S. pneumoniae* CPS4'ün analizi. LLO, *E. coli* SCM6'dan özümlendi (Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX: A combined method for producing homogeneous glycoproteins

with eukaryotic N-glycosylation. Nat Chem Biol 2010) ve daha önce tarif edildiği gibi 2AB ile etiketlendi (US 2011/0274720 A1). Panel A; pGVX803 (pLAFR'den gelen CPS4 grubunun tamamını eksprese eden) ve galeE epimeraz (pGVX207, pMLBAD omurgası) ile transforme edilmiş E. coli SCM6'dan özümlemiş 2AB etiketli LLO'nun kromatogramı, kesikli çizgiler; boş vektörler pLAFR ve pMLBAD ile transforme edilmiş arka plandaki E. coli suşu ile karşılaştırma, sürekli çizgi. Panel B, CPS4 pikinin, 53.9uncu dakikada elüte olan tek tekrar biriminin MS/MS analizi, (panel A).

- 10 **ŞEKİL 14**, E. coli SCM3 içerisinde üretilen S. pneumoniae CPS4'ün analiz sonuçlarını gösterir(Faridmoayer A, Fentabil MA, Mills DC, Klassen JS, Feldman MF: Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2007, 189(22):8088-8098). E. coli'de üretilen S. pneumoniae CPS4'ün analizi. LLO, E. coli SCM3'ten (S ϕ 874, Δ waaL) özümlendi ve tarif edilen şekilde 2AB ile etiketlendi (US 2011/0274720 A1). pGVX771 (bir promoter, RBS, Z3206 geni ve CPS14 grubundan wciJ-fnlc ihtiva eden, regülatör genler içermeyen pLAFR) ile transforme edilmiş E. coli SCM3'ten
- 15 özümlemiş 2AB etiketli LLO'nun HPLC kromatogramı, yekpare çizgi; boş vektör pGVX725 (sadece promotor ve RBS'li pLAFR) ile transforme edilmiş arka plandaki E. coli SCM3 suşu ile karşılaştırma, kesikli çizgi. 50.8, 53.6 ve 56.2nci dakikada elüte olan piklerin MS analizi, piruvat (Pyr) içeren yada içermeyen tek bir CPS4 tekrar birimi
- 20 (RU) ile uyumluydu.

ŞEKİL 15, CPS4-LLO kullanılan in vitro N-glikosilasyonun CPS4 lipit bağlantılı oligosakarid kullanılan in vitro N-glikosilasyonun analiz sonuçlarını gösterir. LLO, pGVX771 (önceki şekilde

açıklanmıştır) ve pGVX725 (boş vektör) ile transforme edilmiş *E. coli* SCM3'ten (Sø874 Δ waaL) özümlendi. İn vitro reaksiyon, saflaştırılmış *C. jejuni* Pg1B, flöresanla etiketlenmiş bir peptit akseptörü (Tamra-DANYTK) ve LLO özütünün bir reaksiyon
 5 tamponu içinde bir gece süreyle karıştırılması suretiyle tamamlandı. Peptit, reaksiyon karışımından organik faz ayırma işlemiyle ayrıldı ve UPLC'nin ardından MS analizine tabi tutuldu. Panel A ve B, peptidin, pGVX725 ihtiva eden SCM3'ten, (negatif kontrol) ve pGVX771 ihtiva eden SCM3'ten özümlenmiş LLO kullanılarak
 10 glikosilasyonundan sonraki UPLC kromatogramları. Panel C ve D, peptit üzerinde birleştirilmiş bir ve iki tam CPS4 alt birimine karşılık gelen, 15.43 ve 17.62nci dakikada elüte olmuş glikopeptitlerin MS/MS analizi.

FIG. 16 *S. pneumoniae* CPS4 ile N-glikosile edilmiş EPA'nın
 15 HisTrap saflaştırma adımları Değiştirilmiş *E. coli*'den *S. pneumoniae* CPS4 ile N-glikosile edilmiş EPA'nın HisTrap saflaştırma adımları. pGVX539, pGVX114, pGVX207 ve pGVX803 ile transforme edilmiş ve TB ortamında büyütülmüş *E. coli* W3110 Δ waaL. Panel A, B ve C, ayrı ayrı anti-His ve anti-CPS4 ile geliştirilmiş EPA-CPS4
 20 konjugatlarının saflaştırma adımlarından gelen protein örneklerinin coomassie boyalı ve western-blot durumunu gösterir. Protein örneklerini ayırtmak için %4-12% Bis-Tris SDS-jel kullanılır. pGVX539, EPA taşıyıcı protein ekspresyonu için içerisinde EPA'nın detoksifiye edildiği ve iki N glikosilasyon konsensüs sekansı ihtiva
 25 eden bir ekspresyon plazmididir.

ŞEKİL 17, CSP4-EPA glikokonjugatlarının HPLC RP analiziyle PMP türevlendirme analizini gösterir. *E. coli*'de üretilen CPS4-EPA glikokonjugatlarının HPLC EP analizine göre PMP türevlendirme

analizi. Yekpare çizgi: glikokonjugatın hidrolizinden ve analizinden elde edilen eser, kesikli çizgi: CPS4 kapsüler polisakaridinden özdeş biçimde hazırlanmış eser.

ŞEKİL 18, CPS4-EPA konjugatları ile immünize edilmiş tavşanların serumlarının Nokta-benek analizini gösterir. CPS4-EPA konjugatları ile immünize edilmiş tavşanların serumlarının Dot-blot analizi. *S. pneumoniae* grup 4'ten izole edilmiş CPS4 kapsüler polisakaridinden 50 ng, her bir benek üzerine blotlandı. İkinci enjeksiyondan sonra elde edilen serumlar, 1 ila 100 seyreltmeli analiz için kullanıldı. Şerit 1, bu çalışmada kullanılan tavşanların immün öncesi serumlarının olduğu havuz; şerit 2-7, EPA-CPS4 enjekte edilmiş farklı tavşanların serumları; şerit 8-9, ayrı ayrı Alüminyum hidroksid ve Freund'un tam adjuvanlarını ihtiva eden tampon enjekte edilmiş kontrol tavşanlarının serumları; Şerit 10-11, Prevenar-13 enjekte edilmiş pozitif kontrol tavşanlarının serumları; Şerit 12-13, 1:100 ve 1:200'lük seyreltmelerle Statens serum enstitüsünden gelen bir primer antikor şeklinde pnömokok antiserumları tip 4 ayrı ayrı kullanıldı.

ŞEKİL 19, CPS'nin biyosentezinde yer alan genlerin CPS14 genetik organizasyonunu açıklar CPS14 genetik organizasyonu, wzg ile wciY, kapsüler polisakaridin biyosentezinde yer alan genlerdir.

ŞEKİL 20, Bir CPS14 alt biriminin şematik diyagramı.

ŞEKİL 21, *E. coli*'de CPS14 LLO ekspresyonu. CPS14 grubundan wchA ile wciY genleri, 016 O antijen grubu (rfbO16) promoteri ihtiva eden gen değiştirme vektörü pDOC-C (pGVX615) içerisine klonlandı ve *E. coli* GVX1128'e (W3110ΔwaaL) transforme edildi. Panel A, pGVX615wzy_{mut} (tek bir alt birim üreten CPS14 polimeraz mutan) ile transforme edilmiş *E. coli* GVX1128'den özümlemiş 2AB etiketli LLO'nun kromatogramı, yekpare çizgi; arka plandaki suştan

özümlemiş LLO ile karşılaştırma, kesikli çizgi; küçük ek, primer antikor olarak anti-CPS14 antikoruyla problemlenmiş pGVX615 ile transforme edilmiş, proteinaz K ile dijest edilmiş *E. coli* GVX1128'in western-blot'udur. Panel B, 57nci dakikada elüte olmuş tek CPS14 alt biriminin MS/MS analizi (panel A'da okla işaret edilir).

ŞEKİL 22. Kolanik asidin (CA) CPS14 grubu ile değiştirildiği *E. coli* suşlarında CPS14 polisakaridinin ekspresyonu. Anti-CPS 14 ile problemlenmiş farklı entegre *E. coli* suşlarından proteinaz K ile dijest edilmiş hücrelerin Western-blot'u gösterilir. Entegre suşların tamamı; GVX6126 (GVX1052 CA::CPS14; şerit 1 ve 2), GVX6129 (GVX1128 CA::CPS14; şerit 3 ve 4) ve GVX6300 (GVX1716; şerit 5 ve 6), RcsA'yı eksprese ederek pGVX688 ile transforme edildiği durumda CPS14 üretimine karşılık gelen merdiven benzeri bir şablon gösterdi.

ŞEKİL 23, CPS14 taşıyıcı genlerinin, *E. coli* suşları GVX6126 (*E. coli* W3110 CA::CPS14)'te *S. pneumoniae* CPS14 polisakaridinin üretimi üzerindeki etkisini gösterir. Farklı *E. coli* hücrelerinden proteinaz K ile işleme tabi tutulmuş bütün hücre özütlerinin Western-blot analizi gösterilir. Şerit 1, protein markeri; şerit 2, pGVX688 (rcsA) ve pGVX72 (boş vektör) ile transforme edilmiş *E. coli* GVX6126; şerit 3, pGVX688 (rcsA) ve pGVX1497 (pGVX72 içerisine klonlanmış CPS14 wzg-wze) ile transforme edilmiş *E. coli* GVX6126. 0.4 OD kültürlenmiş biyokütle muadilleri, 200V'de 35 dakika süreyle MES'li %12 Bis-Tris jel (Invitrogen) üzerinde yürütüldü ve sonra iBlot'ta blotlandı ve bir primer antikor olarak anti-CPS4 antikor (1:100) tarafından geliştirildi.

ŞEKİL 24, pGVXN688 (RcsA'yı eksprese eden) ile transforme edilmiş *E. coli* GVX6129'dan (W31 10ΔwaaL CA::CPS14)

özümlenmiş 2AB etiketli LLO'nun ve bölüm 0079 ve 0080'de tarif edildiği gibi 2-AB etiketleme ve MS/MS analiziyle analiz edilmiş glikolipitlerin bir kromatogramını gösterir. MS/MS analizi, CPS14'ün, ayrı ayrı 95.9 ve 115.3'üncü dakikada elüte olmuş 2 ve 3 alt birimini tanımladı (oklarla gösterilir).

5- BULUŞUN DETAYLI TARİFİ

Pnömonokok kapsüller polisakaridler, taşıyıcı lipitler üzerinde tipik olarak *S. pneumoniae* hücrelerinin CPS grubunda şifrelenen bir dizi enzimin işbirliğiyle sentezlenir (Whitfield C, Roberts IS: Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 1999, 31(5):1307-1319). *wzy*'ye bağlı CPS'nin sentezi, membranin sitoplazmik tarafında undekaprenilfosfata (Und-P) bir monosakarid-fosfat ilave edilmesi ile başlar. Kısa bir oligosakarid, farklı glikosiltransferazlar tarafından aktifleştirilmiş şeker nükleotitlerinden sırayla monosakaridler ilave edilerek uzatılır ve lipit bağlantılı polisakarid, bir flippaz tarafından hafifçe vurularak membrandan geçirilir. Antijen-tekrar birimi (RU), *wzy* proteininin gerçekleştirdiği bir enzimatik reaksiyonla polimerize edilir. Polisakarid daha sonra son akseptör yapısına aktarılır. Polimerizasyon ve hücre yüzeyine taşımanın, CPS kümelerinin 5' ucunda yer alan 3 ila 4 enzimlik bir setle kontrol edildiğine inanılır.

Glikosiltransferazlar, polimeraz *wzy*, flippaz *wzx* ve monosakarid-fosfat transferazlar, çoğu durumda, *dexB* ila *aliA* grubu içerisinde şifrelenirken nükleotide aktifleştirilmiş monosakarid biyosentetik yolları, genel temizlik aktiviteleri durumunda genom içerisinde

herhangi bir yerde ve monosakaridlerin CPS'ye özel olduğu durumda spesifik olarak CPS grubu içerisinde şifrelenir (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabbinoiwitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA ve arkadaşları: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. PLoS genetics 2006, 2(3):e31).

CPS biyosentezinde boy kontrolünün, regülasyon için bir fosforilasyon olayları döngüsünü kapsadığına inanılır (Morona JK, Miller DC, Morona R, Paton JC. The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis. 15 Mayıs 2004;189(10):1905-13.Epub 27 Nisan 2004. PubMed PMID: 15122528). CPS üreten çoğu biyosentetik yolak, substratlar olarak nükleotit difosfatla (NDP) aktive edilmiş monosakaridleri kullanır, yani bu, UDP-Glc ve UDP-GlcNAc'dir. Bu NDP şekerleri, temizlikçi genler tarafından Gram-negatif ve Gram-pozitif konakçılar içinde tedarik edilir ve bu yüzden de spesifik şekerlerin sentez için başlangıç materyalleri olarak elde edilebilir. Spesifik NDP şekerlerinin sentezi için biyosentetik genler veya diğer modifikasyonlar hemen her zaman CPS kümeleri içinde şifrelenir.

O antijen sentez ve CPS sentez, biyosentezin son adımında farklılık gösterir. O antijeni, Lipit A göbeğine ligaz WaaL tarafından eklenir ve ayrıca dış membrana kadar taşınırken CPS, hücreler üzerinde bir kapsüler yapı halinde bulunur. Ortalama olarak son O antijen şekerinin boyu, CPS'den çok daha kısadır.

S. pneumoniae CPS, sentezine yol açan spesifik biyokimyasal yolaklardan ötürü grup I CPS olarak sınıflandırılır. Gram-negatif bakteriler ayrıca dış membrana taşımadan sorumlu ilave membrana taşıyıcı protein genlerinin var olmasıyla pnömokok grup I kümelerinden farklılık gösteren grup I CPS yolakları da ihtiva eder. Orneğin bunlar, kolanik asit (CA) biyosentetik mekanizma gen kümeleri wca, (Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR: Organization of the Escherichia coli K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. J Bacteriol 1996, 178(16):4885-4893) ve K30 CPS kümesidir (Whitfield C: Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli. Annu Rev Biochem 2006, 75:39-68).

Bununla birlikte bazı Gram-negatif ve pozitif kapsüler polisakarid kümelerinin, fonksiyonel elementler bakımından benzer olduğu gerçeğine rağmen E. coli'de fonksiyonel olarak eksprese edilen tam bir pnömokok CPS kümesi asla olmadı. Genellikle farklı hücre kılıfı yapısının, bir dış membrandan geçilmesi gereken durumda farklı olan spesifik polisakarid üretim mekanizması gerektirdiği kabul edilir. Bu yüzden burada, pnömokok kapsüler polisakaridlerinin, i) bir Gram-negatif organizma içerisinde LPS ve kapsüler polisakarid yolaklarının yönleri ve ii) Gram-negatif konakçı hücreler içerisinde kombinasyon halinde Gram-pozitif kapsüler biyosentez regülasyon ve taşıma yolaklarının yönleri kullanılan gelişmiş üretim yöntemleri açıklanır. Bu tür polisakaridler, Gram-negatif konakçı içerisinde LPS yolağı mekanizmalarıyla üretilir; bu tür polisakaridlerin yapısı, LPS polisakaridleri ile aynıdır. Mevcut buluşa ait Gram-negatif sistemlerde üretilen bu tür polisakaridler, böylelikle, bu başvurunun amaçları

çerçevesinde "modifiye edilmiş kapsüler polisakaridler" veya "LPS kapsülleri" şeklinde karakterize edilebilir. Ayrıca LPS ve kapsüler biyosentetik yolları birleştiren bu yeni sentezlenmiş ekspresyon sistemi ve biyosentetik yolağı, bu başvurunun amaçları çerçevesinde

5 bir "modifiye edilmiş LPS biyosentetik yolağı" olarak karakterize edilebilir. Böylece mevcut buluş, bir polisakaridin üretilmesi için değiştirilmiş bir Gram-negatif bakteri sağlar; buradaki Gram-negatif bakteri, (a) *S. pneumoniae* kapsüler polisakarid gen kümesi CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B,C), CPS8,

10 CPS9 (A,L,N,V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A,B,C,D,F), CPS12 (A,B,F), CPS13, CPS14, CPS15 (A,B,C,F), CPS16 (A,F), CPS17 (A,F), CPS18 (A,B,C,F), CPS19 (A,B,C,F), CPS20, CPS21, CPS22 (A,F), CPS23 (A,B,F), CPS24 (A,B,F), CPS25 (A,F), CPS26, CPS27, CPS28 (A,F), CPS29, CPS31, CPS32 (A,F), CPS33 (A,B,C,D,F),

15 CPS34, CPS35 (A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41 (A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47 (A,F), veya CPS48'in bir regülatör geni *wzg*, *wzh*, *wzd* veya *wze*'yi şifreleyen bir nükleik asit; veya (b) *Staphylococcus aureus* kapsüler polisakarid gen kümesi CPS5 veya CPS8'in bir regülatör geni *capA*, *capB* veya

20 *capC*'yi şifreleyen bir nükleik asit; veya (c) *Streptococcus agalactiae* (grup B, GBS) kapsüler polisakarid gen kümesi CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII veya CPSVIII'in bir regülatör geni *CpsA*, *CpsB*, *CpsC* veya *CpsD*'yi şifreleyen bir nükleik asit içerir; burada Gram-negatif bakteri ayrıca Gram-negatif bakteri için

25 heterolog bir oligosakaril transferaz da içerir.

Buna göre ilave bir düzenek, modifiye edilmiş bir kapsüler polisakarid veya LPS kapsülü üretilmesini kapsayan, modifiye edilmiş bir LPS

yolağı kullanılan bir glikosilasyon sistemiyle yapılan bir *S. pneumoniae* aşısını kapsar.

Buluşun bir başka spesifik düzeneği, pnömokok CPS'nin optimum
5 düzeyde ekspresyonu için gram negatif *E. coli* konakçı hücre genomunun optimize edilmesini kapsar. *E. coli* W3110, gtr adıyla bilinen bir profaj gen kümesini şifreler. Gtr enzimleri GtrA, B ve S, periplazmik boşlukta büyüyen O antijen zincirine dallanan glukoz
10 tortuları eklemek suretiyle O antijenlerini modifiye eden bir mekanizmayı şifreler (Lehane AM, Korres H, Verma NK: Bacteriophage-encoded glucosyltransferase GtrII of *Shigella flexneri*: membrane topology and identification of critical residues. The Biochemical journal 2005, 389(Pt 1): 137-143). Yolak, hücre membranının sitoplazmik yüzü üzerinde undekaprenilfosfata (Und-P,
15 Und-PP değil) bağlı glukoz üretilmesini, periplazmaya doğru hafifçe vurulmasını ve arkasından Und-P bağlantılı glukozun büyüyen O antijen polisakaridine aktarılmasını kapsar.

Bazı düzeneklerde gtrABS genleri kısmen veya tamamen fonksiyonel
20 açıdan eylemsizleştirilir veya Gram-negatif konakçı hücreden delete edilir, örn., gtrABS, bir *E. coli* konakçı hücresi içerisinde delete edilir. Teoriye bağlı kalmaksızın bu tür bir delesyon, tüm CPS biyosentetik aktivitesini glikolasyona erişilebilir Und-PP yolağına yönlendirir ve böylelikle glikoprotein üretimini artırır. Birçok pnömokok
25 polisakarid, başlatıcı monosakaridin glukoz olmasıyla tekrar birimi (RU) polimerleri olarak sentezlenir. Böylece bu tür tekrar birimleri, Und-P üzerinde birleştiklerinden proteinlerin glikosilasyonuna müdahale edebilir.

Bir başka spesifik düzenek, UDP-glukoz:undekaprenil fosfat glukoz-fosfat transferaz aktivitesini ekspresyonunu ve aktivitesini arttırmak suretiyle Und-PP bağlantılı CPS üretiminin arttırılmasıdır ki bu, hücreler içerisindeki Und-PP-Glc miktarlarını arttırır ve böylece CPS
 5 tekrar birimi (RU) ve polisakaridlerin üretim verimliliğinin artmasına yol açar. Bu tür UDP-glukoz:undekaprenil fosfat glukoz-fosfat transferazlarının örnekleri, *S. pneumoniae*'ye ait WchA (yani başlatıcı fonksiyon sağlayan doğal enzim) veya *E. coli* W3110 kolanik asit wca operonu içerisinde şifrelenen WcaJ'dir. Buluşun spesifik bir düzeneği,
 10 glikolipit üretim performansının optimum düzeye getirilmesi için doğal *S. pneumoniae* wchA geni fonksiyonu yerine wcaJ geni içerisinde şifrelenen *E. coli* fonksiyonunun konulmasıdır.

Buluşun bir başka düzeneği, *E. coli* W3110 wca operon'un yerine
 15 stabil ve yüksek verimli glikolipit üretimi için ve glikosilasyon aktivitesinin artması için rekombinant CPS kümesinin genomik entegrasyonudur.

Regülatör Genler

20

Gram-pozitif bakterilerin kapsüler polisakarid gen kümelerindeki çeşitli regülatör genler, mevcut buluşa ait yöntemler ve konakçı hücrelerle birlikte kullanılabilir. Spesifik düzeneklerde regülatör gen, *S. pneumoniae*'nin bir kapsüler polisakarid gen kümesinden wzg, wzh,
 25 wzd ve wze veya *S. aureus*'un bir kapsüler polisakarid gen kümesinden capA, capB veya capC veya *Streptococcus agalactiae*'nin (B grubu Streptokok veya GBS) bir kapsüler polisakarid gen kümesinden CpsA, CpsB, CpsC veya CpsD'dir. Bazı düzeneklerde

regülatör gen, aşağıda "Kapsüler Polisakaridler" Bölümünde sıralanan kapsüler polisakarid gen kümesinden bir regülatör gendir.

Kapsüler Polisakaridler

5

Bazı düzeneklerde mevcut buluşa ait yöntemler ve konakçı hücreler, *S. pneumoniae*'nin kapsüler polisakaridlerini üretmek için kullanılır. Bu kapsüler polisakaridler arasında *S. pneumoniae* CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B, C), CPS8, CPS9 (A, L,N, V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A, B,C,D,F), CPS12(A,B,F), CPS13, CPS14 CPS15(A,B,C,F), CPS16(A,F), CPS17(A,F), CPS18(A,B,C,F), CPS19(A,B,C,F), CPS20,CPS21, CPS22(A,F), CPS23(A,B,F), CPS24(A,B,F), CPS25(A,F), CPS26, CPS27, CPS28(A,F), CPS29, CPS31, CPS32(A,F), CPS33(A,B,C,D,F), CPS34, CPS35(A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41(A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47(A,F), CPS48 ve (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabbino-witsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA ve arkadaşları: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. PLoS genetics 2006, 2(3):e31)'de belirtilen bütün ilave kapsüller yer alır. Spesifik olarak bu kapsüler polisakaridler arasında *S. pneumoniae* CPS1, CPS4 ve CPS14 yer alır.

25

Diğer düzeneklerde diğer Gram-pozitif bakterilerin kapsüler polisakaridleri, mevcut buluşa ait yöntemler ve konakçı hücreler kullanılarak üretilir. Diğer Gram-pozitif bakteriler arasında *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* (GBS) yer alır.

Bu tür kapsüler polisakaridlerin örnekleri arasında *S. aureus* CPS5, CPS8, *S. agalactiae* (grup B, GBS) CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII, CPSVIII yer alır.

- 5 Bazı düzeneklerde glikosiltransferazlar, burada tedarik edilen konakçı hücreler içerisine, konakçı hücre içerisinde arzu edilen bir kapsüler polisakarid sentezlenecek şekilde dahil edilir. Bakınız, örn., Uluslararası Patent Başvurusu Başvuru No. WO 2011/138361.

10 **Biyokonjugatlar**

- Mevcut buluşun belirli düzeneklerinde konakçı hücre, bir biyokonjugat, yani konakçı hücre içerisinde üretilmiş kapsüler protein ile glikosile edilen bir taşıyıcı protein üretecek şekilde de modifiye
- 15 edilir. Kapsüler polisakaridin taşıyıcı protein üzerine aktarılmasını, bir oligosakariltransferaz katalize eder. Belirli düzeneklerde bir oligosakariltransferaz, konakçı hücre içerisinde rekombinant şekilde eksprese edilir. Belirli düzeneklerde bir oligosakariltransferaz, prokaryotik konakçı içerisine dahil edilir. Oligosakariltransferazlar
 - 20 arasında heterolog oligosakariltransferazlar, yani prokaryotik konakçı hücreden farklı bir organizmadan türetilen oligosakariltransferazlar (örn., farklı bir bakteri türünden türetilen oligosakariltransferazlar) yer alır. Spesifik bir düzenekte oligosakariltransferaz, bir *Campylobacter* türünden, örn., *C. jejuni*'dendir.

25

Taşıyıcı protein, bir rekombinant protein olabilir. Belirli düzeneklerde taşıyıcı protein, doğal olarak bir veya daha fazla N-glikosilasyon konsensüs sekansı içeren bir proteindir. Diğer düzeneklerde bir veya

daha fazla N-glikosilasyon konsensüs sekansı, taşıyıcı protein içerisine rekombinant şekilde dahil edilmiştir. Burada konjugat aşılarda üretiminde kullanıma uygun herhangi bir taşıyıcı protein kullanılabilir. Taşıyıcı proteinlerin örnekleri arasında, sınırlama
 5 olmaksızın, *P. aeruginosa*'ya ait Eksotoksin A (EPA), *S. aureus*'a ait CRM197, Difteri toksoidi, tetanos toksoidi, detoksifiye hemolisin A, *S. aureus*'a ait kümelenme faktörü A, *S. aureus*'a ait kümelenme faktörü B, *E. coli* FimH, *E. coli* FimHC, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksini, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksininin detoksifiye
 10 varyantları, Kolera toksini B alt birimi (CTB), kolera toksini, kolera toksininin detoksifiye varyantları, *E. coli* Sat proteini, *E. coli* Sat proteininin yolcu alanı, *C. jejuni* AcrA ve *C. jejuni* doğal glikoproteinleri, *S. pneumoniae* pnömolisini ve ilave *S. pneumoniae* protein antijenleri, örn., *S. pneumoniae* NOX, *S. pneumoniae* PspA, *S.*
 15 *pneumoniae* PcpA, *S. pneumoniae* PhtD, *S. pneumoniae* PhtE, *S. pneumoniae* Ply ve *S. pneumoniae* LytB yer alır.

Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen konjugatların üretiminde kullanılan taşıyıcı proteinler modifiye edilir, örn., protein daha az
 20 toksik ve glikosilasyona daha yatkın, vb. olacak şekilde modifiye edilir. Spesifik bir düzenekte, burada tarif edilen konjugat aşılarda üretiminde kullanılan taşıyıcı proteinler, taşıyıcı proteinler içerisindeki glikosilasyon sahalarının sayısının, daha düşük konsantrasyonlarda protein uygulanmasına izin verecek şekilde maksimum düzeye
 25 çıkarılması için örn., bir immünojenik kompozisyon içerisinde, biyokonjugat formunda modifiye edilir. Buna göre belirli düzeneklerde, burada tarif edilen taşıyıcı proteinler, normal olarak taşıyıcı protein ile ilişkili olduğundan (örn., fitri/doğal, örn.,

"vahşi tip" halinde taşıyıcı protein ile ilişkili glikosilasyon sahalarının sayısına göre) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veya daha fazla glikosilasyon sahası içerecek şekilde modifiye edilir. Spesifik düzeneklerde glikosilasyon sahasının dahil edilmesi işlemi, proteinin primer yapısı

5 içerisinde herhangi bir yere glikosilasyon konsensüs sekanslarının sokulmasıyla gerçekleştirilir. Bu tür glikosilasyon sahalarının dahil edilmesi işlemi, örn., proteinin primer yapısına yeni amino asitler eklenmesi (yani glikosilasyon sahaları tamamen veya kısmen eklenir) veya glikosilasyon sahaları üretmek için protein içerisinde mevcut

10 amino asitlerin mutasyona uğratılması (yani amino asitler, proteine eklenmez ancak proteinin seçilen amino asitleri, glikosilasyon sahaları oluşturmak için mutasyona uğratılır) suretiyle gerçekleştirilebilir. Bu konuda uzman kişiler, bir proteinin amino asit sekansının, bu konuda bilinen yaklaşımlar, örn., proteini şifreleyen nükleik asit sekansının

15 modifikasyonunu kapsayan rekombinant yaklaşımlar kullanılarak kolayca modifiye edilebileceğini fark edecektir. Spesifik düzeneklerde glikosilasyon konsensüs sekansları, taşıyıcı proteinin spesifik bölgelerine, örn., proteinin yüzey yapılarına, proteinin N veya C terminallerine ve/veya proteinin tabanında disülfid köprüleriyle

20 stabilize edilen halkalar içine dahil edilir. Belirli düzeneklerde klasik 5 amino asitli glikosilasyon konsensüs sekansı, daha verimli bir glikosilasyon için lisin tortularıyla uzatılabilir ve böylece sokulan konsensüs sekansı, sokulması gereken veya akseptör protein amino asitlerinin yerini alan 5, 6 veya 7 amino asidi şifreleyebilir.

25

Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen konjugat aşılarda üretiminde kullanılan taşıyıcı proteinler, bir "takı", yani taşıyıcı proteinin izole edilmesine ve/veya tanımlanmasına izin veren bir amino asit sekansı

içerir. Örneğin burada tarif edilen bir taşıyıcı proteine bir takı eklenmesi, o proteinin saflaştırılmasında ve böylece takılı taşıyıcı protein içeren konjugat aşılarda saflaştırılmasında faydalı olabilir. Burada kullanılabilen örnek takılar arasında, sınırlama olmaksızın, histidin (HIS) takıları (örn., hekza histidin takısı veya 6XHis-Takısı), FLAG-TAKISI ve HA takıları yer alır. Belirli düzeneklerde burada kullanılan takılar çıkarılabilir, örn., artık ihtiyaç kalmaması üzerine, örn., protein saflaştırıldıktan sonra kimyasal ajanlar tarafından veya enzimatik vasıtalarla çıkarılır.

10

Belirli düzeneklerde burada tarif edilen bakteriyel konakçı hücreler ve burada tarif edilen bu tür bakteriler konakçı hücrelerin ürettiği konjugatlar, avantajlı özelliklere sahiptir. Örneğin belirli düzeneklerde, Gram-pozitif bakterilerden türetilmiş regülatör genler içeren, burada adı geçen regülatör genlerin, oligo- veya polisakarid biyosentezinde yer aldığı burada tarif edilen bakteriyel konakçı hücreler, adı geçen regülatör genlerin var olması sonucunda boyu uzamış şeker antijenleri, örn., oligo- ve/veya polisakaridler üretebilir. Ek olarak burada tarif edilen bakteriyel konakçı hücreler, Gram-pozitif bakterilerden türetilmiş regülatör genlerin olmadığı Gram-negatif bakteriyel konakçı hücreler ile kıyaslandığında artmış miktarlarda şeker antijenleri, örn., oligo- ve/veya polisakaridler üretebilir. Bu karakteristiklerin her biri, bakteri hücrelerinin ürettiği konjugatların, daha yüksek bir şeker antijeni-protein oranına sahip olmasından dolayı ve bakteri hücreleri, daha fazla sayıda konjugat ürettiği için avantajlıdır.

25

Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen bir bakteriyel konakçı hücre,

aynı özellikleri taşıyan ancak Gram pozitif bakterilerden, oligo- veya polisakarid biyosentezinde yer alan bir regülatör gen içermeyen bir bakteriyel konakçı hücreden yaklaşık %5, %10, %15, %20, yaklaşık %25, yaklaşık %30, yaklaşık %40, yaklaşık %50 veya %50'nin

5 üzerinde daha fazla konjugat üretir. Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen bir bakteriyel konakçı hücre, aynı özellikleri taşıyan ancak Gram pozitif bakterilerden, oligo- veya polisakarid biyosentezinde yer alan bir regülatör gen içermeyen bir bakteriyel konakçı hücreden %5

10 ila %10, %10 ila %20, %20 ila %30, %30 ila %40 veya %40 ila %50 daha fazla konjugat üretir.

Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen bir bakteriyel konakçı hücre, aynı özellikleri taşıyan ancak Gram pozitif bakterilerden, oligo- veya polisakarid biyosentezinde yer alan bir regülatör gen içermeyen bir

15 bakteriyel konakçı hücreden yaklaşık %5, %10, %15, %20, yaklaşık %25, yaklaşık %30, yaklaşık %40, yaklaşık %50 veya %50'nin üzerinde daha fazla şeker antijeni, örn., oligo- ve/veya polisakarid üretir. Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen bir bakteriyel konakçı hücre, aynı özellikleri taşıyan ancak Gram pozitif bakterilerden, oligo-

20 veya polisakarid biyosentezinde yer alan bir regülatör gen içermeyen bir bakteriyel konakçı hücreden yaklaşık %5 ila %10, %10 ila %20, %20 ila %30, %30 ila %40 veya %40 ila %50 daha fazla şeker antijeni, örn., oligo- ve/veya polisakarid üretir.

25 Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen bir bakteriyel konakçı hücre, aynı özellikleri taşıyan ancak Gram pozitif bakterilerden, oligo- veya polisakarid biyosentezinde yer alan bir regülatör gen içermeyen bir bakteriyel konakçı hücrenin ürettiği şeker antijenlerinden, örn., oligo

ve/veya polisakaridlerden yaklaşık %5, %10, %15, %20, yaklaşık %25, yaklaşık %30, yaklaşık %40, yaklaşık %50 veya %50'nin üzerinde daha uzun şeker antijenleri, örn., oligo- ve/veya polisakaridler üretir. Belirli düzeneklerde, burada tarif edilen bir bakteriyel konakçı hücre, aynı özellikleri taşıyan ancak Gram pozitif bakterilerden, oligo- ve/veya polisakarid biyosentezinde yer alan bir regülatör gen içermeyen bir bakteriyel konakçı hücrenin ürettiği şeker antijenlerinden, örn., oligo ve/veya polisakaridlerden %5 ila %10, %10 ila %20, %20 ila %30, %30 ila %40 veya %40 ila %50 daha uzun şeker antijenleri, örn., oligo ve/veya polisakaridler üretir.

Burada tarif edilen konjugatları karakterize etmek için, örn., taşıyıcı proteini, eklenmiş şeker antijen(ler)ini (örn., oligo ve/veya polisakarid) veya her ikisini de karakterize etmek için çeşitli deneyler, örneğin yüksek performanslı büyüklük dışlama kromatografisi, izoelektrik odaklanma, SDS-PAGE ve Western Blot, MS'ye göre moleküler ağırlık tespiti, N terminal sekanslama, amino asit analizi, ters fazlı sıvı kromatografisi, elektrosprey kütle spektroskopisi, ardışık kütle spektrometrisi (MS/MS) ve triptik dijesyon sonrası kütle spektroskopisine göre peptit haritalandırma kullanılabilir.

DUZENEKLER

Bir düzenekte, burada bir polisakarid üretimi için değiştirilmiş bir Gram-negatif bakteri sağlanır; buradaki Gram-negatif bakteri, bir Gram-pozitif bakterinin bir kapsüler polisakarid gen kümesinden bir regülatör gen içerir. Belirli düzeneklerde Gram-negatif bakteri, kapsüler polisakarid gen kümesinin açık okuma çerçevelerinden en az

%25, %50, %75, %85, %90 veya en az %95'ini içerir. Belirli düzeneklerde Gram-negatif bakteri, bir tam kapsüler polisakarid gen kümesi içerir. Belirli düzeneklerde polisakarid, kapsüler polisakaridin bir epitopunu içerir.

5

Belirli düzeneklerde, önceki paragraftaki Gram-negatif bakteri, *Escherichia* türleri, *E. coli*, *Shigella* türleri, *Klebsiella* türleri, *Salmonella* türleri, *Yersinia* türleri, *Neisseria* türleri, *Vibrio* türleri ve *Pseudomonas* türlerinin oluşturduğu gruptan seçilir. Spesifik bir düzenekte Gram-negatif bakteri, *E. coli*'dir.

Belirli düzeneklerde, önceki paragraflardan herhangi birindeki Gram-negatif bakteri halinde değiştirilen bir Gram-pozitif bakterinin bir kapsüler polisakarid gen kümesinden regülatör gen, bir *Streptococcus pneumoniae* regülatör genidir. Spesifik bir düzenekte *S. pneumoniae* regülatör geni, *S. pneumoniae* Tip 1'dendir. Spesifik bir düzenekte *S. pneumoniae* regülatör geni, *S. pneumoniae* Tip 4'tendir.

Belirli düzeneklerde, önceki paragraflardan herhangi birindeki Gram-negatif bakteri halinde değiştirilen bir Gram-pozitif bakterinin bir kapsüler polisakarid gen kümesinden regülatör gen, bir *Staphylococcus aureus* regülatör genidir. Spesifik bir düzenekte regülatör gen, bir *Staphylococcus agalactiae* regülatör genidir.

Belirli düzeneklerde, önceki paragrafların herhangi birindeki Gram-negatif bakteri, bir oligosakaril transferaz içerir. Spesifik bir düzenekte oligosakaril transferaz, Gram-negatif bakteri için heterologtur.

Belirli düzeneklerde, önceki paragrafların herhangi birindeki Gram-negatif bakteri, en az bir heterolog glikosiltransferaz içerir. Spesifik bir düzenekte heterolog glikosiltransferaz, bir prokaryotik glikosiltransferazdır. Spesifik bir düzenekte glikosiltransferaz, 5 regülatör gen ile aynı Gram-pozitif bakteriden elde edilir.

Belirli düzeneklerde, önceki paragrafların herhangi birindeki Gram-negatif bakteri, Gram-negatif bakteri için fitri bir veya daha fazla genin delesyonunu veya eylemsizleştirilmesini içerir. Spesifik bir 10 düzenekte bir veya daha fazla delete edilmiş gen, waaL genini içerir. Spesifik bir düzenekte bir veya daha fazla delete edilmiş gen, Gram-negatif bakteri içerisinde O antijen biyosentez ile ilişkili olan bütün genleri içerir.

15 Belirli düzeneklerde, önceki paragraflardan herhangi birindeki Gram-negatif bakteri halinde değiştirilmiş regülatör gen, wzg, wzh, wzd, wze, capA, capB veya capC'dir.

Belirli düzeneklerde önceki paragrafların herhangi birindeki Gram- 20 negatif bakteri, glikosilasyon için bir konsensüs sekansı içeren bir taşıyıcı proteini şifreleyen bir nükleik asit içerir. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı proteini şifreleyen nükleik asit, Gram-negatif bakteri için heterologtur. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı protein, P. auruginosa'dan detoksifiye eksotoksin A, S. aureus'a ait CRM197, 25 Difteri toksoidi tetanos toksoidi, detoksifiye hemolisin A, kümelenme faktörü A, kümelenme faktörü B, E. coli FimH, E. coli FimHC, E. coli ısıyla değişken enterotoksini, E. coli ısıyla değişken enterotoksininin detoksifiye varyantları, Kolera toksini B alt birimi (CTB), kolera

toksini, kolera toksininin detoksifiye varyantları, *E. coli* sat proteini, *E. coli* sat proteininin yolcu alanı, *C. jejuni* AcrA, *C. jejuni* doğal glikoproteinleri ve *S. pneumoniae* pnömolisinidir. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı protein, bir *S. pneumoniae* proteini, örn., *S. pneumoniae* pnömolisini, *S. pneumoniae* NOX, *S. pneumoniae* PspA, *S. pneumoniae* PcpA, *S. pneumoniae* PhtD, *S. pneumoniae* PhtE, *S. pneumoniae* Ply veya *S. pneumoniae* LytB'dir. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı protein, polisakaride, bir oligosakaril transferaz tarafından konjuge edilir.

10

Belirli düzeneklerde, önceki paragrafların herhangi birindeki -negatif bakteri halinde değiştirilmiş regülatör gen, aşağıdaki kapsüller polisakarid gen kümelerinden birine karşılık gelen bir regülatör gendir: *S. pneumoniae* CPS1, CPS2, CPS3, CPS4, CPS5, CPS6 (A ve B), CPS7 (A,B, C), CPS8, CPS9 (A, L,N, V), CPS10 (A,B,C,F), CPS11 (A, B,C,D,F), CPS12(A,B,F), CPS13, CPS14 CPS15(A,B,C,F), CPS16(A,F), CPS17(A,F), CPS18(A,B,C,F), CPS19(A,B,C,F), CPS20,CPS21, CPS22(A,F), CPS23(A,B,F), CPS24(A,B,F), CPS25(A,F), CPS26, CPS27,CPS28(A,F), CPS29, CPS31, CPS32(A,F), CPS33(A,B,C,D,F), CPS34, CPS35(A,B,C,D,F), CPS36, CPS37, CPS38, CPS39, CPS40, CPS41(A,F), CPS42, CPS43, CPS44, CPS45, CPS46, CPS47(A,F) veya CPS48; veya *Staphylococcus aureus* CPS5 veya CPS8; *Streptococcus agalactiae* (grup B, GBS) CPSIa, CPSIb, CPSII, CPSIII, CPSIV, CPSV, CPSVI, CPSVII veya CPSVIII.

25

Bir düzenekte, burada bir Gram-negatif bakteride replikasyon yapabilen bir vektör sağlanır; burada adı geçen vektör, bir Gram-

pozitif bakteri içerisinde kapsüler polisakarid biyosentezi ile ilişkili bir regülatör gen içerir.

5 Belirli düzeneklerde, UDP-glukoz:undekaprenil fosfat glukoz-fosfat transferaz aktivitesinin ekspresyonu ve aktivitesi, önceki paragrafların herhangi birindeki Gram-negatif bakteride artar.

10 Belirli düzeneklerde, önceki paragrafların herhangi birindeki Gram-negatif bakteri, entero-ortak-bakterilerinin (örn., *E. coli* W3110) kolanik asit wca operonu tarafından şifrelenmiş WcaJ'yi eksprese eder.

15 Belirli düzeneklerde, burada bir polisakarid üretimi için değiştirilmiş bir Gram-negatif bakteri, örneğin önceki paragraflardan herhangi birindeki bir Gram-negatif bakteri sağlanır; burada Gram-negatif bakterinin bir Gtr enzimini şifreleyen bir gen işlevsel olarak eylemsizleştirilir. Spesifik bir düzenekte, bir Gtr enzimini şifreleyen genin işlevsel olarak eylemsizleştirilmesi, Und-P bağlantılı glukozun ortadan kalkmasıyla sonuçlanır. Spesifik bir düzenekte, Gram-negatif 20 bakterinin bir Gtr enzimini şifreleyen gen delete edilir. Spesifik bir düzenekte, GtrA, GtrB ve/veya GtrS'yi şifreleyen genler işlevsel olarak eylemsizleştirilir. Spesifik bir düzenekte, GtrA, GtrB ve/veya GtrS'yi şifreleyen genler delete edilir. Spesifik bir düzenekte Gram-negatif bakteri, *Escherichia* türleri, *E. coli*, *Shigella* türleri, *Klebsiella* 25 türleri, *Salmonella* türleri, *Yersinia* türleri ve *Pseudomonas* türlerinin oluşturduğu gruptan seçilir.

Spesifik bir düzenekte, önceki paragraftaki Gram-negatif bakteri, bir

oligosakaril transferaz içerir. Spesifik bir düzenekte oligosakaril transferaz, Gram-negatif bakteri için heterologtur.

5 Spesifik bir düzenekte, önceki paragraflardaki Gram-negatif bakteri, Gram-negatif bakteri için heterolog olan en az bir glikosiltransferaz içerir. Spesifik bir düzenekte glikosiltransferaz, bir prokaryotik glikosiltransferazdır.

10 Spesifik bir düzenekte, önceki paragraflardaki Gram-negatif bakteri, glikosilasyon için bir konsensüs sekansı içeren bir taşıyıcı proteini şifreleyen bir nükleik asit içerir. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı proteini şifreleyen nükleik asit, Gram-negatif bakteri için heterologtur. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı protein, *P. aeruginosa*'dan detoksifiye eksotoksin A, *S. aureus*'a ait CRM197, Difteri toksoidi tetanos toksoidi, detoksifiye hemolisin A, kümelenme faktörü A, kümelenme faktörü B, *E. coli* FimH, *E. coli* FimHC, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksini, *E. coli* ısıyla değişken enterotoksininin detoksifiye varyantları, Kolera toksini B alt birimi (CTB), kolera toksini, kolera toksininin detoksifiye varyantları, *E. coli* sat proteini, *E. coli* sat proteininin yolcu alanı, *C. jejuni* AcrA ve *C. jejuni* doğal glikoproteinleridir. Spesifik bir düzenekte taşıyıcı protein, polisakaride, oligosakaril transferaz tarafından konjuge edilir.

20

25 Spesifik bir düzenekte, önceki paragraflardaki Gram-negatif bakterinin polisakaridi, *Streptococcus pneumoniae*'ye ait bir kapsüler polisakariddir.

Spesifik bir düzenekte, önceki paragraflardaki Gram-negatif

bakterinin polisakaridi, *E. coli*'ye ait bir O antijen (O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12, O13, O14, O15, O16, O17, O18, O19, O20, O21, O22, O23, O24, O25, O26, O27, O28, O29, O30, O32, O33, O34, O35, O36, O37, O38, O39, O40, O41, O42, O43, O44, O45, O46, O48, O49, O50, O51, O52, O53, O54, O55, O56, O57, O58, O59, O60, O61, O62, O63, O64, O65, O66, O68, O69, O70, O71, O73, O74, O75, O76, O77, O78, O79, O80, O81, O82, O83, O84, O85, O86, O87, O88, O89, O90, O91, O92, O93, O95, O96, O97, O98, O99, O100, O101, O102, O103, O104, O105, O106, O107, O108, O109, O110, O111, O112, O113, O114, O115, O116, O117, O118, O119, O120, O121, O123, O124, O125, O126, O127, O128, O129, O130, O131, O132, O133, O134, O135, O136, O137, O138, O139, O140, O141, O142, O143, O144, O145, O146, O147, O148, O149, O150, O151, O152, O153, O154, O155, O156, O157, O158, O159, O160, O161, O162, O163, O164, O165, O166, O167, O168, O169, O170, O171, O172, O173, O174, O175, O176, O177, O178, O179, O180, O181, O182, O183, O184, O185, O186, O187), *Salmonella* sp (*S. enterica* subsp. *Enterica*, *S. enterica* subsp. *Salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *Diarizonae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae*, *S. bongori* ve *S. enterica* subsp. *Indica*, ve O tipleri 1-67, *Pseudomonas* sp (*P. aeruginosa* O serotipleri 1-20), *Klebsiella* sp. (özellikle *K. pneumonia* serotipleri O1, O2 (ve alt serotipleri), O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10, O11, O12), *Acinetobacter* O antijenleri (özellikle *A. baumannii* O antijenleri), *Chlamydia trachomatis* O antijenleri (serotip A, B, C, D, E, F, G, H, I J, K, L1, L2, L3), *Vibrio cholera* O antijenleri O1 ila 155, *Listeria* sp., özellikle *L. monocytogenes* tip 1, 2, 3, 4 ve bunların alt serotipleri, *Legionella pneumophila* serotip 1 ila 15 O antijenleri, *Bordetella parapertussis* O antijenleri, *Burkholderia mallei* ve

pseudomallei O antijenleri, Francisella tularensis, Campylobacter sp. (C. jejuni); Clostridium difficile'ye ait kapsüler polisakaridler (serotip A, G, H, K, S1, S4, D, Cd-5 ve C. perfringens serotip A, B, C, D ve E), Staphylococcus aureus tip 5 ve 8, Streptococcus pyogenes (grup B streptokok kapsüler serotipi polisakaridleri), E. coli, Streptococcus agalacticae (grup A streptokok kapsüler polisakaridleri), Neisseria meningitidis (serotip A, B, C, W, Y, X), Candida albicans, Haemophilus influenza, Enterococcus faecalis kapsüler polisakaridleri tip I-V; ve diğer yüzey polisakarid yapıları, örn., Borrelia burgdorferi glikolipitleri), Neisseria meningitidis pilin O glikan ve lipooligosakaridi (LOS), Haemophilus influenza LOS, Layşmani majör lipofosfoglikan, tümörle bağlantılı karbohidrat antijenleri, sıtma glikosil fosfatidilinositülü veya mikobakteri tüberküloz arabinomannanıdır.

15

Spesifik düzeneklerde, burada önceki paragraflardan herhangi birindeki Gram-negatif bakterinin ürettiği bir rekombinant glikoprotein sağlanır.

20 Spesifik düzeneklerde, burada bir rekombinant glikoprotein üretmeye yönelik olup, önceki paragraflardan herhangi birindeki Gram-negatif bakterinin, proteinlerin üretimi için uygun koşullar altında kültürlenmesini kapsayan bir yöntem sunulur. Spesifik bir düzenekte yöntem ayrıca rekombinant glikoprotein saflaştırılmasını da içerir.

25

Spesifik bir düzenekte, burada bir Plesiomonas shigelloides O antijen gen kümesi içeren değiştirilmiş bir E. colihücreci sunulur; burada O

antijen gen kümesinin wbgW geni eylemsizleştirilir ve burada E. coli hücresi, Und-PP-D-FucNAc4N üretir.

5 Spesifik bir düzenekte, burada bir Shigella sonnei veya Plesiomonas shigelloides O17 O antijen gen kümesi içeren değiştirilmiş bir E. coli hücresi sunulur; burada O antijen gen kümesinin wbgW geni eylemsizleştirilir ve burada E. coli hücresi, Und-PP-D-FucNAc4N üretir.

10 6- ÖRNEKLER

Örnek 1: E. coli'de CPS1 konjugatlarının sentezi:

15 Buluşun bir düzeneginin bir amacı, E. coli'de CPS tip 1 antijenik polisakaridleri üretmektir. Yukarıda müzakere edildiği gibi biz, yeni bir yolda, E. coli'nin, S. pneumoniae CPS kümesinin biyosentetik mekanizmasını eksprese etme kabiliyetinden faydalandık.

20 CPS küme DNA'sı (dexB ile aliA arasındaki DNA sekansıyla tanımlandığı gibi), ŞEKİL 2'de gösterilir ve S. pneumoniae Tip 1'in tekrar birimi yapıları, ŞEKİL 3'te gösterilir. Tekrar birimi, bir D-FucNAc4N ile başlar, ardından alfa 1-3 glikosidik bağlantıları halinde (-4-a-D-GalA-1,3-a-D-GalA-1,3-a-D-FucNAc4N-) bağlanmış iki D-GalA tortusu gelir. Ek olarak RU, steokiometrik olmayan biçimde O-asetile edilir (Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabbinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA ve arkadaşları: Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. PLoS genetics 2006, 2(3):e31).

DNA sekansı, şunlara yönelik proteinleri şifreleyen farazi genler ihtiva eder:

- i) taşıma/regülasyon (Wzg, Wzh, Wzd, Wze),
- ii) sonuçlanmış formda homoloji araştırmaları olarak, çok büyük olasılıkla iki GalA tortusunun transferinden sorumlu iki glikosiltransferaz (WchBD)
- iii) bir farazi asetiltransferaz WchC,
- iv) sitoplazmik membranın dış yaprakçığı üzerindeki tekrar birimlerinin polimerizasyonu için bir polimeraz wzy
- v) tekli tekrar birimlerine, sitoplazmik membranın iç yaprakçığından dış yaprakçığına doğru hafifçe vurması için bir flippaz wzx
- vi) nükleotitle aktifleştirilmiş D-GalA'nın sentezinden sorumlu iki protein, yani Gla ve Ugd. Temizlikçi UDP-Glc'den Gla ve Ugd yoluyla UDP-D-GalA sentezi gösterildi (Munoz R, Lopez R, de Frutos M, Garcia E: First molecular characterization of a uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase: an enzyme required for capsular biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Mol Microbiol* 1999, 31(2):703-713)
- vii) TDP-L-Ramnoz yaptığı bilinen dört protein RmlACBD. Bu genler kriptiktir ve belki CPS üretimi için dispense edilebilir.

Birlikte alındığında bu, aşağıdakiler haricinde bir tip 1 CPS yapmak için gerekli tüm genlerin küme içerisinde şifrelenmesi anlamına gelir:

- a) başlatıcı şeker UDP-D-FucNAc4N'nin sentezi için proteinleri şifreleyen biyosentetik genler;
- b) fosfo-D-FucNAc4N'nin lipid taşıyıcı Und-P'ye eklenmesi için bir fosfor-şeker transferazı şifreleyen bir gen. CPS tip 1'i, modifiye

- edilmiş bir LPS biyosentetik yolağıyla sentezlemek için bir *E. coli* konakçı suşunda a) ve b)'nin, CPS tip 1 kümesi ilavesiyle pnömokok LPS kapsülü sentezlenebilecek şekilde tedarik edilmesi gerekir. *E. coli* suşları genellikle bu tür enzimleri şifrelemez.
- 5 Belirgin şekilde FucNAc4N'yi sentezlediği ve bunu bir polisakarid içerisine dahil ettiği bilinen sadece bir avuç mikroorganizma vardır: *S. pneumoniae* CP1 suşları, *Shigella sonnei*, *Plesiomonas shigelloides* 017 ve *Bacterioides fragilis*.
- 10 Bu nedenle biz, adı geçen işlevsellikleri sağlayan bir gen kümesi bulunması gerekliliğini kanıtlamaya çalıştık. Biz buna, *Shigella sonnei* veya *Pseudomonas shigelloides* 017 O antijeninin sentezi için genetik biyosentetik mekanizma elementlerini kullanarak ulaştık. Bu organizmaların her ikisi de, özdeş yapıda bir O antijeni sentezler. Bu
- 15 O antijen, bir disakarid tekrar birimi -4-a-L-AlfNAcA-1,3-a-D-FucNAc4N-1-'den müteşekkil bir lineer polimerden müteşekkil gerçek bir gram negatif O antijendir, (ŞEKİL 4) (Batta G, Liptak A, Schneerson R, Pozsgay V: Conformational stabilization of the altruronic acid residue in the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*/*Plesiomonas shigelloides*. Carbohydr Res 1997, 305(1):93-99). Başlatıcı şekerin, D-FucNAc4N olduğu gösterildi (Kubler-Kielb J, Vinogradov E, Ben-Menachem G, Pozsgay V, Robbins JB, Schneerson R: Saccharide/protein conjugate vaccines for *Bordetella* species: preparation of saccharide, development of new conjugation
- 20 procedures, and physico-chemical and immunological characterization of the conjugates. Vaccine 2008, 26(29-30):3587-3593). Biyosentez için gerekli gen kümesi (ŞEKİL 5), *P. shigelloides*'in genomu içerisinde ve *S. sonnei*'de bir virülans plazmid üzerinde şifrelenir

(Kopecko DJ, Washington O, Formal SB: Genetic and physical evidence for plasmid control of *Shigella sonnei* form I cell surface antigen. *Infection and immunity* 1980, 29(1):207-214). Gen fonksiyonları, homoloji analiziyle farazi olarak bilinir (Xu DQ, Cisar JO, Ambulos Jr N, Jr., Burr DH, Kopecko DJ: Molecular cloning and characterization of genes for *Shigella sonnei* form I O polysaccharide: proposed biosynthetic pathway and stable expression in a live salmonella vaccine vector. *Infect Immun* 2002, 70(8):4414-4423).

10 Bu nedenle *E. coli*'de CPS tip 1 üretimi için biyosentetik mekanizma kurma stratejisi, şu şekildeydi:

İlk önce biz, Und-PP-D-FucNAc4N üretim yolağını yeniden biçimlendirmeyi amaçladık. Buna ulaşmak için biz, *P. shigelloides* O antijen kümesini *E. coli*'de rekombinant şekilde eksprese ettik.

15 İkinci olarak biz, *P. shigelloides* 017 kümesinden L-AltNAcA glikosiltransferazı delete ederek sonuçta bir Und-PP-D-FucNAc4N kesik lipit öncüsü elde ettik.

Uçuncü olarak biz, bir plazmid üzerine CPS tip 1 kümesini ilave ettik. Bu plazmid içerisinde şifrelenen enzimlerin, *P. shigelloides* sistemiyle yapılmış Und-PP-D-FucNAc4N öncüsünü uzatarak CPS tip 1 RU'yu tamamladığına ve RUları polimerize ederek modifiye edilmiş bir LPS yaptığına inanılıyordu.

Teknik olarak bu, şu şekilde yapıldı:

25 Birinci bir adımda biz, *P. shigelloides* O antijen gen kümesini (rfbP.shigelloidesO17) donör plazmid pDOC-C içerisine klonladık (, Lee DJ, Bingle LE, Heurlier K, Pallen MJ, Penn CW, Busby SJ, Hobman JL: Gene doctoring: a method for recombineering in

laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. BMC Microbiol 2009, 9:252). Bu donör plazmidini ve bir rekombinazı ve bir endonükleazı şifreleyen bir yardımcı plazmid kullanarak (Kuhlman TE, Cox EC: Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. Nucleic acids research 2010, 38(6):e92) biz, bir W3110 Δ wecAwzzECA Δ waaL *E. coli* suşunun rfb kümesini, homolog rekombinasyon yoluyla plazmidden gelen *P. shigelloides* kümesi (wzz ila wbgZ, ŞEKİL 5) ile değiş tokuş ettik. Bakınız örn., Uluslararası Başvuru No. PCT/EP2013/071328. Sonuçta elde edilen kromozom anlamında entegre edilmiş suş, western blotlamada anti *S. sonnei* tiplleme serumlarıyla reaktif rekombinant O antijeni yapar.

Bu entegre edilmiş *P. shigelloides* kümesi içerisinde şifrelenen wbgW geni, Datsenko ve Wanner'in yöntemine göre homolog rekombinasyon yoluyla kromozomdan delete edildi (Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci ABD 2000, 97(12):6640-6645). Sonuçta elde edilen suş, büyük olasılıkla suşun tam bir disakarid tekrar birimi yapamamasından dolayı bir daha hiç anti *S. sonnei*'ye özel lipit bağlantılı polisakarid üretmedi.

Sonra CPS 1 kümesi wzg ila ugd (ŞEKİL 2), bir suni promoter (J23103, http://partsregistry.org/Part:BBa_J23103) ve *E. coli*'de aktif bir optimal ribozomal bağlanma sahasının arkasına klonlandı.

25

Tarif edilen genetik sistemin, lipit bağlantılı oligosakarid biyosentezinin analizi için bir çalkalama şişesi kültüründe ekspresyonu, bir anti CPS tip 1'e özel antiserum kullanılarak western

blotlamada merdiven benzeri bir bant şablonu üretti (ŞEKİL 6). Bu, modifiye edilmiş LPS biyosentez yolağının, *S. pneumoniae*'nin tip 1 CPS'sinin rekombinant ekspresyonuna iştirak ettiğini gösterir.

- 5 Uretilen reaktif, proteaz dirençli materyalin gerçekten undekaprenil pirofosfata bağlı CPS tip 1 olduğuna dair daha fazla kanıt sağlamak için ŞEKİL 6'dan gelen örneklere bir asit duyarlılık testi uygulandı. TFA ile hafif asit işlemi, anti CPS tip 1 sinyalini ortadan kaldırdı ki bu, polisakarid ile undekaprenili bağlayan pirofosfat bağının var
- 10 olduğunun göstergesidir (ŞEKİL 7). Biz, taşıyıcı genler wzg-wzd varlığında modifiye edilmiş bir O antijen yapmanın mümkün olduğunu bulduk. Bu genlerin doğrudan bir etkiye sahip olup olmadığını çek etmek için biz, CPS tip 1 plazmidinden dört taşıyıcı geni homolog rekombinasyon yoluyla delete ettik (Bloor AE,
- 15 Cranenburgh RM: An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. Applied and environmental microbiology 2006, 72(4):2520-2525). Modifiye edilmiş plazmidin birlikte ekspresyonu şaşırtıcı şekilde anti CPS tip 1 sinyalini kaybolmasına yol açar
- 20 (ŞEKİL 8). Bu, modifiye edilmiş O antijenin verimli şekilde üretilmesi için taşıyıcı genlere gerek olduğunu işaret eder.

- Rekombinant CPS tip 1'in, proteinlerin glikosilasyonu ve böylece protein-karbohidrat konjugatlarının oluşturulması için
- 25 kullanılabileceğini göstermek için biz, bakteriyel protein glikosilasyon mekanizmasını (Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW ve arkadaşları: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its

functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002, 298(5599): 1790-1793)
uygun rekombinant *E. coli* suşlarında konjugat üretme kabiliyeti bakımından test ettik.

- 5 Bir deney, (Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M: Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci ABD* 2005, 102(8):3016-3021; Kowarik M, Young NM, Numao S,
- 10 Schulz BL, Hug I, Callewaert N, Mills DC, Watson DC, Hernandez M, Kelly JF ve arkadaşları: Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *The EMBO journal* 2006, 25(9):1957-1966; Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW ve arkadaşları: N-linked
- 15 glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 2002, 298(5599):1790-1793; Ihssen J, Kowarik M, Dilettoso S, Tanner C, Wacker M, Thony-Meyer L: Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 2010, 9:61)'de belgelenen N-glikosilasyon sistemi kullanılarak
- 20 yapıldı. CPS tip 1 lipid bağlantılı oligosakaridi eksprese eden rekombinant *E. coli*, iki indüklenebilir plazmid ile transforme edildi. Bir plazmid, genellikle akseptör proteinleri (-D/E-x-N-x-S/T- tipi bir konsensüs amino asit sekansını şifreleyen; burada x, prolin olamaz) N glikosile ettiği tekrar tekrar gösterilen PglB enzimini şifreledi. İkinci
- 25 plazmidde, iki sokulmuş N glikosilasyon konsensüs sekansı ve Ni-afinite kromatografisiyle saflaştırma için bir His takısı ihtiva eden taşıyıcı protein EPA şifrelendi. Glikosilasyon deneyinden sonra EPA proteini saflaştırıldı ve anti his takısı antiserumları (ŞEKİL 9, panel A)

ve anti CPS tip 1 antiserumları (ŞEKİL 9, panel B) ile problandı ve elüsyon fraksiyonlarında açıkça saptandı. Bu, rekombinant CPS tip 1 ekspresyon sistemi ile birlikte PglB sisteminin, anti-pnömonokok aşı adayları olarak kullanılabilen protein konjugatlarının verimli şekilde
5 üretilmesine izin verdiğini kanıtlar.

Örnek 2: E. coli’de CPS4 konjugatlarının sentezi:

Ayrıca aktif konjugat aşılar üretmek için protein glikosilasyonu
10 kullanılabileceğini göstermek için biz, CPS1 için olduğu gibi taşıyıcı genler varlığında bir CPS tip 4 konjugat üretmeyi amaçladık.

CPS4, indirgeyici ucunda bir GalNAc bulunan bir tekrar birimi yapısına sahiptir (ŞEKİL 10). Tam yapı şöyledir: -1,4-(2,3 S pyr)-a-D-Gal-1,3-a-D-ManNAc-1,3-a-L-FucNAc-1,3-a-D-GalNAc
15

CPS1 gen kümesinin aksine S. pneumoniae’sen CPS tip 4’ü şifreleyen küme, bir CPS4’ü sentezlemek için gerekli tüm enzimleri şifreler (ŞEKİL 11). UDP-D-FucNAc ve UDP-D-ManNAc, MnaA, FnlA, B ve C proteinleriyle yapılır. Farklı glikosiltransferazların fonksiyonları, spesifiteleri bilinen diğer glikosiltransferazlar ile homologilerine dayanarak tahmin edilir. WciI, tahmin edilen bir glikosil-fosfat transferazdır ve bu yüzden Und-PP-D-GalNAc sentezinden sorumludur; WciJ, K ve L, D-ManNAc, L-FucNAc ve D-Gal
20 transferazlardır ve WciM, piruvat transferazların bir homologudur (Jiang SM, Wang L, Reeves PR: Molecular characterization of Streptococcus pneumoniae type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. Infect Immun 2001, 69(3):1244-1255)

- E. coli'de bir CPS4 modifiye edilmiş yolağını yeniden yapılandırmak için biz ilk önce CPS4 gen kümesini (aliA ile dexBarasındaki genler), E. coli'de eksprese edilmesi için bir plazid içerisinde klonlayarak sonuçta pGVXN803 elde ettik. İkinci bir kurulumda biz, wzg, wzh, wzd ve wze'nin etkilerini ve ayrıca wciI delesyonunun etkisini açık bir biçimde analiz etmek için sadece taşıyıcı genlerden aşağı yöndeki genleri (pGVXN753'e neden olan), yani wciJ-fnlC'yi dahil ettik. WciI, biyo-enformatik analizine göre bir fosfor-şeker transferaz homologudur. E. coli'de, spesifik olarak enterobakteriyel ortak antijen (ECA) kümesi içerisinde şifrelenen wecA geni gibi benzer aktiviteler mevcuttur. pGVXN753'te biz, sokulan genlerin transkripsiyonunu garanti altına almak için birçok klonlama sahasında yukarı yönde suni bir promoter sekans dahil ettik.
- E. coli'de ekspresyon üzerine yukarıda adı geçen plazmidlerin etkilerini analiz etmek için biz, W3110 Δ waaL hücrelerini pGVXN753 ve pGVXN803 ile transforme ettik. W3110 Δ waaL, Und-PP-D-GlcNAc'nin sentezinden sorumlu olan ancak Und-PP-D-GalNAc'yi sentezleyemeyen WecA proteinini şifreler. İkinci lipid bağlantılı monosakarid, CPS4 RU'yu tamamlaması gereken CPS4 kümesi enzimleri için beklenen substrattır. Bu yüzden bir, bir CPS4 kümesi plazmidine ek olarak iki farklı D-GlcNAc ile D-GalNAc epimerazı, Z3206 (Rush JS, Alaimo C, Robbiani R, Wacker M, Waechter CJ: A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenyl to GalNAc-P-P-undecaprenyl in Escherichia coli 0157. J Biol Chem 2010, 285(3):1671-1680) ve GalE (Linton D, Dorrell N, Hitchen PG, Amber S, Karlyshev AV, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M, Wren BW: Functional analysis of the Campylobacter

jejuni N-linked protein glycosylation pathway. Mol Microbiol 2005, 55(6):1695-1703) tedarik ettik. Her iki gen de, ilki, lipit bağlantılı D-GlcNAc'nin (Und-PP-D-GlcNAc $\leftrightarrow$ Und-PP-D-GalNAc) epimerize edilmesiyle ve ikincisi, substrat olarak nükleotitle aktifleştirilmiş şeker (UDP-D-GlcNAc $\leftrightarrow$ UDP-D-GalNAc) kullanmak suretiyle olmak üzere D-GalNAc'nin in vivo sentezine izin veren proteinleri şifreler.

ŞEKİL 12, analiz sonuçlarını gösterir. Hücreler büyütüldü ve epimeraz ekspresyonu indüklendi ve proteaz dirençli biokütle, SDS-PAGE yoluyla ayrıldı ve glikolipitlerin nitroselüloz membrana aktarılmasından sonra immüno-saptama yoluyla analiz edildi. Sonuçlar, pGVXN803'ün hücreler içerisinde mevcut olduğu her zaman anti CPS4 antiserumu tarafından merdiven benzeri bir sinyal saptandığını gösterir. pGVXN753 de, taşıyıcı genleri ve wciI'i ihtiva eden yapılardan çok daha zayıf olsa da bir sinyal indükledi. Epimerazın indüklemesi ve doğası, sinyal mukavemetini marjinal şekilde etkiledi. En güçlü reaktivite, pGVXN803 ve nükleotitle aktifleştirilmiş şekere özel epimeraz ile elde edildi ki bu, WciI'nin bir D-GalNAc-fosfat transferaz olduğunu işaret eder. Bu yüzden CPS1 için olduğu gibi şaşırtıcı şekilde taşıyıcı genler, E. coli'de CPS4'le modifiye edilmiş LPS'nin verimli şekilde üretilmesi için önemlidir. wciI'ya karşı taşıyıcı genlerin etkisini incelemek için wciI'in pGVX753 varlığında birlikte ekspresyonu kullanılabilir. Çok muhtemel şekilde tek başına wciI, CPS4 ekspresyonunu, taşıyıcı genler varlığında gözlemlenen seviyeye (yani pGVX803 ihtiva eden W3110 Δ waaL'deki) çıkaramaz.

E. coli'de üretilen CPS4'ü daha fazla karakterize etmek için biz,

pGVXN803'ü E. coli SCM6'da eksprese ettik (Schwarz F, Huang W, Li C, Schulz BL, Lizak C, Palumbo A, Numao S, Neri D, Aebi M, Wang LX: A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. Nat Chem Biol 2010; 5 SCM6, wecA, ECA, waaL'da delete edilir) ve glikolipitleri, 2-AB etiketleme ve MS/MS analiziyle analiz ettik. 2-AB etiketleme, poli- ve oligosakaridleri izole etmek, hidrolize etmek, modifiye etmek ve bunları HPLC ve MS/MS yoluyla analiz etmek için geliştirilmiş olan bir yöntemdir. Hücreler, bir gece süreyle büyütüldü ve kurulu bir
10 prosedüre göre hazırlandı ve işlendi (US2011/0274720).

Kısacası glikolipitler, biokütleden organik solventlerle (Kloroform:Metanol:Su 10:10:3) özümlendi ve C18 kartuşları üzerinden saflaştırıldı; elüatlar, su/izopropanol içinde TFA ile işleme
15 tabi tutularak pirofosfat bağları hidrolize edildi ve Und-PP-glikanlardan glikan kısmı salındı. Sonuçta elde edilen çözelti, bir başka C18 kartuşu üzerinden geçirilerek lipitler çıkarıldı. Devridaim kurutuldu ve glikanlar, indirgeyici uçta 2 aminobenzamid ile etiketlendi. Sonuçta elde edilen etiketli glikanlar, bir glycosepN
20 normal fazda kolonu kullanılarak HPLC yoluyla ayrıldı ve flöresanla saptandı (US2011/0274720 A1).

Sonuçta elde edilen kromatogramlar, ŞEKİL 13'te gösterilmektedir (panel A). pGVXN803 ihtiva eden veya etmeyen SCM6 hücrelerinden
25 elde edilen bir kromatogram karşılaştırması, ilkinde var olan ancak ikincide olmayan bir takım pikler gösterir. Bunlardan bazıları, glikan kimliğinin ve sekansının tanımlanması için MS/MS ile analiz edildi. Bir takım pikler için beklenen CPS4 RU ve polimer yapıları ile tutarlı

olan MS/MS şablonlarının tanımlanması mümkün oldu (oklarla gösterilmiştir). ŞEKİL 13'teki Panel B, 53.8 dakikada elüte olan pikten MALDI-MS/MS spektrumunu gösterir. Fragmentasyon iyon serisi, indirgeyici olmayan heksozda piruvat ile modifiye edilmiş
5 CPS4 RU ile tutarlıdır.

Biz, piruvatın stoikiometrik olmayan varlığından dolayı heterojenlik gözlemledik ki bu, piruvatlı CPS4 tekrar birimlerinin kantitatif olmayan modifikasyonunun yada örnek preparasyonu sırasındaki
10 hidrolizin göstergesidir. Biz verilerden, Und-PP üzerinde CPS4 glikanları üreten modifiye edilmiş bir LPS biyosentetik yolağı üretebileceğimiz sonucuna vardık.

CSP4 glikolipitlerini daha fazla analiz etmek için biz, E. coli SCM3
15 suşundan (Faridmoayer A, Fentabil MA, Mills DC, Klassen JS, Feldman MF: Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2007, 189(22):8088-8098), CSP4'ü eksprese eden glikolipitleri özümledik ve bunları, yukarı tarif edildiği gibi (ŞEKİL 14) analiz ettik veya glikolipitleri in vitro
20 glikosilasyon için direkt olarak kullandık. Bu deneyde glikolipitler, N glikosilasyon konsensüs sekansı ihtiva eden bir akseptör peptit ve oligosakariltransferaz PglB içeren saflaştırılmış preparasyon karıştırılır (Jervis AJ, Butler JA, Lawson AJ, Langdon R, Wren BW,
25 Linton D: Characterization of the structurally diverse N-linked glycans of Campylobacter species. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2012, 194(9):2355-2362). Oluşan glikopeptitler, bir HILIC kromatografisini (ŞEKİL 15, panel A ve B) takiben glikan

sekanslaması için ESI-MS/MS ile analiz edilebilir. Bu tür bir deneyden gelen ürünlerin analiz edildiği durumda sadece peptitlere eklenen piruvile edilmiş glikanlar tanımlandı (ŞEKİL 15, panel C ve D). Buna göre ŞEKİL 13 ve 14'te gözlemlenen stoikiometrik olmayan piruvilasyon çok muhtemel şekilde piruvatın, CPS4 EU'nun kantitatif olmayan dekorasyonundan çok örnek preparasyonu sırasında glikandan hidrolize olmasından kaynaklandı. Bu yüzden biz, modifiye edilmiş LPS biyosentez yolağıyla, kimyasal konjugasyona kıyasla aktif ve muhtemelen daha iyi bir konjugatın sentezine izin veren doğal koşullar altında bir CPS üretmenin mümkün olduğu isteminde bulunuyoruz.

Bu hipotezi test etmek için biz, glikokonjugatı ön klinik deneylerde test etmeyi amaçladık. Birinci bir adımda biz, *Pseudomonas aeruginosa*'nın genetik açıdan detoksifiye Eksotoksini A (EPA, US2011/0274720 A1) olan bir genetik taşıyıcı proteine konjuge edilmiş CPS4 üretmek için mikrobiyal fermantasyon kullandık. *E. coli* W3110 Δ waaL, clmR kaseti yerine bir kanamisin direnç kaseti (kanR) konulmuş olan pACT3 (GenBank: U51556.1) içerisine klonlanmış pGVXN539 (2 N glikosilasyon konsensüs sekanslarını şifreleyen EPA taşıyıcı proteini eksprese eden (US2011/0274720 A1 ve dyx); pGVXN114 (indüklenebilir PglB ekspresyonu, US2011/0274720 A1), pGVXN207 (indüklenebilir GalE ekspresyonu (Rush JS, Alaimo C, Robbiani R, Wacker M, Waechter CJ: A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenyl to GalNAc-P-P-undecaprenyl in *Escherichia coli* 0157. *J Biol Chem* 2010, 285(3):1671-1680) ve pGVXN803 (CPS4 kümesini şifreleyen) ile transforme edildi. Hücreler, TB ortamında büyütüldü ve uygun ODlerde indüklendi ve

üretim, bir gece süreyle yapıldı. His takılı EPA, lizozim kullanılarak periplazmik özümleme ve ardından IMAC ile hazırlanmış periplazmik özütlerden saflaştırıldı. Elüsyon fraksiyonlarının analitik deneyleri, ŞEKİL 16’da gösterilmiştir. SDS-PAGE ve Coomassie boyaması, 70 ve 70 üzeri kDa’da glikosile edilmemiş ve edilmiş EPA gösterir; ikincisi, RUlardan müteşekkil bir (modifiye edilmiş) O antijen göstergesi olarak merdiven benzeri bir şablon halinde mevcuttur (ŞEKİL 16, panel A). Anti His (ŞEKİL 16, panel B) ve anti CPS4 (ŞEKİL 16, panel C) ile immüno-saptama, aynı fraksiyonların nitroselüloz membranlarına elektrotransferinden sonra, materyal içerisinde CPS4 ve EPA varlığını doğruladı.

Glikokonjugatlar, glikosile edilmemiş ve edilmiş EPA’nın ayrılması için anyon değiştirme kromatografisiyle de saflaştırıldı; glikoprotein daha sonra büyüklük dışlama kromatografisiyle de saflaştırıldı. Sonuçta elde edilen glikoprotein preparasyonu, 1-fenil-3-metil-5-pirazolon ile türevlendirme kullanılarak monosakarid kompozisyonu bakımından analiz edildi (PMP, Lv L, Yang X, Zhao Y, Ruan Y, Yang Y, Wang Z: Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. Food Chemistry 2009, 112:742-746) ki bu, rekombinant glikokonjugatın glikan kompozisyonunun, *S. pneumoniae*’den izole edilmiş CPS4’e özdeş olduğunu ortaya koydu (ŞEKİL 17).

25

Glikokonjugatların aşı aktivitesini test etmek için immünizasyon çalışmaları ve opsonofagositoz deneyleri (OPA) yapıldı. OPA, antikorların, *S. pneumoniae* hücrelerini ortadan kaldırma işlevselliğini

irdelemek için genel olarak kabul edilen bir deneydir ve bir koruma vekilidir. Biz, tavşanları, farklı dozlarda EPA-CPS4 konjugatı ile immünize ettik. Bir kontrol olarak biz, pediatrik pnömokok hastalığının engellenmesi için yaygın şekilde kullanılan lisanslı ve satışı yapılan bir ürün olan Prevenar 13'ü kullandık. Sonuçta elde edilen antiserumlar, nokta lekeyle immünojeniklik bakımından (ŞEKİL 18) ve OPA ile işlevsellik bakımından standardize edilmiş bir protokole göre analize tabi tutuldu(Romero-Steiner S, Frasch CE, Carlone G, Fleck RA, Goldblatt D, Nahm MH: Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. Clin Vaccine Immunol 2006, 13(2):165-169).

Tablo 1, elde edilen ilgili opsonik titerleri gösterir. Sonuçlar, E. coli'de rekombinant şekilde yapılmış olan glikokonjugatların, opsonofagositotik deneyde antiserum aktifini yükseltme kabiliyeti bakımından lisanslı aşı karşılığı ile eşit düzeyde iyi olduğunu ve hatta bazı durumlarda ondan daha üstün nitelikli olduğunu gösterir.

Örnek 3: E. coli'de CPS14 konjugatlarının sentezi:

20

E. coli'nin CPS konjugatları üretiminde kullanılabileceğini göstermek için biz, CPS14 konjugatları üretmeyi de amaçladık. CPS14 polisakaridi, CPS1 ve CPS4 ile benzer bir yapıda CPS14 kümesi (ŞEKİL 19) tarafından şifrelenir. CPS14, aşağıdaki yapıya sahip polimerize edilmiş RU'lardan oluşur (ŞEKİL 20): -1,6-(b-D-Gal-1,4)-b-D-GlcNAc-1,3-b-D-Gal-1,4-b-D-Glc-.

CPS14'ün biyosentezi, WchA'nın aktivitesiyle undekaprenil fosfata

(Und-P) fosfo-D-Glc ilavesi ile başlar. WchA'nın, kolanik asit kümesindeki bir genin şifrelediği *E. coli* WcaJ proteini ile özdeş aktiviteye sahip bir fosfo-glikoz transferaz olduğu biyokimyasal olarak gösterildi. D-Glc'nin daha da uzaması, küme içerisinde mevcut diğer glikosiltransferazların enzimatik etkileriyle sağlanır (Kolkman MA, van der Zeijst BA, Nuijten PJ: Functional analysis of glycosyltransferases encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *J Biol Chem* 1997, 272(31):19502-19508). CPS14 kümesi içerisindeki farklı ORFlerin detaylı fonksiyonları, wzg, wzh, wzd, wze (regülatör ve 3 taşımayla bağlantılı gen), WchJK (D-Gal transferaz), WchL (D-GlcNAc transferaz), WchM (D-Gal transferaz), Wzy (polimeraz), Wzx (flippaz) için öngörülür. WciY, CPS14 oluşması için dispense edilebilirken wchN delesyonu, CPS14 verimlerini olumsuz yönde etkiler (Kolkman MA, Wakarchuk W, Nuijten PJ, van der Zeijst BA: Capsular polysaccharide synthesis in *Streptococcus pneumoniae* serotype 14: molecular analysis of the complete cps locus and identification of genes encoding glycosyltransferases required for the biosynthesis of the tetrasaccharide subunit. *Mol Microbiol* 1997, 26(1):197-208). CPS14 kümesi, CPS14 biyosentez için minimum düzeyde gerekenden daha fazla fonksiyonun şifrelenmesi anlamında özeldir. Çok muhtemel şekilde fonksiyonlar tahsis edilmemiş proteinlerden bazıları, kapsülün biyosentezini destekleyen yardımcı enzimlerdir.

25

E. coli'de CPS 14 polisakaridi üretimini test etmek için wchA'dan wciY'ye kadar olan diziden oluşan CPS 14 gen kümesi, CPS14'ün 016 antijen kümesi (pGVXN615) içerisine entegrasyonu için belirlenmiş

pDOC donör plazmidi içerisine klonlandı (Lee DJ, Bingle LE, Heurlier K, Pallen MJ, Penn CW, Busby SJ, Hobman JL: Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. BMC Microbiol 2009, 9:252) ve *E. coli* strain

5 GVXN1128 (W3110 Δ waaL) halinde transforme edildi. pGVXN615'i barındıran proteinaz K ile dijest edilmiş *E. coli* hücrelerinin immüno blot analizi, merdiven benzeri bir şablon gösterdi ki bu, klinik CPS14 izolatlarının kapsüler serotipleme için kullanılan CPS14 antiserumu ile saptandı (ŞEKİL 21, panel A'daki küçük ek). Ayrıca tek

10 bir tekrar birimi biriktirmek için CPS14 kümesi polimerazı, wzy, pGVXN615'te transpozon mutajenezi yoluyla delete edilerek sonuçta pGVXN643 elde edildi. Glikolipitler, pGVXN643 ile transforme edilmiş *E. coli* hücrelerinden özümlendi ve yukarıda tarif edildiği gibi hidroliz ve flöresan etiketleme sonrasında NP-HPLC ile analiz edildi.

15 GlycosepN kolonundan 57.4.üncü dakikada spesifik bir pik elüte oldu (ŞEKİL 21, panel A). Bu pikin MS ve MS/MS analizi, CPS14'ün tek bir tekrar biriminin beklenen kütlesi ve fragmentasyon şablonu ile uyumluydu (ŞEKİL 21, panel B). Bu, kısmi bir CPS14 gen kümesinin, bir O antijen promoterinin kontrolü altında ekspresyonunun, genel bir

20 *E. coli* konakçı hücresi içerisinde bir rekombinant LPS biyosentetik CPS14 oligosakarid üretimine yol açabileceğini doğrular.

E. coli'de CPS14 polisakaridinin biyosentezini geliştirmek ve stabilize etmek için CPS14 kümesinin, wchA'da wciY'ye kadar olan diziyi

25 ihtiva eden bölümü, CPS14'ün *E. coli* kolanik asit kümesi (pGVXN710) içerisine entegrasyonu için belirlenmiş pDOC-C ikame plazmidi içerisine klonlandı (Lee DJ, Bingle LE, Heurlier K, Pallen MJ, Penn CW, Busby SJ, Hobman JL: Gene doctoring: a method for

recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. BMC Microbiol 2009, 9:252). CPS14 entegrasyonu, yukarıda tarif edildiği gibi GVXN1052 (W3110), GVXN1128 (W3110 Δ waaL) ve GVXN1716 (W3110 Δ waaL Δ wecA-wzzE) dahil olmak üzere bir takım *E.coli* suşlarında tamamlandı. Kolanik asit genlerinin, normal koşullar altında *E. coli*'de eksprese edilmediği ve bunların ekspresyonunun, kompleks bir regülatör ağıyla kontrol edildiği gösterilmiştir. Kolanik asit transkripsiyonunun, pozitif bir regülatör olan RcsA gerektirdiği tanımlandı (Ebel W, Trempey JE. J Bacteriol. 1999;181(2):577-84). Kolanik asit kümesi yerine RcsA ekspresyonu için bir plazmid (pGVX688) barındıran CPS14 kümesinin konulduğu proteinaz K ile dijest edilmiş *E. coli* suşlarının immüno blot analizi, CSP14 antiserumuyla saptanan merdiven benzeri bir şablon gösterdi ki bu, klinik CPS14 izolatlarını serotiplemede kullanıldı; bu şablon, RcsA yokken saptanamadı (bakınız ŞEKİL 22). Bu sonuç, kolanik asidin, polisakarid biyosentetik yollarını entegre etmek için uygun bir hedef yeri olduğunu ve heterolog polisakarid ekspresyonunun, *E. coli* RcsA proteini tarafından sıkı kontrol altında olduğunu ortaya koymaktadır.

20

E. coli'de üretilen CPS14'ü daha fazla karakterize etmek için GVX6129 (W3110 Δ waaL CA::CPS14), pGVXN688 (*rscA*) ile birlikte *E. coli*'ye transforme edildi. Glikolipitler, yukarıda tarif edildiği gibi 2-AB etiketleme ve MS/MS analiziyle analiz edildi. MS/MS analizi, CPS14'ün, ayrı ayrı 95.9 ve 115.3'üncü dakikada elüte olan 2 ve 3 alt birimini tanımladı (bakınız ŞEKİL 24).

25

Taşıyıcı genlerin ekspresyonunun, *E. coli*'de CPS14 polisakaridinin

5 üretimini üzerindeki etkisini test etmek için *S. pneumoniae* CPS14 kümesinden, taşıyıcı genleri ihtiva eden *wzg* ile *wze*, IPTG ile indüklenebilir promoter (pGVX 72) ile kopya sayısı düşük bir plazmid içerisine klonlanarak pGVX1497 oluşturuldu. Plazmid, *E. coli* suşu
 10 GVG6126'ya (*E. coli* W3110 CA::CPS14) transforme edildi ki buradan, CPS14 kümesinin *wchA* ile *wciY* bölümü, kolanik asit *E. coli* içerisine entegre edilmişti. 0.01 mM IPTG kullanılarak taşıyıcı gen ekspresyonunun indüklenmesiyle GVG6126, pGVX72 veya pGVX1497 ile transforme edildi ve kültürlendi. *E. coli* hücreleri, bir
 15 gece süreyle inkübe edildikten sonra toplandı ve proteinaz K ile dijest edildi ve proteaz dirençli bir biokütle, SDS-PAGE yoluyla ayrıldı ve glikolipitlerin nitroselüloz membrana aktarılmasından sonra immüno-saptama yoluyla analiz edildi. Sonuçlar, pGVXN1497 (*wzg-wzh-wzd-wze*'yi eksprese eden) varlığında anti CPS14 antiserumu tarafından
 20 moleküler ağırlığı yüksek merdiven benzeri bir sinyal saptandığını (bakınız ŞEKİL 23. Şerit 3) ve pGVXN1497'nin boş bir vektör (pGVX72) ile değiştirildiği durumda merdiven ebadının anlamlı şekilde küçüldüğünü (bakınız ŞEKİL 23. Şerit 2) gösterir. Bu, taşıyıcı genlerin CPS üretimi için bir destek gerektirdiğini ortaya koyar.

20

gtrABS operon, CPS14 (*wchA* tarafından sentezlenir) için doğal başlatıcı adımı, Und-PP'ye çok benzer hücresel bir bileşik olan Und-P üzerindeki glukoz sentezinde yer alır. gtrABS operon, sitoplazma içerisinde Und-P üzerindeki glukoz kurulumunda, glikolipite
 25 periplazma içerisine doğru hafifçe vurulmasında ve glukoz tortusunu *E. coli* W3110'daki 016 alt biriminin indirgeyici ucu GlcNAc üzerine aktarmak için bir donör olarak Und-P-glukoz kullanan bir glukosiltransferazda yer alan enzimleri şifreleyen genleri ihtiva eder.

D-Glc'li iki lipit öncüsü üretilmesinden kaçınmak ve sadece Und-P-CPS14 değil Und-PP-CPS14 üretmek için başlatıcı glukoz olarak sadece Und-PP-glukoz yapan bir enzim kullanılabilir. Ek olarak Und-P-glukoz üretim yolağı da delete edilebilir. Bu yolla CPS'nin tamamı,
 5 Und'a bir pirofosfat bağlantısıyla bağlanır ve böylelikle glikosilasyona hazır olur.

E. coli'de CPS14'ün biyosentetik yolağını daha da aydınlatmak ve optimize etmek için CPS 14 yolağının başlatıcı glukosiltransferaz
 10 aktivitesi arttırılabilir. Bu, wchA ve wcaJ'nin delesyonuyla ve bunların, aynı genler kullanılarak plazmid kaynaklı aşırı ekspresyon stratejileriyle tamamlanması ve glikolipit üretimi üzerindeki etkilerin analiz edilmesiyle açığa çıktı.

wcaJ genini ihtiva eden bir plazmid, CPS14 ihtiva eden ancak WchA ve WcaJ (örn. W3110 Δ waaL Δ rfaO16::CPS14-clmR Δ wchA Δ grABS) içermeyen E. coli suşlarına iyi bir şekilde transforme edilebilir. Kurulu yöntemler kullanılarak şeker üretimi, bu suşlarda analiz edilebilir. Bu sonuçlara dayanarak maksimum miktarda Und-
 15 PP'ye bağlı CPS14 üretimi için optimum gen kombinasyonu belirlenebilir ve E. coli'yi transforme ederek optimal üretim suşu üretmek için kullanılabilir. Kesinlikle üstün nitelikli şeker üretimine sahip bu yeni E. coli suşu, hem N hem de O glikosile edilmiş olmak üzere glikosile edilmiş proteinlerin üretimini zenginleştirmek için
 20 ideal olabilir. Ayrıca bu yeni değiştirilmiş suş, ek olarak indirgeyici ucunda Glc bulunan herhangi bir glikokonjugatın üretim suşuna çeşitli protein taşıyıcılar dahil edilmesi durumunda farklı glikokonjugatlar üretmek için de kullanılabilir.

Tablo 1: 'Yeni Zelanda Beyaz' tavşanları, 0ıncı gün, 21inci gün ve 42nci günde belirtilen glikokonjugat aşıları (not, μg cinsinden belirtilen miktar, enjeksiyon başına polisakarid miktarına karşılık gelir) ile subkütan yoldan immünize edildi. Glikokonjugat aşıları, ya 5 üç immünizasyonun tamamı için $\%0.12 \text{ Al}^{3+}$ ile yada prime immünizasyon (gün 0) için Freund'un Ram Adjuvanı (FCA) ve iki boost immünizasyon (gün 21 ve gün 42) için Freund'un Tam olmayan Adjuvanı (FIA) ile adjuvane edildi. Ureticilerin talimatlarına göre Prevnar-13 kullanıldı ve immünizasyon başına bir insan dozu ($2.2 \mu\text{g}$ 10 CPS4 polisakaridine karşılık gelir) enjekte edildi. Hayvanlar, 56ncı gün itlaf edildi ve elde edilen serum, bir opsonofagositoz öldürme deneyinde (OPK) nötralize edici aktivite bakımından analiz edildi. 'Opsonik Endeks', bakterilerin (pnömokok serotip 4) $\%50$ 'sini öldüren serum seyreltmesi olarak tanımlanır.

15

Tavşanın Kimliği	Tedavi	Opsonik Endeks	
		immün öncesi	immün sonrası
SZ 3415	2 μg CPS4-EPA / Alum	<8	2719
SZ 3416		<8	777
SZ 3417	10 μg CPS4-EPA / Alum	<8	1111
SZ 3418		<8	2215
SZ 3419		<8	29068
SZ 3420	10 μg CPS4-EPA / FCA-FIA	<8	187543
SZ 3421	Sadece FCA-FIA	<8	<8
SZ 3422		<8	<8
SZ 3423	Prevnar-13	<8	2753
SZ 3424		<8	169

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- WO 2003074687 A [0008]
- WO 2006119987 A [0008]
- WO 2009104074 A [0008]
- WO 201106261 A [0008]
- WO 2011138361 A [0008] [0043]
- US 20110274720 A1 [0028] [0095] [0099]
- EP 2013071328 W [0081]
- US 20110274720 A [0094]

10

Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

- **WACKER et al.** Science, 2002, vol. 298 (5599), 1790-3 [0007] [0008]
- **NITA-LAZAR et al.** Glycobiology, 2005, vol. 15 (4), 361-7 [0008]
- **FELDMAN et al.** Proc Natl Acad Sci USA, 2005, vol. 102 (8), 3016-21 [0008]
- **KOWARIK et al.** EMBO J., 2006, vol. 25 (9), 1957-66 [0008]
- **WACKER et al.** Proc Natl Acad Sci USA, 2006, vol. 103 (18), 7088-93 [0008]
- **ISAACMAN DJ ; M. E., REINERT RR.** Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among Streptococcus pneumoniae isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. Int J Infect Dis, 2010, vol. 14 (3), 197-209 [0012]
- **BENTLEY SD ; AANENSEN DM ; MAVROIDI A ; SAUNDERS D ; RABBINOWITSCH E ; COLLINS M ; DONOHOE K ; HARRIS D ; MURPHY L ; QUAIL MA et al.** Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. PLoS genetics, 2006, vol. 2 (3), e31 [0013] [0030] [0041] [0077]

Infect Dis., 2010, vol. 14, 197-209 [0010]

• **RUEDA, A. M. M., MSC ; SERPA, JOSE A. MD ; MATLOOBI, MAHSA MD ; MUSHTAQ, MAHWISH MD ; MUSER, DANIEL M. MD.** The spectrum of invasive pneumococcal disease at an adult tertiary care hospital in the early 21st century. *Medicine*, 2010, vol. 89, 331-336 [0011]

• **HAUSDORFF WP ; BRYANT J ; PARADISO PR ; SIBER GR.** Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2000, vol. 30 (1), 100-121 [0011]

• **JONES RN ; JACOBS MR ; SADER HS.** Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents.*, September 2010, vol. 36 (3), 197-204 [0011]

• **MUSER DM PH ; WATSON DA ; BAUGHN RE.** Antibody to capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* at the time of hospital admission for Pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*, 2000, vol. 182 (1), 158-167 [0012]

• **JIANG SM ; WANG L ; REEVES PR.** Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* type 4, 6B, 8, and 18C capsular polysaccharide gene clusters. *Infect Immun*, 2001, vol. 69 (3), 1244-1255 [0020] [0090]

• **POOLMAN J ; FRASCH C ; NURKKA A ; KAYHTY H ; BIEMANS R ; SCHUERMAN L.** *Clin Vaccine Immunol.*, February 2011, vol. 18 (2), 327-36 [0021]

• **SCHWARZ F ; HUANG W ; LI C ; SCHULZ BL ; LIZAK C ; PALUMBO A ; NUMAO S ; NERI D**

• **AVERY, O. T. ; W. F. GOEBEL.**

Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins. Immunological specificity of synthetic sugar-proteins. *J. Exp. Med.*, 1929, vol. 50, 521-533 [0015]

• **ANDERSON, P.** Antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. *Infect Immun*, 1983, vol. 39, 233-8 [0015]

• **SCHNEERSON, R. ; O. BARRERA ; A. SUTTON ; J. B. ROBBINS.** Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med*, 1980, vol. 152, 361-76 [0015]

• **PAWLOWSKI, A. ; G. KALLENIUS ; S. B. SVENSON.** Preparation of pneumococcal capsular polysaccharide-protein conjugates vaccines utilizing new fragmentation and conjugation Technologies. *Vaccine*, 2000, vol. 18, 1873-1885 [0016]

• **ROBBINS, J. B. ; J. KUBLER-KIELB ; E. VINOGRADOV ; C. MOCCA ; V. POZSGAY ; J. SHILOACH ; R. SCHNEERSON.** Synthesis, characterization, and immunogenicity in mice of *Shigella sonnei* O-specific oligosaccharide-core-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, vol. 106, 7974-7978 [0016]

• *Vaccine*, 06 July 2012, vol. 30 (32), 4717-8 [0020]

• **KUBLER-KIELB J ; VINOGRADOV E ; BEN-MENACHEM G ; POZSGAY V ; ROBBINS JB ; SCHNEERSON R.** Saccharide/protein conjugate vaccines for *Bordetella* species: preparation of saccharide, development of new conjugation procedures, and physico-chemical and

- ; **AEBI M ; WANG LX.** A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation. *Nat Chem Biol*, 2010 [0028] [0094]
- **FARIDMOAYER A ; FENTABIL MA ; MILLS DC ; KLASSEN JS ; FELDMAN MF.** Functional characterization of bacterial oligosaccharyltransferases involved in O-linked protein glycosylation. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 2007, vol. 189 (22), 8088-8098 [0028] [0098]
- **WHITFIELD C ; ROBERTS IS.** Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1999, vol. 31 (5), 1307-1319 [0029]
- **MORONA JK ; MILLER DC ; MORONA R ; PATON JC.** The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes have on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.*, 15 May 2004, vol. 189 (10), 1905-13 [0031]
- **STEVENSON G ; ANDRIANOPOULOS K ; HOBBS M ; REEVES PR.** Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol*, 1996, vol. 178 (16), 4885-4893 [0033]
- **WHITFIELD C.** Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 2006, vol. 75, 39-68 [0033]
- **LEHANE AM ; KORRES H ; VERMA NK.** Bacteriophage-encoded glucosyltransferase GtrII of *Shigella flexneri*: membrane topology and identification of critical residues. *The Biochemical journal*, 2005, vol. 389, 137-143 [0036]
- **MUNOZ R ; LOPEZ R ; DE FRUTOS M ; GARCIA E.** First immunological characterization of the conjugates. *Vaccine*, 2008, vol. 26 (29-30), 3587-3593 [0079]
- **KOPECKO DJ ; WASHINGTON O ; FORMAL SB.** Genetic and physical evidence for plasmid control of *Shigella sonnei* form I cell surface antigen. *Infection and immunity*, 1980, vol. 29 (1), 207-214 [0079]
- **XU DQ ; CISAR JO ; AMBULOS JR N, JR. ; BURR DH ; KOPECKO DJ.** Molecular cloning and characterization of genes for *Shigella sonnei* form I O polysaccharide: proposed biosynthetic pathway and stable expression in a live salmonella vaccine vector. *Infect Immun*, 2002, vol. 70 (8), 4414-4423 [0079]
- **LEE DJ ; BINGLE LE ; HEURLIER K ; PALLAN MJ ; PENN CW ; BUSBY SJ ; HOBMAN JL.** Gene doctoring: a method for recombineering in laboratory and pathogenic *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiol*, 2009, vol. 9, 252 [0081] [0105] [0106]
- **KUHLMAN TE ; COX EC.** Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs. *Nucleic acids research*, 2010, vol. 38 (6), e92 [0081]
- **DATSENKO KA ; WANNER BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, vol. 97 (12), 6640-6645 [0082]
- **BLOOR AE ; CRANENBURGH RM.** An efficient method of selectable marker gene excision by Xer recombination for gene replacement in bacterial chromosomes. *Applied and environmental microbiology*, 2006, vol. 72 (4), 2520-2525 [0085]
- **WACKER M ; LINTON D ; HITCHEN PG ; NITA-LAZAR M ; HASLAM SM ; NORTH SJ ; PANICO M ; MORRIS HR ; DELL**

- molecular characterization of a uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase: an enzyme required for capsular biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* type 1. *Mol Microbiol*, 1999, vol. 31 (2), 703-713 [0077]
- **BATTA G ; LIPTAK A ; SCHNEERSON R ; POZSGAY V.** Conformational stabilization of the altruronic acid residue in the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei*/*Plesiomonas shigelloides*. *Carbohydr Res*, 1997, vol. 305 (1), 93-99 [0079]
 - **RUSH JS ; ALAIMO C ; ROBBIANI R ; WACKER M ; WAECHTER CJ.** A novel epimerase that converts GlcNAc-P-P-undecaprenyl to GalNAc-P-P-undecaprenyl in *Escherichia coli* 0157. *J Biol Chem*, 2010, vol. 285 (3), 1671-1680 [0092] [0099]
 - **LINTON D; DORRELL N ; HITCHEN PG ; AMBER S ; KARLYSHEV AV ; MORRIS HR ; DELL A ; VALVANO MA ; AEBI M ; WREN BW.** Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway. *Mol Microbiol*, 2005, vol. 55 (6), 1695-1703 [0092]
 - **JERVIS AJ ; BUTLER JA ; LAWSON AJ ; LANGDON R ; WREN BW ; LINTON D.** Characterization of the structurally diverse N-linked glycans of *Campylobacter* species. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 2012, vol. 194 (9), 2355-2362 [0098]
 - **LV L; YANG X ; ZHAO Y ; RUAN Y ; YANG Y ; WANG Z.** Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. *Food Chemistry*, 2009, vol. 112, 742-746 [0100]
 - A ; WREN BW et al.** N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 2002, vol. 298 (5599), 1790-1793 [0086] [0087]
 - **FELDMAN MF ; WACKER M ; HERNANDEZ M ; HITCHEN PG ; MAROLDA CL ; KOWARIK M ; MORRIS HR ; DELL A ; VALVANO MA ; AEBI M.** Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, vol. 102 (8), 3016-3021 [0087]
 - **KOWARIK M ; YOUNG NM ; NUMAO S ; SCHULZ BL ; HUG I ; CALLEWAERT N ; MILLS DC ; WATSON DC ; HERNANDEZ M ; KELLY JF et al.** Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *The EMBO journal*, 2006, vol. 25 (9), 1957-1966 [0087]
 - **IHSSEN J ; KOWARIK M ; DILETTOSO S ; TANNER C ; WACKER M ; THONY-MEYER L.** Production of glycoprotein vaccines in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 2010, vol. 9, 61 [0087]
 - **ROMERO-STEINER S ; FRASCH CE ; CARLONE G ; FLECK RA ; GOLDBLATT D ; NAHM MH.** Use of opsonophagocytosis for serological evaluation of pneumococcal vaccines. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, vol. 13 (2), 165-169 [0101]
 - **KOLKMAN MA ; VAN DER ZEIJST BA ; NUIJTEN PJ.** Functional analysis of glycosyltransferases encoded by the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272 (31), 19502-19508 [0104]
 - **KOLKMAN MA ; WAKARCHUK**

**W ; NUIJTEN PJ ; VAN DER
ZEIJST BA.** Capsular polysaccharide
synthesis in *Streptococcus pneumoniae*
serotype 14: molecular analysis of the
complete cps locus and identification of
genes encoding glycosyltransferases
required for the biosynthesis of the
tetrasaccharide subunit. *Mol Microbiol*,
1997, vol. 26 (1), 197-208 [0104]
• **EBEL W; TREMPY JE. J**
Bacteriol., 1999, vol. 181 (2), 577-84
[0106]

5

10

15

20

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1

A = CPS regülatör genleri

5 B = Başlangıçtaki glikosiltransferazlar

C = Glikosil transferazlar

D = Polimeraz

E = Fippaz

F = Şeker biyosentezi

10

ŞEKİL 3

G = 2-Asetamido-4-amino-2,4,6-trideoksigalaktoz

H = D-Galakturonik asit

15 **ŞEKİL 4**

I = Altruronik asit

ŞEKİL 9

J = Yük

20 K = Devridaim

L = Yıkama

M = Elüsyon fraksiyonları

ŞEKİL 10

25 N = N-asetil-D-galaktosamin

O = N-asetil-L-fukosamin

P = N-asetil-D-mannozamin

R = D-Galaktoz

S = 2,3 S Piruvat

ŞEKİL 12

T = Kültür öncesi

5 U = İndükleme

ŞEKİL 13A

V = CPS4 1RU fragmanı

Y = Dakika

10 Z = Tutma Zamanı

ŞEKİL 15A

A1 = Peptit

B1 = Zaman

15 C1 = Aralık

ŞEKİL 20

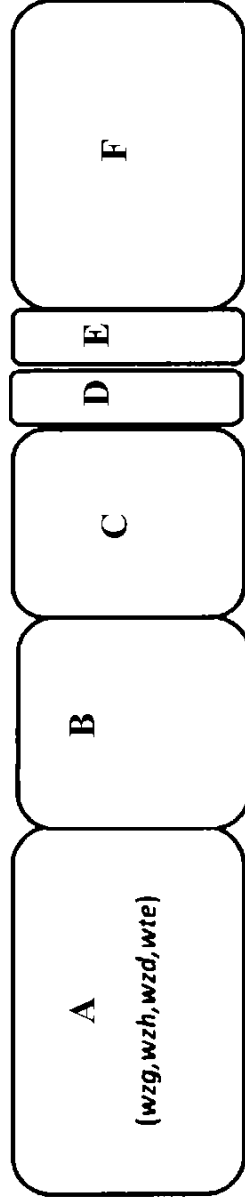
D1 = Glikoz

E1 = N-asetilglukozamin

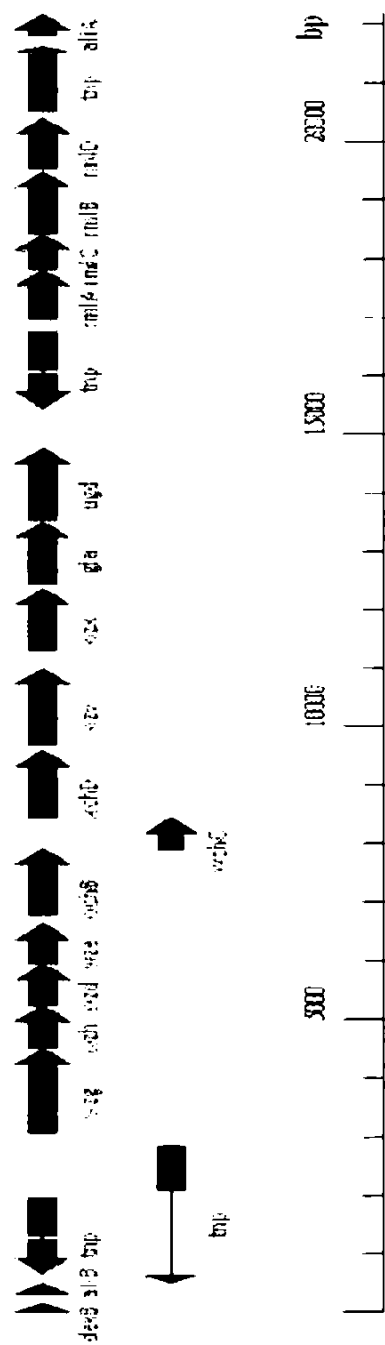
20 F1 = Galaktoz

ŞEKİL 23

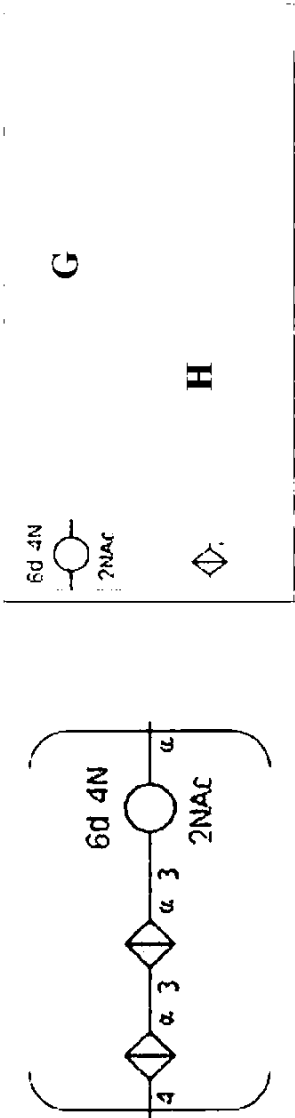
G1 = Taşıyıcılar (trans olarak)



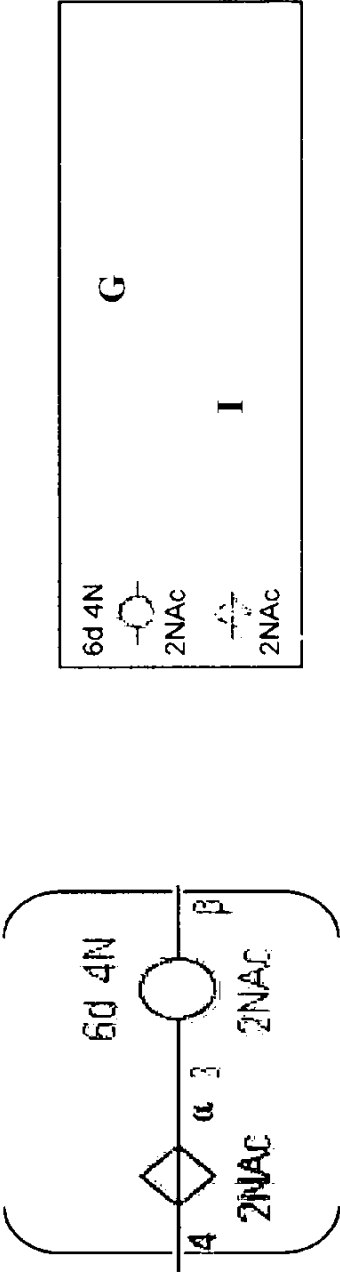
ŞEKİL 1



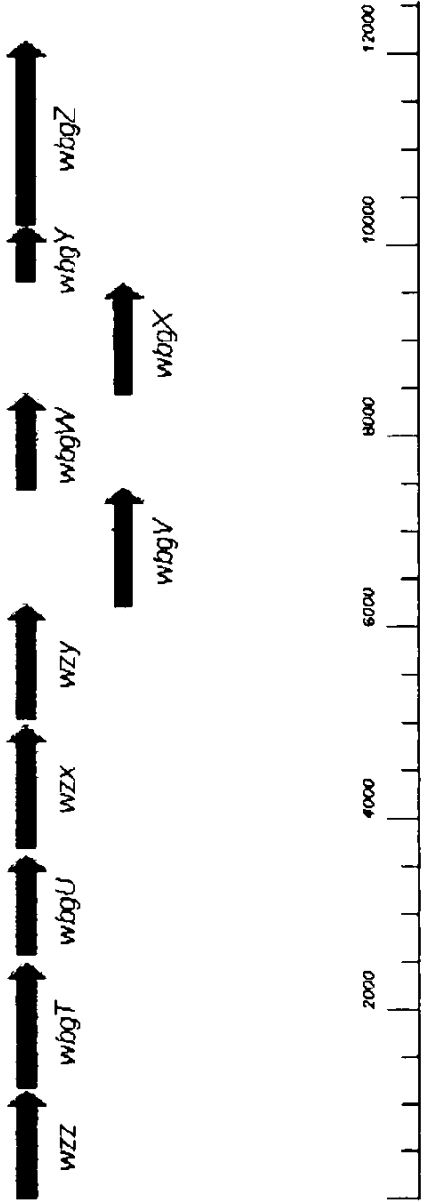
ŞEKİL 2



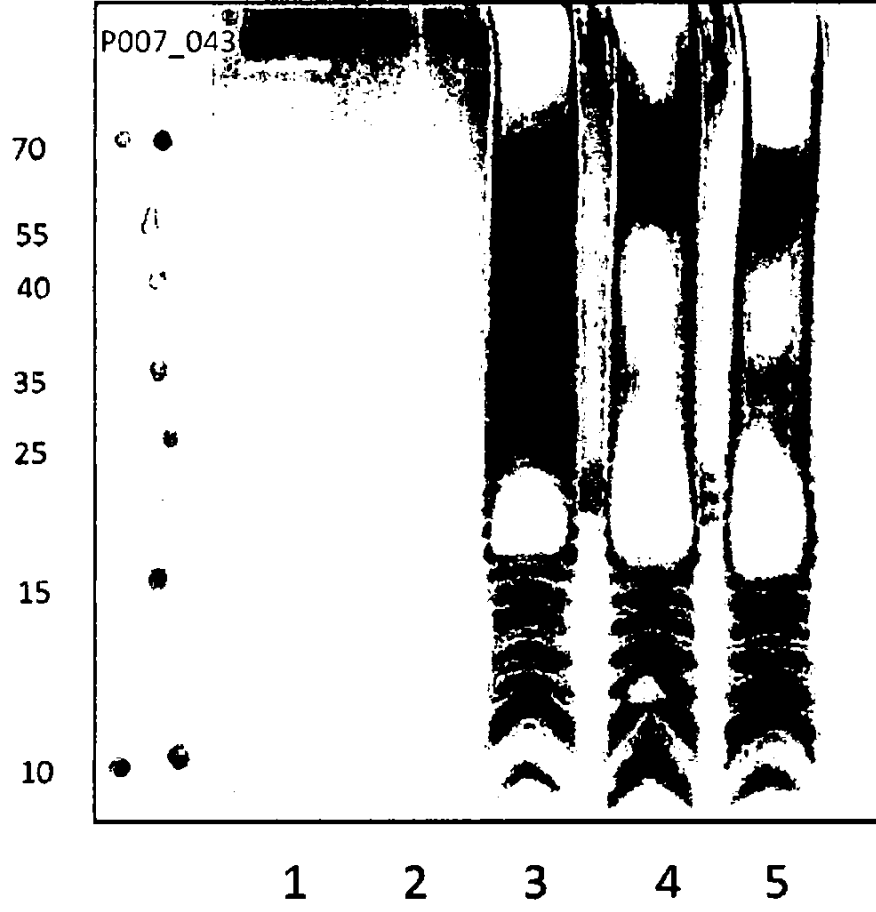
ŞEKİL 3



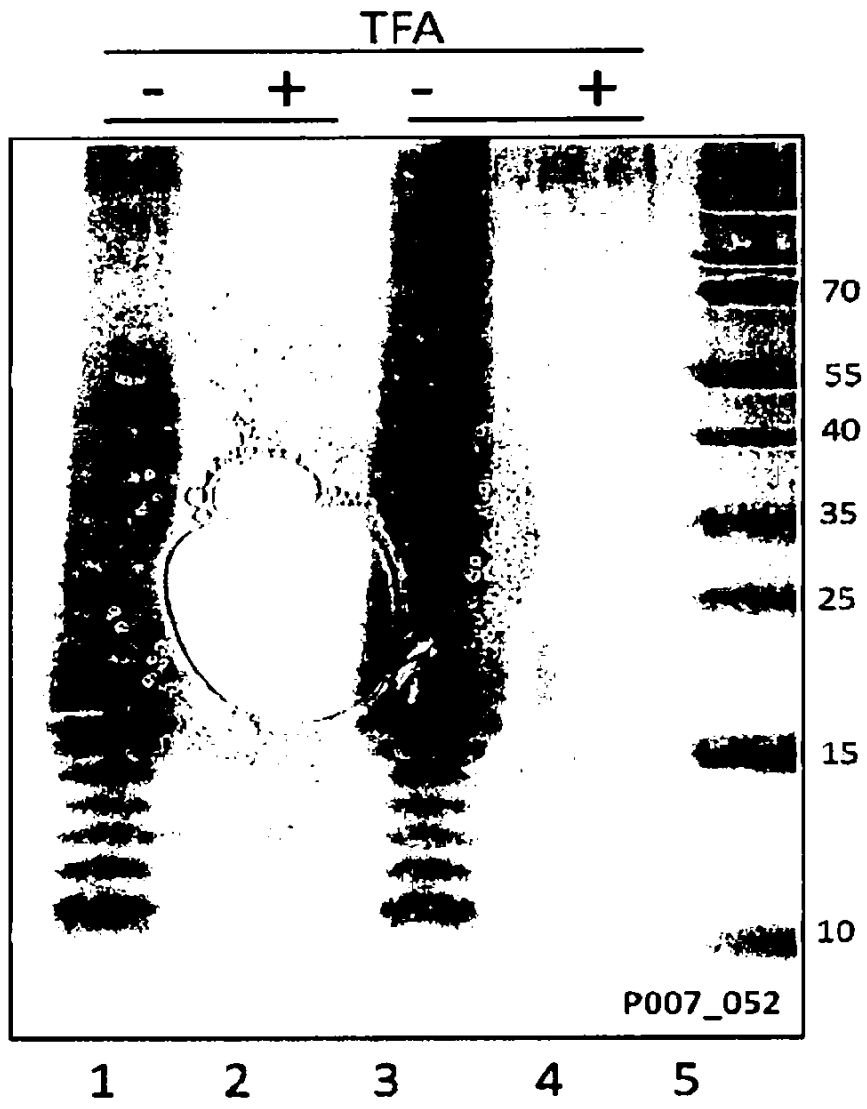
ŞEKİL 4



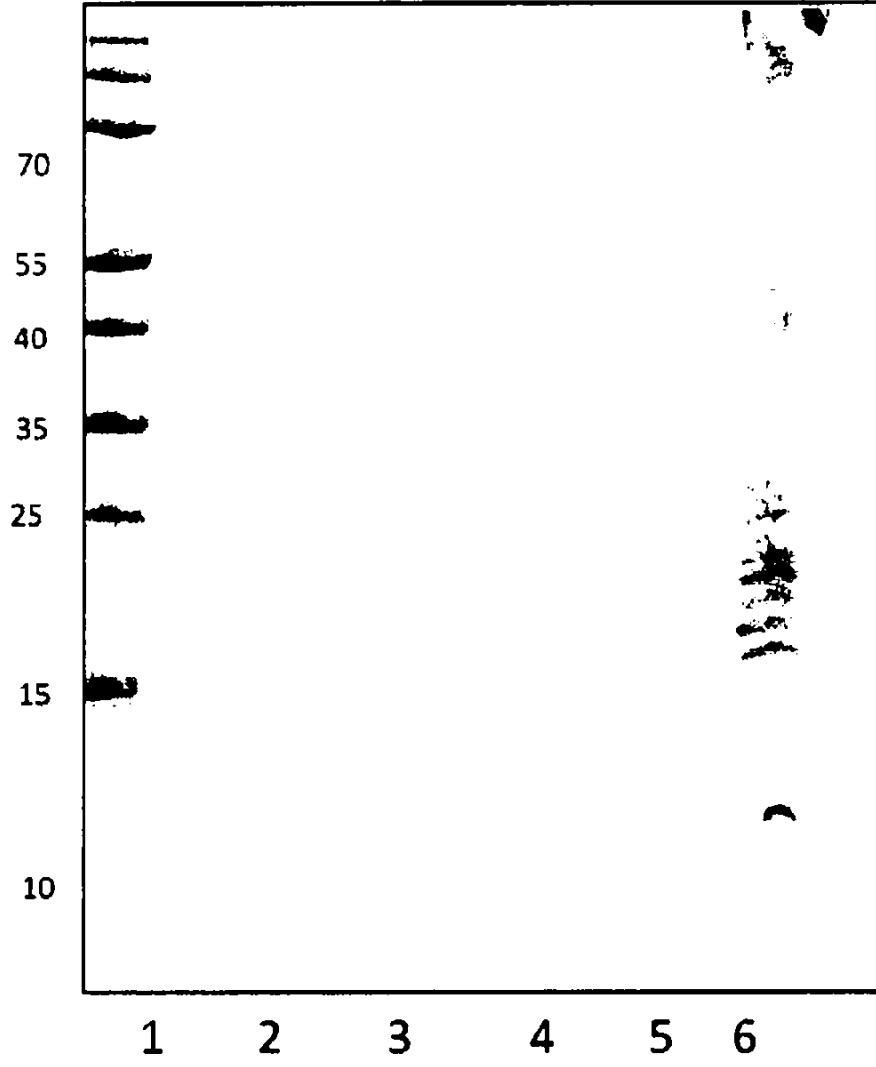
ŞEKİL 5



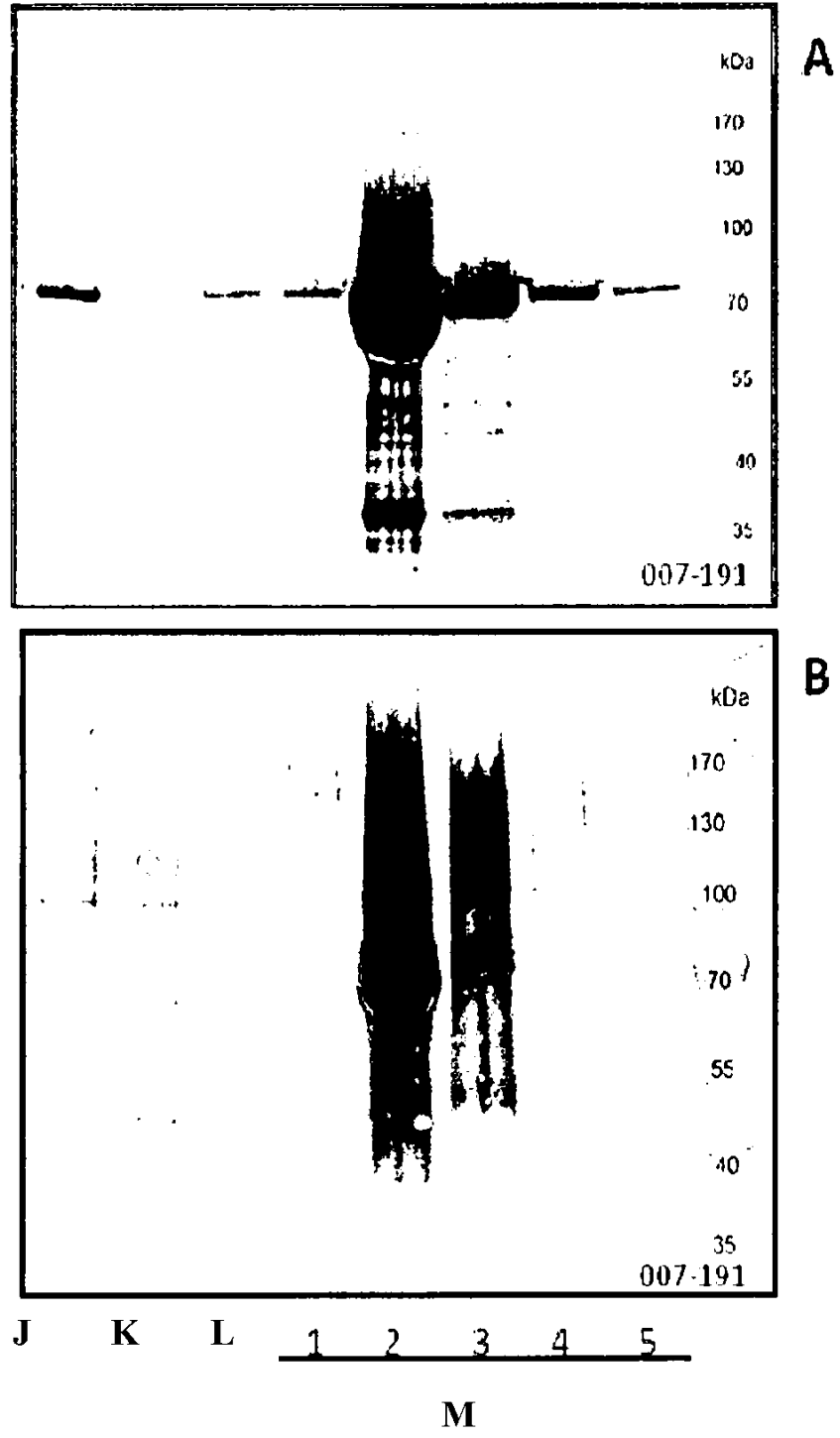
ŞEKİL 6



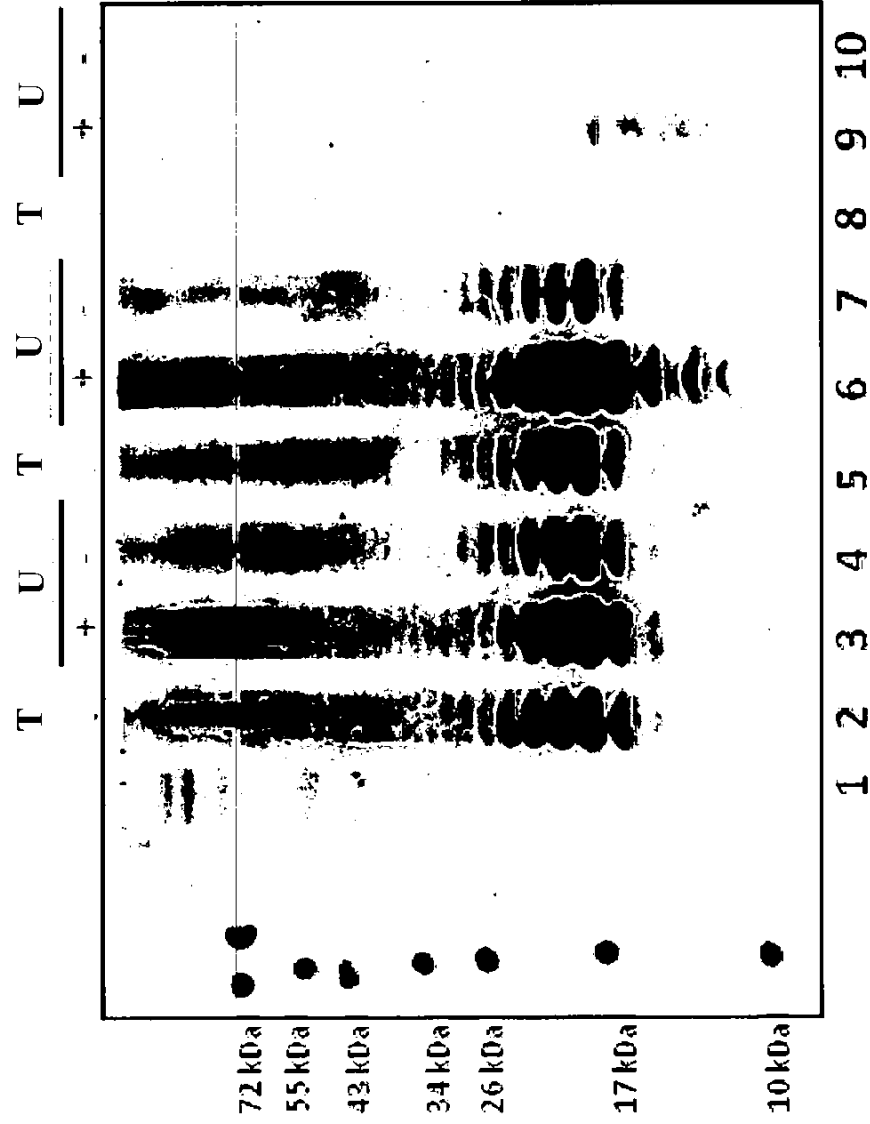
ŞEKİL 7



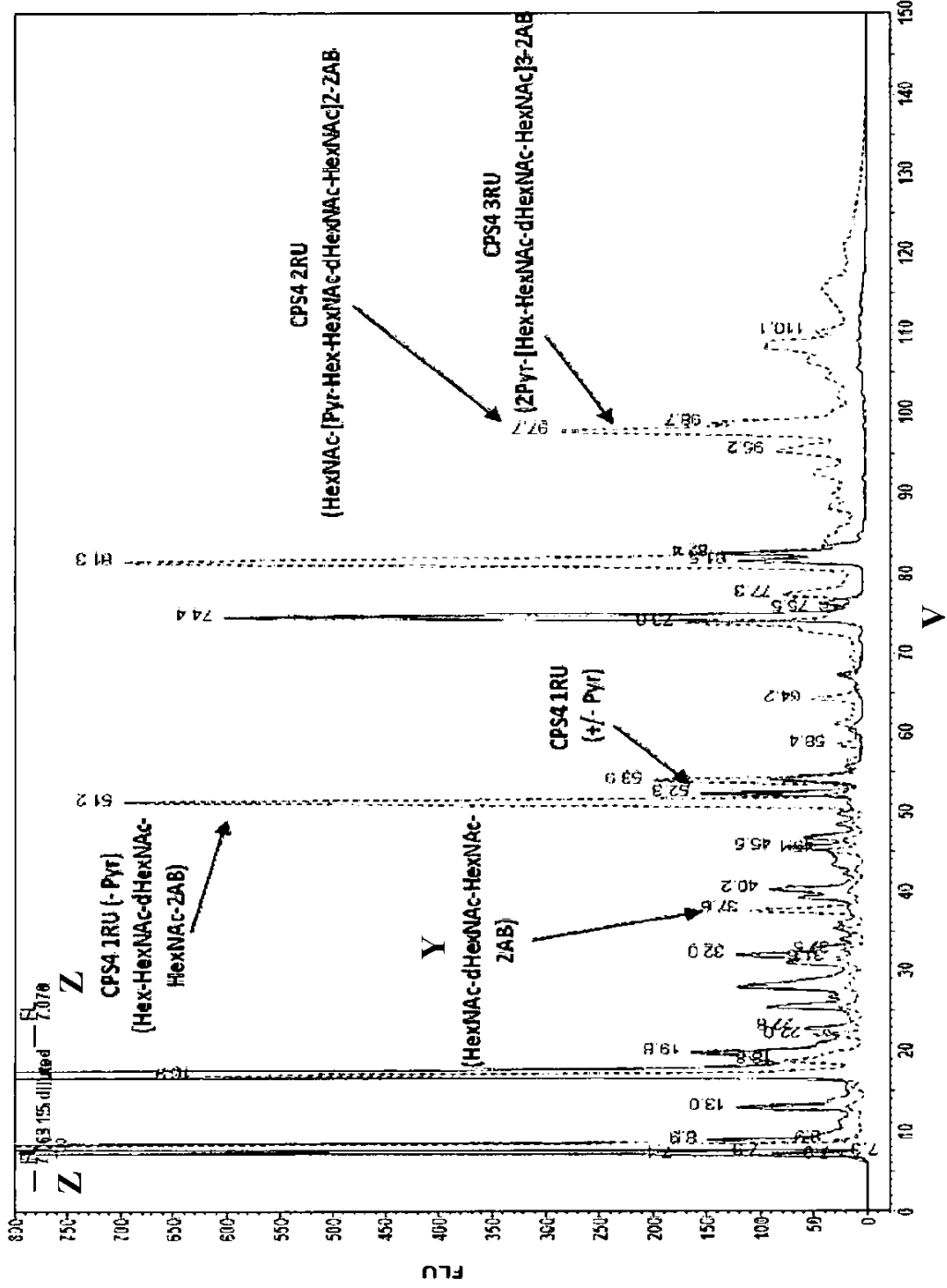
ŞEKİL 8



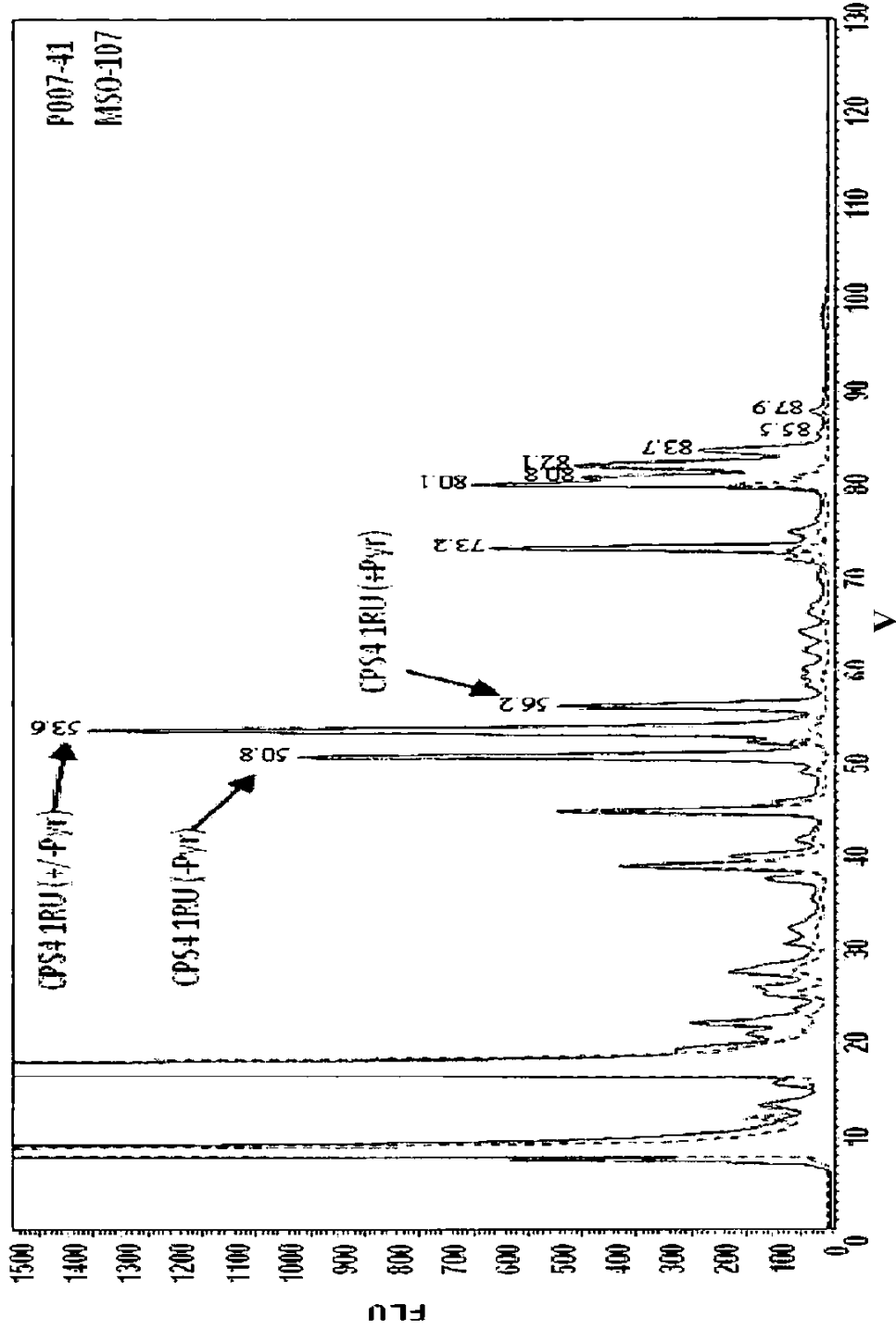
ŞEKİL 9



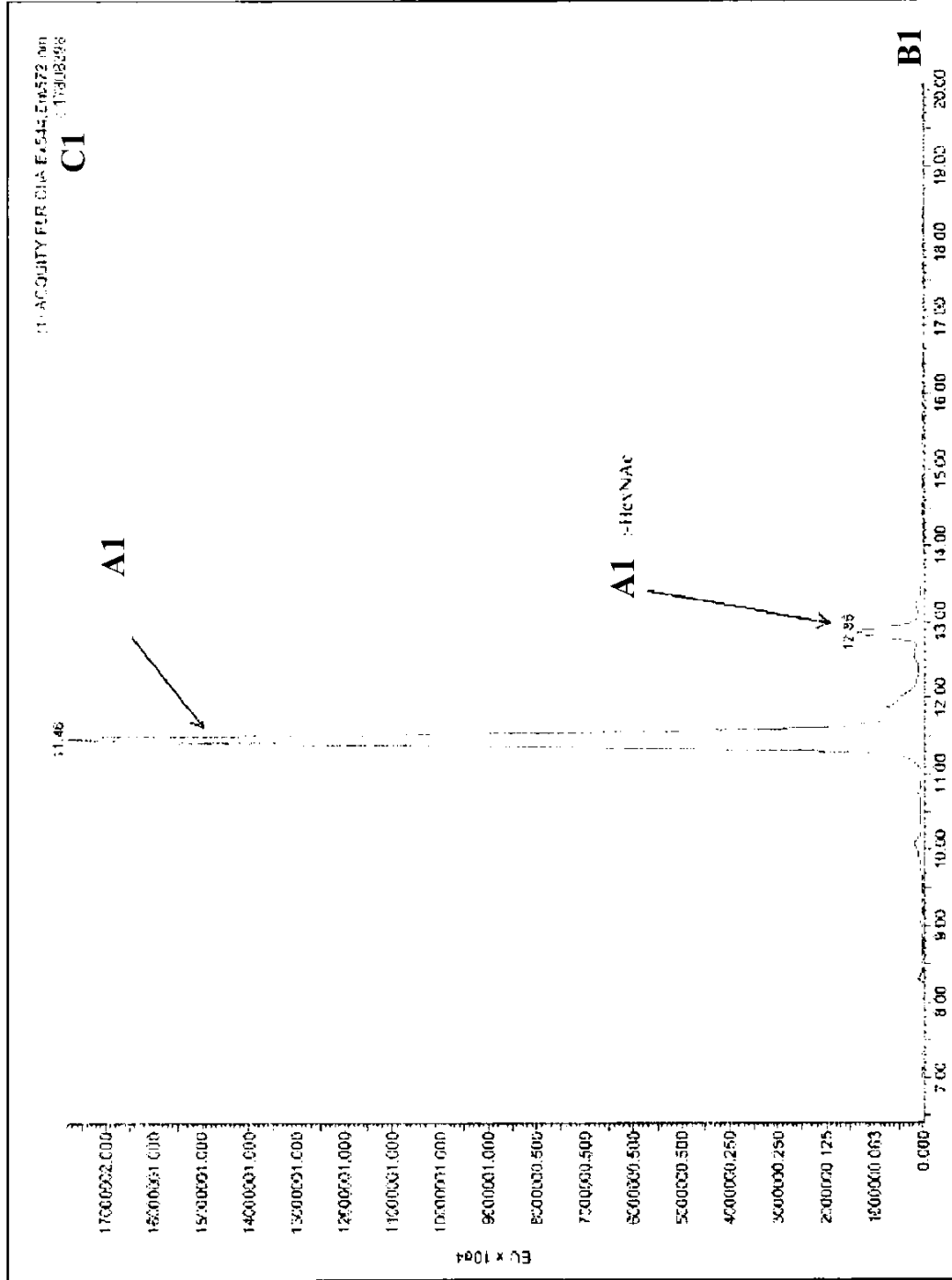
ŞEKİL 12



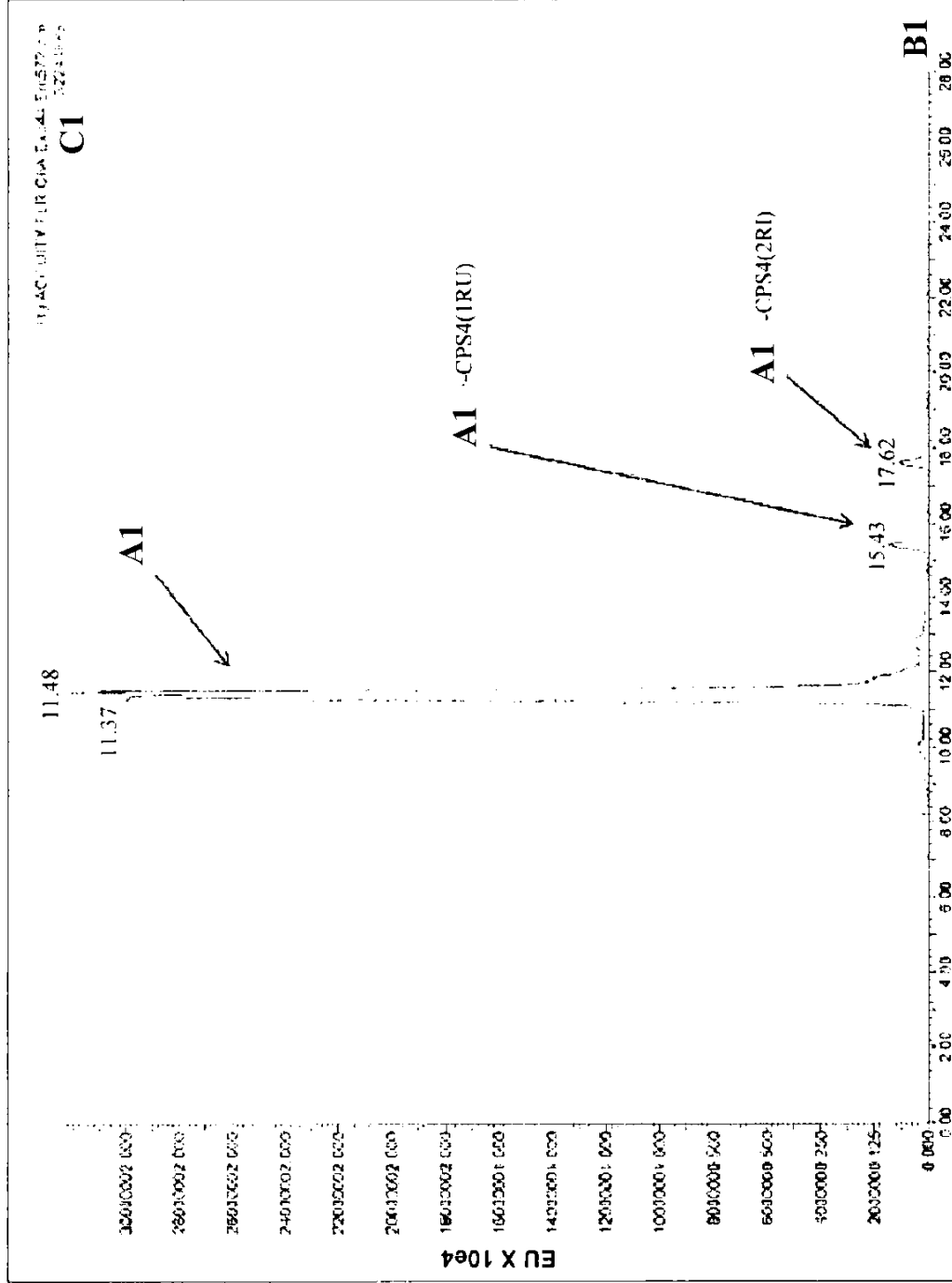
ŞEKİL 13A



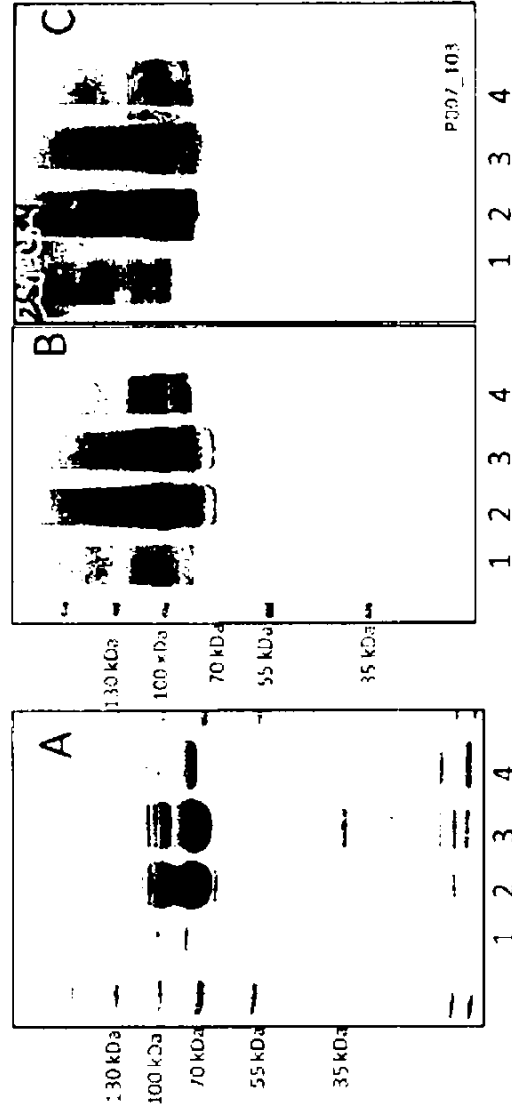
ŞEKİL 14



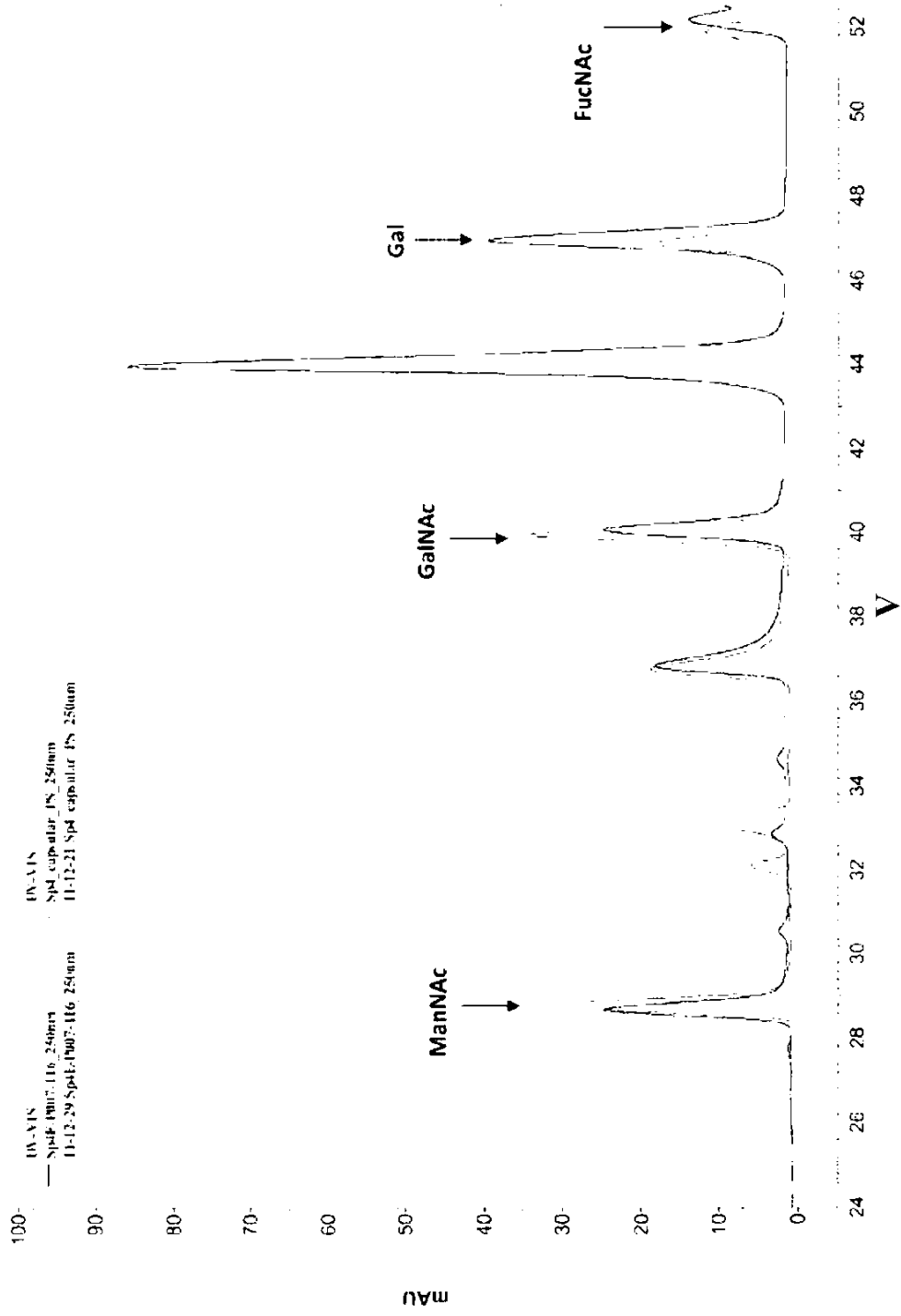
ŞEKİL 15A



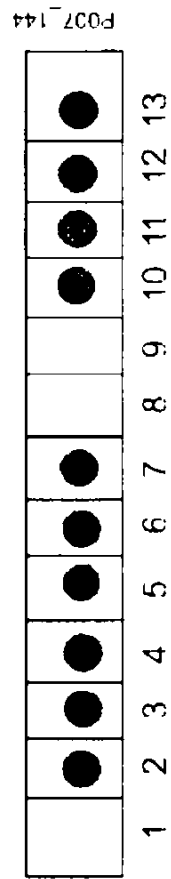
ŞEKİL 15B



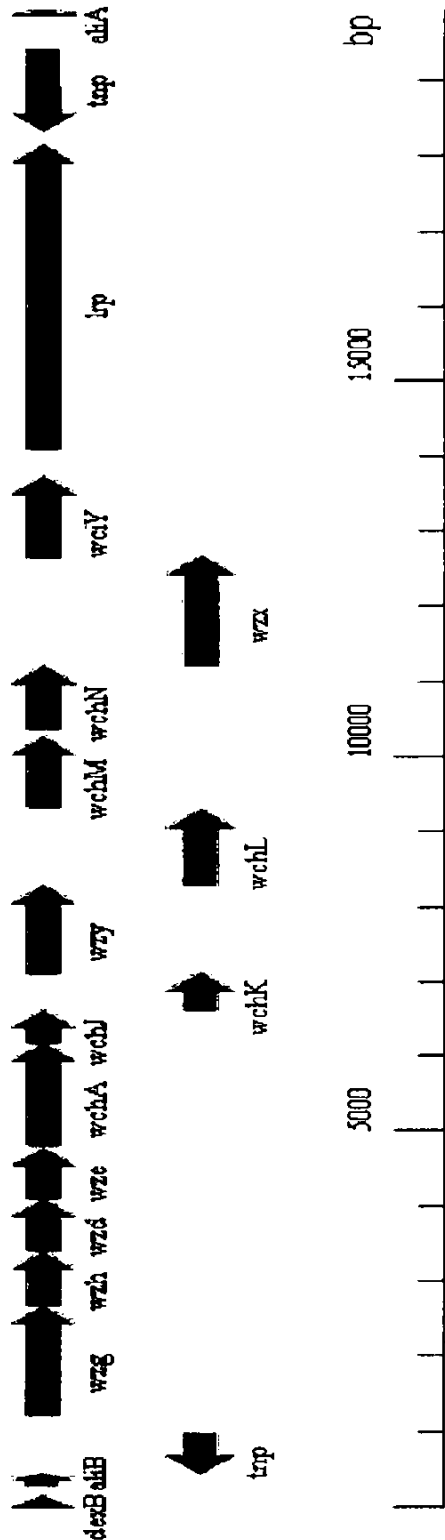
ŞEKİL 16



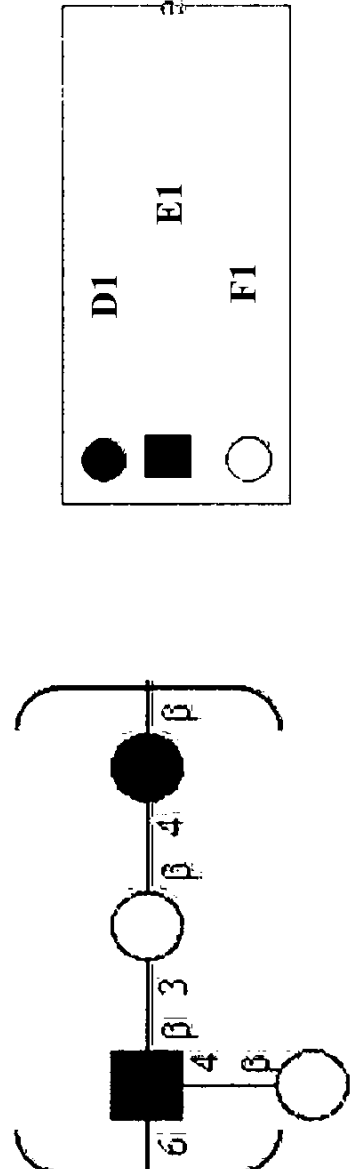
ŞEKİL 17



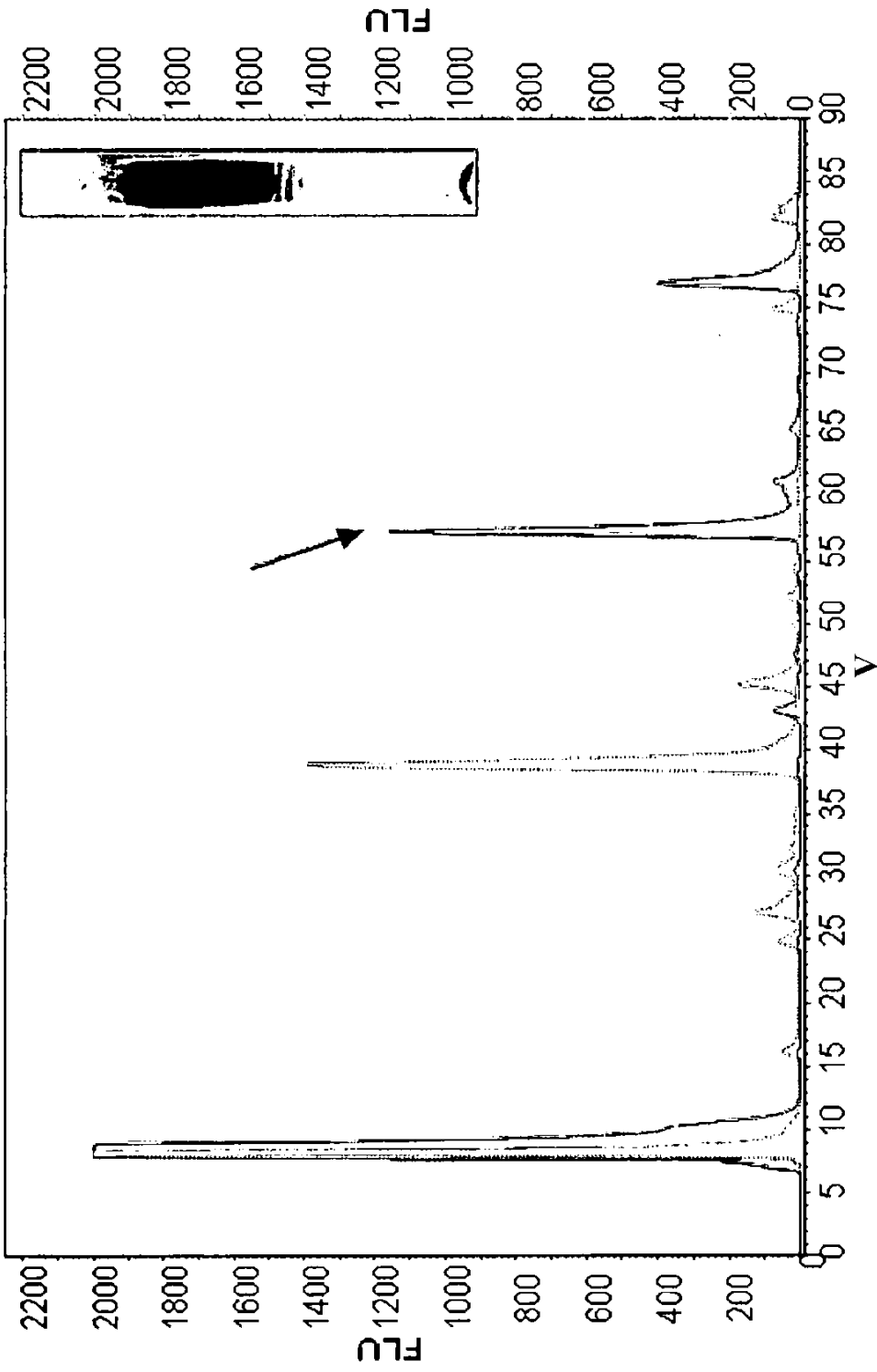
ŞEKİL 18



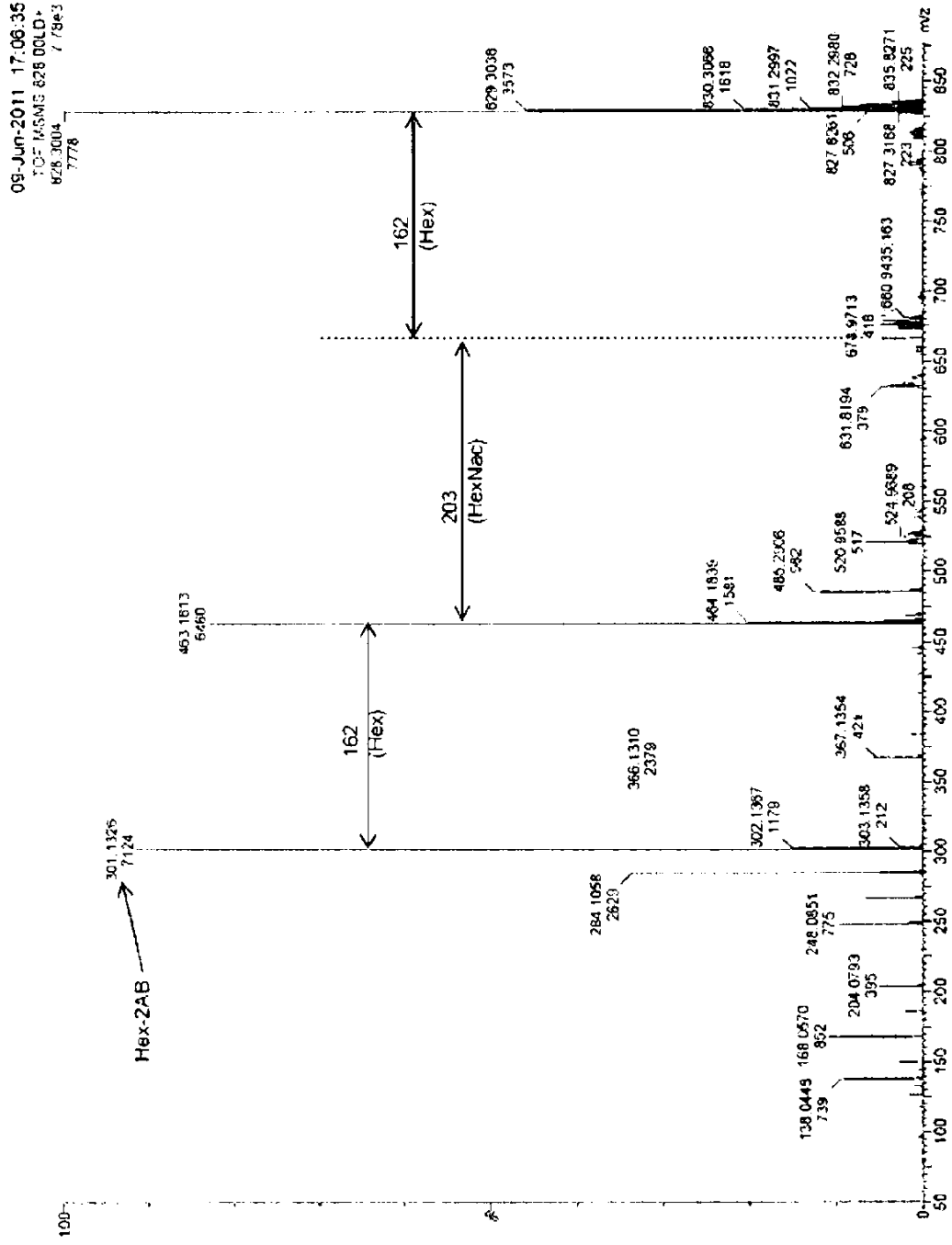
ŞEKİL 19



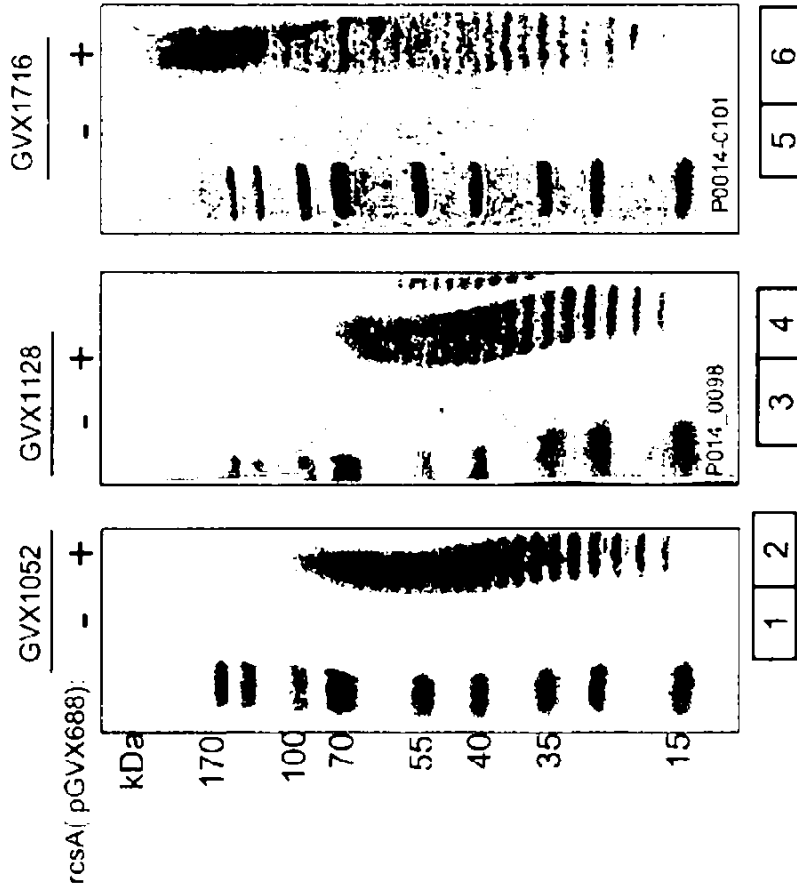
ŞEKİL 20



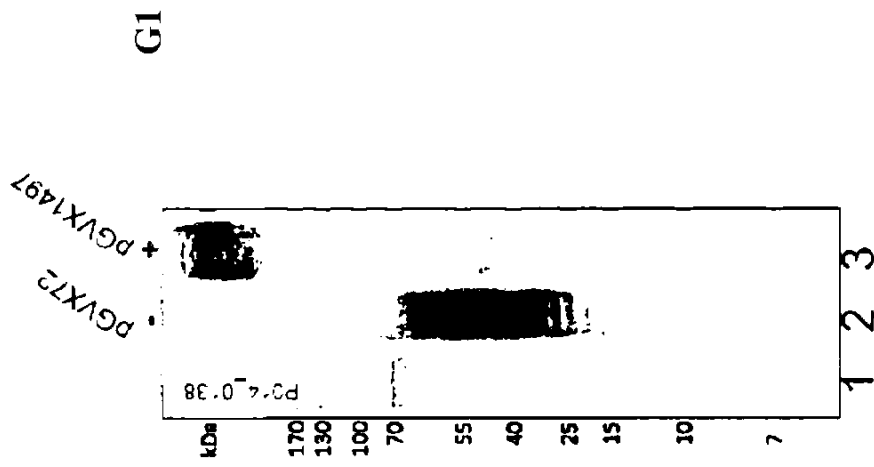
ŞEKİL 21A



ŞEKİL 21B



ŞEKİL 22



ŞEKİL 23

