

## Uppfinningens bakgrund

### 1. Uppfinningens område

Uppfinningen tillhandahåller att förfarande och kompositioner för användning vid bindning, bestämning och förstärkning av påvisandet av specifika målnukleinsyrasekvenser i ett prov med tillförlitlighet och noggrannhet till och med i närvaro av nära besläktade men olika nukleinsyror. Bindningen kan omfatta skydd och ihopsättning av specifika molekyler till målsökande bindande kombinationer som specifikt binder målsökande regioner som bildas genom hybridisering av nukleinsyror som prober och målsökta nukleinsyrasekvenser. Förstärkningen kan involvera skydd och/eller ihopsättning av specifika molekyler till booster-bindande kombinationer som specifikt binder booster-bindande regioner som bildas genom hybridisering av boostrande nukleinsyror med nukleinsyror som prober, målsökta nukleinsyror eller andra boostrande nukleinsyror. Bestämningen omfattar att man tillhandahåller en eller flera bestämbara markörer, inkluderande radioaktiva, ljus- eller fluorescensemitterande, enzymatiska eller andra bestämbara eller signalalstrande molekyler i kombination med nukleinsyraproben, den målsökande bindande kombinationen, den boostrande nukleinsyran eller den boostrande bindande kombinationen.

### 2. Bakgrund och beskrivning av besläktad teknik

Det föreligger att ökat antal fall när det är viktigt att kunna bestämma nukleinsyror, som innehåller en specifik sekvens, hädanefter benämnda målsökta nukleinsyror (Target Nucleic Acids, TNAs) i ett prov. Det är önskvärt att kunna bestämma TNAs med minsta antal processteg, med minsta antal komponenter och kunna utesluta andra liknande men olika nukleinsyror, hädanefter benämnda kusinnukleinsyror (Cousin Nucleic Acids (CNAs)). Det är önskvärt att kunna bestämma specifika TNAs och utesluta vilken som helst och alla CNAs i testprovet utan behov av förstärkning eller annan bearbetning efter påvisande.

Det finns många förfaranden som använder immobiliserade eller märkta nukleinsyror som prober för TNAs. Med användning av kända metoder är det emellertid

svårt att skilja mellan en TNA bunden till probnukleinsyra (Probe Nukleic Acid, PNA) i motsats till en CNA som är bunden till TNA. En eller flera misslyckade matchningar mellan TNA och CNA kan fortfarande resultera i en CNA-TNA-hybridisering som är nästan omöjlig att skilja från en TNA-PNA-hybridisering. Sålunda är enbart hybridisering inte en optimal indikation på att en TNA har hybridiserat till en unik TNA.

Det finns många situationer vid vilka en PNA skulle användas för att försöka bestämma om en TNA förelåg i ett prov som kan innehålla CNAs. Hybridisering av PNA till eventuellt CNA i denna situation skulle begränsa det diagnostiska värdet som PNA kan ha för bestämning av en TNA utan ytterligare verifiering. Vidare är det önskvärt att kunna bestämma och lokalisera TNAs med ett lokalt kopietal i prover som kan innehålla många kopior av CNAs utan behov av att alstra ytterligare kopior av TNA. Det skulle också vara önskvärt att kunna bekräfta närvaron av CNAs oberoende av TNAs utan behov av att separera CNAs och TNAs i provet.

Vidare skulle det vara önskvärt att kunna förstärka signalen från till och med en hybridisering med låg frekvens av en speciell TNA-PNA. För detta ändamål skulle det vara önskvärt att ha ett förfarande för polymerisering av multipla kopior av en markör, hädanefter benämnd en boostrande nukleinsyra (BNA) på TNA-PNA.

Föreliggande uppfinning tillhandahåller förfaranden och kompositioner för att uppnå de nämnda önskade målen. Såsom framgår av följande översikt har föreliggande kompositioner och förfaranden inte rapporterats eller föreslagits inom tekniken. En allmän och beskriven översikt av teknikens stånd över nukleinsyrabestämning tillhandahålles av Keller, H., M.M. Manak (1989) *DNA Robes*, Stockton Press.

Ett förfarande har rapporterats för bestämning av mismatchningar av baspar på kemisk väg för att bestämma om en PNA har hybridiserat till en CNA snarare än till en TNA. I US patent nr 4 794 075 till Ford et al., diskuteras ett förfarande för särskiljande av fragment av DNA som innehåller mismatchningar av en enda bas från deras perfekt parade homologer. Enkelsträngade regioner inom ett duplexfragment

modifieras med karbodiimid, som reagerar med icke parade guanin-(G)- och tymidin- (T)-rester i DNA. Linjära dubbelsträngade DNA-molekyler reagerar inte under det att DNA-molekyler med mismatchningar i en enda bas reagerar kvantitativt. Efter omsättning med karbodiimid fraktioneras DNA-molekylerna på geler med hög procentandel av polyakrylamid så att modifierade och omodifierade fragment kan särskiljas. Ford et al. tillämpade denna teknik för att lokalisera och rena skillnader i DNA-sekvenser som svarar för fenotypvariation i nedärvd sjukdom. Även om denna metod är användbar för att följa variationer i genetiskt material, omfattade med ett stort antal steg, erfordrar dyrbara komponenter och erbjuder inte ett direkt sätt att bestämma om en PNA har hybridiserat till TNA men inte CNAs i provet.

Det har funnits några försök att säkerställa att åtminstone en del av hybridiseringen mellan PNA och en annan nukleinsyra är komplementär. Ett förfarande omfattar styrning av transkriptionsprodukter som produceras om TNA hybridiserar till en nukleinsyra i tillräcklig utsträckning för att transkriberas från ett promotorställe, som föreligger i proben. Sålunda beskriver det amerikanska patentet 5 215 899 till Dattagupta för specifika nukleinsyrasekvenser förstärkta genom användning av en hårnålsprob som, efter hybridisering med och ligering till en målsekvens, kan transkriberas. Proben innehåller en enkelsträngad själv-komplementär sekvens som, under hybridiserande betingelser, bildar en hårnålsstruktur som har en funktionell promotorregion och ytterligare innehåller en enkelsträngad probsekvens, som sträcker sig från 3'-ändan i hårnålssekvensen. Efter hybridisering med en målsekvens, som är komplementär till probsekvensen, och ligering av 3'-ändan på den hybridiserade målsekvensen till 5'-ändan på hårnålsproben, blir målsekvensen transkriberbar i närvaro av ett lämpligt RNA-polymeras och lämpliga ribonukleosidtrifosfater (rNTPs). Förstärkning åstadkoms genom hybridisering av den önskade TNA-sekvensen med proben, ligering av TNA till PNA, tillsatt av RNA-polymeras och rNTPs till de separerade hybriderna och låta transkriptionen fortlöpa tills en önskad mängd av RNA transkriptionsprodukter har ackumulerats. Denna metod omfattar allmänt och specifikt användning av ett hårnåls-DNA bildat med en enkelsträngad oparad ände för att binda (återupprätta vätebindningar) till en målsekvens. När målsekvensen är bunden möjliggörs produktion av RNA-transkriptionsproduk-

ter. Denna metod omfattar sålunda bestämning av sekundära transkriptionsprodukter snarare än användning av en nukleinsyrabindande sammansättning för att direkt immobilisera och/eller lokalisera en målsekvens. En CNA skulle lätt kunna binda till proben och brist på komplementaritet skulle inte nödvändigtvis interferera med bildningen av en CNA-PNA-hybrid som sedan skulle kunna underlätta produktionen av icke-önskade transkriptionsprodukter.

En CNA bunden till PNA kan bestämmas om brist på komplementaritet interfererar med känsligheten hos hybrid-CNA-PNA-paret att skära av ett restriktionsendonukleas. I det amerikanska patentet 5 118 605 till Urdea och det amerikanska patentet 4 775 619 till Urdea tillhandahålles nya metoder för att analysera en nukleinsyraanalys, som använder polynukleotider som har oligonukleotidsekvenser som är väsentligen homologa med en sekvens av intresse i analyten, där närvaron eller frånvaron av hybridisering vid en förutbestämd stringens möjliggör frigivningen av en markör från en bärare. Olika tekniker användes för att binda en markör till en bärare, var- efter spaltning av antingen en enkel- eller dubbelsträng möjliggör att en markör kan frigges från en bärare och frigivningen av markören kan bestämmas som en indikation på närvaron av en speciell polynukleotidsekvens i ett prov.

Denna teknik har emellertid nackdelen att ett CNA-PNA-par kan skäras av restriktionsendonukleasen även om det föreligger en mismatchning som länge som mismatchningen förelåg utanför den igenkännande regionen för endonukleaset. Detta skulle leda till fel i analysen vid identifiering av en CNA-PNA-hybrid.

Ett annat förfarande använder en grenad DNA-prob för att bestämma nukleinsyror. Det amerikanska patentet 5 124 246 till Urdea et al. beskriver linjära eller grenade oligonukleotidmultimerer, som är användbara som förstärkare i biokemiska analyser, som omfattar (1) åtminstone en första enkelsträngad oligonukleotidenhet (PNA) som är komplementär till en enkelsträngad oligonukleotidsekvens av intresse (TNA) och (2) en mängd andra enkelsträngade, oligonukleotidenheter som är komplementära till en enkelsträngad märkt oligonukleotid. Även om förstärkta nukleinsyrahybridiseringar i sandwich och immunoanalyser med utnyttjande av multimererna

beskrives har metoden begränsningen att PNA-CNA-hybridisering kan ske och skulle resultera i produktion av icke önskad signal.

Förutom metoder för att identifiera TNAs har metoder beskrivits för förstärkning av denna DNA. I det amerikanska patentet 5 200 314 till Urdea, bestäms en analyt-polynukleotidsträng som har en analytsekvens (TNA) med ett prov, som innehåller polynukleotider, genom att bringa analytpolynukleotiden i kontakt med en infångande prob (PNA) under hybridiserande betingelser, där den infångande proben har en första bindningspartner, som är specifik för TNA, och en andra bindningssekvens, som är specifik för en tredje bindningspartner i fast fas. Den resulterande dubbelsträngen immobiliseras sedan genom specifik bindning mellan bindningspartnern och icke bundna polynukleotider separeras från de bundna molekylerna. Analyt-polynukleotiden frigörs eventuellt från den fasta fasen och förstärks med PCR. PCR-primers har var och en en polynukleotidregion som kan hybridisera till en region i analytpolynukleotiden, och åtminstone en primers har dessutom en ytterligare bindningspartner, som kan binda till en bindningspartner i fast fas. Den förstärkta produkten separeras sedan från reaktionsblandningen genom specifik bindning mellan bindningsparterna och den förstärkta produkten bestäms. Även om det är möjligt att bekräfta (genom PCR) att en speciell nukleinsyra har hybridiserat med PNA är denna kontroll dyr och omfattar flera steg.

När det gäller rapporter som involverar interaktion av en dubbelsträngad nukleinsyra och ett DNA-bindande protein, har en metod beskrivits där en sekvens av immobiliserad DNA, som innehåller bindningsställen för ett enda protein, användes för att rena det proteinet. Det amerikanska patentet 5 122 600 till Kawaguchi et al. beskriver en DNA-immobiliserad mikrosfär som innehåller DNA-kedjor, som har bassekvenser som specifikt binder till ett visst protein, och en bärare som har en partikelstorlek på inte mer än 50  $\mu\text{m}$  och inte mindre än 0,01  $\mu\text{m}$  som inte absorberar något protein alls, varvid bäraren och DNA-kedjorna är bundna till varandra antingen med kemisk bindning, och ett förfarande för rening av ett protein med användning av mikrosfären. Eftersom detta är en reningsmetod för ett protein beskriver den inte en metod för bestämning av TNA eller en metod där mer än ett protein är bundet till en

dubbelsträngad nukleinsyra för att bestämma och lokalisera specifika TNA-sekvenser.

EP-A-0 453 301 beskriver en metod för att bestämma en målpolynukleotidsekvens i ett prov, varvid sekvenser i en TNA bestäms genom hybridisering av första och andra PNAs till TNA. Varje PNA innehåller en för-formad duplex eller en duplex som är formad genom kedjeförlängning, som kan binda till ett protein som specifikt binder till en nukleotidsekvens.

EP-A-0 147 665 beskriver också användningen av sekvensspecifika duplex-DNA-bindande proteiner som medel för bestämning i en hybridiseringsanalys. Återigen är duplexproben förframställd.

EP-A-0 450 594 beskriver möjligheten att märka s k framkallarmolekyler med föreningar som är specifika för duplexsekvens, t ex vissa inter-jämförande föreningar. Dessa föreningar fästs vid de framkallande molekylerna före hybridisering.

US-A-4 556 643 beskriver icke-radioaktiv bestämning av specifika nukleotidsekvenser i ett prov, involverande hybridisering av ett prov som innehåller DNA-bindande protein-specifika sekvenser.

WO 93/00446 beskriver enkelsträngade oligonukleotider som innehåller en del, som när den görs dubbelsträngad, binder till UL9-proteinet som härrör från herpes simplex virus och ytterligare en del som, när den görs dubbelsträngad, binder inter-jämförande föreningar.

#### Sammanfattning av uppfinningen

Föreliggande uppfinning definieras i de bifogade kraven. Den tillhandahåller metoder med vilka specifika målnukleinsyra (TNA) sekvenser bestäms genom användning av probnukleinsyror (PNAs) som, efter hybridisering med PNAs, kan binda målbindande sammansättningar (TBAs). Varje TBA binder åtminstone en specifik

region av PNA-TNA-hybridparet, den målbindande regionen (Target Binding Region, TBR). TBA är sammansatt av en eller flera molekyler, av vilka en eller flera kan binda till TBR-sekvenser på ett specifikt och sekvens- eller konformationsberoende sätt. TBA kan innehålla en eller flera pilotsekvenser, benämnda "PILOTER" eller "asymmetrisekvenser", som sätter ihop och tvingar de nukleotidbindande komponenterna i TBA till specifika geometrier. PILOTERNA verkar för att sätta ihop specifika nukleinsyraigenkännande enheter eller andra PILOTER till vilka specifika nukleinsyraigenkännande enheter är fästa till TBAs på ett förutbestämt sätt. TBA kan även innehålla en eller flera molekyler som förankrar eller lokaliserar TBA.

PNAs enligt uppfinningen definieras i krav 1. Användningar av dessa nukleinsyror definieras i andra krav, såväl som utrustningar eller kits, som innehåller dem.

PNAs förutom TNA-specifika sekvenser innehåller också en eller flera sekvenser, 1/2 BBRs, som kan hybridisera med komplementära 1/2 BBRs, i boostrande nukleinsyror (BNAs). Genom hybridisering av BNAs satta till de igångsättande 1/2 BBRs, som föreligger i PNAs, görs förlängningar av PNAs i form av PNA-BNA och sedan BNA-BNA-hybrider. Dessa förlängningar innehåller en eller flera boostrande bindande regioner (BBRs). Varje BBR kan binda en boostrande bindande sammansättning (Booster Binding Assembly, BBA). BBA är sammansatt av molekyler av vilka en eller flera kan binda till en BBR på ett specifikt och sekvens- eller konformationsberoende sätt. BBA kan innehålla en eller flera pilotsekvenser, benämnda "PILOTER" eller "asymmetrisekvenser", som sätter ihop och tvingar de nukleotidbindande komponenterna i TBA till specifika geometrier. PILOTERNA verkar för att sätta ihop specifika nukleinsyraigenkännande enheter eller andra piloter till vilka specifika nukleinsyraigenkännande enheter är fästa i BBAs på ett förutbestämt sätt. BBA kan innehålla molekyler som förankrar eller lokaliserar BBA eller som tillåter bestämning av de bundna BBAs och därigenom av TBA-TNA-PNA-komplex till vilka de i sin tur är bundna. Metoder och kompositioner beskrivs för användning av 1/2 BBRs, BNAs, BBRs, BBAs och BBA-piloter inkluderande deras användning som komponenter i diagnostiska och rättsmedicinska testkits.

Metoder och kompositioner beskrives för testförfaranden och förfarande för ett test-kit innehållande PNAs, TBAs, TBRs, BNAs, BBRs och BBAs för bestämning, lokalisering och differentiering av specifika nukleinsyrasekvenser inkluderande nukleinsyrasekvenser som återfinns i humana celler, i humant immunbristvirus (HIV), humant papillomavirus (HPV) och i andra nukleinsyrerika system inkluderande virus och bakterier.

Det är följaktligen ett syfte med föreliggande uppfinning att tillhandahålla förfaranden och kompositioner för användning vid bindning, bestämning och förstärkning av bestämningen av specifika målnukleinsyrasekvenser i ett prov med säkerhet och noggrannhet till och med i närvaro av nära besläktade men olika nukleinsyrasekvenser.

Det är följaktligen ett syfte med uppfinningen att tillhandahålla förfaranden och kompositioner för att alstra målbindande sammansättningar som specifikt binder målbindande regioner som bildas genom hybridisering av probnukleinsyra- och målnukleinsyrasekvenser.

Ett annat syfte med denna uppfinning är att tillhandahålla ett förfarande och kompositioner för att alstra booster-bindande sammansättningar, som specifikt binder booster-bindande regioner, som bildas genom hybridisering av bostrande nukleinsyrasekvenser med probnukleinsyror, bostrande nukleinsyror och hårnålsnukleinsyror.

Ett annat syfte med denna uppfinning är att tillhandahålla ett förfarande och kompositioner för användning vid förstärkning av bestämningen av målbindande sammansättningar bundna till målbindande regioner med användning av booster-bindande sammansättningar och bostrande nukleinsyror.

Ett annat syfte med denna uppfinning är att tillhandahålla ett förfarande och kompositioner som tillåter användning av en eller flera bestämbara markörer, inkluderande, men icke begränsat till, radioaktiva markörer, ljus-emitterande, fluorescenta, enzy-



matiska eller andra signalalstrande molekyler. Dessa markörer användes tillsammans med probnukleinsyror, målbindande sammansättningar, boosterbindande sammansättningar, boosterande nukleinsyror eller hårnålsnukleinsyror.

### Kort beskrivning av ritningarna

Följande illustrationer förekommer i fig 1: **figur 1-I** är en PNA innehållande en  $\frac{1}{2}$  TBR, som är enkelsträngad sekvens som är komplementär till en TNA och en  $\frac{1}{2}$  BBR-sekvens. **Figur 1-IIa** är en TNA till vilken komponenterna i figur 1-I sättes och, under hybridiserande betingelser, binder PNA för att bilda komponenterna i **figur 1-IIIa**, en PNA-TNA-hybrid innehållande minst en TBR. **Figur 1-IVa** är en BNA som sätts till komponenterna i fig 1-IIIa och, under hybridiserande betingelser, binder till  $\frac{1}{2}$  BBR i figur 1-IIIa för att bilda en PNA-BNA-hybrid som innehåller en BBR som visas i **figur 1-Va**.

**Figur 1-IIb** är en BNA som sättes till komponenterna i figur 1-I och som under hybridiserande betingelser binder PNA för att bilda komponenterna i **figur 1-IIIb**, en PNA-TNA-hybrid innehållande en BBR. **Figur 1-IVb** är en TNA till vilken komponenterna i figur 1-IIIb sättes, och som under hybridiserande betingelser binder  $\frac{1}{2}$  TBR i figur 1-IIIb för att bilda en PNA-BNA-hybrid, som innehåller en TBR som visas i **figur 1-Vb**.

**Figur 1-IIc** är en HNA som sättes till komponenterna i figur 1-I och som under hybridiserande betingelser binder PNA för att bilda komponenterna i **figur 1-IIIc**, en PNA-HNA-hybrid som innehåller en BBR. **Figur 1-IVc** är en TNA som sättes till komponenterna i figur 1-IIIc och som under hybridiserande betingelser binder  $\frac{1}{2}$  TBR i figur 1-IIIc för att bilda en PNA-BNA-hybrid som innehåller en BBR som visas i **figur 1-Vc**.

De hybrider som bildar TBRs och BBRs är användbara i föreliggande uppfinning. PNAs och BNAs anges i figur 1 och kan innehålla ingen vidhäftande bärare och/eller indikator (OSA), eller en vidhäftande bärare eller annat medel för att loka-

lisera, inkluderande men inte begränsat till, vidhäftning till pärlor, polymerer och ytor och/eller indikatorer.

**Figur 2a** är ett diagram över strategier för polymerisering av BNAs till PNAs och infångning med HNAs.

**Figur 2b** är ett diagram över ytterligare strategier för att förstärka PNA-TNA-signalerna via polymerisering av BNAs och infångning med HNAs.

**Figur 3** är ett diagram som visar användning av BNAs innehållande multipla  $1/2$  BBRs per BNA.

**Figur 4a** är ett diagram som visar bindningen av TBAs och BBAs till TBRs och BBRs och förmågan hos TBA att skilja mellan TNAs och CNAs. Enligt denna utföringsform, om TBA immobiliseras, antingen på en pärla, yta av mikrotiterplatta eller vilken annan sådan yta som helst, kommer endast komplex såsom komplex X att hållas kvar och bestämmas, under det att komplex såsom komplex XI inte bestäms.

**Figur 4b** är ett diagram som exemplifierar händelser liknande dem som visas i figur 4a men i någon annan ordning av uppträdande.

**Figur 5** är ett diagram som exemplifierar PNAs som innehåller mellan  $1/2$  TBR och ingen  $1/2$  BBR till PNAs som innehåller upp till fem  $1/2$  TBRs och en  $1/2$  BBR. (a) och (b) medlemmarna i varje nummer (I, II, III, IV, V) bildar en uppsättning som, kommer efter hybridisering till TNA, tillhandahåller TBRs antingen med ((a) medlemmar) eller utan ((b) medlemmar) en tillgänglig  $1/2$  BBR för förstärkning via hybridisering till BNAs som har komplementära  $1/2$  BBRs.

**Figur 6a** är ett diagram som exemplifierar en speciell TNA som har två  $1/2$  TBRs som, efter bindning till en lämplig TNA, bildar två tätt associerade TBRs som kan binda två TBAs. En  $1/2$  BBR tillhandahålls även för förstärkning.

**Figur 6b** är ett diagram som visar samma händelser som i figur 6a förutom att här användes en dubbel TBA så att åtskillnader mellan enkla TBRs, som sker i normala cellprover, kan skiljas från onormala dubbla TBRs.

**Figur 6c** är ett diagram som visar samma scenario som i figur 6a förutom att här identifieras fem TBRs i TNA. Varje TBR kan vara bunden till en TBA lika eller olika, och varje TBA kan vara märkt på olika sätt för att bekräfta att alla fem ställena föreligger i TNA.

**Figur 6d** är ett diagram med samma händelser som i figur 6c förutom att här visas en dubbel TBA som utsträcker det som visas i figur 6b till användningen av det dubbla TBA. Ett exempel på TNA, som visas i punkt II i figurerna 6a, 6b, 6c och 6d, är HIV enkelsträngat DNA eller RNA.

**Figur 7** visar HIV LTR som en TNA och två PNAs och en strategi för bestämning av TNA med användning av PNAs.

**Figur 8** är ett schema över en utföringsform enligt uppfinningen där en målbindande sammansättning användes för att binda en hybrid TNA-PNA, och boostrande bindande sammansättning användes för att binda polymeriserade BNAs.

**Figur 9** är ett schema över en modulerande TBA i vilken sammansättande sekvenser, länksekvenser och asymmetrisekvenser användes för att skydda önskade igenkännande enheter av nukleinsyror tillsammans för att bilda en TBA.

**Figur 10** visar modulerande TBAs som är användbara vid bestämning av HIV-specifika sekvenser.

**Figur 11** visar modulerande TBAs som är användbara vid bestämning av humana papillomavirus-sekvenser. Varje enhet i E2 är i själv verket en dimer av den DNA-bindande delen av E2.

**Figur 12a** är en schematisk vy av TNA-fraktionering och växling i mobilitet på grund av bindning av en TBA.

**Figur 12b** är en schematisk vy av TNA-fraktionering och förstärkt förändring i mobilitet på grund av bindning av BBAs dessutom till TBAs.

**Figur 13** visar en bestämningsstrategi för borttagning av sekvenser; ett exempel på användning av denna strategi är för en integreringsanalys av humant papillomavirus.

**Figur 14** visar ihopsättning av högre ordning av TBAs genom användning av nukleinsyra igenkännande enheter av, länkar, sammansättande sekvenser så att olika TBA-specifika för bindingsställen i HIV LTR bildas.

**Figur 15** visar ihopsättning av högre ordning genom TBAs användning av DNA-igenkännande enheter, länkar sammansättande sekvenser så att olika TBA-specifika för bindingsställen i HPV-genomet bildas.

**Figur 16** visar den åtskillnad som uppnås med användning av en komplex TBA och förmågan hos endogena tävlande målbindande molekyler att eliminera bindning av TBA till en kusinnukleinsyra men inte från TNA som innehåller den lämpliga orienteringen av mer än ett ställe som känns igen av TBA.

**Figur 17** visar förmågan hos en TBA att specifikt målsökas för att bindas till ställen av mismatchande sekvens och att företrädesvis binda till de ställen över kusinställen som inte innehåller alla de målsökta mismatchningarna.

#### Kort beskrivning av sekvenserna

SEKV ID NR 1 motsvarar figur 5-Ia-1 och visar MHC klass 1 NF-kB-bindande ställe.

SEKV ID NR 2 motsvarar figur 5 (Ia) och visar B2-mikroglobulin NF-kB bindingsstället.

SEKV ID NR 3 motsvarar figur 5 (Ia) och visar kappa immunoglobulin NF-kB bindningsstället.

SEKV ID NR 4 motsvarar figur 5(Ia) och visar en av de HIV NF-kB bindande ställena.

SEKV ID NR 5 motsvarar figur 5(Ia) och visar en av de HIV NF-kB bindande ställena.

SEKV ID NR 6 motsvarar figur 5(Ia) och visar c-myc NF-kB bindande ställe.

SEKV ID NR 7 motsvarar figur 5(IIa) och visar ett dubbelt HIV NF-kB bindande ställe.

SEKV ID NR 8 motsvarar figur 5(IIa) och visar ett dubbelt HIV NF-kB bindande ställe.

SEKV ID NR 9-16 motsvarar figur 5(IIa) och visar ett dubbelbindande ställe där ett ställe binder ett HIV NF-kB bindande ställe och det andra stället är ett HIV SP1 bindande ställe.

SEKV ID NR 17-18 motsvarar figur 5(IIa) och visar ett dubbelt HIV SP1 bindande ställe.

SEKV ID NR 19-31 motsvarar figur 5(IIIa) och visar ett dubbelt HIV NF-kB bindande ställe och ett HIV SP1 bindande ställe.

SEKV ID NR 32-33 motsvarar figur 5(IVa) och visar ett fyrfaldigt bindande ställe där två ställen är dubbelt HIV NF-kB bindningsställena och två ställen är HIV SP1 bindningsställena.

SEKV ID NR 34 motsvarar figur 5(VIa) och visar ett fembindande ställe där två ställen är dubbelt HIV NF-kB bindande ställen och tre ställen är HIV SP1 bindande ställen.

SEKV ID NR 35 är ett exempel på en 1/2 BBR, i detta fall OL1, OL2 och OL3 element bakteriofag lambda vänstra operator inkluderande mellanliggande sekvenser.

SEKV ID NR 36 är ett exempel på en 1/2 BBR, i detta fall OR3, OR2 och OR1 element bakteriofag lambda högra operatör inkluderande mellanliggande sekvenser.

SEKV ID NR 37 är HIV LTR.

SEKV ID NR 38 är en PNA komplementär till PNA i HIV LTR.

SEKV ID NR 39 är en PNA komplementär till en annan PNA till HIV LTR än SEKV ID NR 38.

SEKV ID NR 40 är en PNA som är komplementär till en del av HIV LTR och även innehåller en 1/2 BBR och en överhängande sekvens för att polymerisera BNAs på PNA

SEKV ID NR 41 är en BNA komplementär till SEKV ID NR: 40 1/2 BBR.

SEKV ID NR 42 är en BNA som kommer att polymerisera på SEKV ID NR: 41 BNA och som med SEKV ID NR: 40 och 41 alstrar ett *PstI* igenkännande ställe.

SEKV ID NR: 43 är en BNA som är komplementär till SEKV ID NR: 42 BNA och som kompletterar ett *BamHI* igenkännande ställe.

SEKV ID NR: 44 är en HNA som har ett *BamHI* igenkännande ställe som kommer att hybridisera med *BamHI* igenkänningsstället alstrat av SEKV ID NR: 42 och 43 till den växande polymeren.

SEKV ID NR: 45 är en andra PNA som, såsom SEKV ID NR: 41 är komplementär till en del av HIV LTR men inte till samma sekvens som SEKV ID NR: 40. SEKV ID NR: 45 kodar också en 1/2 BBR och ett överhäng som kommer att medge polymerisering av BNAs som startar med ett *SphI* igenkännande ställe.

SEKV ID NR: 46-62 är humana papillomavirus (HPV) specifika PNAs som, efter hybridisering med HPV-sekvenser, bildar TBRs som binder HPV DNA-bindande proteiner.

SEKV ID NR: 63-71 är NF-KB DNA igenkännande enheter för inkorporering i TBAs.

SEKV ID NR: 72 är en nukleär lokaliseringssekvens.

SEKV ID NR: 73 är en SP1-sekvens igenkännande enhet.

SEKV ID NR: 74 är en igenkännande enhet för ett TATA-bindande protein.

SEKV ID NR: 75-84 är igenkännande enheter för papillomavirus E2 DNA.

SEKV ID NR: 85-92 är asymmetrisekvenser.

SEKV ID NR: 93 är en igenkännande enhet för en arabidopsis TATA.

SEKV ID NR: 94 är en igenkännande enhet för ett HPV-16-E2-1-DNA-bindande protein.

SEKV ID NR: 95 är ett igenkännande ställe för ett HPV-16-E2-2-DNA-bindande protein

SEKV ID NR: 96 är ett igenkännande ställe för ett HPV-18-E2-DNA-bindande protein

SEKV ID NR: 97 är ett igenkännande ställe för ett HPV-33-E2-DNA-bindande protein

SEKV ID NR: 98 är ett igenkännande ställe för ett bovint papillomavirus E2-DNA-bindande protein

SEKV ID NR: 99-102 är exempel på länksekvenser.

SEKV ID NR: 103 är ett exempel på en nukleär lokaliseringssignalsekvens (NLS).

SEKV ID NR: 104-108 är exempel på skyddande sekvenser.

SEKV ID NR: 109-116 är exempel på sammansatta TBA-sekvenser.

SEKV ID NR: 117 är ett konsensus NF-kB bindande ställe.

SEKV ID NR: 118 är en HIV Tat aminosyrasekvens.

### Förkortningar



enkelsträngad nukleinsyra



dubbelsträngad nukleinsyra



bindande region på nukleinsyra



ingen bärare eller inga indikatorer eller fast bärare eller andra medel för lokalisering, inkluderande, men inte begränsat till vidhäftning vid pärlor, polymerer och ytor eller indikatorer = OSA

BBA

boosterbindande sammansättning

BBR

boosterbindande region

BNA

boostrande nukleinsyra

CNA

kusinnukleinsyra

1/2 BBR	enkelsträngad region som, när den hybridiserar till den komplementära sekvensen bildar en HNA eller en BNA, kan binda en BBA
1/2 TBR	enkelsträngad region av PNA som, när den hybridiserar till den komplementära sekvensen från en TNA, kan binda till en TBA
OSA	eventuellt bärare eller vidhäftning, cirkel med låda
PNA	probnukleinsyra
TBA	målbindande sammansättning
TBR	målbindande region
TNA	målnukleinsyra
HNA	hårnålsnukleinsyra

### Definitioner

Det framgår av den beskrivning som följer att när man nämner sådana uttryck som målbindande sammansättningar (TBAs), boostrande bindande sammansättningar (BBAs), DNA-bindande proteiner, nukleinsyrabindande proteiner eller RNA-bindande proteiner, är det som avses kompositioner som innehåller molekyler som binder till DNA eller RNA målnukleinsyrasekvenser (TNAs) oberoende av specificitet hos kategorin av bindande molekyler från vilka de härrör. Sålunda kan t ex en TBA anpassad att binda till sekvenser från humant immunbristvirus vara mycket lik en NF-KB transkriptionsfaktor som typiskt binder DNA-sekvenser. Emellertid, såsom den användes häri skall det framhållas att TBA kan anpassas för optimal användning för att binda till RNA-sekvenser med speciell sekvensammansättning eller konformation.

Tillförlitligheten hos den analysmetod, som beskrivs häri, beror i stor utsträckning den på selektiva bindningen av TBAs och BBAs till speciella nukleinsyraenheter. Det skall framhållas i hela denna beskrivning att grunden till TBA och BBA särskiljandet av TNAs från besläktade sekvenser (kusinnukleinsyror eller CNAs) kan vara bildningen av de exakta probnukleinsyra (PNA)-målnukleinsyra (TNA) hybridsegmenten (PNA-TNA-hybridser). Grunden till detta särskiljande kan emellertid lika väl



vara bildningen av en speciell konformation och behöver inte erfordra fullständig frånvaro av mismatchande basparning i TNA-PNA-hybriden. Följaktligen skall grunden till verkningssättet hos TBA eller BBA helt förstås att bero på särskiljandet av vilken unik egenskap som helst hos TNA-PNA-hybriden i motsats till eventuella egenskaper som företes av vilka som helst PNA-CNA-hybrider, som kan bildas i ett testprov, som bringas i kontakt med en given PNA.

### Detaljerad beskrivning av uppfinningen

Föreliggande uppfinning definieras av de bifogade kraven. Den tillhandahåller ett förfarande för specifik identifiering av en målnukleinsyra (TNA) i ett prov genom användning av målbindande sammansättningar (TBAs) som inkorporerar specifika nukleinsyrabindande proteiner. Genom att använda probnukleinsyror (PNAs), som är specifika för en given TNA-sekvens, och en TBA som är specifik för den duplexmålbindande regionen (TBR) som alstras vid bildning av hybrider TNA-PNA-sekvenser, bildas ett stabilt TBA-TNA-TNA-komplex. Genom att dessutom tillhandahålla specifika förökningsbara sekvenser i PNA, förutom sekvenser som specifikt medverkar till bildningen av TBR som känns igen av TBA, bestäms bindningen av PNA till TNA och upptäckten förstärks. För detta ändamål kan vilket antal som helst av nukleinsyraförstärkande system, inkluderande polymeraskedje-reaktion, eller användning av grenade DNA, varvid varje förening innehåller en bestämbar markör, användas. I synnerhet beskrives häri ett nytt förfarande för förstärkning, varvid den förstärkta delen av PNA innehåller sekvenser på vilka boosterande nukleinsyror (BNAs) kan polymeriseras. Vid bildning av varje BNA-TNA-hybrid bildas en boosterande bindingsregion (BBR) till vilken en boosterande bindande sammansättning (BBA) specifikt binder. Om BBAs eller BNAs märks på ett bestämbarbart sätt tillhandahåller de väsentligen obegränsad förstärkning av den ursprungliga TNA-PNA-bindande händelsen.

Enligt denna uppfinning skall TNA förstås så att den innehåller specifika nukleinsyrasekvenser. TBA skall förstås att vara vilken molekylär sammansättning som helst, som specifikt kan och tätt binder för att bilda en TNA-PNA-hybrid. TBA innehåller en eller flera molekyler, vars sekvenser är tillräckliga för att binda till

TBR. De nukleinsyrabindande domänerna, som är kända, kan antingen användas direkt som komponenter för TBA eller modifierade enligt den information som tillhandahålles häri. De mest lättillgängliga molekylerna med sådana sekvenser är de DNA-bindande domänerna från DNA-bindande proteiner. Specifikt är många DNA eller RNA-bindande proteiner kända som antingen kan användas direkt som det kända, icke modifierade proteinet, eller TBA kan vara ett nukleinsyrabindande protein, modifierat enligt den specifika information som tillhandahålls häri. I det senare fallet skulle specifika modifieringar som är önskvärda inkluderar optimering av bindande affiniteter, avlägsnande av icke-önskade aktiviteter (såsom nukleasaktivitet och igenkänning av TBA i närvaro av andra molekyler med affinitet för komponenter i TBA), optimering av selektivitet för en målsekvens i förhållande till närbesläktade sekvenser och optimering av stabilitet.

Exempel på DNA-bindande proteiner som skulle kunna användas enligt denna uppfinning är de DNA-bindande delarna av transkriptionsfaktorn NF-kB (p50 och p65), NF-IL6, NF-AT, rel, TBP, papillomavirus' E2-proteinet, sp1, repressorerna *cro* och CI från bakteriofag lambda, och liknande proteiner som är välkända proteiner vars DNA-bindande del har isolerats, klonats, sekvensbestämts och karakteriserats. Dessutom inkluderas vilket annat DNA-bindande protein som helst eller del av ett protein som helst som är erforderligt och tillräckligt för att binda till en TBR-hybrid eller en BBR. Detta inkluderar proteiner eller delar av vildtyp-proteiner med förändrad DNA-bindande aktivitet samt proteiner skapade med förändrad DNA-bindande specificitet, såsom utbyte av en DNA-bindande igenkännande helix från ett protein till ett annat. Dessutom kan proteiner som har nukleinsyrabindande och annan nukleinsyrafunktion, såsom restriktionsendonukleaser, användas som den nukleinsyrabindande funktionen. Proteiner, som binder till målregioner i DNA-RNA-hybrider samt RNA-RNA-hybrider, inkluderas (se t ex Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). De bindande sammansättningarna kan konstrueras med användning av en molekyl med skyddsdelar för den bindande sammansättningen så att specifika komponentkombinationer och geometrier kan uppnås. Denna molekyl betecknas här som en PILOT. Piloter kan vara sammansatta av proteiner eller vilken

kombination som helst av organiska och oorganiska material som åstadkommer det kombinatoriska urvalet och/eller inducerar specifika geometrier mellan medlemmar i TBA eller BBAs. Ett skydd är en stabil ställning på vilken en TBA eller en BBA kan konstrueras så att den korrekta konformationen av TBA eller BBA tillhandahålls samtidigt som kan man eliminera oönskade egenskaper hos ett naturligt förekommande nukleinsyrabindande protein. Ett specifikt exempel på denna utföringsform, en modifierad version av den pleiotropa transkriptionsfaktorn, NF- $\kappa$ B, åstadkoms med användning av ett modifierat bakteriofag-lambda *cro*-protein som skyddet. Varje NF- $\kappa$ B-bindande dimer bibehåller den pikomolära bindningsaffiniteten för NF- $\kappa$ B-bindningsstället samtidigt som den bindande sammansättningen presenterar flera fördelaktiga fabrikationsegenskaper, stabilitet och karaktäristikspecifitet.

Med hänsyn till det föregående beskrivs olika aspekter och utföringsformer av denna uppfinning i detalj nedan.

1. Probnukleinsyror (PNAs) och deras framställning. PNAs enligt föreliggande uppfinning innehåller minst tre huvuddelar förenade tillsammans. Med referens till fig 1(I) i ritningarna är den första delen av PNA en eller flera sekvenser av baser betecknade "1/2 TBR". Med referens till fig 1(I och IIa) på ritningarna är 1/2 TBR i PNA komplementär till en sekvens av intresse i ett prov, TNA som innehåller en 1/2 TBR. Med referens till fig 1(IIIa) av ritningarna bildar TNA, när den sättes till PNA under hybridiserande betingelser, en PNA-TNA-hybrid som innehåller en TBR. Med referens till fig 1(I) på ritningarna är den andra delen av TNA en sekvens av baser betecknad "1/2 BBR". Med referens till fig 1(I, IIb, IIc och IVa) på ritningarna är 1/2 BBR i PNA komplementär till en 1/2 BBR som finns i en BNA eller en HNA. Med referens till fig 1 (IIIb, IIIC och Va) på ritningarna bildar BNA eller HNA, när de sättes till PNA under hybridiserande betingelser en PNA-BNA-hybrid eller PNA-HNA-hybrid respektive, innehållande en BBR. Med referens till fig 1(I) på ritningarna är den tredje delen i PNA OSA, som betecknas med en ring med en fyrkant runt den. OSA är inget stöd och/eller en indikator eller en fast bärare eller något annat medel för lokalisering, inkluderande, men inte begränsat till, vidhäftning till pärlor, polymerer och ytor och/eller indikatorer som är kovalent bundna till eller

icke kovalent bundna utan specifikt förenat med PNA. OSA kan vara en atom eller en molekyl som underlättar vid separationen och/eller lokaliseringen så att en fast bärarbindande grupp eller markör, som kan upptäckas med olika fysikaliska medel, inkluderande men inte begränsat till, adsorption eller bildåtergivning av emitterade partiklar eller ljus. Förfaranden för att bestämma indikatorer på oligonukleotider eller för att immobilisera oligonukleotider vid fasta bärare är välkända inom tekniken (se Keller and Manak, supra).

PNA enligt föreliggande uppfinning kan framställas med vilken lämplig metod som helst. Sådana metoder i allmänhet inkluderar oligonukleotidsyntes och kloning i en förökningsbar vektor. Förfaranden för nukleinsyrasyntes är välkända inom tekniken. När de klonas eller syntetiseras kan strängrening och separation vara erforderlig för att använda produkten som en ren PNA. Förfaranden för att framställa RNA-prober är välkända (se t ex Blais 1993, Blais 1994, som använder *in vitro*-transkription från en PCR-reaktion som inkorporerar en T7 RNA-polymeraspromotor).

Längden och den specifika sekvensen för PNA beror, som fackmannen inom tekniken förstår, på längden och sekvensen som skall bestämmas i en TNA, och kraven för att uppnå tät och specifik bindning av den speciella TBA som skall användas (se diskussion angående TBAs nedan). I allmänhet är PNAs med sekvenslängder mellan ca 10 och ca 300 nukleotider i längd lämpliga, varvid längder om ca 15-100 nukleotider är önskvärda för många av de specifikt exemplifierade utföringsformer- na häri.

Det skall också framhållas att PNA kan konstrueras för att innehålla mer än en 1/2 TBR och för att producera mer än en TBR för en eller flera TBAs, som är lika eller olika, samt komplexa TBRs som känns igen av nya duplexa och multiplexa TBAs (se beskrivningen nedan avseende dessa nya TBAs) vid hybridisering av PNAs och TNAs. Fig 5 illustrerar specifika PNAs som innehåller en eller flera 1/2 TBRs. Specifika sekvenser som motsvarar 1/2 TBR-sekvenserna illustreras i fig 5 (Ia, IIa, IIIa, IVa och Va) är SEKV ID NR: 1-34 (se beskrivning av sekvenser ovan).

Såsom visas i fig 2a och 2b kan PNA innehållande en 1/2 TBR hybridiserad med en eller flera BNAs (se beskrivning nedan) och kedjan av BNAs polymeriseras till vilken önskad potentiell längd som helst för amplifiering av TNA-PNA-hybridiseringshändelsen. Företrädesvis föreligger mellan 1 och 10 1/2 BBRs i PNA:

Såsom visas i fig 6a och 6b kan PNA innehålla flera 1/2 TBRs, lika eller olika, som kan hybridisera med flera 1/2 TBRs i en TNA. Varje gång en 1/2 TBR i TNA matchar en 1/2 TBR i en TNA bildas en målbindande region, TBR, som kan binda en TBA. Vidare är det inte nödvändigt att alla TBRs är på en enda kontinuerlig PNA. I en utföringsform enligt uppfinningen kan sålunda två olika PNAs användas för att bestämma sekvenser på en speciell TNA. Som en illustration av denna aspekt av uppfinningen visar fig 7 en representation av det humana immunbristviruset (HIV) och den långa terminaluppreningen (LTR). Såsom är känt i tekniken innehåller HIV LTR två NF-kB-bindande ställen och SP1-bindande ställen, som ligger nära varandra, varvid NF-kB och SP1 är kända DNA-bindande proteiner. Fig 7 tillhandahåller två PNAs, PNA1 (SEKV ID NR 38) och PNA2 (SEKV ID NR 39), som var och en är komplementära till de motsatta strängarna som visas som en TNA (SEKV ID NR 37), som visar de två NF-kB-bindande ställena och de tre SP1-bindande ställena i HIV LTR. Enligt denna aspekt av uppfinningen hybridiseras PNA1 specifikt med denna sektion av TNA som visas i fig 7 med baser understrukna med en "+"-symbol, under det att PNA2 specifikt hybridiserar med den sektion i TNA som visas i fig 7 med baser understrukna med en "="-symbol. Var och en av PNA1 eller PNA2 kan även innehålla sekvenser (indikeras med symboler "#" eller "\*"") som hybridiserar med en BNAs 1/2 BBR-sekvenser (se nedan). Dessutom kan var och en av PNA1 och PNA2 vara märkta på olika sätt med en OSA, såsom en fluorofor såsom ett fluorescein eller en rodaminmarkör, som skulle kunna medge bekräftelse att båda prober har blivit bundna till TNA. Om endast en markör eller ingen av markörerna upptäcks drar man slutsatsen att TNA inte föreligger i det prov som testas.

I ytterligare en aspekt av utföringsformen som visas i fig 7, visas en metod för att förändra specificiteten hos den här analysmetoden. Genom att förändra längden av

gapet mellan PNA1 och PNA2 så den region av TNA som förblir ohybridiserad förändras, kan någon som utövar uppfinningen förändra särskiljandet i analysen.

För att mer tydligt exemplifiera denna utföringsform av uppfinningen är det erforderligt att framhålla att TBR kan ha en helixstruktur. Sålunda, när PNA1 alstrar TBRs på en "sida" av helixen alstrar PNA2 en TBR på antingen samma eller en annan sida av helixen, beroende på avståndet mellan mitten på varje TBR (understruket i fig 7). Om mitten till varje bindningsställe är en integral produkt om 10,5 baser åtskilda, kommer TBRs att vara på samma sida om helixen, under det att icke-integrala produkter om 10,5 baser åtskilda kommer att placera TBR på motsatta sidor om helixen. På detta sätt kan någon samstämning i bindningen av TBA som känner igen PNA1 TBR och TBA som känner igen PNA2 TBR manipuleras (se Hochschild, A., M. Ptashne [1986] Cell 44:681-687, som visar denna effekt för bindning av bakteriofag lambda repressor till två olika operatorställen lokaliserade vid olika avstånd från varandra i en DNA-helix). Såsom beskrivits av Perkins et al. ([1993] EMBO J. 12:3551-3558), erfordras samstämmig bindning mellan NF-kB och SP1-ställena för att åstadkomma aktivering av HIV LTR. För syftet att med föreliggande uppfinning kan man dra fördel av det dubbla motivet med NF-kB-trippel-SP1-bindningsstället i HIV LTR genom att tillhandahålla ett enda, nytt bindande protein som kan binda båda ställena samtidigt men endast om avståndet mellan ställena är geometriskt lämpligt. Detta kontrolleras både av strukturen av den valda TBA och av det använda PNAs. Sålunda, i utföringsformen som exemplifieras i fig 7, kan de två proberna användas med en tillräckligt stor mellanliggande prob-region av enkelsträngat DNA som blir kvar så att, även om NF-kB- och SP1-bindingställena är på motsatta sidor om helixen den enkelsträngade regionen mellan proberna tillhandahåller en tillräckligt flexibel "länk" så att DNA:t både kan böjas och vridas för att anpassa sig till geometrin hos TBA. Alternativt kan en mer stringent analys upprättas genom att förkorta avståndet mellan proberna så att DNA:t endast kan böjas men inte vridas. Slutligen kan proberna placeras så nära varandra eller kan en enda DNA användas så att DNA:t endast kan böjas men inte vridas. Denna figur exemplifierar och möjliggör sålunda produktion av det ställningssystem

med vilken given önskad grad som helst av åtskillnad mellan målnukleinsyror som har liknande sekvenser men olika närliggande positioner av dessa sekvenser.

I termer av diagnostisk eller rättsmedicinsk utrustning för HIV förstår fackmännen att den enda aspekten enligt uppfinningen medger att komponenterna för den diagnostiska eller rättsmedicinska utrustningen kan skräddarsys för att matcha vad som är känt vid varje givet tillfälle om de rådande stammarna för HIV eller annan patogen eller sjukdomstillstånd. Det framgår också för fackmännen inom tekniken att även om bestämningen av HIV-infektion inte är den enda användningen av föreliggande uppfinning är, på grund av mutationsförmågan hos HIV-genomet, den troligen en av de mest komplexa testmiljöer för en sådan diagnostik. Det är exakt i en sådan mutationsbenägen omgivning där flexibiliteten hos föreliggande uppfinning i kombination med dess förmåga att särskilja mellan vilket nära besläktade sekvenser som den emellertid kommer att helt klart uppskatta. I mindre mutationsbenägna miljöer behöver inte en del av den sofistikerade med vilken uppfinningen kan utföras användas. Sålunda, i en diagnosutrustning för papillomavirusinfektion är alla särskiljande egenskaper hos TBA-TBR-interaktionen tillgängliga tillsammans med förmågan att förstärka signalen med användning av BNAs och BBAs, men en enda, enkel TNA, såsom någon av SEKV ID NR. 46-62 kan användas som unikt identifierar papillomavirussekvenser, som även är kända för att binda till en TBA såsom papillomavirus E2-proteinet eller trunkerade DNA-bindande delar därav (se Hegde et al [1992] *Nature* 359:505-512; Monini et al [1991] *J. Virol.* 65:2124-2130).

Vid tillämpning av föreliggande förfarande att bestämma en speciell TNA för syftet att avgöra om vissa nukleinsyror är närvarande som är förknippade med förloppet för melanom, hepatom, bröst-, cervikal-, lung-, colon-, prostata-, pankrea- eller äggstockscancer, kan TNA erhållas från biopsimaterial tagna från organ och vätskor, som misstänks innehålla de cancerartade cellerna. För bestämning av genetiska brister kan TNA erhållas från patientprover innehållande de drabbade cellerna. För bestämning av jästa kontaminerande ämnen och produkter vid framställning av födoämnen, kemiska eller biotekniska produkter eller vid biologisk behandling av avlopp, kan TNA erhållas från prover tagna vid olika stadier i jäsnings- eller

behandlingsprocessen. För bestämning av patogener eller kontaminerande ämnen i födoämnen eller läkemedel kan TNA-provet erhållas från födoämnet eller läkemedlet, avstrykningar av födoämnen eller ytor i kontakt med födoämnen, vätskor i kontakt med födoämnen, processmaterial, vätskor och liknande, som är förknippade med framställningen av eller som är i kontakt med födoämnen, läkemedlet eller biologiska prover tagna från dessa i kontakt med födoämnet eller läkemedlet eller liknande.

2. Boosternukleinsyror (BNAs), boosterbindande regioner (BBRs) och framställning därav. BNAs enligt föreliggande uppfinning minst en eller flera 1/2 BBRs kopplade till en OSA. 1/2 BBRs kan hybridisera till komplementära 1/2 BBRs som föreligger i PNA eller andra BNAs eller en HNA.

Med referens till fig 1(I, IIb och IIIb) på ritningarna består den enklaste BNA av två delar. Med referens till fig 1 (IIb) på ritningarna är den första delen av den enklaste BNA en sekvens av baser som är komplementär till sekvensen i PNA som betecknas "1/2 BBR". Med referens till fig 1(IIb) på ritningarna är den andra delen av den enklaste BNA OSA, betecknad med en cirkel med en fyrkant runt dem. OSA är inte bärare och/eller indikator eller fast bärare eller annat medel för lokalisering, inkluderande men inte begränsad till, vid häftning till pärlor, polymerer, ytor och/eller indikatorer som är kovalent fästa till eller icke-kovalent, men specifikt förenade med DNA.

Med referens till fig 2a(II och III) på ritningarna kan BNA innehålla mer än en 1/2 BBR-sekvens. BNA som visas i fig 3(II) innehåller en sekvens, som är komplementär till den PNA, som visas i fig 3(I) och två andra 1/2 BBR-sekvenser. BNA som visas i fig 3(III) innehåller 1/2 BBR-sekvenser som är komplementära till två av de 1/2 BBR-sekvenserna i BNA, som visas i fig 3(II) plus upp till "n" ytterligare 1/2 BBRs för polymerisering av ytterligare BNAs.

Under hybridiserande betingelser alstrar den BNA som visas i fig 3(II), när den kombineras med den PNA som visas i fig 3(I), den PNA-BNA-hybrid som visas i



fig 3(IVa), som innehåller en BBR och en icke-hybridiserad förlängning med två ytterligare 1/2 BBR-sekvenser eller ”booster”-sekvenser. BBRs som skapas med denna hybridisering kan vara identisk, liknande eller olik i sekvens. BBRs som skapas med denna hybridisering kan binda identiska, liknande eller olika BBAs (se nedan). BNAs kan framställas analogt med PNAs.

Under hybridiserande betingelser alstrar BNA-BNA-hybriden som visas i fig 3(IVb), när den kombineras med den PNA som visas i fig 3(Vb), den PNA-BNA-hybrid som illustreras i fig 3(VI), som innehåller en BBR, två ytterligare BNA-BNA-hybrider som innehåller BBRs, och en ohybridiserad förlängning med ytterligare en 1/2 BBR-sekvens, en ”booster”-sekvens. BBRs som skapas med denna hybridisering kan vara identiska, liknande eller olika i sekvensen. BBRs som skapas genom denna hybridisering kan binda identiska, liknande eller olika BBAs (se nedan). BNAs kan framställas på ett sätt analogt med framställning av PNAs.

3. Målnukleinsyror (TNAs) och framställning därav. Det första steget för att upptäcka och förstärka signaler alstrade genom bestämning av en viss TNA enligt föreliggande förfarande är hybridisering av sådant mål med PNA i en lämplig blandning. Sådant hybridisering åstadkoms under lämpliga betingelser som är välkända inom tekniken.

Det prov som misstänks eller är känt för att innehålla det avsedda TNA:t kan erhållas från en mängd källor. Det kan vara ett biologiskt prov, ett födoämne eller jordbruksprov, ett prov från omgivningen, osv. Vid tillämpning av föreliggande förfarande för att bestämma en viss TNA för syftet med medicinsk eller rättsmedicinsk diagnostik kan TNA erhållas från ett biopsipro, en kroppsvätska eller ett exudat såsom urin, blod, mjölk, cerebrospinal vätska, sputum, saliv, avföringsprov, lunga, utsuget material, avstrykning från hals eller genitalia och liknande. Dessutom kan bestämningen vara *in situ* (se t ex Embretson 1993; Patterson 1993; Adams 1994).

Följaktligen kan man tänka sig PNAs specifika för ryggradsdjur (inkluderande däggdjur och inkluderande människor) eller till vilken som helst av eller alla av följande mikroorganismer av intresse och användas i föreliggande förfarande:

Korynebakterier

*Corynebacterium diphtheria*

Bacillus

*Bacillus thuringiensis*

Pneumokocker

*Diplococcus pneumoniae*

Streptokocker

*Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus salivarius*

Staphylococcus

*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus albus*

Pseudomonas

*Pseudomonas stutzeri*

Neisseria

*Neisseria meningitidis*

*Neisseria gonorrhoea*

Enterobacteriaceae

*Escherichia coli*

*Aerobacter aerogenes*

*Klebsiella pneumoniae*

Koliformbakterierna

*Salmonella typhosa*

Salmonella

*Salmonella choleraesuis*

*Salmonella dysenteriae*

*Shigellae dysenteriae*

*Shigellae schmirrii*

*Shigellae arabinotarda*

Shigellae

*Shigellae flexneri*

*Shigellae boydii*

*Shigellae sonnei*

Andra enteriska baciller

*Proteus vulgaris*

Proteus species

*Proteus mirabilis*

*Proteus morgani*

*Pseudomonas aeruginosa*

*Alcaligenes faecalis*

*Vibrio cholerae*

Hemofilus-bordetella-grupp

*Hemophilus influenzae, H. ducreyi*

*Haemophilus hemophilus*

*Hemophilus aegypticus*

*Hemophilus parainfluenzae*

*Bordetella pertussis*

Pasteurella

*Pasteurella pestis*

*Pasteurella tularensis*

Brucella

*Brucella melitensis*

*Brucella abortus*

*Brucella suis*

Aeroba spor-bildande baciller

*Bacillus anthracis*

*Bacillus subtilis*

*Bacillus megaterium*

*Bacillus cereus*

Anaeroba spor-bildande baciller

*Clostridium botulinum*

*Clostridium tetani*

*Clostridium perfringens*

*Clostridium novyi*

*Clostridium septicum*

*Clostridium histolyticum*

*Clostridium tertium*

*Clostridium bifermentans*

*Clostridium sporogenes*

Mycobacterier

*Mycobacterium tuberculosis hominis*

*Mycobacterium bovis*

*Mycobacterium avium*

*Mycobacterium leprae*

*Mycobacterium paratuberculosis*

Aktinomyces (svampliknande bakterier)

*Actinomyces israeli*

*Actinomyces bovis*

*Actinomyces naeslundii*

*Nocardia asteroides*

*Nocardia brasiliensis*

Spiroketer

*Treponema pallidum*

*Treponema pertenue* *Treponema carateum*

*Spirillum minus*

*Streptobacillus moniliformis*

*Borrelia recurrentis*

*Leptospira icterohemorrhagiae*

*Leptospira canicola*

Trypanosomer

Mycoplasma

*Mycoplasma pneumoniae*

Andra patogener

*Listeria monocytogenes*  
*Erysipelothrix rhusiopathiae*  
*Streptobacillus moniliformis*  
*Donvania granulomatis*  
*Bartonella bacilliformis*

Rickettsie (bakterieliknande parasiter)

*Rickettsia prowazekii*  
*Rickettsia mooseri*  
*Rickettsia rickettsii*  
*Rickettsia conori*  
*Rickettsia australis*  
*Rickettsia sibiricus*  
*Rickettsia akari*  
*Rickettsia tsutsugamushi*  
*Rickettsia burnetti*  
*Rickettsia quintana*

Chlamydia (icke klassificerbara bakteriella/virala parasiter)

*Chlamydia agents* (benämning osäker)

Svampar

*Cryptococcus neoformans*  
*Blastomyces dermatidis*  
*Histoplasma capsulatum*  
*Coccidioides immitis*  
*Paracoccidioides brasiliensis*  
*Candida albicans*  
*Aspergillus fumigatus*  
*Mucor cotymbijera* (*Absidia corymbijera*)  
*Rhizopus oryzae*  
*Rhizopus nigricans*  
*Sporotrichum schenkii*  
*Flonsecaea pedrosoi*  
*Fonsecaea compact*  
*Fonsecaea dermatidis*  
*Cladosporium carrioni*  
*Phialophora verrucosa*  
*Aspergillus nidulans*  
*Madurella mycetomi*  
*Madurella grisea*  
*Allescheria boydii*  
*Phialophora jeanselmei*  
*Microsporurn gypsum*  
*Trichophyton mentagrophytes*  
*Keratinomyces ajelloi*  
*Microsporum canis*  
*Trichophyton rubrum*  
*Microsporum adouini*

*Phycomycetes*

Virus*Adenoviruses*Herpes virus*Herpes simplex**Varicella* (Chicken pox)*Herpes zoster* (Shingles)

Virus B

Cytomegalovirus

Poxvirus

Variola (smallpox)

Vaccinia

Poxvirus bovis

Paravaccinia

*Molluscum contagiosum*Picornavirus

Poliovirus

Coxsackievirus

Echoviruses

Rhinoviruses

Myxovirus

Influenza (A, B, and C)

Parainfluenza (1-4)

Mumps virus

Newcastle disease virus

Measles virus

Rinderpest virus

Canine distemper virus

Respiratory syncytial virus

Rubella virus

Arbovirus

Öst häst encefalitvirus

Väst häst encefalitvirus

Sindbis virus

Chikungunya virus Semliki forest virus

Mayora virus

St Louis encefalivirus

California encephalitvirus

Colorado tick fever virus

Gula febern virus

Dengue virus

Reovirus

Reovirus typ 1-3

Retrovirus

Humant immunbristvirus (HIV)

Human T-cell lyfotropt virus I &amp; II (HTLV)

Hepatit

Hepatit A virus

Hepatit B virus

Hepatit nonA-nonB virus  
Hepatit, C, D, E

Tumörvirus

Rauscher leukemia virus  
Gross virus  
Maloney leukemia virus  
Humant papillomavirus

Fackmannen inom tekniken förstår att det allmänt erfordras att behandla prover, som antas innehålla en viss TNA, på sådant sätt så att man producerar fragment som lätt kan hybridisera med PNA. Det kan vara nödvändigt att behandla testprovet för att åstadkomma frigivning av eller för att extrahera TNA för hybridisering, såsom genom exponering av blod eller andra celler för en hypoton omgivning eller på annat sätt bryta sönder provet med användning av ett kraftigare medel. När TNA antages föreligga i dubbelsträngad form skulle det vara naturligt önskvärt att separera strängarna för att göra TNA hybridiserbar i enkelsträngad form med metoder som är välkända inom tekniken, inkluderande men inte begränsad till uppvärmning eller begränsad exponering för alkaliska betingelser, som kan neutraliseras efter tillsats av den enkelsträngade PNA för att medge att hybridisering äger rum. Förfaranden före framställning av RNA-mål är välkända (se Waterhouse 1993, Mitchell 1992).

Fragmentering av nukleinsyraprover innehållande TNAs erfordras vanligen för att minska provviskositeten och öka tillgängligheten av TNAs för PNAs. Sådan fragmentering åstadkoms med slumpmässiga eller specifika medel som är kända inom tekniken. Sålunda kan specifika nukleaser som är kända för att skära med en speciell frekvens i det speciella genom som analyseras, användas för att producera fragment med en känd medelmolekylstorlek. Dessutom är nukleaser, fosfodiesteraser, exonukleaser och endonukleaser, fysikalisk skjuvning och ljudbehandling, alla metoder som är användbara för detta ändamål. Dessa förfaranden är välkända inom tekniken. Användningen av restriktionsenzymer för DNA-fragmentering föredrages allmänt. DNA kan emellertid också fragmenteras med en mängd kemiska medel såsom användning av följande slag av reagens: EDTA-Fe(II) (enligt Stroebel et al [1988] *J. Am. Chem. Soc.* 110:7927; Dervan [1986] *Science* 232:464); Cu(II)-fenantrolin (enligt Chen and Sigman [1987] *Science* 237:1197); klass IIS restriktionsenzym

(enligt Kim et al. [1988] *Science* 240:504); hybrid DNase (enligt Corey et al. [1989] *Biochem.* 28:8277); bleomycin (enligt Umezawa et al. [1986] *J. Antibiot.* (Tokyo) ser. A, 19:200); neocaezinostatin (Goldberg et al. [1981] *Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research*, Academic Press, New York, s. 163) och metidiumpropyl-EDTA-Fe(II) (enligt Hertzberg et al. [1982] *J. Am. Chem. Soc.* 104:313). Borttagning av proteiner såsom genom behandling med ett proteas, är också i allmänhet önskvärt och metoder för att utföra proteinavlägsning från nukleinsyraprover utan nämnvärd förlust av nukleinsyra är också välkända inom tekniken.

TNA enligt föreliggande uppfinning skall vara tillräckligt långa så att det finns en tillräcklig mängd av dubbelsträngad hybrid, som flankerar TBR så att TBA kan binda ostört till de olegerade fragmentändarna. Typiskt användes fragment i intervallet från ca 10 nukleotider till ca 100 000 nukleotider, och företrädesvis i intervallet från ca 20 nukleotider till ca 1 000 nukleotider som medelstorlek för TNA-fragment. Exempel på specifika TNA-sekvenser som skulle kunna bestämmas är sekvenser som är komplementära till PNA-sekvenserna som beskrivits här för bestämning av normala cellulära, icke normala cellulära (såsom inaktiverade onkogener, integrerade främmande gener, genetiskt defekta gener) och patogen-specifika nukleinsyrasekvenser, för vilka specifika nukleinsyrabindande proteiner är kända, eller som kan produceras med metoder som beskrivs i denna beskrivning. Med referens till fig 7, visas en specifik HIV-relaterad TNA som SEKV ID NR 37.

4. Förlängningar av PNA med användning av BNAs, framställning därav och signalförstärkning. Under hybridiserande betingelser kan BNAs sättas till som hybridiserar till PNAs, PNA-BNA-hybrider, BNAs och/eller BNA-BNA-hybrider. De nämnda tillsatserna kan göras på ett icke-vektoriellt polymert sätt eller med ett vektor-sätt, med en känd ordning av BNAs.

Med referens till fig 2a presenteras en enkel booster. En booster-polymer framställs genom att sätta två BNAs, såsom illustreras i fig 2a(1b och 1c), som när de kombineras under hybridiserande betingelser med PNA, bildar PNA-BNA-BNA-hybrider,

som innehåller PNA och "booster"-förlängningarna, som illustreras i fig 2a(IIa, IIb, IIc och IId) och ger åtminstone en icke-parad 1/2 BBR-sekvens. Varje icke-parad 1/2 BBR-sekvens, som illustreras i fig 2a(IIa, IIb, IIc och IId) kan hybridisera med ytterligare BNAs för att bilda ytterligare "booster"-förlängningar. Varje oparad 1/2 BBR-sekvens illustreras i fig 2a(IIa, IIb, IIc och IId) och kan hybridisera med tillsatta HNAs, såsom visas i fig 2a (IIIa och IIIb). Hybridiseringen av HNAs, som inte kan hybridisera till ytterligare BNAs, verkar så att "locket läggs på" för ytterligare tillsats av BNAs till PNA såsom visas i fig 2a(IVa, IVb, IVc och IVd).

Med referens till fig 2b är det möjligt att kontrollera och specificera ordningen och komponenterna och förlängningarna av PBA. Om en enda BBR erfordras sättes en HNA som innehåller den komplementära sekvensen till 1/2 BBR i PNA till PNA för att producera en enda BBR och för att "sätta locket på" för eventuella "booster"-förlängningar av PNA. Om ytterligare BBRs skall sättas till PNA kan en kontrollerad förlängning av PNA åstadkommas.

Med referens till fig 2b återges en enkel booster. Vektorpolymerförlängning åstadkoms genom att tillsätta en BNA som är specifik för PNA, såsom visas i fig 2b(Ia och IIa), som när den kombineras under hybridiserande betingelser med PNA, bildar PNA-BNA-BNA-hybrider, som innehåller PNA och "booster"-svängningar. Dessa förlängningar ger om den märks med en OSA, ett förfarande för att på ett bra sätt förstärka vilken signal som helst som produceras efter bindning av en PNA till en TNA i provet. Genom att binda märkta BBAs till BBRs i polymeren åstadkoms dessutom ytterligare förstärkning.

Vilket antal förfaranden som helst kan användas för att framställa BNA inkluderande t ex syntes med känd kemi eller via rekombinanta DNA-produktionsmetoder. Vid den senare metoden kan ett väsentligen obegränsat antal BNAs produceras enkelt och billigt, t ex genom produktion i prokaryoter (t ex *E. coli*) av plasmid-DNA som har multipla upprepningar av de specifika BNAs sekvenser som flankeras av restriktionsställen som har utstående ändrar. På detta sätt kan t ex bakteriofag lambda



vänstra eller högra operatorställen eller vilken annan DNA eller annan nukleinsyra-sekvens som helst, känd för att specifikt och tätt binda en speciell BBA, såsom ett DNA- eller RNA-bindande protein, framställas med ett väsentligen obegränsat antal kopior, varvid varje kopia flankeras av en *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* eller vilket annat antal som helst av andra kända restriktionsnukleasställen. Alternativt kan en polymer med upprepade ställen skäras ut med unika restriktionsställen, som inte finns inom polymeren. Stora mängder pBR322, pUC-plasmid eller annan plasmid som har multipla kopior av dessa sekvenser produceras med metoder som är välkända inom tekniken, plasmiden skärs med restriktionsenzymet som flankerar det polymeriserade stället och de frigivna multipla kopiorna av operatorerna isoleras antingen med kromatografi eller vilken annan lämplig metod som helst, som är känd inom tekniken. BNA före användning, är den sträng som separeras och den kan sedan användas för polymerisering på en PNA som kodar för en enkelsträng som är komplementär kopia av operatorm som en 1/2 BBR. BNAs kan polymeriseras vektoriellt på PNA med användning av olika restriktionsenzymer för att flankera varje upprepning av polymeren i plasmiden för att framställa multipla kopior av BNA. Alternativt kan BNA-polymeren hybridiseras till PNA via utskjutande delar vid en eller båda ändarna av BNA-polymeren utan behov av att separera strängar och sätta ihop varje BNA-segment med vätebindning. Exempel på specifika BNA-sekvenser återges ovan i sektionen benämnd beskrivning av sekvenser, såsom SEKV ID NR 35-36. För att stabilisera BNA-polymeren, kan DNA-ligas användas för att kovalent binda till hybridiserade BNAs.

5. Hårnåls-nukleinsyror (HNAs) och framställning därav. HNAs, som beskrivs häri, innehåller minst två huvuddelar förenade tillsammans: En enkelsträngad sekvens, som är komplementär till en 1/2 BBR, och en dubbelsträngad nukleinsyra-region bildad under hybridiserande betingelser genom självsammansättning av självkomplementära sekvenser inom HNA. Med referens till fig 1(IIc) på ritningarna kan 1/2 BBR i HNA konstrueras så att den blir komplementär till 1/2 BBR-sekvensen i PNA. Med referens till fig 1(I, IIc och IIIc) på ritningarna, bildar nämnda HNA, när den sättes till PNA under hybridiserande betingelser, en PNA-HNA-hybrid, som innehåller en BBR. Med referens till fig 1(IIIc, IVc och Vc) på ritningarna, kan

PNA-HNA-hybriden under hybridiserande betingelser, efter tillsats av TNA, bilda en TNA-PNA-HNA-hybrid, som innehåller en TBR och en BBR.

Med referens till fig 2a och 2b kan HNAs användas för att "sätta lock på" eller avsluta tillsatsen av BNA-förlängningar till PNA. De två BNAs i fig 2a(Ib och Ic) kan förenas och bilda den hybrid som visas i fig 3(Ivb) eller kan direkt och individuellt hybridisera till PNA som visas i fig 2a(Ia-c, IIa-d). De två HNAs (visas i fig 2a(IIIa och IIIb)) kan bestämma hybridiseringen av BNA till andra BNAs, som sträcker sig från PNA, såsom visas i fig 2a(IVa-d). HNA i fig 2a(IIIa) kan avsluta PNA-BNA-hybriderna såsom visas i fig 2a(IIb och IId) och en PNA-BNA-hybrid med en enkelsträngad 1/2 BBR som är komplementär till 1/2 BBR i HNA som illustreras i fig 2a(IIIa). På samma sätt kan HNA i fig 2a(IIIb) avsluta PNA-BNA-hybriderna såsom visas i fig 2a(IIA och IIc) och vilken PNA-BNA-hybrid som helst med två enkelsträngade 1/2 BBRs, som är komplementära till 1/2 BBRs i HNA som illustreras i fig 2a(IIIb).

HNAs konstrueras som avslutade PNA-BNA-hybrider som konstrueras från sekventiell tillsats av BNA till PNA såsom illustreras i fig (2b). De enkelsträngade 1/2 BBR-sekvenserna som visas i fig 2b(Ia, IIIa, Va och VIIa) är specifikt komplementära till de enkelsträngade 1/2 BBR-sekvenserna som visas i fig 2b(Ib, IIIb, Vb och VIIb) och producerar de unika med block försedda (kappade) PNA-BNA-HNA-hybriderna som visas i fig 2b(Ic, IIIc, Vc och VIIc).

De självkomplementära sekvenserna i HNA och öglesekvenserna som binder de självkomplementära hårnålssekvenserna kan ha vilken sammansättning och längd som helst så länge de inte väsentligen hindrar eller inhiberar presentationen av den enkelsträngade 1/2 BBR som innehåller en del av HNAs i HNA eller selektivt binder BBA till TBA. Öglesekvenserna skall väljas så att bildningen av öglan inte förhindrar bildning av hårnålen. Som exempel på en HNA, som är användbar i denna tillämpning, tillhandahålles som SEKV ID NR 44 (se beskrivning av sekvenser ovan).

6. De målbindande sammansättningarna (TBAs) och deras framställning. En TBA kan vara vilken substans som helst som binder en speciell TBR, som bildas genom hybridisering av speciella TNAs och PNAs, förutsatt att TBA måste ha minst följande egenskaper:

- (a) TBA måste binda den TBR(s) på ett sätt som är mycket specifikt för den TBR(s) av intresse. Det vill säga TBA måste skilja mellan TBRs, som föreligger i TNA-PNA-hybriden och liknande duplexsekvenser som bildas av PNA-CNA-hybrider. TBA måste binda PNA-CNA-hybriden med en tillräckligt låg vidhäftning så att efter tvätt av TBA-TNA-PNA-komplexet, PNA-CNA-hybriden förskjuts och PNA-TNA-hybriden inte förskjuts;
- (b) TBA måste binda TBR(s), som alstras genom hybridisering av TNA med PNA, med vidhäftning. Bindningsaffiniteter i storleksordningen  $10^{-5}$  eller ca  $10^{-12}$  eller större anses allmänt vara tillräckliga. Såsom nämns nedan kan det i vissa fall vara önskvärt att använda en speciell TBA, som har en mycket låg vidhäftning för en speciell TBR, men som har en avsevärt ökad affinitet när en speciell konfiguration av multipla TBRs föreligger så att affiniteten höjs till 2 för TBA för varje TBR blir affiniteten av relevans för den speciella TBA.

Exempel på DNA-bindande komponenter som är användbara vid bildning av TBA inkluderar, men är inte begränsad till NF-kB, papillomavirus E2-protein, transkriptionsfaktor SP1, inaktiva restriktionsenzymer, antikroppar etc. Var och en av dessa proteiner har ansetts inom tekniken innehålla sekvenser som binder till speciella nukleinsyrasekvenser och affiniteterna för dessa interaktioner är kända. Naturligtvis är förfarandet enligt föreliggande uppfinning inte begränsat till användningen av dessa kända DNA-bindande proteiner eller fragment därav. Från föreliggande beskrivning är det tydligt för en fackman inom tekniken att föreliggande förfarande lätt skulle kunna tillämpas med användning av nya TBAs som har åtminstone de erforderliga attribut, som noterats ovan. Sålunda i t ex WO 92/20698, beskrevs en sekvensspecifik DNA-bindande molekyl, som innehåller ett oligonukleotidkonjugat, bildat genom den kovalenta vidhäftningen av ett DNA-bindande läkemedel till en triplexbildande oligonukleotid. Förfarandet i den beskrivningen skulle kunna använ-

das för att framställa nya TBAs för användning enligt föreliggande beskrivning förutsatt att de så bildade TBAs uppfyller de ovan nämnda kriterierna. Dessutom kan förfarandena enligt de amerikanska patenten 5 096 815, 5 198 346 och WO 88/06601 användas för att alstra nya TBAs för användning enligt förfarandet i denna uppfinning. Specifika utföringsformer eller delar därav kan användas (se t ex Blais 1994).

När TBA är ett protein, eller ett komplex av proteiner, inses det att vilket antal som helst av antal rutinmetoder inom tekniken kan användas för att framställa TBA. TBA kan isoleras från dess naturliga uppträdande omgivning i naturen eller, om detta är opraktiskt, framställas genom standardtekniker inom molekylärbiologi. Med användning av NF- $\kappa$ B som ett exempel, med användning av DNA-bindande delar av p50- eller p65-subenheter, skulle sålunda bindningsanalysen kunna produceras med rekombinanta metoder som är kända inom tekniken (se t ex Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029, som beskriver kloningen av p50 DNA-bindande subenheten i NF- $\kappa$ B och homologin för detta protein till *rel* och *dorsal*).

Många DNA-bindande och andra nukleinsyrabindande proteiner är kända som kan användas som eller i TBAs enligt denna uppfinning. När en gång aminosyrasekvensen i vilket protein som helst som binder DNA, RNA:DNA, RNA eller annan nukleinsyra är känd kan en lämplig DNA-sekvens som kodar för proteinet antingen framställas med syntetiska metoder, eller kan en cDNA-kopia av mRNA som kodar proteinet från en lämplig vävnadskälla användas. Vidare kan genomiska kopior som kodar för proteinet erhållas, och introner splitsas ut enligt metoder som är kända inom tekniken. Vidare kan TBAs syntetiseras kemiskt.

När en gång lämpliga kodande sekvenser har erhållits kan till stället riktad mutagenes användas för att förändra aminosyrasekvensen, som kodas för att framställa mutanta nukleinsyrabindande proteiner, som har mer önskvärda bindningsegenskaper än dem hos det ursprungliga nukleinsyrabindande proteinet. Som ett exempel på denna metod kan aminosyrasekvensen hos de DNA-bindande delarna i NF- $\kappa$ B för-

ändras att producera en NF- $\kappa$ B'-molekyl, som binder mer tätt till NF- $\kappa$ B-bindande stället (se exempel nedan – HIV-bestämning och HIV-lock).

För att tillhandahålla ytterligare insikt i denna aspekt av uppfinningen noteras följande beaktanden. Med användning av NF- $\kappa$ B som ett exempel kan en TBA framställas med användning av den naturligt förekommande NF- $\kappa$ B-molekylen. På grund av att denna molekyl emellertid föreligger i försvinnande små mängder i celler, och eftersom subenheterna i detta DNA-bindande protein har klonats, skulle det vara mera rimligt att framställa stora mängder av komplexet via rekombinanta DNA-metoder såsom redan har åstadkommit för detta protein (se t ex Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029). NF- $\kappa$ B är en pleiotrop inducerare av gener, som är involverad i immunsvaret, inflammatoriska svar och tillväxtreglerande svar på primära patogena utmaningar (virus, bakterie eller stress) eller sekundära patogena utmaningar (inflammatorisk cytokin). NF- $\kappa$ B är ett dimert DNA-bindande protein, som innehåller en p50- och en p65-subenhet, som båda kontaktar och binder specifikt till DNA-sekvenser. I ett inaktiverat tillstånd förekommer NF- $\kappa$ B i den cellulära cytoplasman, komplexbundet med en specifik inhibitor, I- $\kappa$ B, för att bilda en cytoplasmatisk heterotrimer. Vid aktivering befrias inhibitorn från komplexet, och p50-p65-dimeren omlokaliseras vid en specifik nukleär lokaliseringssignal (NLS) till cellkärnan, där den kan binda DNA och utöva sin roll som en transkriptorisk aktivator för flera gener (se Grimm and Baeuerle [1993] *Biochem. J.* 290:297-1308, för en översikt av teknikens ståndpunkt avseende NF- $\kappa$ B).

p50-p65-dimeren binder med pikomolär affinitet till sekvenser som matchar konsensussekvensen GGGAMTNYCC (SEKV ID NR 117), med något annorlunda affiniteter beroende på den exakta sekvensen. Det är värt att notera att homodimerer av p50 och p65 också har observerats uppträda. Dessa homodimerer visar olika biokemiska egenskaper samt något olika affiniteter för bindande sekvenser inom och liknande ovan konsensussekvens. Beroende på de önskade bindningsegenskaperna hos TBA kan en p50-p65-heterodimer, en p50-p50-homodimer eller en p65-p65-homodimer eller fragment av de nämnda dimererna sålunda användas.

Ett sätt på vilka olika nya TBAs kan framställas återges schematiskt i fig 9. De igenkännande enheterna för nukleinsyra i TBA kan sammanställas och kombineras med lika eller olika igenkännande enheter för TBA-nukleinsyra via ett "skydd". Skyddet är en struktur på vilken de olika TBA-igenkännande elementen är byggda och som ger önskade egenskaper till de nukleinsyraigenkännande enheterna. Skyddet är sammansatt av vilken sekvens som helst som tillhandahåller ihopsättande sekvenser så att samma eller olika nukleinsyraigenkännande enheter bringas i nära och stabil association med varandra. För att sålunda t ex vid fall av en TBA avsedd att binda tätt till NF-kB TBRs sätts en TBA ihop genom att tillhandahålla lambda *cro*-sekvenser som hopsättningssekvenser bundna till nukleinsyrabindande sekvenser för antingen NF-kB p50 eller p65. De sekvenser som binder till p50 eller p65 nukleinsyra binds till *cro*-sekvenserna antingen vid karboxi- eller aminoterminalen på *cro* och antingen karboxi- eller aminoterminalen på den nukleinsyra igenkännande enheter på p50 eller p65. Länksekvenser tillhandahålles eventuellt för att tillåta lämpligt avstånd hos de nukleinsyraigenkännande enheterna för optimal TBR-bindning.

Hopsättningssekvenserna exemplifierade ovan med *cro*- och CI-sekvenser (SEKV ID NR 104-108), innehåller vilka stabila oligopeptider som helst, som naturligt och starkt binder till lika sekvenser. Sålunda, vid fall av *cro*, är det välkänt att en dimer av *cro* binder till bakteriofag lambda-operatorställen (Anderson et al. [1981] *Nature* 290:754-758; Harrison and Aggarwal [1990] *Ann. Rev. Biochem.* 595:933-969). De monomera enheterna i *cro* associerar tätt och specifikt med varandra. Genom att sålunda binda DNA-igenkännande enhetssekvenser till *cro*-sekvenserna åstadkoms nära och tät associering.

De eventuella länksekvenserna innehåller vilken aminosyrasekvens som helst som inte interfererar med TBA-hopsättningen eller nukleinsyrabindningen och som inte är labil så att den nukleinsyraigenkännande enheten frigges från den kompletta TBA. Det är önskvärt, men inte erforderligt, att länksekvenserna är kovalent bundna till andra bindande hopsättningskomponenter. Associationen skall vara specifik för att underlätta vid hopsättningen och framställningen av de bindande hopsättningarna. Exempel på sådana sekvenser inkluderar, men begränsas inte till, välkända sekven-

ser som visar sig binda olika domäner i strukturproteiner. I t ex lambda repressorproteinet finns sålunda en länksekvens mellan den DNA-bindande domänen och dimeriseringsdomänen, som är användbar för detta ändamål. Många andra sådana sekvenser är kända och den exakta sekvensen därav är inte kritisk för denna uppfinning förutsatt att rutinexperimentering utföres för att säkerställa stabilitet och icke-interferens med bindning till målnukleinsyra. Exempel på sådana sekvenser tillhandahålls häri som Met Ser och SEKV ID NR 99-102. Insättning av kända specifika proteolysställen i dessa länkar är också en integral del av denna uppfinning. Närvaron av sådana ställen i länksekvenserna skulle medföra fördelar vid framställningen, eftersom de tillåter att olika molekyler sätts ihop på skyddsställningen.

Förutom nukleinsyraigenkännande enheter, eventuella länksekvenser och hopsättande sekvenser har de nya TBAs enligt uppfinningen eventuellt asymmetri eller PILOT TNA-sekvenser och en eller flera OSA-enheter. Asymmetrisekvenserna tillhandahålles för att gynna eller förhindra vissa önskade eller oönskade associationer. Vid fall när en TBA som har homodimer p50 DNA-igenkännande enheter är önskvärd, tillhandahålls t ex asymmetrisekvenser för att bryta den naturliga starkare associationen av NF-kB p50 subenheter och p65 subenheter, eftersom ihopsättningssekvenserna inte bryts genom att bringa samman p50 subenheter. Exempel på sådana sekvenser tillhandahålls häri som SEKV ID NR 85-92 och SEKV ID NR 105 och 106.

I en annan konfiguration bringas NF-kB p50 subenhetssekvensen i tät association med transkriptionsfaktor SP1 DNA igenkänningsenhetssekvenser. Det är önskvärt att om ett NF-kB/SP1-bindande motiv är av betydelse såsom i HIV LTR där ett motiv med minst sex DNA-bindande proteinigenkänningsställen, två NF-kB, tre SP1 och ett TATA-ställe är känt för att föreligga. Eftersom det också är känt att det andra NF-kB och första SP1-stället är betydelsefulla för reglering av HIV-transkription (Perkins et al. [1994] *Embo J.* 12:3551-3558), är denna speciella konfiguration av TBA användbar inte enbart vid analys av HIV utan som ett behandlande eller profylaktiskt agens mot HIV-infektion (se nedan). På samma sätt kan den långa kontroll-

regionen (LCR) i humant papillomavirus användas som en nyckelkontrollregion för probning enligt denna metod.

Med hänsyn till de olika element som kan associeras, kassett-typ enligt denna metod av TBA-bildning, produceras en väsentligen obegränsad variation av TBAs. I fig 10 exemplifieras en serie av olika molekyler refererade till som "HIV-bestämning I-IV" där "CHAP" betecknar skyddet, "nfb" betecknar NF-kB-subenheter, "sp1" betecknar nukleinsyraigenkännande enhet hos SP1 transkriptionsfaktorn, och "TATA" betecknar en dimer av DNA-igenkännande enheten i ett TATA-sekvens-DNA-bindande protein (TBP), även känt som ett TATA-bindande protein eller TBP. Dessa konfigurationer exemplifieras ytterligare nedan och är alla integrala delar av föreliggande uppfinning.

I ytterligare en annan konfiguration anpassas den modulära strukturen som visas i fig 9 till bestämning och eller behandling av profylax av en helt annan patogen. I fig 11 produceras en serie av "HIV-bestämning I-IV"-molekyler på ett liknande sätt som beskrivit ovan "HPV-bestämning I-IV". I denna utföringsform drar man fördel av de DNA-bindande egenskaperna hos E2-proteinet med humant papillomavirus (HPV). Dessutom drar man fördel av rollerna hos SP1 och TBP genom att tillhandahålla specifika DNA-igenkännande anpassade till att binda till dessa sekvenser i HPV-genomet. Vid bildningen av de E2-specifika TBAs för användning vid bestämning av HPV-infektion kan det vara önskvärt att använda några av SEKV ID NR 75-84 eller 93-98 som de E2 DNA-igenkännande enheterna. En TBA som innehåller en bovin E2-dimer och en human E2-dimer DNA-bindande domän kan vara speciellt användbar.

De olika sekvenserna som beskrivits ovan kan antingen vara kemiskt länkade med användning av rena oligopeptidutgångsmaterial eller kan de vara länkade genom förekomst av rekombinanta nukleinsyror som, via den välkända genetiska koden, kodar för de olika subelementen. Vid fall av rekombinant produktion, är det fördelaktigt att binda *cro*-kodande sekvenser till sekvenser med nukleinsyraigenkännande enheter för framställning av TBA eftersom *cro* inte endast verkar som ihopsättande



sekvenser i skyddet, det verkar också för att styra den rätta vikningen av de nukleinsyraigenkännande elementen. Exempel på sekvenser för skydd tillhandahålles häri som SEKV ID NR 104-108. Vidare, om man önskar strukturer med högre ordning som innehåller multipla bindningsställen såsom i en pentamer NF-kB/NF-kB/-SP1/SP1/SP1 TBA tillåter rätt design av asymmetrisekvenserna att man tillverka sådana strukturer.

På de föregående sättet framställs TBAs som binder till sina besläktade bindningsställen med hög affinitet. Till exempel förväntas de NF-kB DNA-bindande komponenterna i TBAs i fig 10 att binda till HIV LTR med hög affinitet på mellan ca  $10^{-8}$  och  $10^{-12}$  molar. Sekvenser som är användbara som DNA-igenkännande enheter tillhandahålls som SEKV ID NR 63-71, 73-84, 93-98 och 104-108 och exemplifieras ytterligare nedan.

Med hänsyn till föregående beskrivning av riktad ihopsättning av nukleinsyrabindande proteiner med användning av ihopsättnings- och asymmetri- (eller pilot-) sekvenser kommer fackmännen inom tekniken att inse att en allmänt tillämpbar metod för ihopsättning av proteinstrukturer tillhandahålls med denna uppfinning. Den allmänna giltigheten hos denna metod demonstreras vidare genom att man som ytterligare exempel betraktar användningen av en antikropp-epitopinteraktion vid ihopsättningen av önskade strukturer. Baserat på specificiteten kan en DNA-bindande proteinstruktur sättas ihop genom att länka en NF-kB p50 subenhet till ett antigen, såsom ett cirkulariserat (genom disulfidbindningar) melanocytstimulerande hormon (MSH). Denna pro-MSH-molekyl kan sedan bindas med en anti-MSH-antikropp för att tillhandahålla en ny nukleinsyrabindande hopsättning där antigenet och antikroppen verkar som ihopsättande sekvenser.

Den modulära struktur som erhålls med fig 9 avslöjar att en stor variation av TBAs kan sättas ihop med användning av olika kombinationer av komponenter. Sålunda tillhandahålls representativa utföringsformer av denna allmänna struktur som SEKV ID NR 109-116.

7. De boosterbindande ihopsättningarna (BBAs) och deras framställning. En BBA kan vara vilken substans som helst som binder en speciell BBR bildad genom hybridisering av speciella PNAs och BNAs, inkluderande när multipla BNAs (upp till och inkluderande "n" BNAs, dvs  $BNA_n$ , där "n" är teoretiskt  $0 \sim \infty$ , men praktiskt ligger mellan 1 och 100) polymeriseras på PNA för signalförstärkning, förutsatt att BBA måste ha åtminstone följande egenskaper:

- (a) BBA måste binda BBRs på ett sätt som är mycket specifikt för BBR av intresse. Det vill säga BBA måste skilja mellan BBRs som finns i PNA-BNA-hybriden och liknande duplexsekvenser i BNA-CNA-hybrider eller andra CNAS. Sålunda där till och med en enda bas-mismatchning eller konformatoriska skillnader med eller utan bas-mismatchningar uppträder vid produktionen av PNA- $BNA_n$  eller PNA- $BNA_n$ -HNA-hybrid, måste BBA binda hybriderna med en tillräckligt låg styrka så att vid tvätt av TBA-TNA-PNA- $BNA_n$ -komplexet BBA förskjuts från CNA-sekvenserna men inte BBR-sekvenserna.
- (b) BBA måste kraftigt binda BBR(s). Bindningsaffiniteter i intervallet  $10^{-5}$  till ca  $10^{-9}$  eller högre betraktas i allmänhet som tillräckliga.

Exempel på BBAs inkluderar, men är inte begränsat till *cro*, och bakteriofag lambda repressorproteinet CI. Se dessutom US patent nr 4 556 643, som föreslår andra DNA-sekvenser och specifika bindande proteiner såsom repressorer, histoner, DNA-modifierande enzymer och katabolitgenaktiverande protein. Se också EP 0 453 301 häri, som föreslår en mängd proteiner som specifikt binder (NSBPs) såsom tetracyclinrepressorn, lac-repressorn och tryptofanrepressorn. Var och en av BBAs har känts igen inom tekniken och binder kända speciella nukleinsyrasekvenser, och affiniteterna hos dessa interaktioner är kända. Naturligtvis är förfarandet enligt föreliggande uppfinning inte begränsat till användningen av dessa kända BBAs. Från denna beskrivning kan en fackman lätt tillämpa användningen av nya BBAs som har åtminstone de erforderliga egenskaperna, som nämnts ovan, vid föreliggande förfarande.

Exempel på nya BBAs som är användbara enligt denna utföringsform av uppfinningen inkluderar nya proteiner baserade på motivet av ett känt DNA eller RNA eller DNA:RNA-bindande protein såsom *cro* eller  $\lambda$  CI repressorproteinet. Förträdesvis görs sådana modifieringar för att förbättra hanteringen av dessa komponenter enligt uppfinningen. Sålunda kan det vara önskvärt att sätta till en hög koncentration av *cro* till en analys. En av de negativa kvaliteterna hos *cro* är att vid höga koncentrationer går bindningen av *cro* till dess DNA-mål in i tävling med *cro-cro*-interaktioner. Sålunda kan t ex en skyddad eller muterad *cro* framställas, som inte har denna olägenhet. Exempel på sådana förändrade skyddade grupper är SEKV ID NR 105-106 och 108. Förfaranden kända inom tekniken såsom framställning av nya målbindande proteiner med användning av mångskiftande populationer av nukleinsyror och val av bakteriofagbindning till speciella, förutvalda mål (dvs så kallade fag-display-teknologi, se diskussionen ovan för framställning av nya TBAs) kan användas för att producera sådana nya BBAs samt de tidigare nämnda nya TBAs.

När BBA är ett protein eller ett komplex av proteiner inses att vilka som helst av ett antal rutinmetoder inom tekniken kan användas för att producera BBA. BBA kan isoleras från dess naturligt förekommande omgivning i naturen, eller om detta är opraktiskt, framställas med standardtekniker för molekylärbiologi. Sålunda, t ex, är sekvensen för *cro*-proteinet känd, och vilken molekylärklon som helst av bakteriofag lambda kan användas för att erhålla lämpliga nukleinsyror som kodar *cro* för rekombinant produktion därav. Dessutom kan de beskrivna TBAs användas som BBAs förutsatt att olika TBAs användes för att binda TBRs och BBRs.

8. Användningen av BBAs och BBRs för att lokalisera och förstärka lokaliseringen av PNA-TNA-TBA-komplex (se fig 8). I en av utföringsformerna enligt uppfinningen användes en mycket specifika och extremt täta bindningen av TBAs som finns i nukleinsyrabindande komponenter för att producera en förstärkningsbar nukleinsyra sandwich-analys. Enligt en aspekt av denna utföringsform beläggs en bärare med en första TBA, vilket alstrar en immobiliserad TBA. I lösning bringas en PNA och TNA i kontakt under hybridiserande betingelser och bringas sedan i kontakt med den olösliggjorda TBA. Endast sådana PNA-TNA-interaktioner som bildar spe-

specifika TBR, som känns igen av den immobiliserade TBA, hålls kvar efter uttvättning av den fasta ytan, som binder TBA-TBR-komplexet.

Upptäck av den bundna TBR åstadkoms genom bindning av booster-nukleinsyror, BNAs till 1/2 BBRs som finns på PNAs under hybridiserande bringelser. På detta sätt, även om endast en enda TBA-TBR-komplex binds till den immobiliserade TBA, kan en stor, förstärkt signal produceras genom att polymerisera multipla BNAs till den immobiliserade TNA. Varje BNA som binder till TNA bildar en BBR, som kan bindas med BBAs, som precis som TBAs immobiliserade på den fasta ytan, kan väljas med avseende på deras mycket täta och specifika bindning till vissa nukleinsyrastrukturer. Sålunda, enligt denna utföringsform, kan den immobiliserade TBA innehållande den DNA-bindande delen av NF- $\kappa$ B, som mycket specifikt och tätt binder till NF- $\kappa$ B-bindande ställen, som bildas efter hybridisering av TNA och PNA för att bilda ett sådant ställe.

Eftersom det är välkänt att det finns NF- $\kappa$ B-bindande ställen både i det normala humana genomet och i de långa terminala upprepningarna i humant immunbristvirus (HIV), tillhandahåller denna uppfinning ett förfarande för att skilja mellan de "normala" humana ställena och de ställen som föreligger i celler på grund av HIV-infektion. Därför, i ett test avsett att bestämma närvaron eller frånvaron av HIV DNA i ett prov av humant DNA kan HIV-NF- $\kappa$ B-bindande ställen ses som TNAs, och de normala humana NF- $\kappa$ B-bindande ställena kan ses som CNAs. Enligt metoden enligt denna uppfinning åstadkoms särskiljning mellan dessa TNAs och CNAs genom att man drar fördelen av det faktum att i HIV LTR finns två NF- $\kappa$ B-bindande ställen, följt av tre SPI-ställen (se t ex Koken et al. [1992] *Virology* 191:968-972), under det att cellulära NF- $\kappa$ B-bindande ställen med samma sekvenser inte återfinns i tandem.

I fall där TNA innehåller mer än en 1/2 TBR och det är önskvärt att genomföra terapeutiska och profylaktiska användningar av TBAs, kan det vara önskvärt att använda mer än en TBA, var och en med förmågan att använda en TBR i TNA-PNA-komplexet. I detta fall kan det vara fördelaktigt att välja, som komponenter för

TBAs, DNA-bindande eller RNA-bindande domäner med lägre affinitet för dess TBR än den DNA-bindande eller RNA-bindande domänen i vildtypen. Givet att det är TBAs som är involverad i bindningen till den multipla TBRs, antingen kan sättas samman före bindningen till deras TBRs eller sättas samman efter bindningen till deras TBRs, kommer de individuella TBAs inte att blockera motsvarande TBRs i den andra genomen än målgenomen såvida inte TBRs är rymdmässigt kapabla att binda de ihopsatta TBA-komplexet. Ett särdrag hos den multimer ihopsättningen av TBAs, som specifikt patentsöks här som del av denna uppfinning, är att en sådan multimer ihopsättning förväntas ha en mycket reducerad affinitet för ett enda ställe i TNA. Eftersom emellertid bindningen dramatiskt ökas relativt vilken som helst TBA, skulle TBA-komplexet förväntas inte tävla om bindningen till vilken som helst enskild TBR med motsvarande naturliga proteiner *in situ* utan binda tätt till sekvenser i PNA-TNA-hybriden, som innehåller TBR för var och en av de nukleinsyrabindande komponenterna som är hopsatta i TBA. TBA-komplexet skall vara ihopsatt och länkar justerade i den individuella TBAs för att tillåta att de nukleinsyrabindande regionerna som finns i TBA-komplexet samtidigt når och binder dessa mål.

När en gång TNA-PNA-hybrider har bildats och satts i kontakt med den immobiliserade TBA, tvättas icke bunden nukleinsyra från den immobiliserade ytan, och de immobiliserade hybriderna upptäcks. Detta åstadkoms på vilket som helst av flera sätt. Enligt en aspekt av uppfinningen märks PNA med ett OSA, såsom en radionukleoid, färgade pärlor, eller ett enzym som kan bilda en färgad reaktionsprodukt. Förutom att ha en eller flera 1/2 TBRs kan dessutom PNA även innehålla minst en 1/2 BBR. 1/2 BBR-sekvenserna väljs så att de är komplementära till unika 1/2 BBR-sekvenser i BNAs. I utföringsformen som beskrivs ovan t ex där TBA är NF-kB och TBR, som bildas efter TNA-PNA-hybridisering, är en eller flera NF-kB-bindande ställen, kan 1/2 BBRs åstadkomma hybridiserbara (dvs enkelsträngade, komplementära) sekvenser av de vänstra eller högra bakteriofag lambda-operatorerna (se t ex Ptashne [1982] *Scientific American* 247:128-140, och referenser nämnda häri för sekvenser för dessa operatörer). Dessa kan polymeriseras på PNA 1/2 BBRs på ett vektorsätt (se fig 2 och 3) som tillhandahåller upp till "n" BBRs, och varje BBR

bildar ett *cro*-bindande ställe. Enzymatiskt, radioaktivt, eller på annat sätt märkt *cro* bringas i kontakt med TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>-komplex. På detta sätt produceras en mycket selektiv och förstärkt signal. Signal som produceras med användning av en PNA som har en enkel 1/2 TBR indikerar framgång i analysen när det gäller att uppnå TBA-TBR-bindning och polymerisation av BNAs för att producera signal från cellulära ställen (t ex från CNAs). Frånvaro av signal när en dimeriserad TBA används indikerar att i TNA fanns inga HIV LTRs eftersom inga dubbla NF-kB-bindande ställen förelåg. Å andra sidan indikerar närvaron av signal med användning av dimeren NF-kB HIV-infektion. Som ett specifikt exempel på den föregående beskrivningen av denna utföringsform enligt uppfinningen, se exempel 6 som beskriver ett HIV-testkit.

Naturligtvis kommer fackmännen inom tekniken att inse att den föregående beskrivningen utsätts för flera modifieringar vid valet av PNAs, TNAs, TBAs, BNAs, och BBAs. Vidare när det gäller andra system än HIV, kommer fackmännen att förstå att den allmänna metoden som beskrivits ovan också kan tillämpas. Dessa andra tillämpningar kan emellertid vara enklare än den ovan beskrivna metoden eftersom TBA som användes kanske inte känner igen några normala cellulära ställen, och att därför utnyttjandet av dimerisering eller andra förfaranden för att särskilja mellan TNAs och CNAs kan vara mindre kritiskt. När man designar prober och bindande hopsättningar för dessa andra system får fackmannen vägledning av följande principer och beaktanden.

I den ovan beskrivna utföringsformen är attraktionen att använda de DNA-bindande delarna av NF-kB-proteiner som TBA och NF-kB-igenkännande bindande element som TBRs att dessa element bildar en viktig "kontrollpunkt" för replikeringen av HIV. Det vill säga, det är känt att HIV måste använda NF-kB som ett kritiskt särdrag i sin upprepade livscykel. Liknande kontrollpunkter för andra patogener väljs och används som bas för bestämning enligt de förfaranden som beskrivs häri.

Av den föregående beskrivningen av allmänna särdrag i denna uppfinning och förfarandet för dess hantering kommer fackmännen att inse att det finns en mängd

specifika sätt att utöva denna uppfinning. Som exempel är förfarandet enligt denna uppfinning anpassningsbart till en metod och anordningar som användes för kromatografisk testutrustning som beskrives i de amerikanska patenten 4 690 691 och 5 310 650 ('691 och '650 patenten). I dessa patent användes ett poröst medel för immobilisera antingen en TNA eller en infångande prob, och ett lösningsmedel användes för att föra en rörlig fas, som innehåller antingen en märkt PNA, om TNA var immobiliserad eller TNA om den infångande proben var immobiliserad, in i "infångningszonen". När en gång TNA bundits i infångningszonen, antingen genom direkt immobilisering därav eller genom infångning, kromatograferades en märkt TNA genom infångningszonen och eventuellt bunden markör bestämdes.

Anpassning av föreliggande uppfinning till sådant system tillhandahåller förbättringen genom att använda en målbindande ihopsättning i infångningszonen och därför infångning av endast perfekt matchade TBR-sekvenser eller andra TBRs, som representerar nukleinsyrakonformationer specifikt bundna av TBA i TNA-PNA-duplexen med hjälp av den tidigare beskrivna känsliga särskiljningen av TBA mellan TNAs och CNAs.

När en gång TNA-PNA-hybriderna blivit bundna till den immobiliserade TBA förstärks signalen genom att sätta till BNAs eller kromatografering av BBAs genom infångningszonen. Slutligen kan signalen ytterligare förstärkas genom tillsättning av BBAs eller kromatografering av märkt BBAs genom infångningszonen. På detta förbättras enkelheten vid genomföringen av analysstegen som beskrives i '691 och '650 patenten genom att tillhandahålla den ytterligare möjligheten av öka specificiteten och genom förstärkning av sensitiviteten hos den metod som beskrivs i dessa patent.

Fackmännen inom tekniken kommer att inse att förfarandet enligt föreliggande uppfinning kan hanteras och utföras i mikrotiterplattor eller automatiseras. Användningen av maskiner som omfattar förfarandet enligt uppfinningen faller därför naturligt inom ramen för föreliggande beskrivning och de bifogade kraven. Föreliggande uppfinning är t ex anpassningsbar för användning i sådana instrument som Abbot

Laboratories' (Abbot Park, IL) IMx tabletop analyzer. IMx är för närvarande utformad att köra både fluorescent polarisationsimmunoanalys (FPZA, se Kier [1983] *KCLA* 3:1315) och mikropartikelenzymimmunoanalys (MEZA, se *Laboratory Medicine*, vol. 20, nr 1, januari 1989, s. 47-49). MEZA-metoden kan lätt omvandlas till en metod för nukleinsyrabestämning med användning av föreliggande uppfinning med användning av en TBA som infångningsmolekyl belagd på en submikron (< 0,5  $\mu\text{m}$  i medeltal) utformad mikropartikel suspenderad i lösning. Mikropartiklarna överdragna med TBA pipetteras i en reaktionsbrunn. IMx pipetterar sedan prov (hybridiserade PNA-TNA) i reaktionscellen, vilket bildar ett komplex med TBA. Efter en lämplig inkuberingsperiod överföres lösningen till en inert glasfibrermatrix till vilken partiklarna har en stark affinitet och till vilken mikropartiklarna adderar. Antingen före eller efter filtrering av reaktionsblandningen genom glasfibrermatrixen tillsättes BNAs och BBAs eller annan signalförstärkning, och analysmedel användes som beror på specifik bildning av TNA-PNA-hydrider. Det immobiliserade komplexet tvättas och det icke-bundna materialet flödar genom glasfibrermatrixen.

De bundna komplexen upptäcks med alkalisk fosfatasmärkta BBAs eller BBAs märkta på annat sätt (radioaktivt, enzymatiskt, fluorescent). Vid fall av alkaliskt fosfatasmärkta BBAs kan det fluorescenta substratet 4-metyl-umbelliferylfosfat eller liknande reagens tillsättas. Alternativt kan enzymet hoppas över genom direkt märkning av BBAs med detta eller ett liknande reagens. I vilket fall som helst är fluorescens eller annan signal proportionell mot mängden PNA-TNA-hydrider som föreligger.

Fluorescensen bestäms på ytan av matrixen med en frontytefluorometer såsom beskrives av tillverkaren av IMx. Med mindre justeringar som kan göras genom rutinexperimentering för att optimera ett instrument såsom IMx med avseende på nukleinsyrahybridisering och nukleinsyra-TBA-interaktioner, kan föreliggande uppfinning fullständigt anpassas till automatiserade analyser av TNA-prover.

9. Andra diagnostiska tillämpningar av denna uppfinning. Även om föregående beskrivning möjliggör användning av föreliggande uppfinning i ett antal olika för-



faringsätt kan många ytterligare användningar av denna uppfinning lätt inses, t ex i ett system för fördröjning av rörlighet.

I denna utföringsform av uppfinningen genomförs en förbättring av den välkända elektroforetiska rörlighetsskiftningsanalysen (EMSA) på följande sätt (se fig 12a och 12b).

Ett prov av DNA fragmenteras antingen genom slumpmässig klyvning eller genom behandling av specifikt restriktionsendonukleas. DNA i provet uppdelas sedan i två lika provvolymmer och ett specifikt TNA sättes till det första provet men inte till det andra. Det första och andra provet elektroforesbehandlas sedan i en akrylamin eller agarosgel, och mönstret på DNA-banden (antingen visualiserade genom etidiumbromidbindning eller genom att de blivit märkta radioaktivt före elektroforesen) jämförs sedan för de två proverna. Fragment av DNA som har bindande ställen till vilka TBA är specifikt hålls kvar i sin rörlighet genom elektroforesmediumet. Genom användning av en lämplig TBA kan vilket antal som helst av DNA eller andra nukleinsyrasekvenser fångas in på detta sätt.

I en modifiering av EMSA beskriven ovan, hybridiseras fragmenterad TNA med PNA och fraktioneras i en första dimension. Den fraktionerade DNA omsättes sedan med en lämplig TBA och förändringen i rörligheten hos DNA-fragmentet noteras. Förstärkning av fördröjningen är möjlig genom att sätta till BBAs såsom beskrivs ovan. (se t ex Vijg och referenser citerade häri för kända tekniker av två (2) dimensionella nukleinsyraelektroforeser som föreliggande uppfinning kan tillämpas på.

Följande exempel tillhandahålls för ytterligare vägledning för fackmännen inom tekniken avseende förfaranden för utövning av uppfinningen. Standardmässiga rekombinanta DNA-tekniker beskrives i Sambrook, Fritsch och Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, och senare texter nämns inte eftersom de är välkända för fackmännen inom tekniken.

### Exempel 1 – Framställning av PNAs och märkning av PNAs

Probnukleinsyror, PNAs, kan framställas med metoder som är välkända inom tekniken. Sålunda kan enkelsträngade polynukleotid-PNAs definierad sekvens framställas via fastfaskemisk syntes enligt Merrifield. PNAs kan framställas genom automatiserad syntes med användning av kommersiellt tillgänglig teknologi, såsom hartser och maskiner framställda eller saluförda av Applied Biosystems, ABI, eller andra tillverkare. Alternativt, genom kända rekombinanta DNA-metoder, syntetiseras speciella PNA-sekvenser *in vivo*, t ex genom kloning av en duplex PNA i en vektor, som kan replikera i *E. coli*, kan stora mängder av duplex DNA framställas. Multimerer av PNA kan klonas i vektorn så att för varje mol vektor flera moler PNA frigges vid uppslutning av vektorn med ett restriktionsfragment, som flankerar DNA-sekvensen. Efter syntes eller rekombinant produktion renas PNAs med metoder som är välkända inom tekniken såsom gelelektrofores eller vätskekromatografi under högt tryck (HPLC). Om PNA produceras som duplex separeras strängarna i PNA genom uppvärmning eller med andra metoder som är kända inom tekniken före användning i en hybridiseringsanalys för bestämning av målnukleinsyrasekvenser.

Den specifika sekvensen för baserna i PNA väljs för att återspegla den sekvens som skall bestämmas i TNA med det förbehållet att enligt föreliggande uppfinning PNA innehåller en 1/2 TBR-sekvens, som är en som efter hybridisering av PNA och TNA, bildas en TBR. Eftersom det finns ett väsentligen obegränsat antal av sådana sekvenser kända inom tekniken kan valet av PNA-sekvens väljas av fackmännen inom tekniken för en given tillämpning. Sekvensen av HIV LTR är en sådan sekvens, som efter hybridisering av en PNA som kodar för portioner av LTR med TNAs som kodar för HIV LTR, ger TBRs som kan binda NF-kB eller SP1 DNA-bindande proteiner.

Förutom sekvenser som bildar en TBR efter hybridisering kan PNA också innehålla en 1/2 BBR. Denna sekvens är en, som efter hybridisering med en boosternukleinsyra, BNA, bildar en BBR som kan binda en BBA. BBA är företrädesvis ett DNA-bindande protein som har hög affinitet för BBR-sekvensen.

I detta speciella exempel sker hybridisering mellan en PNA som har som en 1/2 TBR, SEKV ID NR 4 och, vid 3'-ändan av denna sekvens en 1/2 BBR-sekvens visad som SEKV ID NR 35. PNA som kodar dessa sekvenser användes antingen utan märkning eller är märkt med en radioaktiv isotop såsom  $P^{32}$ ,  $S^{35}$ , eller en liknande isotop, enligt metoder som är välkända inom tekniken. Alternativt binds PNA till en pärla på mellan 0,01 till 10  $\mu\text{m}$ , som kan vara färgad för enkel visuell bestämning. Denna markör bildar OSA, som beskrivits i beskrivningen. Denna prob hybridiserar med HIV LTR-sekvenser för att bilda en TBR som binder NF-kB. Dessutom hybridiserar PNA med BNAs som har en komplementär 1/2 BBR för att bilda en bakteriofag lambda vänster operator som binder antingen *cro* eller lambda repressorproteiner.

På ett liknande sätt som beskrivits ovan användes PNAs där 1/2 TBR är en av SEKV ID NR 5 eller SEKV ID NR 7-34, och en 1/2 BBR såsom SEKV ID NR 35 eller SEKV ID NR 36 antingen vid 3'-ändan eller 5'-ändan av 1/2 TBR.

### Exempel 2 – Framställning och märkning av BNAs

På liknande sätt som metoderna som beskrivs i exempel 1 för framställning och märkning av PNAs framställs BNAs och märks enligt metoder kända inom tekniken. Såsom beskrives i US patent nr 4 556 643 inkorporerad häri med referens (se i synnerhet exempel 1), kan nukleinsyrasekvenser som kodar speciella nukleinsyra-bindande sekvenser massproduceras genom kloning i en replikerbar vektor. Vidare, liknande den beskrivningen, kan 1/2 TBR- och 1/2 BBR-sekvenser samlinjärt produceras på detta sätt, emellertid med den skillnaden, att enligt föreliggande uppfinning 1/2 TBR-sekvensen själv bildar ett igenkänningsställe för en nukleinsyrabindande komponent och 1/2 BBR, samtidigt den bildar ett igenkänningsställe för en nukleinsyrabindande komponent, också tillhandahåller ett sätt för att förstärka den signal som bildas vid bindning av 1/2 TBR till komplementära sekvenser i TNA genom att tillhandahålla polymerisering av BNAs på TNA bunden till PNA. För att möjliggöra detta tillhandahålls en sekvens såsom SEKV ID NR 35, som kodar för den vänstra operatoren i bakteriofag lambda, med ytterligare sekvenser så att en över-

hängande sekvens alstras på ena eller båda sidor om BNA vid hybridisering med PNA.

Som ett specifikt exempel tillhandahålls polymerisering med vektor av BNAs på TNA med SEKV ID NR 40-43. I detta exempel kodar SEKV ID NR 40 två 1/2 TBRs som kommer att hybridisera med två 1/2 TBRs i en TNA för att bilda två NF- $\kappa$ B-bindningsställen, under det att den samtidigt tillhandahåller en bakteriofag lambda vänster operator 1/2 BBR, som dessutom är avslutad vid 3'-änden med igenkänningsstället för restriktionsenzymet *Pst*I. Tillsats av BNA, SEKV ID NR 41 med 1/2 BBR komplementär till 1/2 BBR på PNA, SEKV ID NR 41, kompletterar BBR samtidigt som igenkänningsstället *Pst*I kompletteras, vilket ger ett överhäng om fyra baser för hybridisering med ytterligare BNAs. Följaktligen tillsättes SEKV ID NR 42 som har en fyra basers sekvens vid 3'-änden, som är komplementär med de fyra basernas överhäng som är kvar från hybridiseringen av SEKV ID NR 40 och 41. Dessutom förses SEKV ID NR 42 med en fem basers sekvens vid sin 5'-ände, som bildar en del av igenkänningsstället för *Bam*HI. Den växande polymeren av BNAs förlängs ytterligare genom tillsats av BNA SEKV ID NR 43, som är komplementär med SEKV ID NR 42, som fulländar BBR samtidigt som igenkänningsstället för *Bam*HI fulländas och ger ett fyra basers överhäng, som kan hybridiseras ytterligare med BNAs som har komplementära sekvenser. På detta sätt kan BNAs hybridiseras omfattande för att kraftigt förstärka signalen från en enda PNA-TNA-hybridiseringshändelse.

Såsom med PNAs beskrivna i exempel 1, kan BNAs användas i en omärkt form eller kan märkas med förfaranden kända inom tekniken och som beskrives i exempel 1. Det skall också påpekas att snarare än att producera BNA-polymeren genom sekventiell tillsats av BNAs till PNA-TNA-komplexet, kan BNA-polymeren framställas och sättas direkt till PNA-TNA-komplexet. En enkel metod för framställning av sådan BNA-polymer omfattar den rekombinanta produktionen av en vektor i vilken multimerer av BNA åstadkoms med ett unikt restriktionsställe vid endera änden av polymeren. Denna polymer av BNAs som innehåller multipla BBRs skärs ut ur vektorn och hybridiseras till en enkelsträngad 1/2 BBR som är

kvar i PNA vid hybridisering av PNA och TNA. Detta åstadkoms genom att tillhandahålla en enkelsträngad sekvens i PNA komplementär till ett överhäng producerat i BNA-polymeren när den skärs ut från produktionsvektorn.

### Exempel 3 – Produktion av HNAs och användning därav för att skydda BNA-polymerer

HNAs enligt uppfinningen framställs med metoder kända inom tekniken för polynukleotidproduktion såsom beskrivits i exempel 1 och 2 för PNAs och BNAs. Vid produktion av HNAs är emellertid sekvensen av HNA specifikt utformad så att en väsentlig del av HNA bildar en självkomplementär palindrom för att bilda en hårnål samtidigt som tillräckligt med baser i enkelsträngad form lämnas kvar för att kunna hybridisera med enkelsträngade sekvenser i den växande kedjan av BNAs såsom beskrivits i exempel 2.

I detta exempel åstadkoms en HNA med SEKV ID NR 44 för att skydda förlängningen av BNAs på PNA i exempel 2 efter tillsats av BNA, SEKV ID NR 43. Detta åstadkoms eftersom SEKV ID NR 44, lämnar en palendromsekvens som bildar en stabil hårnål och även har en sekvens vid 5'-ändan på HNA som kompletterar *Bam*HI-sekvensen som bildas genom hybridiseringen av SEKV ID NR 42 och SEKV ID NR 43. Naturligtvis är avslutningen av polymeren efter tillsats av endast 3 BNAs i syfte att förenkla vid demonstrering av uppfinningen. Såsom beskrivits ovan kan denna polymerisering fortsättas väsentligen i all oändlighet för att förstärka signalen av PNA-TNA-hybridiseringshändelsen. När en gång HNA hybridiserar till den växande kedjan av BNAs skyddas polymeren och ingen ytterligare förlängning av polymeren är möjlig.

### Exempel 4 – Framställning av TBAs och BBAs, märkning och immobilisering därav

TBAs och BBAs, som kan användas enligt föreliggande uppfinning, inkluderar vilken substans som helst som specifikt kan binda till TBRs och BBRs som bildas genom hybridisering av PNAs, TNAs och BNAs. Användning av DNA-bindande proteiner bildar ett exempel av sådana substanser.

Till exempel är TBA dimeren av DNA som binder delen av p50 och BBA är lambda *cro*-proteinet. Dessa proteiner kan framställas med metoder kända inom tekniken. Generna för båda dessa proteiner har klonats. Sålunda är dessa proteiner rekombinant framställda och renade med förfaranden kända inom tekniken. Vidare är dessa proteiner märkta antingen med en radioisotop, såsom radioaktivt jod, eller med ett enzym, såsom beta-galaktosidas och pepparrotsperoxidas, eller med en fluorescent färg såsom fluorescein eller rodamin, med metoder som är välkända inom tekniken. Dessutom kan endera eller båda TBA och BBA immobiliseras på en fast yta såsom ytan på en mikrotiterplatta eller ytan på en pärla, såsom en färgad pärla med en diameter var som helst från 0,01 till 10 µm. Markörerna på TBAs och BBAs kan vara lika eller olika.

I detta exempel märks TBA innehållande de dimera p50 DNA-bindande domänerna med rodamin under det att BBA *cro* märks med fluorescein. Följaktligen, efter hybridisering av PNAs, TNAs, BNAs och HNAs, såsom beskrivet i denna patentbeskrivning och i det föregående och i följande exempel, bringas nukleinsyrahybriderna, om de bildas, i kontakt med överskottmärkt TBA och *cro*. Fluorescensen på dessa markörer mätes med kända metoder och bestämning av båda signalerna är en indikation på närvaron av 1/2 TBR-sekvenser i TNA. Differentialsignalen som produceras genom fluorescens av NF-kB och *cro* är ett mått på den grad med vilken polymeriseringen av BNAs till PNA-TBA-hybriden har resulterat i förstärkning av signalen. Förstärkning från en till över ett tusen gånger är tänkbart med metoden enligt denna uppfinning.

#### Exempel 5 – Hybridisering av två PNAs med en TNA och åtskiljning mellan en TNA och en CNA

PNAs, PNA1, SEKV ID NR 40 och PNA2, SEKV ID NR 45 användes i ca tiofaldigt molärt överskott i förhållande till koncentrationen av TNAs i ett testprov. För detta exempel användes en isolerad duplex HIV LTR, vari en sträng har sekvensen SEKV ID NR 37, såsom visas i fig 7, och den andra strängen är komplementär till sekvensen som visas i fig 7, som TNA. En duplex isolerad CNA användes också i detta exempel, varav en sträng har samma sekvens som SEKV ID NR 37, förutom att i det

första NF-kB-bindande stället, som visas i fig 7, vid centrum av bindningsstället, position 1 i fig 7 i stället för en "T", föreligger en "A", varför dess komplementära sträng mismatchar med SEKV ID NR 40 PNA vid denna punkt.

SEKV ID NR 40 och SEKV ID NR 45 sätts båda till separata reaktioner, varav den första innehåller ovan beskrivna TNA och den andra innehåller ovan beskrivna CNA. Proverna solubiliseras i en lämplig hybridiseringsbuffert, såsom 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA. Proverna värms till ca 90°C under ca fem minuter för att strängseparera duplex TNAs och CNAs i provet och sedan får proverna svalna för att låta strängarna i PNAs, TNAs och CNAs binda ihop med vätebindningar.

När hybridiseringen är avslutad, vilket kan bestämmas med kända förfaranden såsom beräkning av  $t_{1/2}$  baserat på bassammansättningar och temperatur för återrättande av vätebindningar enligt kända metoder, polymeriseras SEKV ID NR 40 PNA genom tillsats av BNAs i exempel 2 och SEKV ID NR 45 PNA2-proben polymeriseras med BNAs med början med Sph1 igenkänningsställe som överhäng. Efter tillsats av BNAs och en kort hybridiseringsperiod sättes de separata proverna till pärlor överdragna med kovalent immobiliserad NF-kB, och NF-kB får binda till eventuella TBRs bildade i TNA- och CNA-proverna. Efter ca 15 minuters bindning tvättas proverna två gånger med ca tre volymer av en lämplig tvättbuffert, såsom 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl eller en annan buffert som förutbestämts inte interfererar med NF-kB eller bakteriofag lambda CI-repressorprotein bindande aktivitet. Efter varje tvätt får pärlorna sätta sig under graviditeten eller genom kort centrifugering. Detta avlägsnar eventuella nukleinsyrsor som inte har perfekt NF-kB-bindande ställe bildat genom hybridisering av PNA1 och TNA-sekvenserna.

Efter den slutliga tvätten sättes bakteriofag lambda CI-repressorprotein märkt med en radioaktiv isotop, såsom med radioaktivt jod, eller märkt med ett enzym, såsom pepparrotsperoxidas, med färgade kulor, eller med en fluorescent markör till varje prov. Proverna tvättas sedan flera gånger (ca 3) med flera volymer (ca 2) av en lämplig tvättbuffert såsom 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, eller annan förutbestämd buffert som inte interfererar med NF-kB eller bakteriofag lambda CI-

repressorproteinbindande aktivitet. Efter varje tvätt får pärlorna sättas under graviditet eller genom kort centrifugering. Efter den sista sättningen eller centrifugeringen bestäms den bundna markören genom bestämning av bunden radioaktivitet, frigiven färg i en enzymanalys, färg på bundna pärlor, eller fluorescensbestämning. Alternativt kan en anti-CI.-antikropp sättas till och en standard sandwich-enzymbunden immunoanalys eller radioimmunoanalys utföras för att bestämma bunden repressor. Dessutom, som en negativ kontroll (bakgrund) utföres alla av de föregående manipuleringarna i tandem med ett prov i vilket pärlor användes som inte har immobiliserad NF-kB.

Som ett resultat av den föregående analysen har kontrollen och CNA-haltiga prover liknande låga signaler under det att de TNA-haltiga proverna har en signal väl över bakgrunden.

#### Exempel 6 – En testutrustning för bestämning av HIV

##### A. Utrustningsinnehåll:

1. Mikrotiterplatta
2. 1 mg/ml lösning av rekombinant producerad NF-kB i tris-buffrat koksalt
3. Rör innehållande enkelsträngad HIV PNAs (en blandning av förblandade oligonukleotider som kodar två NF-kB 1/2-bindningsställen, dvs en blandning av SEKV ID NR 7 och 8).
4. Rör innehållande enkelsträngat humant genomiskt PNA, SEKV ID NR 1.
5. Rör med nukleas (*PstI*).
6. Rör med proteas.
7. Rör som innehåller för-polymeriserad BNAs, 100 upprepade enheter av bakteriofag lambda  $O_R$ , skyddad med en HNA men med fria 1/2 BBRs tillgängliga för att binda PNA-TNA-hybrider.
8. Rör med pepparrotsperoxidase (hrp) konjugerad *cro*.
9. Rör med hrp-färgat substrat.
10. Tris-buffrad koksalt, 100 ml.
11. Lancet.



12. Reaktionsrör A, B, C, som vart och ett innehåller 250 µl destillerat vatten.
13. Medicin-droppanordning.

#### B. Analysmetod:

- (a) Mikrotiterplattan (föremål 1) beläggs med lösning av rekombinant framställt NF-kB (föremål 2) vid en koncentration av 1 mg/ml i tris-buffrat koksalt över natt vid 4°C under skakning.
- (b) Tre droppar blod från testtagaren erhålles genom att sticka ett finger med lancetten (reagens 11) och en droppe blod hålls i vart och ett av rören A, B och C (reagens 12).
- (c) I varje rör hålls en droppe proteaslösning (reagens 6) med medicindroppanordningen (föremål 12) och röret omröres och får sätta sig under 5 minuter.
- (d) En droppe nukleas (föremål 5) sättes till vart och ett av rören A-C med användning av medicindroppanordningen och rören omröres och får sätta sig under 10 minuter.
- (e) En droppe av föremål 3 sättes till rör A (testprov); en droppe av föremål 4 sättes till rör B (positiv kontroll); och en droppe av koksalt (föremål 12) sättes till rör C som en negativ kontroll. Rören värms till 50°C i varmt vatten och får svalna till rumstemperatur under 1 timme.
- (f) Medan hybridiseringen sker i steg (d) tages överskott av protein bort från ytan och mikrotiterplattan från steg (a), och plattan sköljs med tris-buffrat koksalt (rör 10).
- (g) Innehållen i rören A-C från steg (e) överförs till tre brunnar i mikrotiterplattan och får stå under 1 timme under skakning.
- (h) Mikrotiterbrunnarna innehållande innehållet från rören A-C sköljs med tris-buffrat koksalt och töms.
- (i) En droppe av föremål 7 sätts till varje brunn och får hybridisera med eventuella 1/2 BBR-ställen bundna till plattan under en timme, följt av tre sköljningar med tris-buffrat koksalt.

- (j) En droppe av föremål 8 sättes till varje brunn och *cro* får binda till eventuellt bundna BNAs under 10 minuter, följt av fem, en ml tvättad med tris-buffrad koksaltlösning.
- (k) En droppe av hrp-substrat sättes till varje brunn och färgen får utvecklas.

### C. Resultat:

Om brunnarna A och B båda visar färgutveckling och brunn C inte gör det, är testet giltigt och individen har infekterats med HIV. Om endast brunn A visar färgutveckling, eller brunn C visar färgutveckling, har testet utförts på ett felaktigt sätt och är ogiltigt. Om brunnarna A och C inte visar någon färgutveckling men brunn B gör det, är testet giltigt och individen har inte infekterats med HIV.

### Exempel 7 – Produktion av olika nya TBAs

Nya TBAs för användning enligt föreliggande uppfinning framställs på följande sätt:

(a) NFkB/NF-kB (HIV-bestämning I). En nukleinsyra som kodar för vilken som helst av SEKV ID NR 63-71 eller ett liknande NF-kB DNA-bindande protein, fusioneras i ram till en nukleotidsekvens som kodar för en sammansättningssekvens, såsom *cro*, så att NF-kB DNA-igenkännande sekvensen kodas vid amino- eller karboxiterminalen i *cro*-sekvensen. Eventuellt tillhandahålls en länksekvens mellan NF-kB-sekvensen och *cro*-sekvensen. Vid den andra änden av *cro* tillhandahålls eventuellt en nukleär lokaliseringssignalsekvens såsom SEKV ID NR 72. Ytterligare tillhandahålls eventuellt asymmetrisk sekvenser vid *cro*-terminalen som inte används av den NF-kB igenkännande sekvensen. Exempel på fullständiga TBAs visas nedan.

(b) NF-kB/SP1 (HIV-bestämning II). På samma sätt som beskrivits i (a) ovan framställs en rekombinant kodande sekvens som kodar för en NF-kB-igenkännande domän. I en separat konstruktion, inkluderas i stället för SEKV ID NR 63-72 den kodande sekvensen för den DNA-igenkännande delen av SP1. En sådan sekvens skall koda alla de funktionella delarna i SEKV ID NR 73, som är den del av SP1-transkriptionsfaktorn som har DNA-bindning (se Kadonaga et al. [1987] *Cell* 51:1079-1090]. Den NF-kB-kodande vektorn och SP1-kodande vektorn samtrans-

fekteras sedan i ett lämpligt expressionssystem såsom är välkänt inom tekniken. En monomer NF-kB-igenkännande enhet sättes till för att göra den NF-kB-igenkännande dimeren fullständig efter ihopsättning av de SP1 och NF-kB-igenkännande enheterna med skyddet. Asymmetrisekvenserna som förhindrar bildning av NF-kB eller SP1-dimererna och styr i stället bildningen av NFkB-SP1-heterodimererna (dvs HIV-bestämning II), som sedan isoleras från expressionssystemet (däggdjurs- eller bakterieceller) med kända metoder.

(c) SP1/SP1 TBAs (HIV-bestämning III). Såsom beskrivet i (b) ovan, bereds en SP1-kodande TBA-konstruktion. Endast denna konstruktion transfekteras emellertid in i expressionssystemet och asymmetrisekvenser som tillåter bildning av SP1-SP1-dimerer inkluderas.

(d) SP1-TATA (HIV-bestämning IV). Såsom beskrivet i (b) ovan produceras en SP1-kodande TBA-rekombinant. Dessutom framställs en rekombinant som kodar för en TBA som har den bindande sekvensen SEKV ID NR 74 eller liknande sekvens som kodar en TATA-igenkännande enhet med asymmetrisekvenser som är komplementära till dem som är inkluderade i SP1-TBA-kodande konstruktionen. Dessa konstruktioner samtransfekteras, och heterodimererna isoleras med standardmetoder, inkluderande affinitetsrening på en DNA-kolonn som har de lämpliga SP1-TATA-målbildande regionerna.

(e) SP1-E2 (HPV-bestämning I). En SP1-kodande konstruktion framställs som i (b) ovan. En E2 TBA-kodande konstruktion framställs med användning av en sekvens som kodar någon av SEKV ID NR 75-84 och 94-98 som är papillomavirus E2 DNA igenkännande enheter (se Hegde et al. [1992] *Nature* 359:505-512) eller liknande igenkännande enheter framställs och sam-transformeras eller sam-transfekteras med den SP1 TBA-kodande konstruktionen. Monomer E2 igenkännande enhet sättes till för att göra E2 igenkännande dimeren fullständig efter ihopsättning av E2-SP1 igenkännande enheten med skyddet. Heterodimeren HPV-bestämning I isoleras med kända metoder.

(f) E2-E2 (HPV-bestämning II). Såsom beskrivits ovan i (e) framställs en E2 TBA-kodande konstruktion förutom att asymmetrisekvenser inkluderas, som erbjuder bildning av E2-dimerer. De uttryckta dimererna isoleras sedan med kända metoder inkluderande affinitet för ett dimert E2-bindande ställe på en DNA-affinitetskolonn.

(g) E2-TATA (HPV-bestämning III). Såsom beskrivits ovan i (c) och (d) framställs E2 och TATA-bindande TBAs (respektive) förutom att asymmetrisekvenser inkluderas som förstärker bildningen av heterodimerer snarare än homodimerer. Konstruktionerna samuttrycks sedan och heterodimererna isoleras.

(h) TATA-TATA (HPV-bestämning IV). Såsom beskrivits ovan i (a) och (d), framställs en TATA-bindande TBA-kodande konstruktion med användning av asymmetrisekvenser som gynnar denna homodimerbildning och homodimerisolerar.

(i) Andra TBAs. Såsom beskrivits ovan för HIV och HPV TBAs, kan TBAs för vilken given patogen som helst eller sjukdomstillstånd som helst framställas genom att identifiera specifika DNA-bindande proteiner och bilda en expressionskonstruktion med användning av lämpligt längd, ihopsättning och asymmetrisekvenser.

### Exempel 8

På samma sätt som beskrivits i exempel 5 framställs en mer stringent analys med användning av duplexen NF-kB-SP1-bindande protein framställt enligt exempel 6. Följaktligen kan problemen som visas i fig 7 och används i exempel 5 förlängas för att reducera avståndet mellan problemen och därvid reducera flexibiliteten hos DNA i TNA.

### Exempel 9 – Framställning av TBAs med ”hög ordning”

Genom lämplig användning av asymmetrisekvenser framställs TBAs som är dimerer, trimerer, tetramerer, pentamerer eller hexamerer av speciella DNA-igenkännande enheter. På detta sätt framställs en hexamer TBA genom att göra en första NF-kB p50-dimer TBA med användning av asymmetrisekvenser som möjliggör dimerbildning. Dessutom möjliggör asymmetrisekvenserna tetrameriseringen av p50-dimeren

med en SP1-SP1-dimer. Slutligen styr ytterligare asymmetrisekvenser hexameriseringen med en dimer som har nukleära lokaliseringsssekvenser. Detta åstadkoms genom att t ex inkorporera asymmetrisekvenser från insulin, som i naturen bildar hexamerer. Denna hexamerbildning styrs av sekvenserna SEKV ID NR 85 (A) och 86 (B), 87 (A) och 88 (B), 89 (A) och 90 (B), och 91 (A) och 92 (B) (se fig 13 och 14).

Eftersom den extremt höga affiniteten för HIV-LTR kan alstras med användning av en multimer TBA benämns föreningar som har denna struktur och som kan användas för detta syfte häri som "HIV-lock".

Ett optimalt HIV-lock definieras genom fotavtryck (med metoder som är välkända inom tekniken) har TBAs bundna till TBRs i HIV LTR för att bekräfta att bindingsaffiniteten för varje DNA-bindande protein, som medverkar till bindningen av det multimer TBA-komplexet, skiftas ned relativt affiniteten för eventuella naturliga målsekvenser, (dvs CNAs) från vilka den DNA-bindande igenkänningsenheten i TBA härrör. Eventuell samtidig förlust i bindingsaffinitet för HIV TBRs är mer än kompenserad för efter bildning av multimeren, såsom beskrives nedan.

Det kan föreligga tävling mellan bindningen av varje komponent TBA med avseende på dess TBR och ihopsättning via asymmetrisekvenser för att bilda multimeren. Detta undviks genom att justera länkarna mellan skyddet och asymmetrisekvenserna i varje TBA-komponent så att dessa tävlande händelser icke är kopplade till varandra. Den resulterande reduktionen i diffusionens dimension (effektiv koncentrationsoökning) för TBA asymmetri- och ihopsättningskomponenterna resulterar i effektiv bildning av det multimer komplexet.

På basis av fotavtryckning justeras längden och sammansättningen av länkarna för att uppnå optimal diskriminering mellan mål-HIV-sekvenser och naturliga sekvenser. På detta sätt, även om varje komponent TBA kan ha en låg affinitet för CNA- och TBR-sekvenser, kommer det multimer komplexet att ha en extremt hög affinitet för den nu expanderade TBR som känns igen av det multimer komplexet (andra

digniteten av affiniteten för varje TBR igenkänd genom varje komponent TBA i den multimeren TBA), samtidigt som det har en låg affinitet för CNAs. På samma sätt framställs multimeren TBA-komplex bortsett från HIV-lock.

TBAs som kan bildas på detta sätt inkluderar följande sekvenser, som sätts ihop genom länkning av antingen proteinsubenheter eller nukleinsyrasekvenserna som kodar dessa subenheter på följande sätt:

<u>Set</u>	<u>Länksekvenser från grupper</u>
A	I + II + III
B	IV + V + III
C	IV + III

vari grupperna I-IV består av sekvenser valda från

<u>Grupp</u>	<u>Vald från sekvenser</u>
I	Vilket som helst av SEKV ID NR 85-92
II	Met Ser, länkat till vilken som helst av SEKV ID NR 104-106, som var och en är länkad till SEKV ID NR 99.
III	SEKV ID NR 100 länkad till vilken som helst av SEKV ID NR 75-84 eller 94-98; SEKV ID NR 101 länkad till endera av SEKV ID NR 74 eller SEKV ID NR 93; eller SEKV ID NR 102 länkad till SEKV ID NR 74 eller SEKV ID NR 93; eller vilken som helst av SEKV ID NR 72, 103, 73 eller 63-71.
IV	Vilken som helst av SEKV ID NR 104-106.
V	SEKV ID NR 99.

Specifika exempel för TBAs är SEKV ID NR 109-116, sammansatta på följande sätt:

<u>Set</u>	<u>SEKV ID NR</u>	<u>Länk SEKV ID</u>
A	109	85 + Met Ser + 104 + 99 + 100 + 94
A	110	85 + Met Ser + 104 + 99 + 72
A	111	86 + Met Ser + 105 + 99 + 102 + 74
A	112	86 + Met Ser + 106 + 99 + 73
A	113	89 + Met Ser + 106 + 99 + 63
C	114	106 + 64
C	115	105 + 64
B	116	106 + 99 + 73

På detta sätt kan många olika TBAs framställas genom val mellan lämpliga asymmetriska sekvenser, hopsättningssekvenser och DNA-igenkännande enheter. Vidare kan uppsättningar av dessa, såsom SEKV ID NR 114 och 115 associera med varandra, men dimererna SEKV ID NR 114 eller 115 kommer inte att bildas på grund av laddningsavstötning i de muterade ihopsatta sekvenserna (SEKV ID NR 104 är *cro*; SEKV ID NR 105 är en ny muterad, negativt laddad *cro*, och SEKV ID NR 106 är en ny muterad, positivt laddad *cro*).

Givet aminosyrasekvensen för dessa TBAs kan naturligtvis en fackman inom tekniken framställa rekombinanta nukleinsyrakloner som kodar dessa, och sådana rekombinanta kloner utgör naturligtvis en integrerad del av denna uppfinning.

#### Exempel 10 – HIV-test med användning av "HIV-lock"

På i stort sett samma sätt som användes i exempel 6 användes "HIV-lock" som produceras enligt exempel 9 som TBA, reagens 2, med liknande resultat.

#### Exempel 11 – HIV-test med användning av "HIV-lock" för att testa blod för donation

När mängden blod som skall testas inte är begränsat såsom när prov av blod för donation skall testas med avseende på HIV-kontaminering, utförs tester liknande i exempel 6, men för varje rör A-C, snurrar ca 5 ml blod till bottensats i en boxcentri-

fug. Andra reagenser uppskalas såsom erfordras för att hantera den större mängden av TNA som föreligger i provet.

#### Exempel 12 – ”HIV-lock” som anti-HIV-terapeutiskt medel

”HIV-lock” producerad enligt exempel 9 formuleras som en 1 mg/ml lösning i liposomer och injiceras intravenöst till en individ, som har testats och bekräftats vara infekterad med HIV. En dos av 0,1 mg till 100 mg av ”HIV-lock”/kilogram kroppsvikt infunderas under en tjugofyrtimmarsperiod, och koncentrationen av HIV p24 i patientens serum övervakas. Behandlingen upprepas så ofta som erfordras, såsom när förhöjningar i serum p24 uppträder.

#### Exempel 13 – Användning av en HIV-TBA-konstruktion som ett terapeutiskt medel

En rekombinant retroviral eller liknande vektor användes för att leverera en konstruktion som kodar en HIV-LTR-bindande TBA till en infekterad patient. Vektorn kodar ett skydd, såsom *cro*, och sekvens-DNA för bindande delar av p50. Samma vektor kodar också ett skydd på vilket en SP1 TBA viker sig. Asymmetrisekvenser tillhandahålles så att efter samuttryck av p50-TBA och SP1-TBA i en enda HIV-infekterad cell *in vivo* en omedelbar associering sker mellan dessa TBAs, under det att samtidigt eventuell associering mellan de DNA-bindande delarna av p50 och endogena p50 eller p65 monomerer förhindras. NLS-sekvenser tillhandahålles även i TBAs så att, efter dimerbildning, TBA omedelbart omlokaliseras till kärnan i cellen och specifikt binder till integrerade HIV-sekvenser och sålunda förhindrar eventuell transkription från detta ställe.

För detta ändamål är det önskvärt att välja sekvenser som kodar DNA-bindande domäner så att de uttryckta monomererna sätts ihop till en TBA, som inte binder naturliga humana sekvenser. Det är sålunda först efter bindning av TBA-komponenterna till deras målsekvenser som association mellan alla komponenter i TBA äger rum för att bilda ett komplex, som tätt och specifikt binder HIV LTR.



#### Exempel 14 – Diagnostiskt kit för humant papillomavirus

Denna diagnostik för human papillomavirus drar fördelen av den kända skillnaden mellan benigt och karcinogent HPV för att tillhandahålla ett test som indikerar känsligheten för malignitet i patienten. Papillomavirusen är en grupp av små DNA-virus förknippade med benigna fjällande epitelialcelltumörer i högre ryggradsdjur. Åtminstone 27 olika humana typer av papillomavirus (HPVs) har hittats, av vilka många är förknippade med specifika kliniska skador. Fyra av dessa HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, och HPV-33 har förknippats med humana genitaltraktskador. I allmänhet har HPV-6 och HPV-11 DNAs visat sig vara associerade med benigna skador i genitaltrakten. HPV-16, HPV-18 och HPV-33 har även visat sig vara associerade med premaligna och maligna skador och transkriberas i de flesta cellinjer som upprättas från cervikalkarcinom. HPV-16, HPV-18 och HPV-33 är antagligen endast två medlemmar i en stor uppsättning av HPV DNAs förknippade med malignt humant cervikalkarcinom.

Djurmodeller har visat att benigna papillomaviruskador kan utvecklas till maligna skador i närvaro av en ko-karcinogen. HPV DNA har återfunnits i metastaser från cervikalkarcinomer. I maligna cervikalskador integreras vanligen HPV DNA in i det humana genomet men det kan även föreligga extra kromosomalt HPV DNA. Integrering av HPV för att bilda probviruset resulterar ofta i brott av den virala E2 öppna läsramen (ORF). Trots brott av E2 ORF har undersökning av cellinjer från flera cervikalkarcinom visat transkriptionellt aktivt och integrerat HPV-16 och HPV-18. När HPV-16-genom som föreligger i humana cervikalkarcinomcellinjer SiHa och CaSki undersökts, hittas skillnader i integreringen HPV-16. I SiHa-linjen uppträdde den enda HPV-16-genomintegreringen vid baserna 3132 och 3384, som bryter av E1 och E2 ORFs med en deletion om 0,3 kb. Ytterligare en 50 baspar deletion av HPV-16 DNA resulterade i att E2 och E4 ORFs fusionerades. 5'-ändan av HPV-16 DNA bestående av avbruten E2 ORF, ligeras till kontinuerliga humana högerflankerande sekvenser. Dessutom bestäms en enda tillsats guanin i nukleotid 1138 i mitten av E1 ORF. Denna tillsats av baspar resulterar i fusion av E1a och E1b ORFs till en enda E1 ORF.

Det kompletta genomet hos HPV-16 är tillgängligt i GenBank som tillgänglighetsnummer K02718; det fullständiga genomet HPV-33 är tillgängligt i GenBank som tillgänglighetsnummer M12732; det kompletta genomet av HPV-18 är tillgängligt i GenBank med tillgänglighetsnummer X05015.

Som en preliminär kartläggning etableras tillståndet av en HPV-infektion för ett givet cervikalbiopsiprof med en enkelt "ja/nej"-typ av analys med användning av t ex en eller alla av PNAs SEKV ID NR 46-53 och en E2 TBA såsom beskrivits ovan (t ex fragmenterad DNA, bind PNA, immobiliserad med TBA, och bestäms signalen med BNAs och BBAs).

När en gång ett biopsiprof visat sig vara positivt för HPV erhålles ytterligare information när det gäller malignitetspotentialen hos HPV genom att analysera integrationsstatusen för viruset i det humana genomet.

1. Fragmenterad DNA i biopsiprovet från cerviks och hybridisera till en blockerande prob som har sekvensen SEKV ID NR 60. Denna prob kommer att binda alla fragment i DNA som inte har splitsat ut 0,3 kb fragmentet.
2. Exponera DNA i biopsiprovet för en PNA som har sekvensen SEKV ID NR 61. Denna prob kommer endast att binda till fragment som har 0,3 kb fragment borttaget (den blockerande proben kommer att förhindra att stora borttagande segment försvinner från öglan om den är närvarande).
3. En PNA med SEKV ID NR 62 hybridiseras med SEKV ID NR 41 för att bilda en BBR som kommer att binda till *cro* eller  $\lambda$  CI repressor som en BBA, som ger en enkelsträngad del, som kan hybridisera med TATA-stället på SEKV ID NR 61. Detta tillsättes för att bilda en TBR på 5'-ändan på den stora borttagningen.
4. TPR immobiliseras med en TBA som har en DNA-igenkännande enhet för TATA-bindande protein.
5. De bundna fragmenten bestäms genom att sätta till BNAs och BBAs såsom beskrivs ovan.

Bestämning av signaler i denna analys indikerar att det stora fragmentet tas bort i HPV som föreligger i TNA. Eftersom denna borttagning är korrelerad med malignicitet ger denna analys insikt i malignitetspotentialen hos HPV-infektionen. Denna slutsats kan bekräftas genom att utföra en analog analys baserat på borttagningen av 52 basparfragmentet som också är korrelerat med HPV-inducerad malignicitet.

Den TBP-igenkännande enheten som användes i TBA för denna analys kan väljas ut från en sekvens såsom SEKV ID NR 70 eller SEKV ID NR 93.

### Exempel 15 – Rekombinant HIV-LOCK™-produktion

**Fas ett – Framställning av DNA för framställning av HIV-LOCK™.** *In vitro*-mutagenes av de kodande regionerna för de naturligt förekommande klonade komponenterna av HIV-LOCK™ som måste modifieras utförs med en mutagen fagemidkit. Det modifierade protokollet inkluderar användningen av en Bluescript-plasmid som innehåller var och en av de bindande komponenterna i HIV-LOCK™. Dessa transformeras till kompetenta celler och uracil-haltiga fagemider odlas. Enkelsträngat DNA extraheras och användes som en mall för den mutagena strängen. Oligonukleotider som innehåller de önskade mutationerna, inkluderande inkorporeringen av ett nytt restriktionsställe, syntetiseras och behandlas med polynukleotidkinas och ATP. De kinasbehandlade oligonukleotiderna sätts ihop genom återuppbyggnad av vätebindning på enkelsträngad mall, och en mutagen syntetiseras och liggeras enligt mutagenprotokollet med undantag att Sequenase 2,0 är polymerasen. Bibliotek kartläggs för användning av både g-<sup>32</sup>P änd-märkta nukleotider, som innehåller sekvenser som är komplementära till de introducerade mutationerna och genom att isolera plasmid DNA och identifiera mutanter genom närvaron av det introducerade restriktionsstället. Mutationerna bekräftas också genom sekvensbestämning med ett Sequenase kit. HIV-LOCK™ DNA klonas i bakulovirusexpressionssystemet med en polyhedronpromotor.

**Fas två – Produktion av HIV-LOCK™ proteiner med användning av bakulovirus.** SF-9-celler odlas till en förutbestämd densitet (ca  $1 \times 10^6$  celler/ml logfas), som infekteras med bakulovirus som innehåller HIV-LOCK™-instruktioner och skördas

för att utvinna rekombinanta proteiner som innehåller HIV-LOCK™. I uppskalningsprocessen expanderas kulturer från flaskor till roterande kärl och därefter till bioreaktorer. Efter infektion skördas cellerna vid 12, 24, 36 och 48 timmar med avseende på proteinet. Indicier avseende viabilitet övervakas genom hela processen.

**Fas tre – Rening av HIV-LOCK™-proteiner.** De skördade proteinerna separeras först från partikelformat material genom flow-through-ultracentrifugering för att underlätta nedströmsrening. Den centrifugerade produkten sterilfiltreras sedan. Extrakten centrifugeras sedan vid 40 000 vpm vid 4°C under 30 minuter, och prover immunoprecipiteras med polyklonal kaninantikropp mot en av HIV-LOCK™-komponenterna. De immunoprecipiterade proteinerna körs på en SDS-10 % PAGE-gel.

**Fas fyra – Test med avseende på HIV-LOCK™-proteiner mot HIV DNA.** Analys avseende rörlighetsskift utföres med användning av en oligonukleotidprob, som innehåller element av den HIV-långa terminala upprepningen och fragment innehållande NFkB-bindande DNA förenade med kappa lätt kedja och mikroglobulin-reglering. Oligonukleotiden sätts ihop med återupprättning av vätebindningar med dess komplementära sträng och ändmärks med  $g\text{-}^{32}\text{P-ATP}$ .

Fotavtryck åstadkoms genom att kombinera små ( $10^{-15}$  M) av radiomärkt HIV LTR DNA med en något större mängd av HIV-LOCK™ i en buffert vid rumstemperatur under 10 minuter. Ditionitritol tillsättes före tillsatsen av protein. Järn (II), EDTA, väteperoxid och natriumaskorbat tillsättes, och reaktionsblandningen inkuberas. Ett stoppande medel tillsättes och produkterna analyseras med denaturerande gelelektrofores. Detta görs för olika koncentrationer av protein. Den resulterande gelen avbildas med användning av en fosfobild-scanner och den resulterande bildfilen med hög upplösning analyseras för att ta bort den bindande affiniteten hos HIV-LOCK™ till HIV DNA relativt till cellulärt DNA.

Multipla utformnings- och testupprepningar kan genomföras för att återdefiniera bindning av HIV-LOCK™ och andra TBAs till HIV och andra organismer. Denna

process gör det möjligt att etablera bindande ihopsättningar så att den bindande ihopsättningen inte tävlar med vildtyp-proteiner med avseende på enskilda bindningsställen i genomproverna. Utvecklingen av TBAs med andra organismer och TNAs för sekvenser inom dessa organismer kan göras med användning av ovan nämnda metod. Denna metod gäller när man producerar bindande ihopsättningar för alla nukleinsyror TBAs inkluderande DNA-DNA, DNA-RNA och RNA-RNA-hybrider och kombinationer av dessa hybrider.

Exempel 16 – Metod för att identifiera nukleinsyrabindande molekyler för produktion av TBAs och BBAs enligt uppfinningen:

Vid metoden enligt uppfinningen sätts målbindande ihopsättningar och boosterbindande ihopsättningar samman genom identifiering av nukleinsyrabindande molekyler, och länkning av de nukleinsyrabindande delarna av molekylerna på sådant sätt att man åstadkommer TBAs som särskiljer mellan speciella målsekvenser och till och med nära besläktade sekvenser. En metod för att identifiera nukleinsyrabindande molekyler omfattar följande steg:

1. Framtagning av ett biologiskt prov som innehåller målnukleinsyran. Detta kan t ex vara en organism eller ett vävnadsextrakt infekterad med en patogen.
2. Fragmentering av provet för att exponera nukleinsyror och reducera storlekskomplexiteten hos nukleinsyror som finns i provet.
3. Bringa ett första prov av de fragmenterade nukleinsyror i kontakt med ett kontrollbuffertmedium och bringa ett andra prov av de fragmenterade nukleinsyror i kontakt med kontrollbuffertmediumet, som innehåller en känd profil av nukleinsyrabindande molekyler.
4. Analys av de två proverna för att identifiera fragment, som har förändrat beteende i provet som bringas i kontakt med de målbildande molekylerna i motsats till kontrollprovet. Detta åstadkoms med gelelektrofores med enkel dimension, gelelektrofores med två dimensioner, vätskekromatografi med hög prestanda, papperskromatografi eller vilka andra medel som helst som avslöjar ett annorlunda beteende hos nukleinsyrafragmenten när de är bundna till en nukleinsyrabindande molekyl i motsats till när nukleinsyrafragmentet är obundet.

5. Identifiering och isolering av fragment, som har förändrat beteende när de bringas i kontakt med den nukleinsyrabindande molekylen och antingen sekvensbestämma nukleinsyrafragmentet för att bestämma om kända nukleinsyrabindande molekylnmotiv föreligger eller direkt identifiera den nukleinsyrabindande molekylen, som är bunden till nukleinsyran. Det senare kan åstadkommas t ex genom att bringa ett tvådimensionellt system av de elektroforesbehandlade nukleinsyrorna med på olika sätt märkta antikroppar, som binder till de olika nukleinsyrabindande molekylnerna.

I denna metod användes företrädesvis nukleinsyraenheter för antingen diagnostiska eller terapeutiska syften när målnukleinsyran har mer än ett enda användbart nukleinsyrabindande molekylnmål. På detta sätt kan en komplex målbindande sammansättnings alstras, som drar fördelen av närheten hos olika nukleinsyrabindande molekylnenheter för att förstärka specificiteten hos de TBA som är sammansatt från de olika individuella nukleinsyrabindande komponenterna, som identifierats. De olika nukleinsyrabindande delarna i de nukleinsyrabindande molekylnerna sätts sedan samman till en fullständig TBAs som beskrivits ovan, t ex för HIV-LOCK™.

#### Exempel 17 – Förfarande för identifiering av specifika RNA-sekvenser i ett prov.

Enligt de förfaranden kompositioner som beskrivits i denna uppfinning kan vilken nukleinsyrasekvens som helst identifieras specifikt. Identifiering av mål HIV RNA i ett prov åstadkoms genom att erhålla ett prov från en patients blod eller annan biologisk vätska eller extrakt, som kan innehålla HIV RNA, och testa med avseende på närvaron av TAR-bindande ställen. Tat är en positiv regulator för HIV-replikering, som binder till TAR-regionen i HIV RNA. Den minsta naturligt förekommande helt aktiva formen av HIV-Tat är 72 aminosyror lång, SEKV ID 118 häri. Tat innehåller minst två funktionella domäner, och transaktiverar genuttryck från det HIV långa terminala upprepade området (HIV LTR). Tat binder till en RNA-stamöglestruktur, som bildas genom självhybridisering av sekvenser i TAR, som ligger precis 5' om HIV LTR. HIV TAR RNA bildar en dinukleotidutbuktning och två stamöglestrukturer (Rhim et al. 1994 Virology: 202, 202-211). Tat (SEKV ID 118) binder till denna struktur med lägre styrka än Tat-varianter vari Ala58 är en treonin eller där His65 är

en Asp-rest. (Derse et al., 1993 *Virology*: 194, 530-536). Användning av dessa faktorer vid föreliggande förfarande åstadkoms genom:

1. Fragmentering av ett biologiskt prov för att exponera nukleinsyror och reducera storlekskomplexiteten i nukleinsyrorna.
2. Bringa en TBA i kontakt med det prov som identifierar en hybrid TAR-bindande proteinsekvens och en närliggande flankerande sekvens i HIV-genomet. Den TBA som användes för detta syfte sätts ihop på *cro* som skydd med användning av Tat som den HIV RNA specifikt bindande molekylen. För att tillhandahålla specificitet såsom korsanslutning mellan HIV TAR-stället och nära besläktade TAR-ställen, som kan föreligga på grund av sådana andra patogener såsom cytomegalovirus, har TBA också en antikropps-komponent, som känner igen den DNA-RNA-hybridmålbindande regionen som bildas när en probnukleinsyra binds till HIV LTR RNA.
3. Eliminering av eventuellt "korskontakt" som produceras genom bindning av Tat till TAR-regionen i HIV RNA på grund av sådan kontaminering (kusin RNAs) såsom CMV TAR-sekvensen genom att bringa reaktionen med överskott av Tat-variant (antingen Ala58 med Thr eller His65 med Asp-varianter) som binder mer starkt. Enkla bindningshändelser på grund av att TBA binder till kusin RNAs konkurreras ut från nukleinsyraprovet med Tat-varianten på detta sätt. Å andra sidan genom att på lämpligt välja affiniteten för den dubbelbindning som åstadkoms som ett resultat av antikroppen och Tat, förskjuts inte TBA från samma mål. Detta förlopp illustreras i fig 16. I en annan utföringsform av samma metod kan TBA vara en i vilken, snarare än att man använder en variant av Tat, en antikropp används som känner igen detta nukleinsyrasegment, och den använda TBA är en dubbel antikropp TBA.

I en alternativ version av denna metod kan en probnukleinsyra användas som hybridiserar med HIV LTR RNA. Följaktligen kan ett duplexsegment av LTR sp1-ställen alstras som en del av den målbindande regionen. Denna region av HIV RNA flankerar TAR-regionen, som är 5' till LTR men i tät närhet därtill. En TBA som innehåller Tat och två Sp1-bindande ställen är skyddad för att åstadkomma Tat-bindning till TAR och Sp1-bindning till de Sp1-bindande ställena. Förstärkning och bestämning

utföres sedan genom att sätta till lämpliga BNAs, BBAs och HNAs. I ytterligare ett alternativ kan PNAs som har SEKV ID. 38 och SEKV ID. 39 (ses fig 7) användas. En TBA användes som innehåller en eller flera Sp1-bindande enheter, och en anti-kroppsenhet som binder till DNA-RNA-hybrid producerad från ett prov RNA och sekv.id. 38 PNA. Lämpliga BNAs, BBAs och HNAs sättes sedan till för att förstärka signalen.

Naturligtvis kommer fackmännen inom tekniken att komma fram till andra TBA- och TNA-kombinationer som kan användas för att optimera de metoder som exemplifieras häri.

Det skall framhållas att sekvenser som tillhandahålls häri endast är exempel, och att andra lika sekvenser föreslagna genom dessa kan användas i förfarandena enligt uppfinningen. Det skall också framhållas att även om vilken som helst sekvens som tillhandahålls häri kan utformas som linjär, skulle den kunna användas i en cirkulär eller på annat sätt permuterad form och även om den är utformad så att den är antisens, skulle den kunna användas i den kodande eller icke-kodande formen eller för att binda till kodande eller icke-kodande komplementära sekvenser.



## SEKVENSLISTA

## (1) ALLMÄN INFORMATION:

- (i) SÖKANDE:
- (A) NAMN: THE GENE POOL, INC.
  - (B) GATUADDRESS: 300 Queen Anne Ave. N., Suite 392
  - (C) STAD: Seattle
  - (D) STATE/PROVINS: Washington
  - (E) LAND: USA
  - (F) POSTNR (zip): 98109-4599
  - (G) TELEFON: (206) 526-8617
  - (H) TELEFAX:
- (ii) UPPFINNINGENS TITEL: FÖRFARANDE FÖR PÅVISANDE AV  
NUKLEINSYROR MED EN SPECIFIK SEKVENSSAMMAN-  
SÄTTNING
- (iii) ANTAL SEKVENSER: 118
- (iv) KORRESPONDENSADRESS:
- (A) ADRESS: Saliwanchik & Saliwanchik
  - (B) GATA: 2421 N.W. 41st st., Suite A-1
  - (C) STAD: Gainesville
  - (D) STAT: Florida
  - (E) LAND: USA
  - (F) ZIP: 32606
- (v) DATAAVLÄSBAR FORM:
- (A) MEDIUMTYP: Diskett
  - (B) DATOR: IBM PC-kompatibel
  - (C) OPERATIVSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) MJUKVARA: PatentIn Release #1,0, version #1,25
- (vi) TIDIGARE ANSÖKNINGSDATA:
- (A) ANSÖKNINGSNUMMER:
  - (B) REGISTRERINGSDATUM:
  - (C) KLASSIFICERING:
- (viii) OMBUD/AGENTINFORMATION:
- (A) NAMN: Bencen, Gerard H
  - (B) REGISTRERINGSNUMMER: 35 746
  - (C) REFERENS/INNEHÅLLSFÖRTECKNING NR: GP-100.C1
- (ix) TELEKOMMUNIKATION INFORMATION:
- (A) TELEFON: (904) 375-8100
  - (B) TELEFAX: (904) 372-5800

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 1:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 13 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 1:

**TGGGGATTCC CCA****13**

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 2:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 13 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 2:

**AAGGGACTTT CCC****13**

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 3:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 13 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 3:  
**AGGGGACTTT CCG**

13

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 4:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 15 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 4:

**GCTGGGGACT TTCCA**

15

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 5:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 15 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 5:

**ACAAGGGACT TTCCG**

15

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 6:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 13 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 6:

**CCGGGTTTTTC CCC**

13

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 7:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 27 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 7:

**AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA**

27

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 8:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 27 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 8:

**AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG**

27

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 9:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 26 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 9:

**GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 10:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 26 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 10:

**GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 11:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 26 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 11:

**GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGGC**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 12:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 26 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 12:

**GCTGGGGACT TTCCGGGAG GCGCGG**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 13:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 26 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 13:

**GCTGGGGACT TTCCGGGAG GCGTGG**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 14:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 26 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 14:

**GCTGGGGACT TTCCGGGGA GCGGTG**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 15:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 26 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 15:  
GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 16:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:  
(A) LÄNGD: 26 baspar  
(B) TYP: nukleinsyra  
(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel  
(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 16:

**GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC**

26

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 17:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:  
(A) LÄNGD: 33 baspar  
(B) TYP: nukleinsyra  
(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel  
(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 17:

**TTTCCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGGACT GGG**

33

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 18:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:  
(A) LÄNGD: 33 baspar  
(B) TYP: nukleinsyra  
(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel  
(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 18:

**CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC**

33

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 19:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 45 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 19:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT**

45

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 20:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 46 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 20:

**CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT**

46

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 21:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 46 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär



(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 21:

**CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT**

46

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 22:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 46 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 22:

**CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT**

46

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 23:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 45 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 23:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGAGGCGT GGCAAT**

45

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 24:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 44 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

- (ii) MOLEKYLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 24:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC GGGGAGCGTG GCCT**

44

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 25:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 44 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 25:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC GGGGAGGCGC GGCT**

44

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 26:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 45 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 26:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGAGAGGCGT GGACT**

45

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 27:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 46 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 27:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGGAGGCG TGGACT**

46

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 28:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 46 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 28:

**CTACAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGGAG**

46

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 29:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 43 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 29:

**CTACAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCTG CCT**

43

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 30:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 48 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

- (ii) MOLEKYLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 30:

**CTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG**

48

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 31:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 45 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 31:

**TTTCCAGGGA GGCCTGGCCT GGGCGGGACT GGGGAGTGGC GTCCC**

45

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 32:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 59 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 32:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG**

59

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 33:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 59 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 33:

**TTCCGCTGG GACTTTCCA GGGAGGCGT GCCTGGGCGG GACTGGGAG TGGCGTCCC**

59

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 34:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 70 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 34:

**CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GACTGGGGA**

60

**GTGGCGTCCC**

70

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 35:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 61 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 35:

**TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTTATCAC CGCAGATGGT**

60

T

61

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 36:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 64 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 36:

**TATCACCGCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT** 60

**GATA**

64

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 37:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 70 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 37:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA CTGGGGA** 60

**GTGGCGTCCC**

70

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 38:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 37 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 38:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGG**

37

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 39:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 22 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(ix) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 39:

**CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC**

22

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 40:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 103 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 40:

**CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG**

60

**TCAACACCGC CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA**

103

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 41:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 62 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MÅ

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 41:

**GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA** 60

**TA** 62

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 42:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 71 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 42:

**GATCCAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCG** 60

**GTGATACTGC A** 71

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 43:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 63 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 43:

**GTATCACCGC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG** 60

**TTG** 63



## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 44:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 21 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 44:

**GATCCGGGGG GATACCCCC G**

21

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 45:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 91 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 45:

**CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGGATAA ATATCTAACA CCGTGCGTGT**

60

**TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G**

91

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 46:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 53 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (x) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 46:

CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTGAACCG AAACCGTTA GTATAAAGC AGA

53

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 47:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 54 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 47:

AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCCGGACC GAAAACGGTG TATATAAAG ATGT

54

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 48:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 54 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 48:

AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTCAACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA

54

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 49:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 24 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRVNING: SEKV ID NR 49:

**GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG**

24

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 50:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 24 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRVNING: SEKV ID NR 50:

**TGTGCAACCG AATTCGGTTG CCTT**

24

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 51:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 24 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRVNING: SEKV ID NR 51:

**TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA**

24

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 52:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 24 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 52:

**TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTTG**

24

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 53:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 24 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 53:

**GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT**

24

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 54:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 52 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 54:

**GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC**

52

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 55:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 53 baspar
  - (B) TYP: nukleinsyra
  - (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 55:

**GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AAACAGCTAC AGCACACCCC CTC**

53

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 56:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 60 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 56:

**GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG**

60

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 57:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 68 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 57:

**CATACCAAG CCCTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTC TTGCACAGAG**

60

**ACTCAGTC**

68

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 58:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 77 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 58:

**TAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTATTCC AGCACCGTGT 60**  
**CCGTGGCCAC CGCAAG 77**

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 59:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 80 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 59

**ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAAC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60**  
**ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80**

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 60:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 266 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 60

CATATGCAAT ACAATGCATT ATACAACTG GACACATATA TATATTTGTG AAGAAGCATC	60
AGTAACTGTG GTAGAGGGTC AAGTTGACTA TTATGGTTA TATTATGTTC ATGAAGGAAT	120
ACGAACATAT TTTGTGCAGT TTAAAGATGA TGCAGAAAA TATAGTAAAA ATAAAGTATG	180
GGAACTTCAT GCGGGTGGTC AGGTAATATT ATGTCCTACA TCTGTGTTA GCAGCAACGA	240
AGTATCCTCT CCTGAAATTA TTAGGC	266

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 61:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 95 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 61

AGGATGTATA AAAAAACATG GATATACAGT GGAAGTGCAG TTTGATGGAG ACATATGCTA	60
TTAGGCAGCA CTTGGCCAAC CACCCCGCCG CGACC	95

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 62:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 81 baspar

(B) TYP: nukleinsyra

(C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 62

CATGTTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT	60
AATTTATCAC CGCAGATGGT T	81

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 63:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 322 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 63

Met Ala Asp Asp Asp Pro Tyr Gly Thr Gly Gln Met Phe His Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Leu Thr His ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Pro Glu  
 20 25 30  
 Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu Glu Gln Pro  
 35 40 45  
 Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr val Cys Glu Gly Pro Ser His  
 50 55 60  
 Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser ser Glu Lys Asn Lys Lys Ser Tyr Pro  
 65 70 75 80  
 Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr val Gly Pro Ala Lys Val Ile Val Gln  
 85 90 95  
 Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His Ser Leu Val  
 100 105 110  
 Gly Lys His Cys Glu Asp Gly val Cys Thr val Thr Ala Gly Pro Lys  
 115 120 125  
 Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val Thr Lys  
 130 135 140  
 Lys Lys val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu Ala Cys Ile  
 145 150 155 160  
 Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu val His Ser Asp Leu Ala Tyr Leu  
 165 170 175  
 Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg Glu Lys Glu  
 180 185 190  
 Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met Asp Leu Ser  
 195 200 205



Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser Thr Gly Ser  
 210 215 220  
 Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile Tyr Asp Ser  
 225 230 235 240  
 Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp Arg Thr  
 245 250 255  
 Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Lys  
 260 265 270  
 Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Glu Asn  
 275 280 285  
 Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His  
 290 295 300  
 Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Val Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Thr

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 64:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 325 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 64

Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met Phe His  
 1 5 10 15  
 Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val Phe Gln  
 20 25 30  
 Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu  
 35 40 45  
 Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly  
 50 55 60  
 Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys  
 65 70 75 80

Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val  
 85 90 95  
 Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His  
 100 105 110  
 Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala  
 115 120 125  
 Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His  
 130 135 140  
 Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu  
 165 170 175  
 Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg  
 180 185 190  
 Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met  
 195 200 205  
 Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser  
 210 215 220  
 Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile  
 225 230 235 240  
 Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met  
 245 250 255  
 Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu  
 260 265 270  
 Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu  
 275 280 285  
 Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr  
 290 295 300  
 Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Asn Ile Thr  
 325

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 65:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
- (A) LÄNGD: 268 aminosyror
  - (B) TYP: aminosyra
  - (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 65

Met Glu Pro Ala Asp Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Gln Pro Glu Trp Gly  
 1                   5                                   10                                   15  
 Glu Gln Glu Pro Gly Gly Ala Thr Pro Phe Val Glu Ile Leu Glu Gln  
           20                                   25                                   30  
 Pro Lys Gln Arg Gly Met Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser  
           35                                   40                                   45  
 Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser Thr Asp Ser Ala Arg Thr His  
           50                                   55                                   60  
 Pro Thr Ile Arg Val Asn His Tyr Arg Gly Pro Gly Arg Val Arg Val  
           65                                   70                                   75                                   80  
 Ser Leu Val Thr Lys Asp Pro Pro His Gly Pro His Pro His Glu Leu  
                           85                                   90                                   95  
 Val Gly Arg His Cys Gln His Gly Tyr Tyr Glu Ala Glu Leu Ser Pro  
           100                                   105                                   110  
 Asp Arg Ser Ile His Ser Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys  
           115                                   120                                   125  
 Lys Arg Glu Leu Glu Ala Ala Val Ala Glu Arg Ile Arg Thr Asn Asn  
           130                                   135                                   140  
 Asn Pro Phe Asn Val Pro Met Glu Glu Arg Gly Ala Glu Tyr Asp Leu  
           145                                   150                                   155                                   160  
 Ser Ala Val Arg Leu Cys Phe Gln Val Trp Val Asn Gly Pro Gly Gly  
                           165                                   170                                   175  
 Leu Cys Pro Leu Pro Pro Val Leu Ser Gln Pro Ile Tyr Asp Asn Arg  
           180                                   185                                   190  
 Ala Pro Ser Thr Ala Glu Leu Arg Ile Leu Pro Gly Asp Arg Asn Ser  
           195                                   200                                   205  
 Gly Ser Cys Gln Gly Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val  
           210                                   215                                   220  
 Gln Lys Glu Asp Ile Glu Val Arg Phe Trp Ala Glu Gly Trp Glu Ala  
           225                                   230                                   235                                   240  
 Lys Gly Ser Phe Ala Ala Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val  
                           245                                   250                                   255  
 Phe Arg Thr Pro Pro Phe Arg Glu Arg Ser Leu Arg  
           260                                   265

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 66:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 263 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 66

Met Asp Asp Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ser Glu Pro Ala Gln Ala  
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met  
 20 25 30

Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly  
 35 40 45

Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn  
 50 55 60

Gly Tyr Thr Gly Pro Gly Thr Val Arg Ile Ser Leu Val Thr Lys Asp  
 65 70 75 80

Pro Pro His Arg Pro His Pro His Glu Leu Val Gly Lys Asp Cys Arg  
 85 90 95

Asp Gly Tyr Tyr Glu Ala Asp Leu Cys Pro Asp Arg Ser Ile His Ser  
 100 105 110

Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln  
 115 120 125

Ala Ile ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe His Val Pro  
 130 135 140

Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys  
 145 150 155 160

Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ala Gly Arg Pro Leu Leu Leu Thr  
 165 170 175

Pro Val Leu Ser His Pro Ile Phe Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala  
 180 185 190

Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly  
 195 200 205

Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile  
 210 215 220

Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser  
 225 230 235 240

Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro  
 245 250 255

Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln  
 260

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 67:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:  
 (A) LÄNGD: 263 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 67

Met Asp Glu Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ala Glu Pro Ala Gln Ala  
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met  
 20 25 30

Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly  
 35 40 45

Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn  
 50 55 60

Gly Tyr Thr Gly Pro Gly Thr Val Arg Ile Ser Leu Val Thr Lys Asp  
 65 70 75 80

Pro Pro His Arg Pro His Pro His Glu Leu Val Gly Lys Asp Cys Arg  
 85 90 95

Asp Gly Phe Tyr Glu Ala Glu Leu Cys Pro Asp Arg Cys Ile His Ser  
 100 105 110

Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln  
 115 120 125

Ala Ile Ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe Gln Val Pro  
 130 135 140

Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys  
 145 150 155 160

Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ser Gly Arg Pro Leu Arg Leu Pro  
 165 170 175

Pro Val Leu Pro His Pro Ile Phe Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala  
 180 185 190

Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly  
 195 200 205

Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile  
 210 215 220

Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser  
 225 230 235 240

Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro  
 245 250 255

Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln  
 260

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 68:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 299 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 68

Met Phe Pro Asn Gln Asn Asn Gly Ala Ala Pro Gly Gln Gly Pro Ala  
 1 5 10 15

Val Asp Gly Gln Gln Ser Leu Asn Tyr Asn Gly Leu Pro Ala Gln Gln  
 20 25 30

Gln Gln Gln Leu Ala Gln Ser Thr Lys Asn Val Arg Lys Lys Pro Tyr  
 35 40 45

Val Lys Ile Thr Glu Gln Pro Ala Gly Lys Ala Leu Arg Phe Arg Tyr  
 50 55 60

Glu Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Val Asn Ser Thr  
 65 70 75 80

Pro Glu Asn Lys Thr Tyr Pro Thr Ile Glu Ile Val Gly Tyr Lys Gly  
 85 90 95  
 Arg Ala Val Val Val Val Ser Cys Val Thr Lys Asp Thr Pro Tyr Arg  
 100 105 110  
 Pro His Pro His Asn Leu Val Gly Lys Glu Gly Cys Lys Lys Gly Val  
 115 120 125  
 Cys Thr Leu Glu Ile Asn Ser Glu Thr Met Arg Ala Val Phe Ser Asn  
 130 135 140  
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Ile Glu Ala Ala Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Glu Glu Ile Arg Val Asp Pro Phe Lys Thr Gly Phe Ser His  
 165 170 175  
 Arg Phe Gln Pro Ser Ser Ile Asp Leu Asn Ser Val Arg Leu Cys Phe  
 180 185 190  
 Gln Val Phe Met Glu Ser Glu Gln Lys Gly Arg Phe Thr Ser Pro Leu  
 195 200 205  
 Pro Pro Val Val Ser Glu Pro Ile Phe Asp Lys Lys Ala Met Ser Asp  
 210 215 220  
 Leu Val Ile Cys Arg Leu Cys Ser Cys Ser Ala Thr Val Phe Gly Asn  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Ile Ile Leu Leu Cys Glu Lys Val Ala Lys Glu Asp Ile Ser  
 245 250 255  
 Val Arg Phe Phe Glu Glu Lys Asn Gly Gln Ser Val Trp Glu Ala Phe  
 260 265 270  
 Gly Asp Phe Gln His Thr Asp Val His Lys Gln Thr Ala Ile Thr Phe  
 275 280 285  
 Lys Thr Pro Arg Tyr His Thr Leu Asp Ile Thr  
 290 295

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 69:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 261 aminosyror
  - (B) TYP: aminosyra
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: peptid
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 69

Met Asp Phe Leu Thr Asn Leu Arg Phe Thr Glu Gly Ile Ser Glu Pro  
 1 5 10 15  
 Tyr Ile Glu Ile Phe Glu Gln Pro Arg Gln Arg Gly Thr Arg Phe Arg  
 20 25 30  
 Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser  
 35 40 45  
 Thr Asp Asn Asn Lys Thr Phe Pro Ser Ile Gln Ile Leu Asn Tyr Phe  
 50 55 60  
 Gly Lys Val Lys Ile Arg Thr Thr Leu Val Thr Lys Asn Glu Pro Tyr  
 65 70 75 80  
 Lys Pro His Pro His Asp Leu Val Gly Lys Gly Cys Arg Asp Gly Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Pro Glu Arg Gln Val Leu Ser Phe Gln Asn  
 100 105 110  
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Ile Ser  
 115 120 125  
 Leu Arg Ile Ser Lys Lys Asn Pro Phe Asn Val Pro Glu Glu Gln Leu  
 130 135 140  
 His Asn Ile Asp Glu Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe Gln  
 145 150 155 160  
 Ala Phe Leu Pro Asp Glu His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro Pro  
 165 170 175  
 Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala Glu  
 180 185 190  
 Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly Gly  
 195 200 205  
 Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Glu  
 210 215 220  
 Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro Phe  
 245 250 255  
 Leu Gly Asp Ile Thr  
 260



- (2) INFORMATION FÖR SEK V ID NR 70:
- (i) SEKVENSGENSKAPER:
- (A) LÄNGD: 262 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: Injäta
- (ii) MOLEKYLTYP: peptid
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTTIENS: NEJ
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEK V ID NR 70

Met Asp phe Leu Thr Asn Leu Arg phe Thr Gln Gly Ile Ser Gln Pro 1  
 5 10 15  
 Tyr Ile Gln Ile Phe Gln Pro Arg Gln Arg Gly Met Arg Phe Arg 20  
 25 30 35  
 Tyr Lys Cys Gln Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Gln His Ser 40  
 45 50  
 Thr Asp Asn Asn Lys Thr Phe Pro Ser Ile Gln Ile Leu Asn Tyr Phe 55  
 60 65  
 Gly Lys Val Lys Ile Arg Thr Thr Leu Val Thr Lys Asn Gln Pro Tyr 70  
 75 80  
 Lys Pro His Pro His Asp Leu Val Gly Lys Gly Cys Arg Asp Gly Tyr 85  
 90 95  
 Tyr Gln Ala Gln Phe Gly Pro Gln Arg Gln Val Leu Ser Phe Gln Asn 100  
 105 110  
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Tyr Asp Leu Lys Gln Ser Ile Ser 115  
 120 125  
 Leu Arg Ile Ser Lys Lys Ile Asn Pro Phe Asn Val Pro Gln Gln 130  
 135 140  
 Leu His Asn Ile Asp Gln Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe 145  
 150 155  
 Gln Ala Phe Leu Pro Asp Gln His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro 165  
 170 175  
 Pro Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala 180  
 185 190  
 Gln Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly 195  
 200 205  
 Gly Asp Gln Ile Phe Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile 210  
 215 220

Glu Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser  
 225 230 235 240

Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro  
 245 250 255

Phe Leu Gly Asp Ile Thr  
 260

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 71:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 314 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 71

Met Ser Asn Lys Lys Gln Ser Asn Arg Leu Thr Glu Gln His Lys Leu  
 1 5 10 15

Ser Gln Gly Val Ile Gly Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys Ala His Asp  
 20 25 30

Leu Ala Val Gly Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn  
 35 40 45

Glu Tyr Pro Gln Leu Ser Phe Arg Tyr Arg Asp Ser Ile Lys Lys Thr  
 50 55 60

Glu Ile Asn Glu Ala Leu Lys Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly Gly Thr  
 65 70 75 80

Leu Phe Val Ser Asn Ser Ser Ile Lys Pro Asp Gly Gly Ile Val Glu  
 85 90 95

Val Lys Asp Asp Tyr Gly Glu Trp Arg Val Val Leu Val Ala Glu Ala  
 100 105 110

Lys His Gln Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu Leu Val  
 115 120 125

Gly Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Gly Asn Ala Ile Glu  
 130 135 140

Arg Ser His Asn Ile Ser Glu Ile Ala Asn Phe Met Leu Ser Glu Ser  
 145 150 155 160

His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly Ser Asn Phe Leu Thr Glu  
 165 170 175  
 Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg Val Val Asn Leu Glu Tyr  
 180 185 190  
 Asn Ser Gly Ser Glu Ser His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly  
 195 200 205  
 Ser Asn Phe Leu Thr Glu Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg  
 210 215 220  
 Val Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Ala Ala Asn Tyr Gly Met Pro Ile Asn Ser Asn Leu Cys Ile  
 245 250 255  
 Asn Lys Phe Val Asn His Lys Asp Lys Ser Ile Met Leu Gln Ala Ala  
 260 265 270  
 Ser Ile Tyr Thr Gln Gly Asp Gly Arg Glu Trp Asp Ser Lys Ile Met  
 275 280 285  
 Phe Glu Ile Met Phe Asp Ile Ser Thr Thr Ser Leu Arg Val Leu Gly  
 290 295 300  
 Arg Asp Leu Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys  
 305 310

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 72:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 17 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 72

Cys Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Lys  
 1 5 10 15

Thr

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 73:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 168 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 73

Gly	Asp	Pro	Gly	Lys	Lys	Lys	Gln	His	Ile	Cys	His	Ile	Gln	Gly	Cys	1	5	10	15
Gly	Lys	Val	Tyr	Gly	Lys	Thr	Ser	His	Leu	Arg	Ala	His	Leu	Arg	Trp	20	25	30	
His	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Met	Cys	Thr	Trp	Ser	Tyr	Cys	Gly	Lys	35	40	45	
Arg	Phe	Thr	Arg	Ser	Asp	Glu	Leu	Gln	Arg	His	Lys	Arg	Thr	His	Thr	50	55	60	
Gly	Glu	Lys	Lys	Phe	Ala	Cys	Pro	Glu	Cys	Pro	Lys	Arg	Phe	Met	Arg	65	70	75	80
Ser	Asp	His	Leu	Ser	Lys	His	Ile	Lys	Thr	His	Gln	Asn	Lys	Lys	Gly	85	90	95	
Gly	Pro	Gly	Val	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Thr	Leu	Pro	Leu	Asp	Ser	Gly	100	105	110	
Ala	Gly	Ser	Glu	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Thr	Pro	Ser	Ala	Leu	Ile	Thr	115	120	125	
Thr	Asn	Met	Val	Ala	Met	Glu	Ala	Ile	Cys	Pro	Glu	Gly	Ile	Ala	Arg	130	135	140	
Leu	Ala	Asn	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asp	Leu	Gln	Ser	145	150	155	160
Ile	Asn	Ile	Ser	Gly	Asn	Gly	Phe									165			

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 74:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 181 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid



(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 75

Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln Val Lys Cys Tyr  
 1 5 10 15

Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr Glu Asn Cys Thr  
 20 25 30

Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu Arg Gln Gly Gln  
 35 40 45

Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln Arg Gln Asp Phe  
 50 55 60

Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile Ser Gly Phe Thr  
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Asp Phe  
 85

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 76:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 87 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 76

Cys Pro Cys Leu Leu Ile Gly Thr Ser Gly Asn Gly Asn Gln Val Lys  
 1 5 10 15

Cys Tyr Ser Phe Arg Val Lys Arg Trp His Asp Arg Asp Lys Tyr His  
 20 25 30

His Thr Thr Thr Trp Trp Ala Val Gly Gly Gln Gly Ser Glu Arg Pro  
 35 40 45

Gly Asp Ala Thr Val Ile Val Thr Phe Lys Asp Gln Ser Gln Arg Ser  
 50 55 60

His Phe Leu Gln Gln Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Ser Ala His Gly  
 65 70 75 80

Val Thr Met Thr Val Asp Phe  
 85

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 77:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 84 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 77

Pro	Pro	Val	Ile	Cys	Leu	Lys	Gly	Gly	His	Asn	Gln	Leu	Lys	Cys	Leu
1				5					10					15	
Arg	Tyr	Arg	Leu	Lys	Ser	Lys	His	Ser	Ser	Leu	Phe	Asp	Cys	Ile	Ser
			20					25					30		
Thr	Thr	Trp	Ser	Trp	Val	Asp	Thr	Thr	Ser	Thr	Cys	Arg	Leu	Gly	Ser
		35					40					45			
Gly	Arg	Met	Leu	Ile	Lys	Phe	Ala	Asp	Ser	Glu	Gln	Arg	Asp	Lys	Phe
		50				55					60				
Leu	Ser	Arg	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Thr	Thr	Gln	Val	Phe	Leu	Gly	Asn
65					70					75					80
Phe	Tyr	Gly	Leu												

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 78:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 84 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 78:

Pro Pro Val Ile Leu Val Arg Gly Gly Ala Asn Thr Leu Lys Cys Phe  
 1 5 10 15  
 Arg Asn Arg Ala Arg Val Arg Tyr Arg Gly Leu Phe Lys Tyr Phe Ser  
 20 25 30  
 Thr Thr Trp Ser Trp Val Ala Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Gly Arg  
 35 40 45  
 Ser Arg Met Leu Ile Leu Phe Thr Ser Ala Cys Gln Arg Glu Lys Pro  
 50 55 60  
 Asp Glu Thr Val Lys Tyr Pro Lys Gly Val Asp Thr Ser Tyr Gly Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Ser Leu

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 79:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 84 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 79

Pro Pro Val Val Cys Val Lys Gly Gly Ala Asn Gln Leu Lys Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Thr Gln Val Asp Phe Asp Ser Ile Ser  
 20 25 30  
 Thr Thr Trp His Trp Thr Asp Arg Lys Asn Thr Glu Arg Ile Gly Ser  
 35 40 45  
 Ala Arg Met Leu Val Lys Phe Ile Asp Glu Ala Gln Arg Glu Lys Phe  
 50 55 60  
 Leu Glu Arg Val Ala Leu Pro Arg Ser Val Ser Val Phe Leu Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Phe Asn Gly Ser



## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 80:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 84 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 80

Thr	Pro	Ile	Val	Gln	Leu	Gln	Gly	Asp	Ser	Asn	Cys	Leu	Lys	Cys	Phe
1			5					10						15	
Arg	Tyr	Arg	Leu	Asn	Asp	Lys	Tyr	Lys	His	Leu	Phe	Glu	Leu	Ala	Ser
			20				25						30		
Ser	Thr	Trp	His	Trp	Ala	Ser	Pro	Glu	Ala	Pro	His	Lys	Asn	Ala	Ile
			35				40					45			
Val	Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Arg	Gln	Gln	Phe	Leu	Asn
			50			55					60				
Ser	Val	Lys	Ile	Pro	Pro	Thr	Ile	Arg	His	Lys	Val	Gly	Phe	Met	Ser
					70					75					80
Leu	His	Leu	Leu												

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 81:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 84 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 81

Thr Pro Ile Val Gln Phe Gln Gly Glu Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe  
 1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Asn Arg Asp His Arg His Leu Phe Asp Leu Ile Ser  
 20 25 30

Ser Thr Trp His Trp Ala Ser Ser Lys Ala Pro His Lys His Ala Ile  
 35 40 45

Val Thr Val Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asp  
 50 55 60

Val Val Lys Ile Pro Pro Thr Ile Ser His Lys Leu Gly Phe Met Ser  
 65 70 75 80

Leu His Leu Leu

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 82:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 80 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 82

Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser Leu Lys Cys Leu  
 1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg Asp Ile Ser Ser  
 20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr  
 35 40 45

Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe Leu Asn Thr Val  
 50 55 60

Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr Asn Thr Met Tyr  
 65 70 75 80

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 83:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 80 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 83

Thr	Pro	Ile	Val	His	Leu	Lys	Gly	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Lys	Cys	Leu	15
1				5					10							
Arg	Tyr	Arg	Phe	Lys	Lys	His	Cys	Thr	Leu	Tyr	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	30
			20					25								
Thr	Trp	His	Trp	Thr	Gly	His	Asn	Tyr	Lys	His	Lys	Ser	Ala	Ile	Val	45
		35					40									
Thr	Leu	Thr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Asp	Gln	Phe	Leu	Ser	Gln	60
		50				55					60					
Val	Lys	Ile	Pro	Lys	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Phe	Met	Ser	Ile	80
65					70					75						

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 84:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 81 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: intern



(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 86

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
20 25 30

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 87:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 21 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 87

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn  
20

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 88:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 30 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 88

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
20 25 30

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 89:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 24 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 89

Gln	Leu	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ala	Asn	Lys	Cys	Cys	His	Val	Gly	Cys	Ile
1			5						10					15	

Lys	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Phe	Cys
			20				

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 90:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 33 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 90

Asp	Ser	Trp	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Lys	Ile	Cys	Gly	Arg	Glu	Leu	Val
1				5					10					15	

Arg	Ala	Gln	Ile	Ala	Ile	Cys	Gly	Met	Ser	Thr	Trp	Ser	Lys	Arg	Ser
			20					25					30		

Leu

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 91:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 24 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 91

Glu Glu Lys Met Gly Thr Ala Lys Lys cys cys Ala Ile Gly Cys Ser  
1 5 10 15

Thr Glu Asp Phe Arg Met Val Cys  
20

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 92:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 40 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 92

Arg Pro Asn Trp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Cys Gly Arg Asp Leu Ile  
1 5 10 15

Arg Ala Phe Ile Tyr Leu cys Gly Gly Thr Arg Trp Thr Arg Leu Pro  
20 25 30

Asn Phe Gly Asn Tyr Pro Ile Met  
35 40

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 93:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 182 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ







## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 96:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 83 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 96

```

Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser
1          5          10          15
Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg
20          25          30
Asp Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr
35          40          45
Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe
50          55          60
Leu Asn Thr Val Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr
65          70          75          80
Met Thr Met

```

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 97:

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 84 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 97

Ser Gly Asn Thr Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu Ser Asn Ser  
 1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

Ser Met Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys  
 35 40 45

Asn Gly Ile Val Thr Val Thr Phe Val Thr Glu Gln Gln Gln Gln Met  
 50 55 60

Phe Leu Gly Thr Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile Ser Thr Gly  
 65 70 75 80

Phe Met Thr Leu

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 98:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:  
 (A) LÄNGD: 89 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 98

Ser Gly Asn Thr Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln  
 1 5 10 15

Val Lys Cys Tyr Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr  
 20 25 30

Glu Asn Cys Thr Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu  
 35 40 45

Arg Gln Gly Gln Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln  
 50 55 60

Arg Gln Asp Phe Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile  
 65 70 75 80

Ser Gly Phe Thr Ala Ser Leu Asp Phe  
 85

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 99:

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 7 aminosyror
  - (B) TYP: aminosyra
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: peptid
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (v) FRAGMENTTYP: C-terminal
- (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 99

Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala  
 1 5

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 100

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 4 aminosyror
  - (B) TYP: aminosyra
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: peptid
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 100:

Asn Ser Asn Thr  
 1

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 101

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 4 aminosyror
  - (B) TYP: aminosyra
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: peptid
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 101

**ser Gly Asn Thr**

**1**

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 102

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 6 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 102

**ser ser Gly ser ser Gly**

**1**

**5**

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 103

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 15 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 103

**Cys Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg**

**1**

**5**

**10**

**15**

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 104

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 66 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 104

Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln
1				5					10					15	
Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys
			20					25					30		
Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly
		35					40					45			
Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr
	50					55					60				
Thr	Ala														
65															

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 105

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 66 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 105

Met	Glu	Gln	Glu	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln
1				5					10					15	

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
 20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
 35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
 50 55 60

Thr Ala  
 65

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 106

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 66 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: protein

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 106

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
 20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
 35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
 50 55 60

Thr Ala  
 65

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 107

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 96 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: peptid

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 107

```

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
1          5          10          15
Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
          20          25          30
Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
          35          40          45
Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
          50          55          60
Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
65          70          75          80
Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser
          85          90          95

```

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 108

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 96 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 108

```

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
1          5          10          15
Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
          20          25          30
Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
          35          40          45
Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
          50          55          60
Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
65          70          75          80

```



Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Cys Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser  
 85 90 95

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 109

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:  
 (A) LÄNGD: 180 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 109

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Asn Met Ser Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp  
 20 25 30  
 Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val  
 35 40 45  
 Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe  
 50 55 60  
 Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala  
 85 90 95  
 Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr  
 100 105 110  
 Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr  
 115 120 125  
 Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys  
 130 135 140  
 Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln  
 145 150 155 160  
 Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly  
 165 170 175  
 Phe Met Ser Ile  
 180

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 110

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 113 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: protein

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 110

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	1	5	10	15
Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ser	Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	20	25	30	
Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	35	40	45	
Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	50	55	60	
Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	65	70	75	80
Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	85	90	95	
Cys	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	His	Arg	Ile	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	100	105	110	

Thr

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 111

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 292 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: protein

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 111

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Met Ser  
 20 25 30  
 Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
 35 40 45  
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
 50 55 60  
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
 85 90 95  
 Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Ile Val Pro Gln Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu Gly  
 115 120 125  
 Cys Lys Leu Asp Leu Lys Thr Ile Ala Leu Arg Ala Arg Asn Ala Glu  
 130 135 140  
 Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu Pro  
 145 150 155 160  
 Arg Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr Gly  
 165 170 175  
 Ala Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala Arg  
 180 185 190  
 Val Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys Ile  
 195 200 205  
 Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu  
 210 215 220  
 Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu Leu  
 245 250 255  
 Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg Ala  
 260 265 270  
 Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly Phe  
 275 280 285  
 Arg Lys Thr Thr  
 290

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 112

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 273 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 112

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Met Ser  
 20 25 30  
 Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Glu  
 35 40 45  
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
 50 55 60  
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
 65 70 75 80  
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
 85 90 95  
 Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys  
 100 105 110  
 Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr  
 115 120 125  
 Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe  
 130 135 140  
 Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys  
 165 170 175  
 Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His  
 180 185 190

Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser  
195 200 205

Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly  
210 215 220

Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu  
225 230 235 240

Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn  
245 250 255

Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly  
260 265 270

Phe

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 113

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LÄNGD: 421 aminosyror

(B) TYP: aminosyra

(D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 113

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile  
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Met Ser Met Arg Gln Arg Ile Thr  
20 25 30

Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln Thr Lys Thr Ala Lys Asp  
35 40 45

Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg  
50 55 60

Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Val Tyr Ala Glu Glu  
65 70 75 80

Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Asn Lys Lys  
85 90 95

Thr Thr Ala Met Ala Asp Asp Asp Pro Tyr Gly Thr Gly Gln Met Phe  
100 105 110

His Leu Asn Thr Ala Leu Thr His Ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr  
 115 120 125  
 Ser Pro Glu Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu  
 130 135 140  
 Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly  
 145 150 155  
 Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys  
 165 170 175  
 Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val  
 180 185 190  
 Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His  
 195 200 205  
 Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala  
 210 215 220  
 Gly Pro Lys Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His  
 225 230 235 240  
 Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu  
 245 250 255  
 Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Ser Asp Leu  
 260 265 270  
 Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg  
 275 280 285  
 Glu Lys Glu Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met  
 290 295 300  
 Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile  
 325 330 335  
 Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met  
 340 345 350  
 Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu  
 355 360 365  
 Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu  
 370 375 380  
 Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr  
 385 390 395 400  
 Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys  
 405 410 415  
 Asp Val Asn Ile Thr  
 420

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 114

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 391 aminosyror  
 (B) TYP: aminosyra  
 (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

## (xi) SEKVENSBEKRVNING: SEKV ID NR 114

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
 20 25 30  
 Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
 35 40 45  
 Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
 50 55 60  
 Thr Ala Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met  
 65 70 75 80  
 Phe His Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val  
 85 90 95  
 Phe Gln Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln  
 100 105 110  
 Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys  
 115 120 125  
 Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn  
 130 135 140  
 Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala  
 145 150 155 160  
 Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His  
 165 170 175  
 Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val  
 180 185 190

Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile  
 195 200 205  
 Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met  
 210 215 220  
 Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly  
 245 250 255  
 Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys  
 260 265 270  
 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro  
 275 280 285  
 Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp  
 290 295 300  
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val  
 305 310 315 320  
 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr  
 325 330 335  
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr  
 340 345 350  
 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser  
 355 360 365  
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys  
 370 375 380  
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr  
 385 390

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 115

- (i) SEKVENSEGENSKAPER:
  - (A) LÄNGD: 391 aminosyror
  - (B) TYP: aminosyra
  - (D) TOPOLOGI: linjär
- (ii) MOLEKYLTYP: protein
- (iii) HYPOTETISK: NEJ
- (iv) ANTISENS: NEJ
- (v) FRAGMENTTYP: N-terminal





Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp  
 290 295 300

Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val  
 305 310 315 320

Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr  
 325 330 335

Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr  
 340 345 350

Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser  
 355 360 365

Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys  
 370 375 380

Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr  
 385 390

(2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 116

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 241 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

(ii) MOLEKYLTYP: protein

(iii) HYPOTETISK: NEJ

(iv) ANTISENS: NEJ

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEKVENSBEKRIVNING: SEKV ID NR 116

Met Arg Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys  
 20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly  
 35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr  
 50 55 60

Thr Ala Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys  
 65 70 75 80

Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr  
 85 90 95

Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp His Thr Gly Glu Arg Pro Phe  
 100 105 110

Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu  
 115 120 125

Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys  
 130 135 140

Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His  
 145 150 155 160

Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser  
 165 170 175

Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly  
 180 185 190

Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu  
 195 200 205

Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn  
 210 215 220

Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly  
 225 230 235 240

Phe

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 117

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 10 baspar
- (B) TYP: nukleinsyra
- (C) STRÄNGEGENSKAPER: dubbel
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: cDNA

## (iii) HYPOTETISK: NEJ

## (iv) ANTISENS: NEJ

## (xi) SEKVENSBESKRIVNING: SEKV ID NR 117

GGGAMTNYCC

10

## (2) INFORMATION FÖR SEKV ID NR 118

## (i) SEKVENSEGENSKAPER:

- (A) LÄNGD: 72 aminosyror
- (B) TYP: aminosyra
- (D) TOPOLOGI: linjär

## (ii) MOLEKYLTYP: protein



**PATENTKRAV**

1. Probnukleinsyra (PNA) innehållande två olika sekvenser som är:
  - (a) en enkelsträngad sekvens (1/2 TBR) som kan, under hybridiserande betingelser, bilda en hybrid (TBR) med en nukleinsyra (TNA); och
  - (b) en enkelsträngad sekvens (1/2 BBR), som kan, under hybridiserande betingelser, bilda en hybrid (BBR) som är en enkelsträngad sekvens som föreligger i en booster-nukleinsyra (BNA);varvid TBR kan binda med hög affinitet till en substans (TBA), som kan särskilja mellan en parad hybrid (TBR) och en hybrid som har oparade nukleotider, och varvid BBR kan binda med hög affinitet till en substans (BBA), som kan särskilja mellan en parad hybrid (BBR) och en hybrid som har oparade nukleotider.
  
2. PNA enligt krav 1, varvid TBR innehåller en eller flera igenkännande ställen för ett nukleinsyrabindande protein, ett DNA-bindande protein, ett DNA-RNA-hybridbindande protein eller ett RNA-bindande protein.
  
3. PNA enligt krav 2, varvid TBR är ett igenkänningsställe för ett nukleinsyra-bindande protein, som föreligger i genomet i en patogen, eller är ett bindningsställe associerat med ett patogent tillstånd i ett ryggradsdjursgenom eller är ett igenkännande ställe för ett nukleinsyrabindande protein, som föreligger i genomet hos den organism, som kontaminerar en fermentationsprocess.
  
4. PNA enligt krav, vari TBR är HIV-LTR eller en del därav.
  
5. Förfarande för att bestämma eller lokalisera en specifik TNA-sekvens, omfattande stegen:
  - (a) hybridisering av TNA med PNA enligt krav 1;
  - (b) hybridisering av PNA med BNA som innehåller 1/2 BBR, vars sekvens är komplementär till en 1/2 BBR-sekvens i PNA;
  - (c) sätta till produkterna från steg (a) och (b) som innehåller en TBR och en BBR till en yta, vätska eller ett medium som innehåller en TBA;

- (d) sätta till BBAs till blandningen med (c), vari BBA innehåller:
  - (i) en molekyl eller en del av en molekyl, som selektivt kan binda till en BBR;
  - (ii) en bestämbar indikator; och
- (e) bestämma signal alstrad av indikatorn fäst vid BBA.

6. Förfarande enligt krav 5, vari indikatorn är ett protein, inkluderande enzymer som kan katalysera reaktioner, som leder till produktion av färgade reaktionsprodukter; en radionukleotid; färgade kulor.

7. In *vitro*-förfarande för förstärkning av signalen som erhålles genom bindning av PNA enligt krav 1 till en TNA, som omfattar bindning av BNAs till PNA-TNA-hybriden och bindning av märkta BBAs till BNAs.

8. Förfarande för att bestämma eller lokalisera specifika nukleinsyrasekvenser med hög grad av känslighet och specificitet som omfattar:

- (a) sätta PNAs såsom definieras i krav 1, som innehåller en 1/2 BBR och en 1/2 TBR, till ett prov som innehåller eller antas innehålla TNAs, som innehåller 1/2 TBR-sekvenser, för att bilda ett komplex som har målbindande regioner, TBRs, bildade genom hybridisering av komplementära 1/2 TBRs som föreligger i PNAs respektive TNAs;
- (b) binda de TBRs som bildas i steg (a) till en immobiliserad TBA för att bilda ett TBA-TNA-PNA-komplex;
- (c) sätta booster-nukleinsyror, BNAs, som innehåller booster-bindande regioner, 1/2 BBRs, till komplexet bildat i steg (b) så att 1/2 BBRs i BNAs hybridiserar med 1/2 BBR-sekvenserna som föreligger i PNAs eller till 1/2 BBRs som föreligger i BNAs som redan bundit till PNA, för att bilda BBRs, så att TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub> komplex bildas;

- (d) sätta hårnålsnukleinsyror, HNAs, innehållande 1/2 BBR-sekvenser till komplexet som bildades i steg (c) så att 1/2 BBRs i HNAs hybridiserar med eventuell tillgängliga 1/2 BBR-sekvenser som föreligger i BNAs i komplexet i steg (c), varvid förlängningen av BNAs på TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>-komplexen i steg (c) skyddas för att bilda TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>-HNA-komplex;
- (e) sätta booster-bindande sammansättningar, BBAs, länkade till indikatorenheter, till TBA-TNA-PNA-(BNA)<sub>n</sub>-HNA-komplex bildade i steg (d) för att bilda TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)<sub>n</sub>-HNA-komplex; och
- (f) bestämma de signaler som produceras med indikatorenheter länkade till TBAs, TNAs, BNAs, BBAs eller HNAs i TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)<sub>n</sub>-HNA-komplexen i steg (e);

varvid TNA innehåller:

- (i) en eller flera specifika 1/2 TBR-nukleinsyrasekvenser, varvid närvaron eller frånvaron av ett speciellt prov skall bekräftas;

BNA innehåller:

- (i) en 1/2 BBR, såsom visas i fig 1(IIb), som har en sekvens som är komplementär till en 1/2 BBR-sekvens i en PNA och som kan, under hybridiserande betingelser, bilda en hybrid, BBR med PNA;
- (ii) en OSA, som är ingen vidhäftad bärare eller indikator eller en vidhäftad bärare eller annat medel för lokalisering, inkluderande, men inte begränsad till, vidhäftning till pärlor, polymerer, och ytor och/eller indikatorer;
- (iii) ytterligare hybridiseringsställen, 1/2 BBRs för andra BNAs; och
- (iv) sekvenser, 1/2 BBRs, som kan hybridisera till BNAs som redan hybridiserar till PNA;

BBA innehåller:

- (i) en molekyl eller en andel av en molekyl som selektivt kan binda till en BBR; och
- (ii) en OSA som inte är vidhäftad bärare och/eller indikator, eller en vidhäftad bärare eller andra medel för lokalisering, inkluderande, men inte begränsad till, vidhäftning till pärlor, polymerer och ytor och/eller indikatorer;

och TBA innehåller:

- (i) en molekyl eller en del av en molekyl som selektivt kan binda till en TBR; och
- (ii) ingen vidhäftad bärare och/eller indikator, eller en vidhäftad bärare eller annat medel för lokalisering, inkluderande, men inte begränsat till, vidhäftning till pärlor, polymerer och ytor och/eller indikatorer.

9. Hybridiseringsförfarande i fast fas för bestämning av närvaron av en målpolynukleotid med användning av en PNA som definieras i krav 1, omfattande: immobilisering av en målpolynukleotid, om den finns i ett testprov, direkt eller via en mellanliggande infångande struktur, på en fast fas vid ett infångningsställe; före, under eller efter immobiliseringen, vidhäftning av en bestämbar markör till målpolynukleotiden, om den föreligger; och bestämning av markören, om den finns, vid infångningsstället; varvid immobiliseringen omfattar användning av en målbindande sammansättning (TBA), som binder endast till en unik hybrid av målnukleinsyran, och en probnukleinsyra (PNA) som innehåller en 1/2 BBR som kan binda en booster-nukleinsyra (BNA) som innehåller en enkelsträngad komplementär 1/2 BBR som, vid hybridisering med 1/2 BBR i PNA, bildar en BBR som kan binda märkta boosterbindande sammansättningar (BBAs), varvid termerna TBA, BNA, BBR och BNA är som definieras i krav 1.

10. Diagnostiskt eller rättsmedicinskt testkit för bestämning av en målnukleinsyrasekvens i ett prov av nukleinsyra, som omfattar första och andra nukleinsyraprober och första och andra nukleinsyrabindande proteiner, varvid den första proben har en sekvens som är komplementär till målsekvensen och ytterligare sekvens; det första bindande proteinet är specifikt för den första prob-målduplexen; den andra proben är komplementär till den ytterligare sekvensen på den första proben; och det andra bindande proteinet binder specifikt till den första prob-andra prob-duplexen, och är märkt med en bestämbar markör.



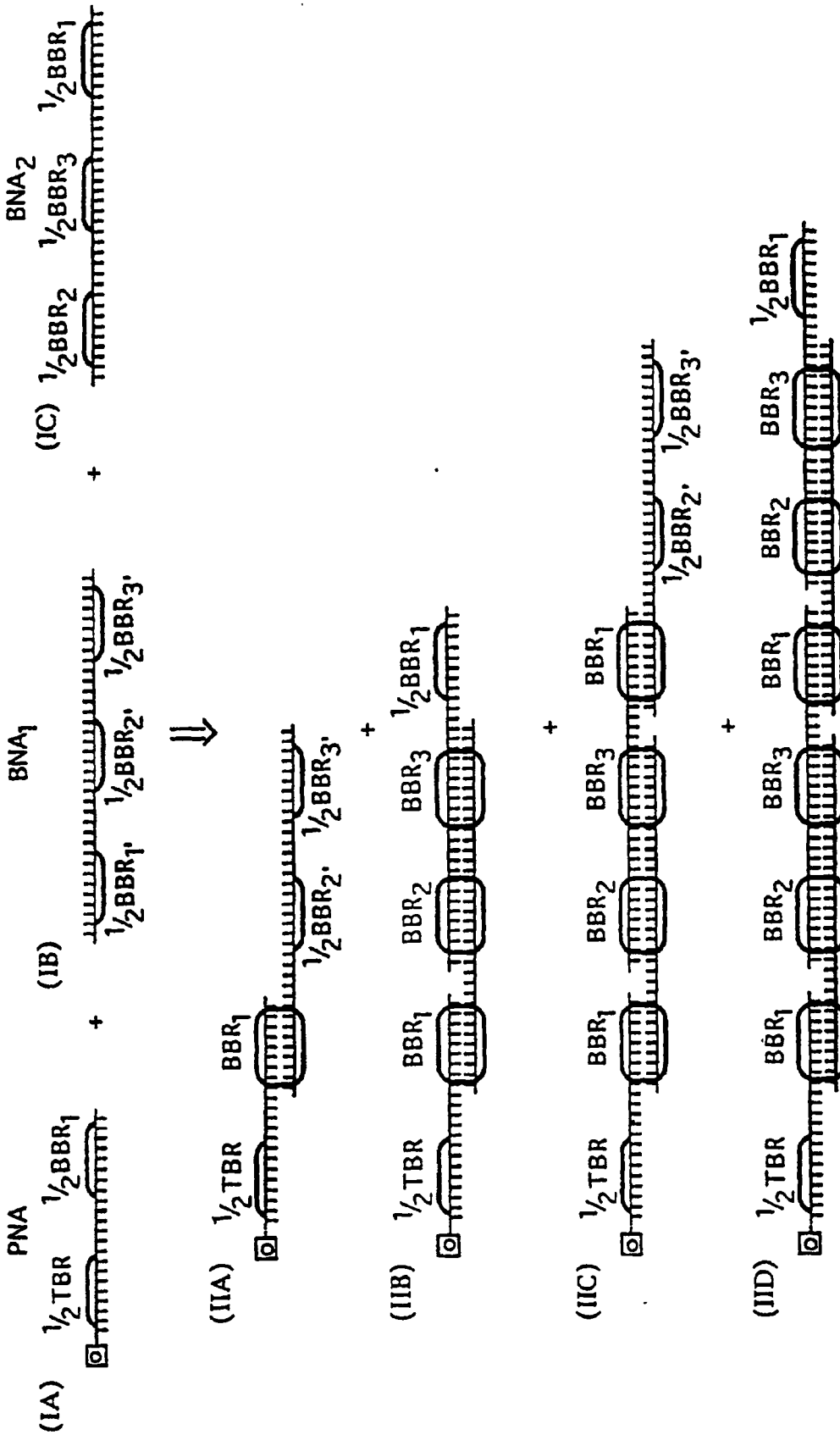
11. Kit enligt krav 10, vari den första proben är komplementär till HIV LTR och, efter hybridisering av den första proben med HIV LTR, bildas ett bindningsställe för NF-kB eller en subenhet därav, SP1, TATA-bindande protein, HIV-bestämning I, II, III eller IV, eller HIV-lock.

12. Kit enligt krav 11, vari det första bindande proteinet är NF-kB eller en subenhet därav, SP1, TATA-bindande protein, HIV-bestämning I, II, III eller IV, eller HIV-lock.

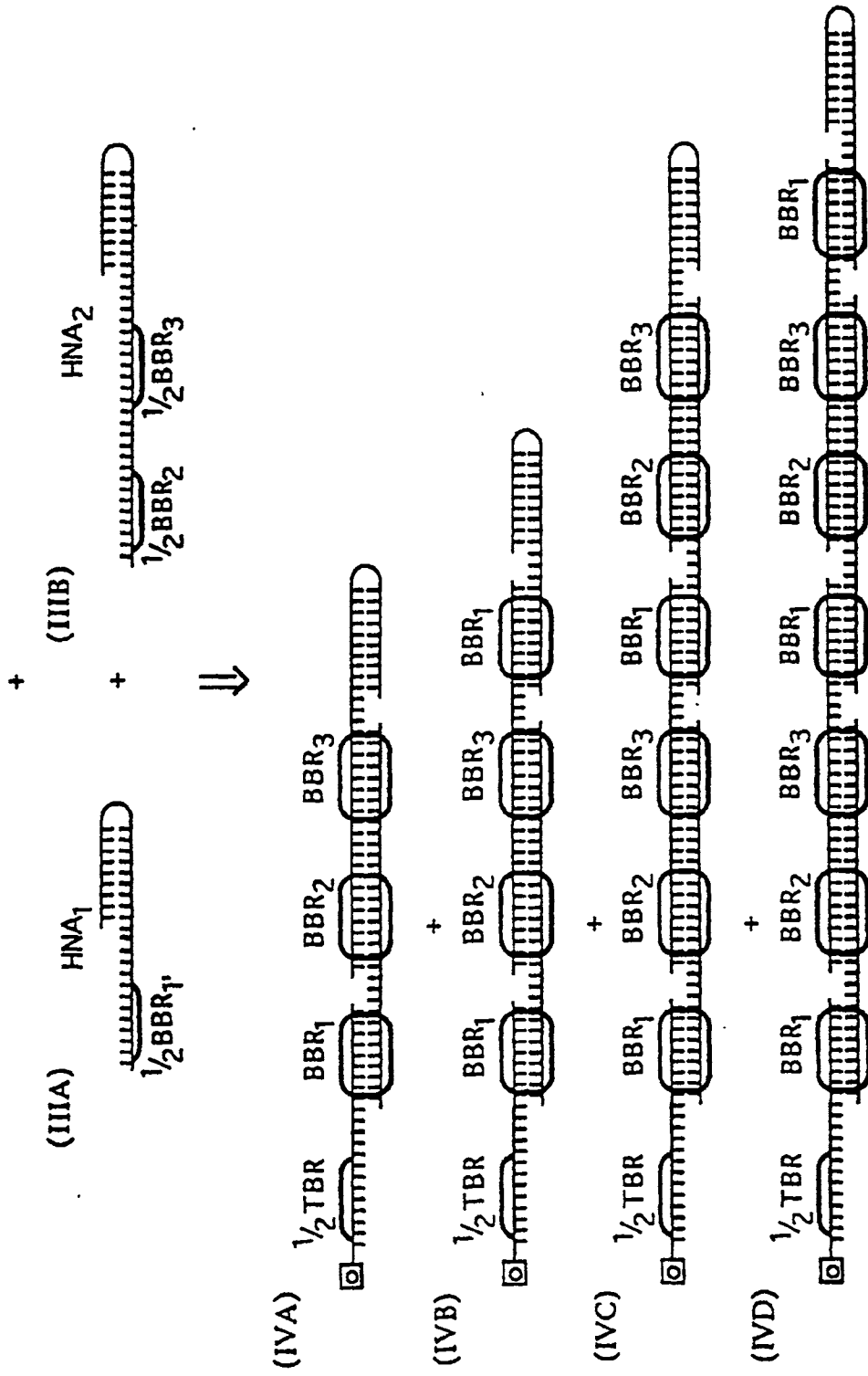
13 Kit enligt något av kraven 10-12, vari den första proben, förutom att den är komplementär till HIV LTR, innehåller en sekvens som kodar för bakteriofag lambda vänstra eller högra operatorm, och en andra prob innehåller sekvens komplementär till den bakteriofag lambda vänstra eller högra operatorsekvensen, så att vid hybridisering av de första och andra proberna bildas ett bindningsställe för bakteriofag lambda CI-repressorproteinet, bakteriofag lambda *cro*-proteinet eller ett derivat eller homolog därav.

14. Kit enligt krav 13, vari det andra bindande proteinet är bakteriofag lambda CI-repressorproteinet, bakteriofag lambda *cro*-proteinet eller ett derivat eller en homolog därav.

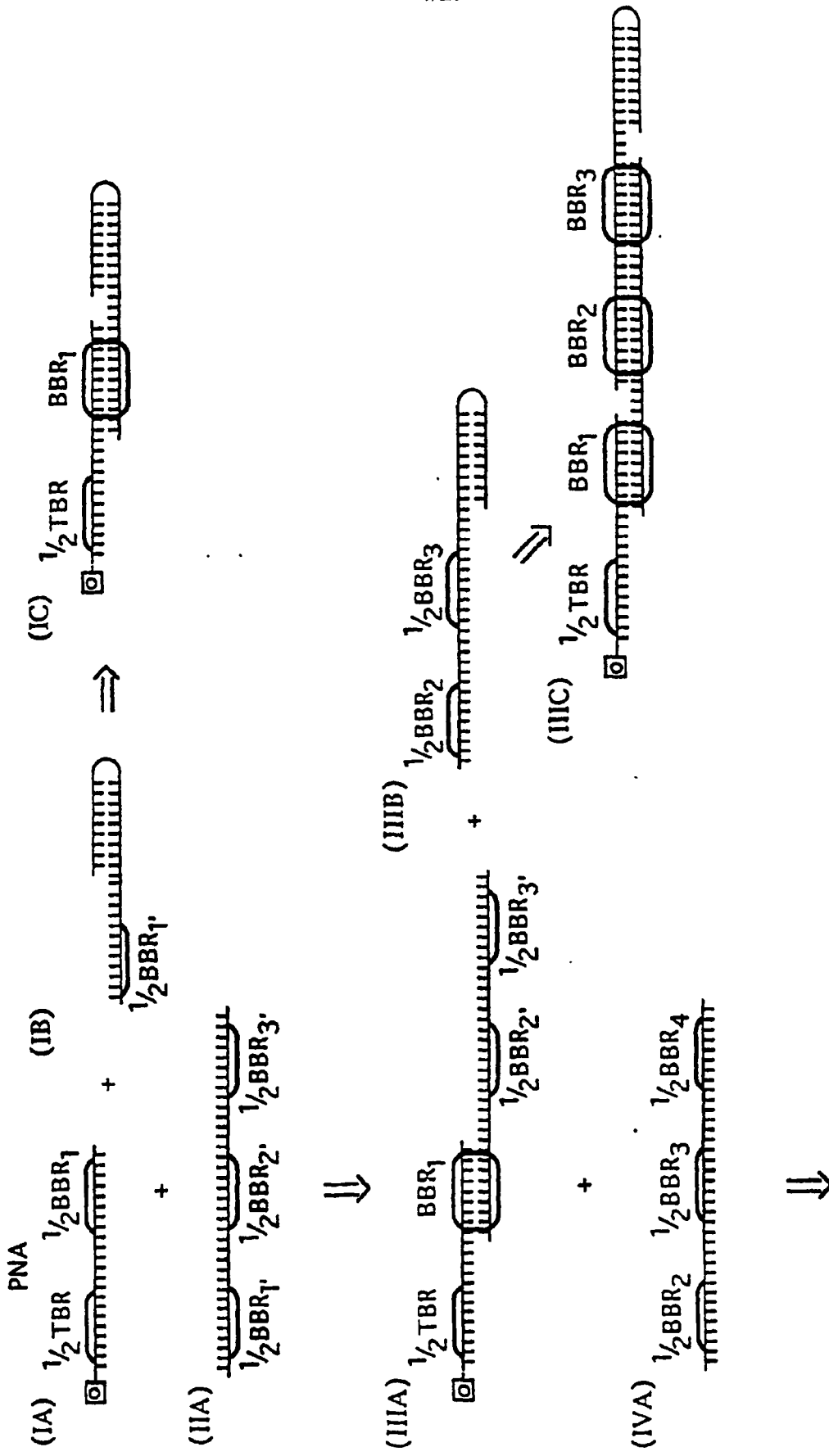




FIGUR 2A



FIGUR 2B



FIGUR 2C

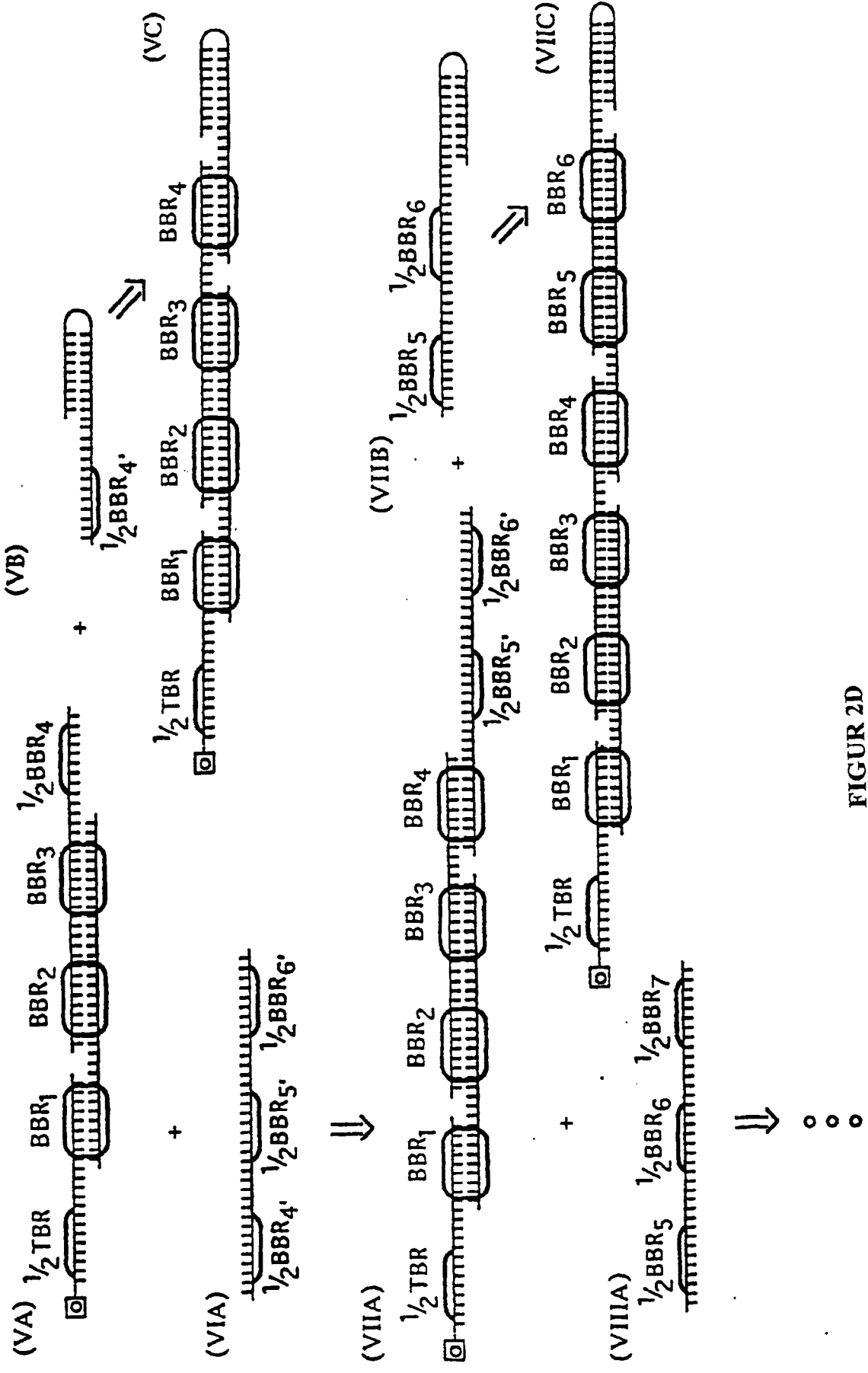
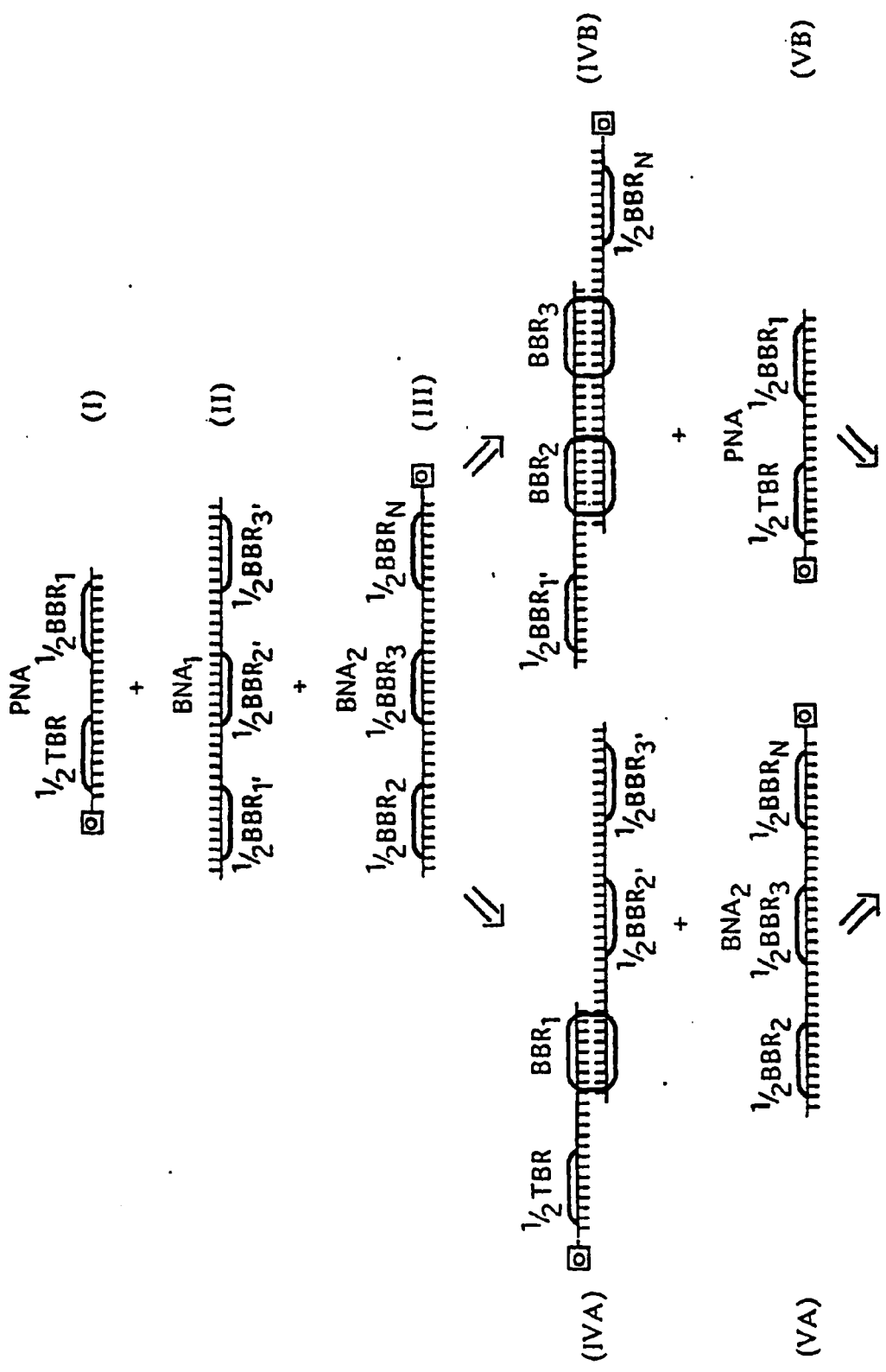
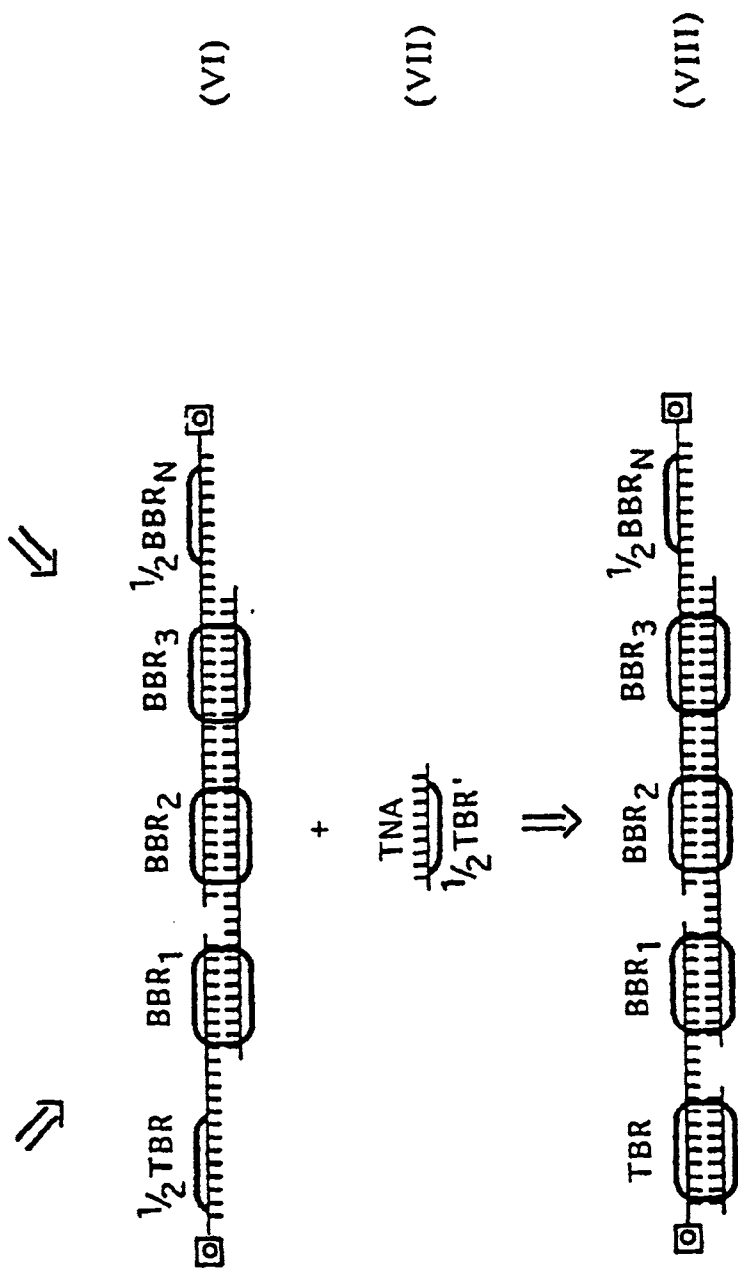


FIGURE 2D

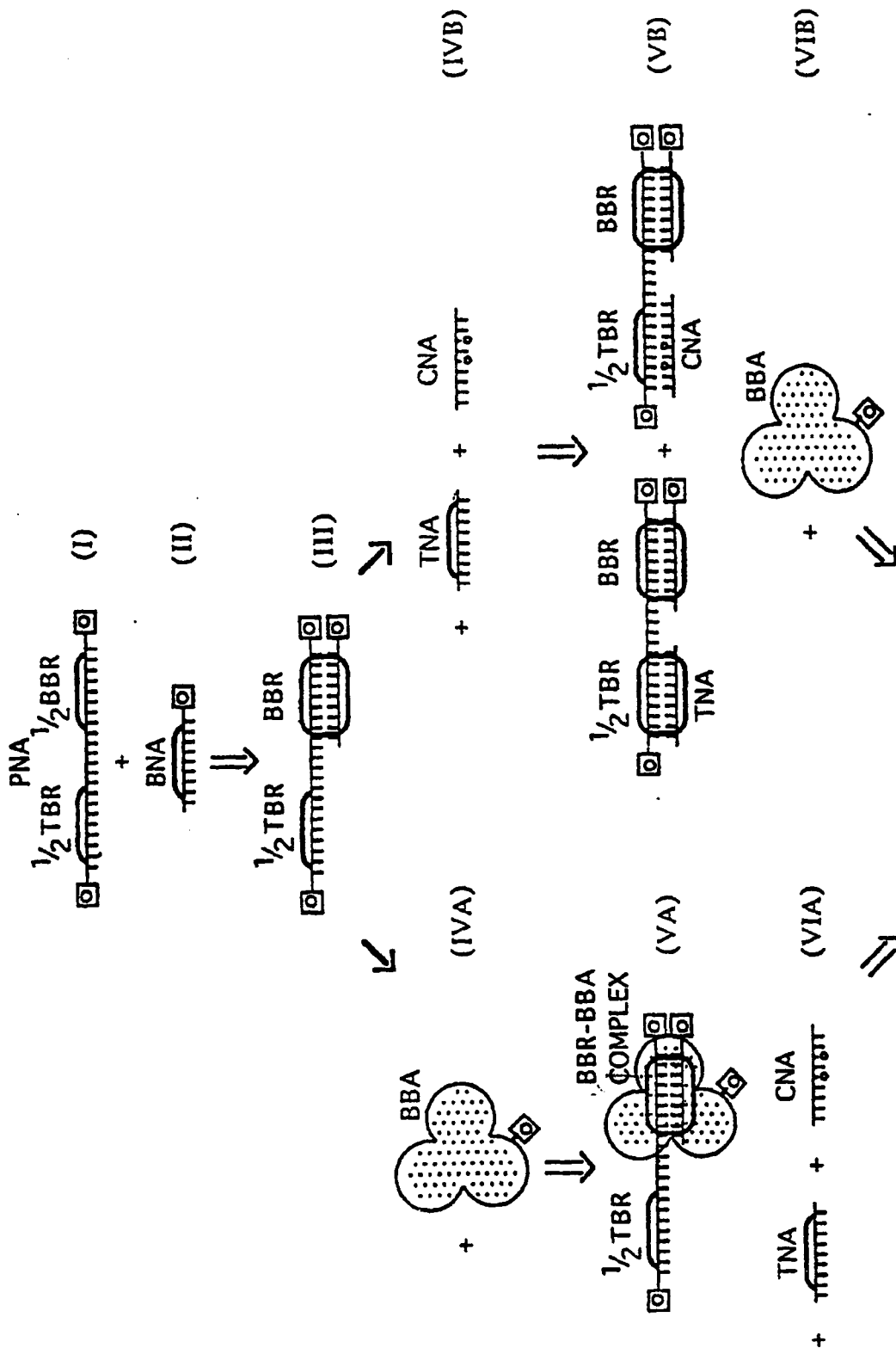


FIGUR 3A



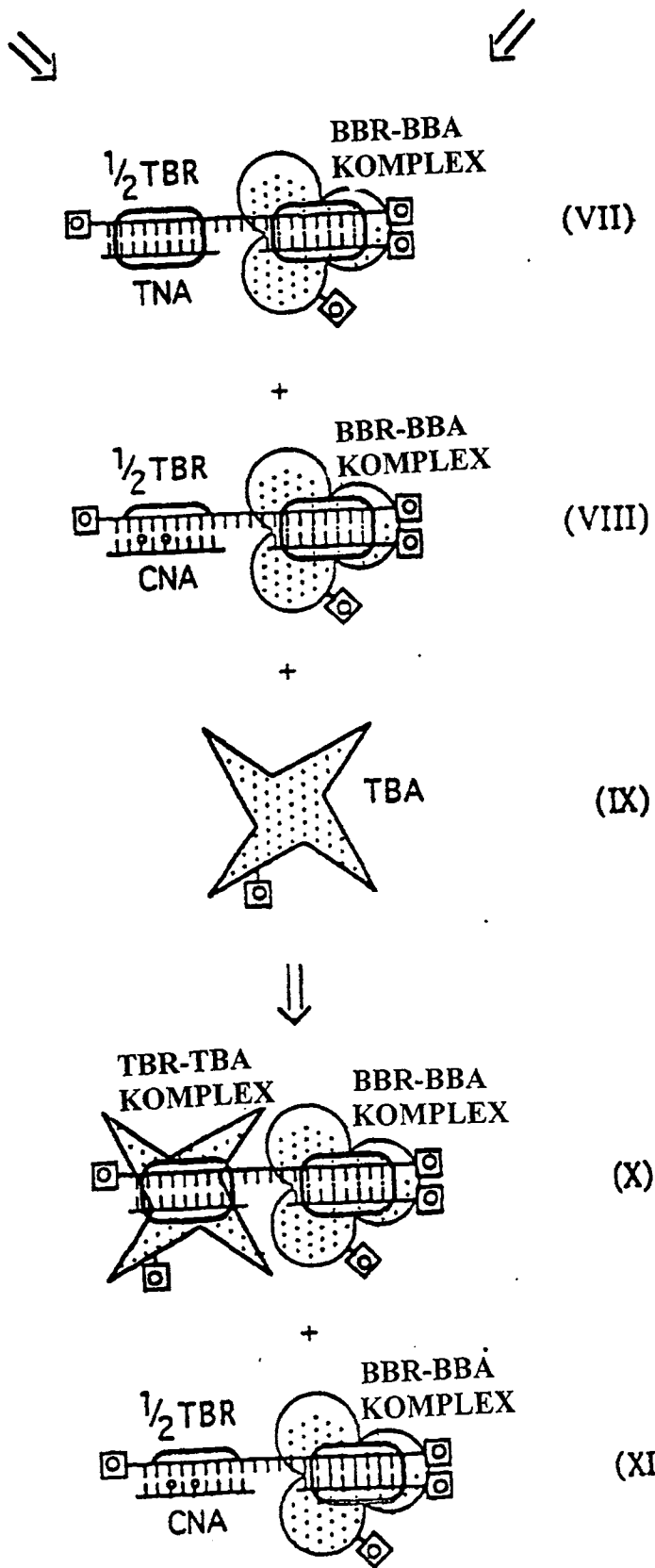
FIGUR 3B





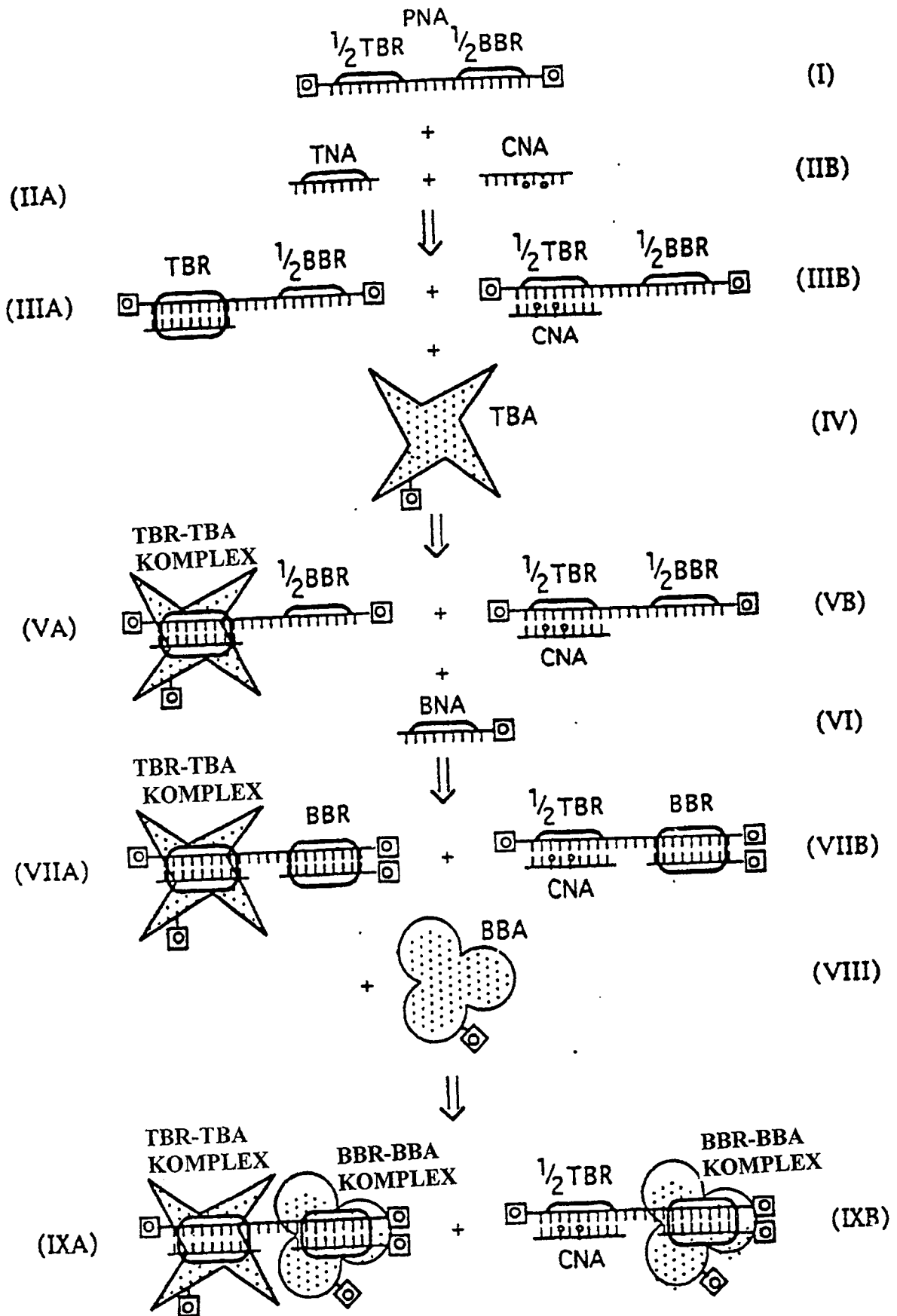
FIGUR 4A

9/29



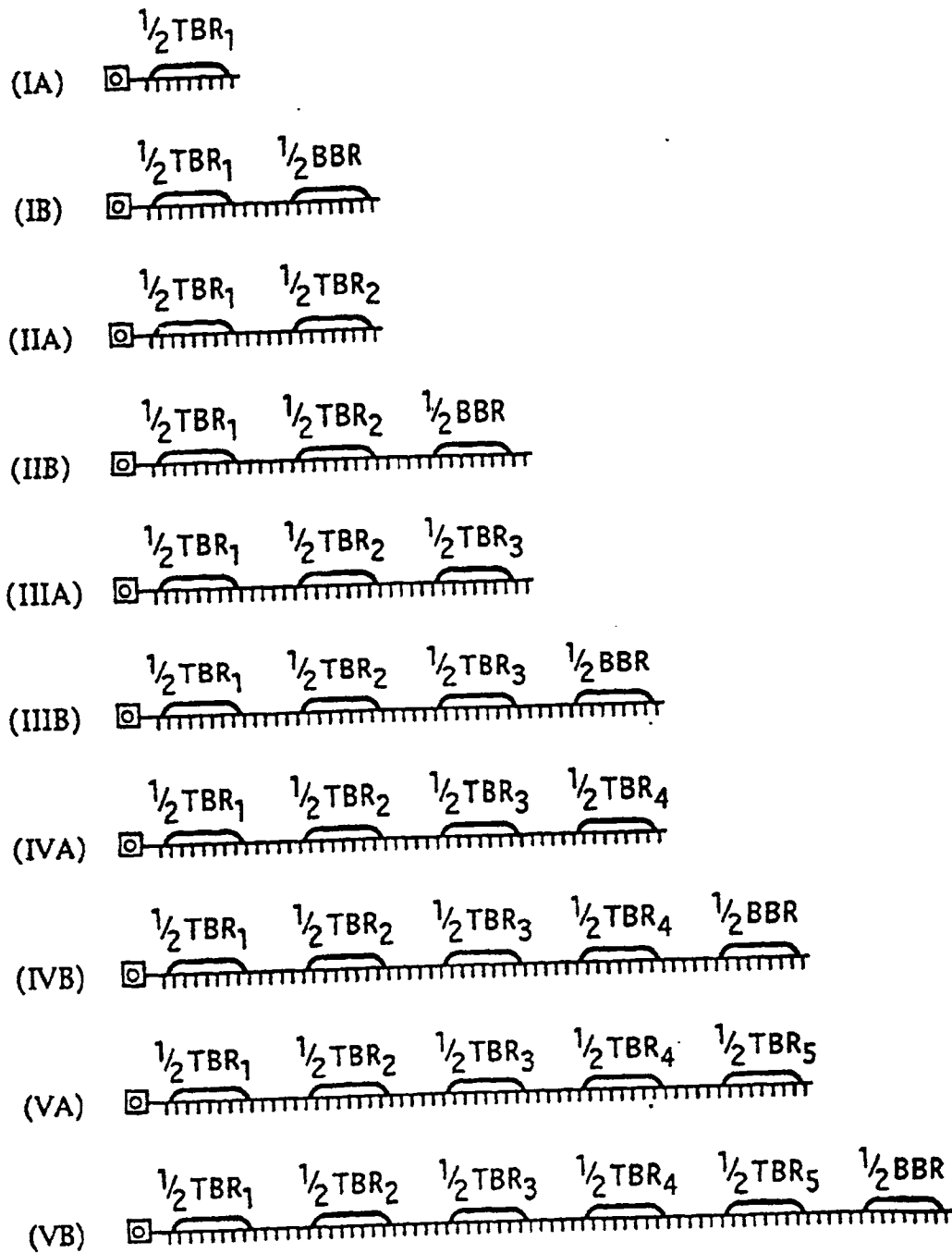
FIGUR 4B

10/29

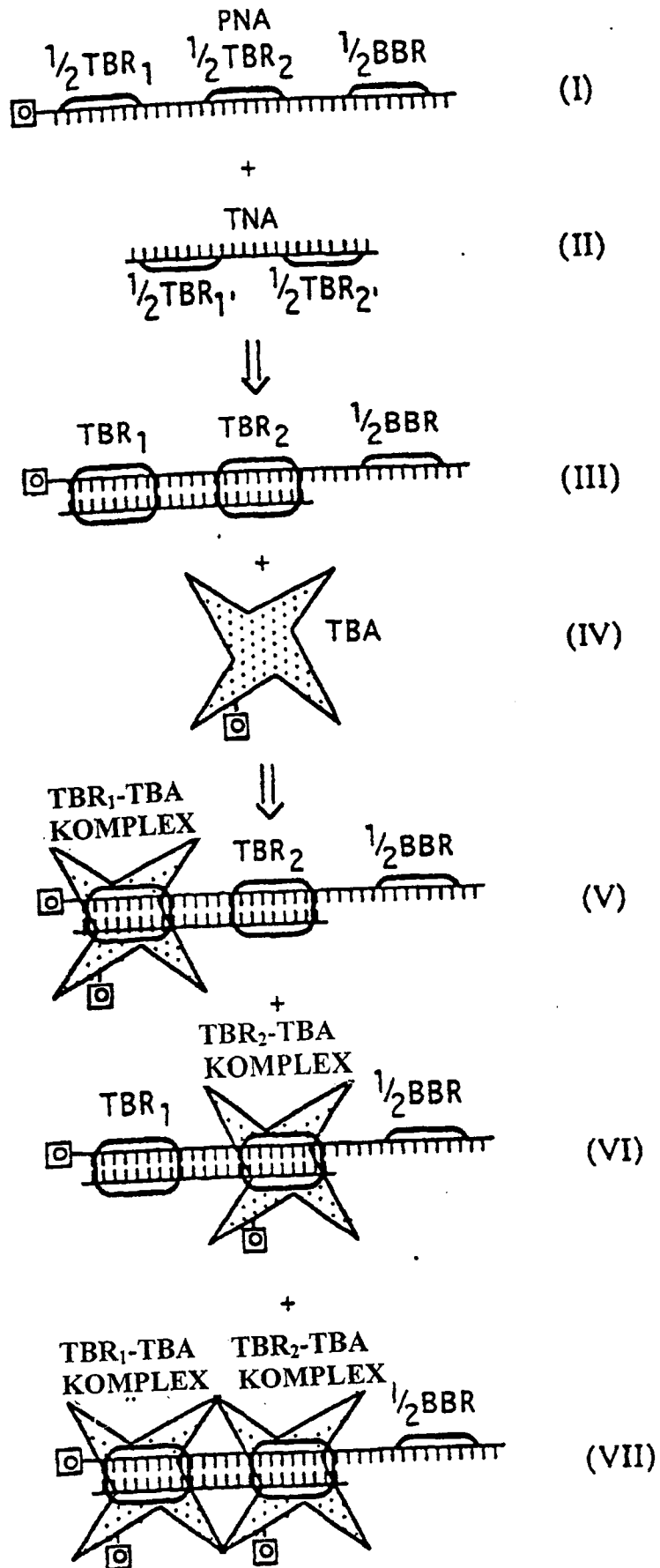


FIGUR 4C

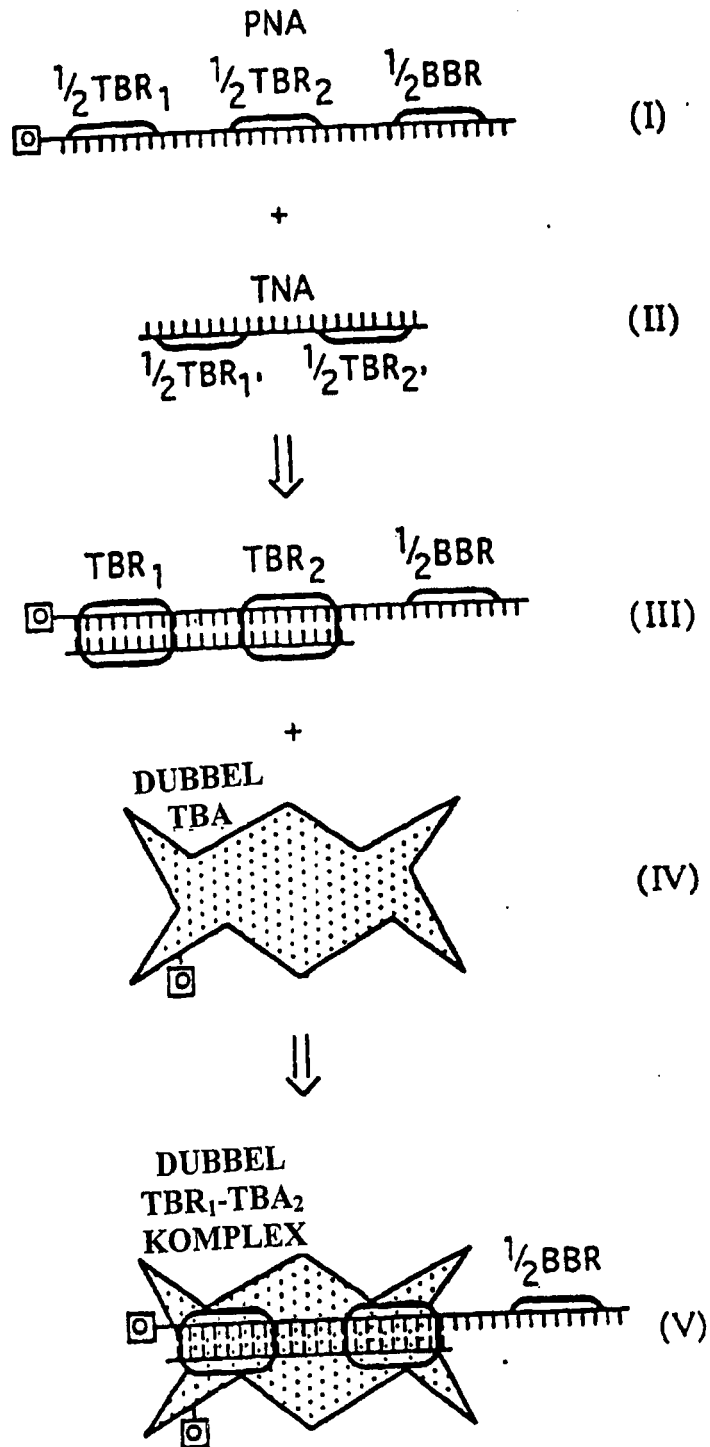
11/29



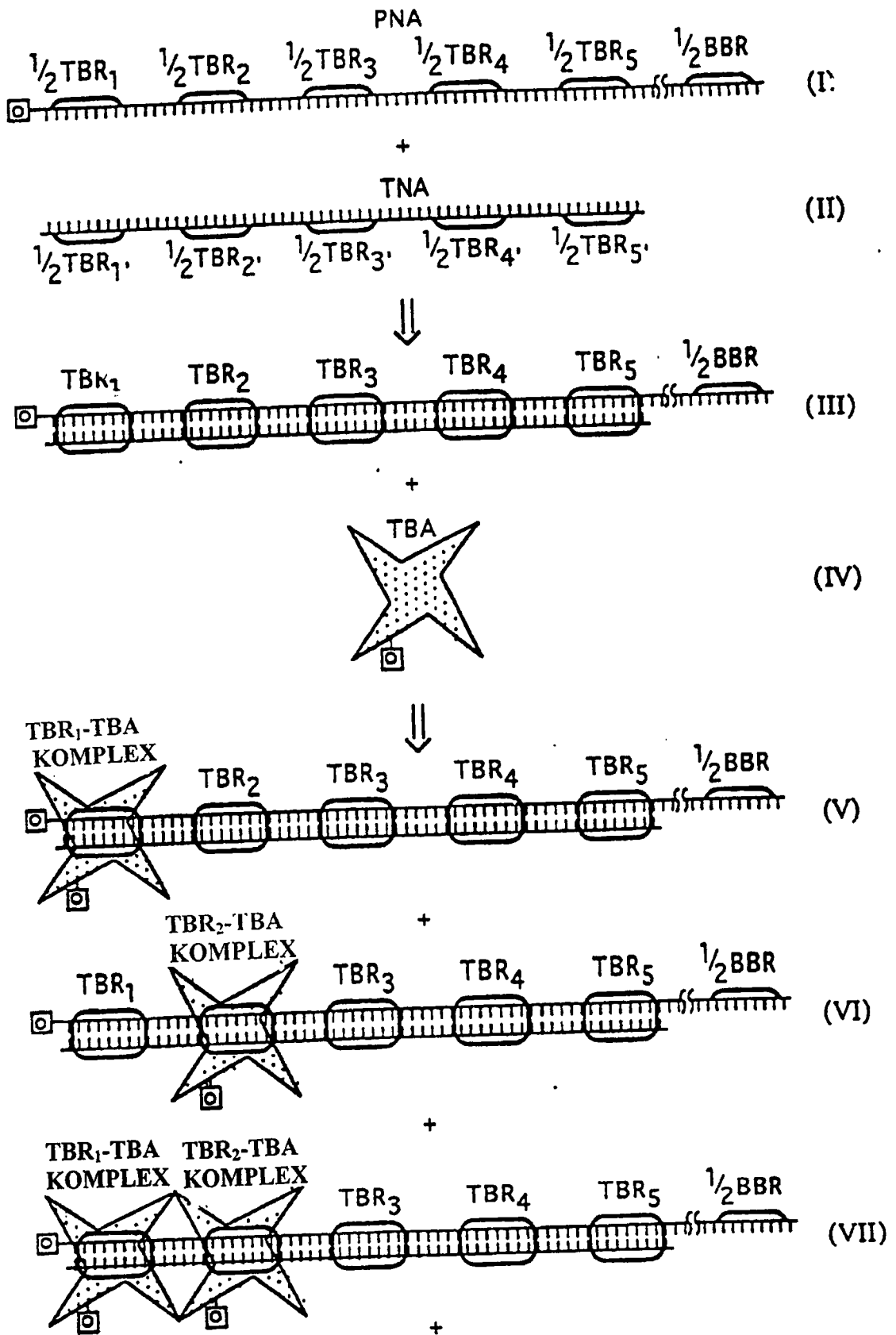
FIGUR 5



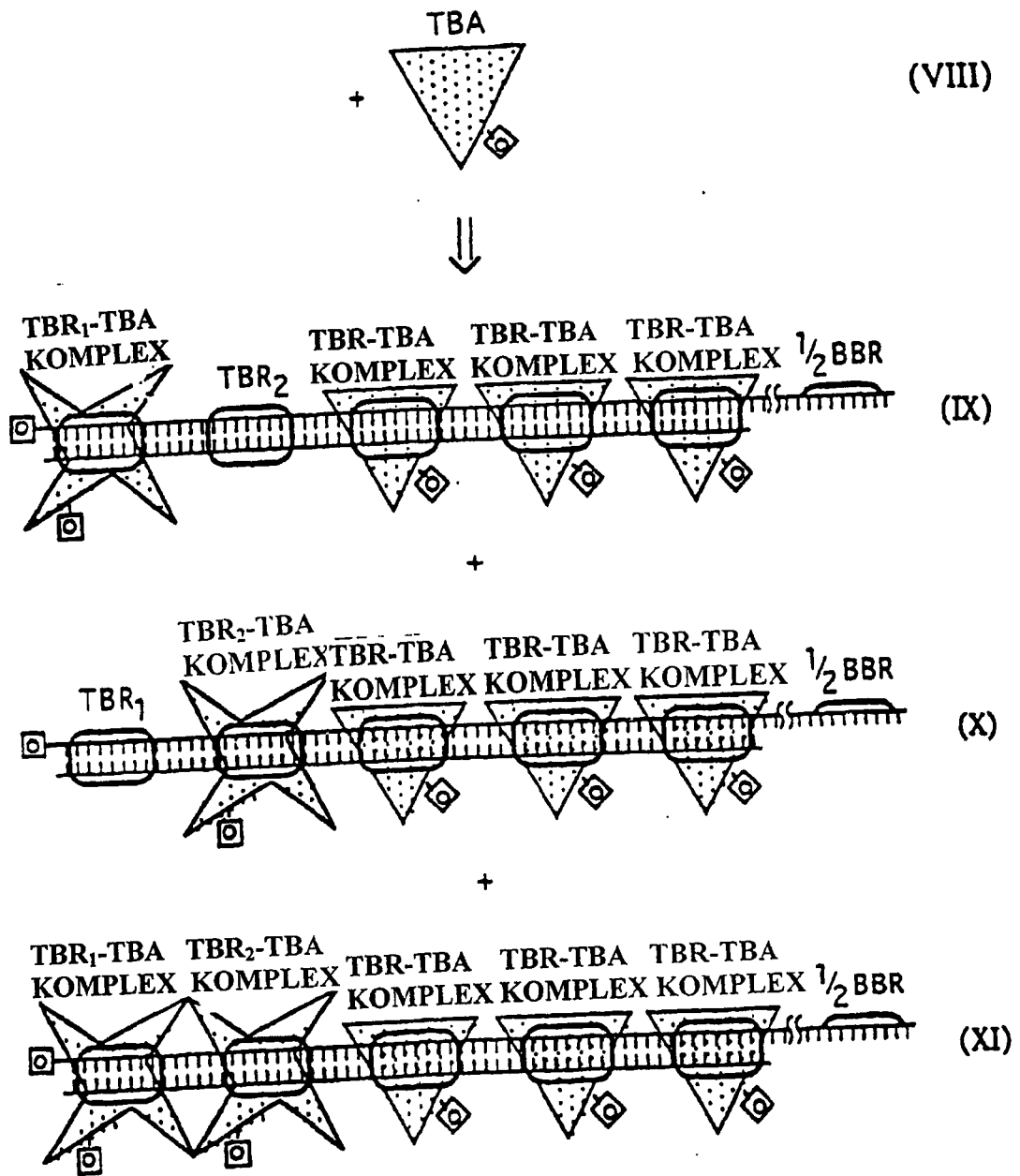
FIGUR 6A



FIGUR 6B



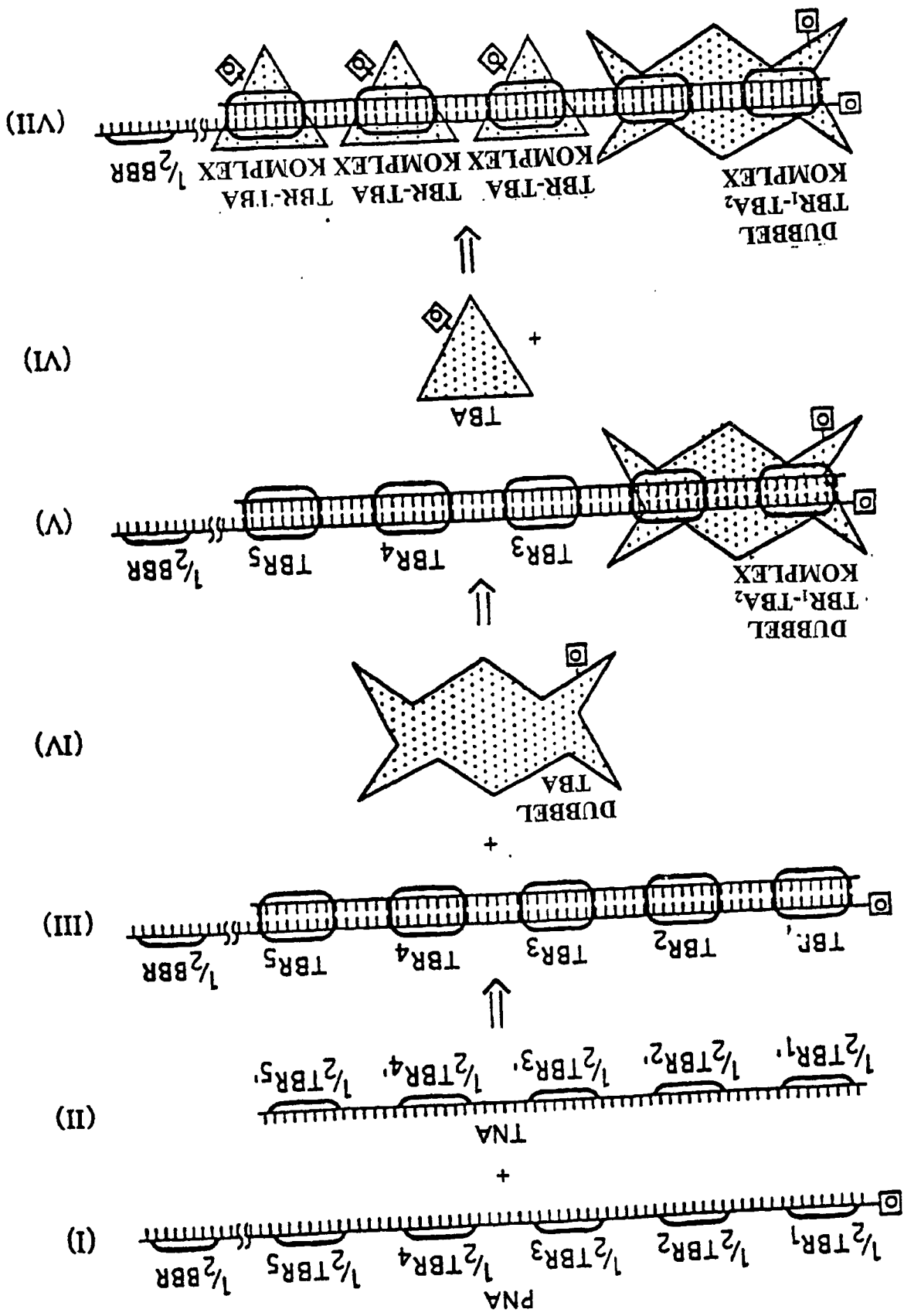
FIGUR 6C



FIGUR 6D



FIGUR 6E



SEKV. ID: 37:

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890  
CTACAAGGAC|TTCCGCTGGGACTTTCCAGGGAGG|GTGGCCTGGGCGGGACTGGGAGTGGCGTCCC  
+++++NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1 SP1  
+++++NF-kB NF-kB SP1 SP1

HIV Test kit PNA1 (+++ från ovan). SEKV. ID: 38:

\*\*\*CTACAAGGACTTTCCGCTGGGACTTTCCAGGGAGG\*\*\*

HIV Test kit PNA2 (=== från ovan). SEKV. ID: 39:

###CGGGACTGGGAGTGGCGTCCC###

Utstickande ändsekvens i PNA2 är komplementär till  
en av ändarna på operator-DNA bildat av:

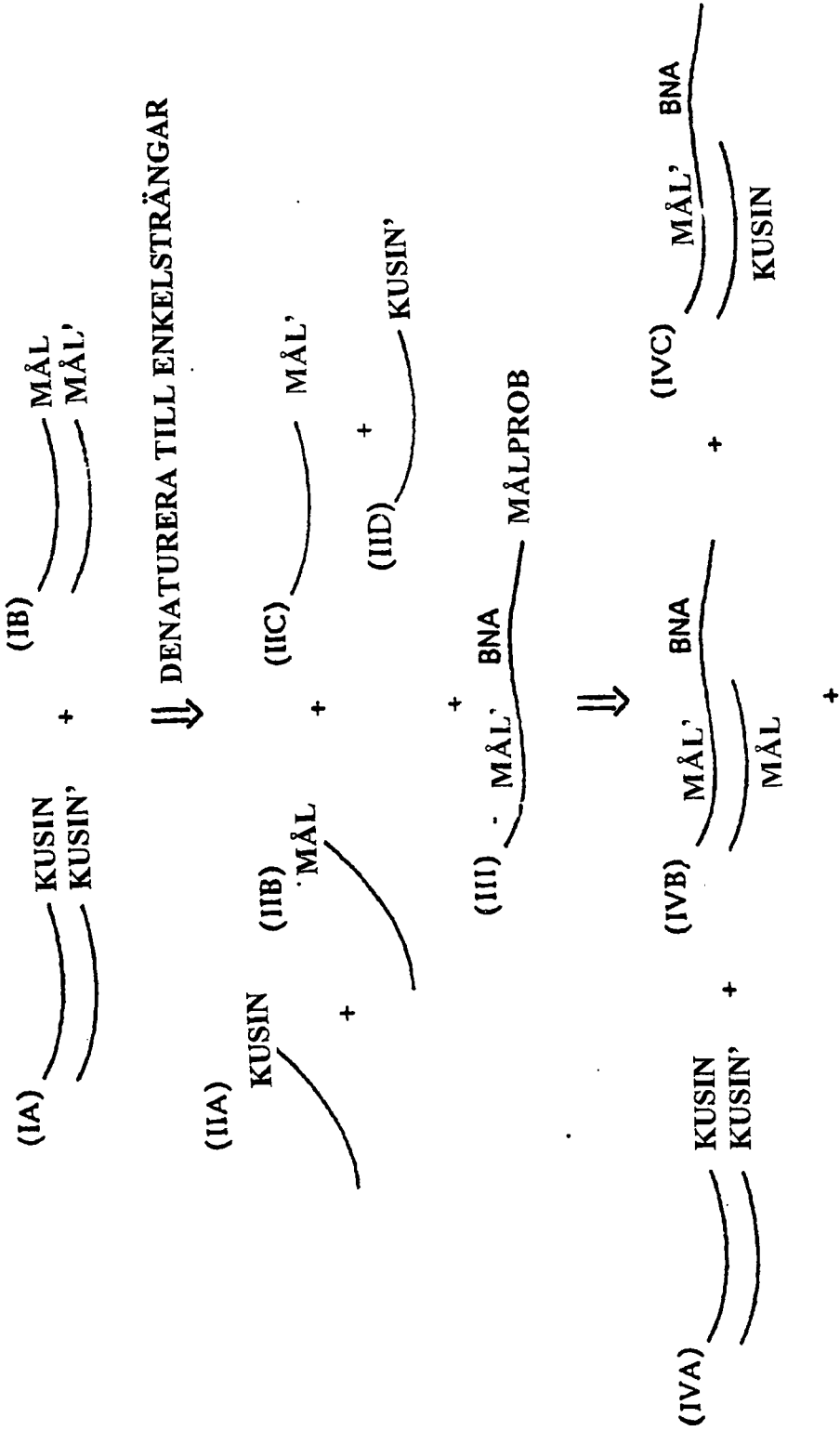
###OL1-OL2-OL3  
OL1'-OL2'-OL3',\*\*\*

eller

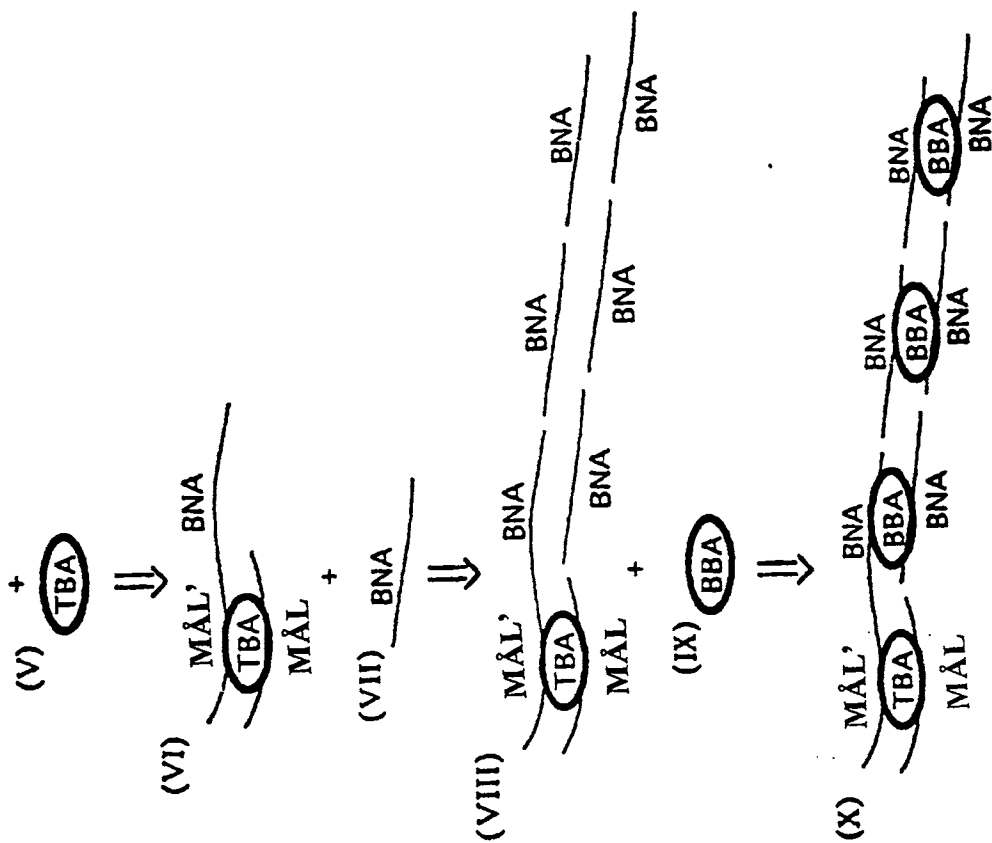
###OL3-OL2-OL1  
OL3'-OL2'-OL1',\*\*\*

FIGUR 7

FRAGMENTERAD DUBBELSTRÄNGAD  
NUKLEINSYRAPROV

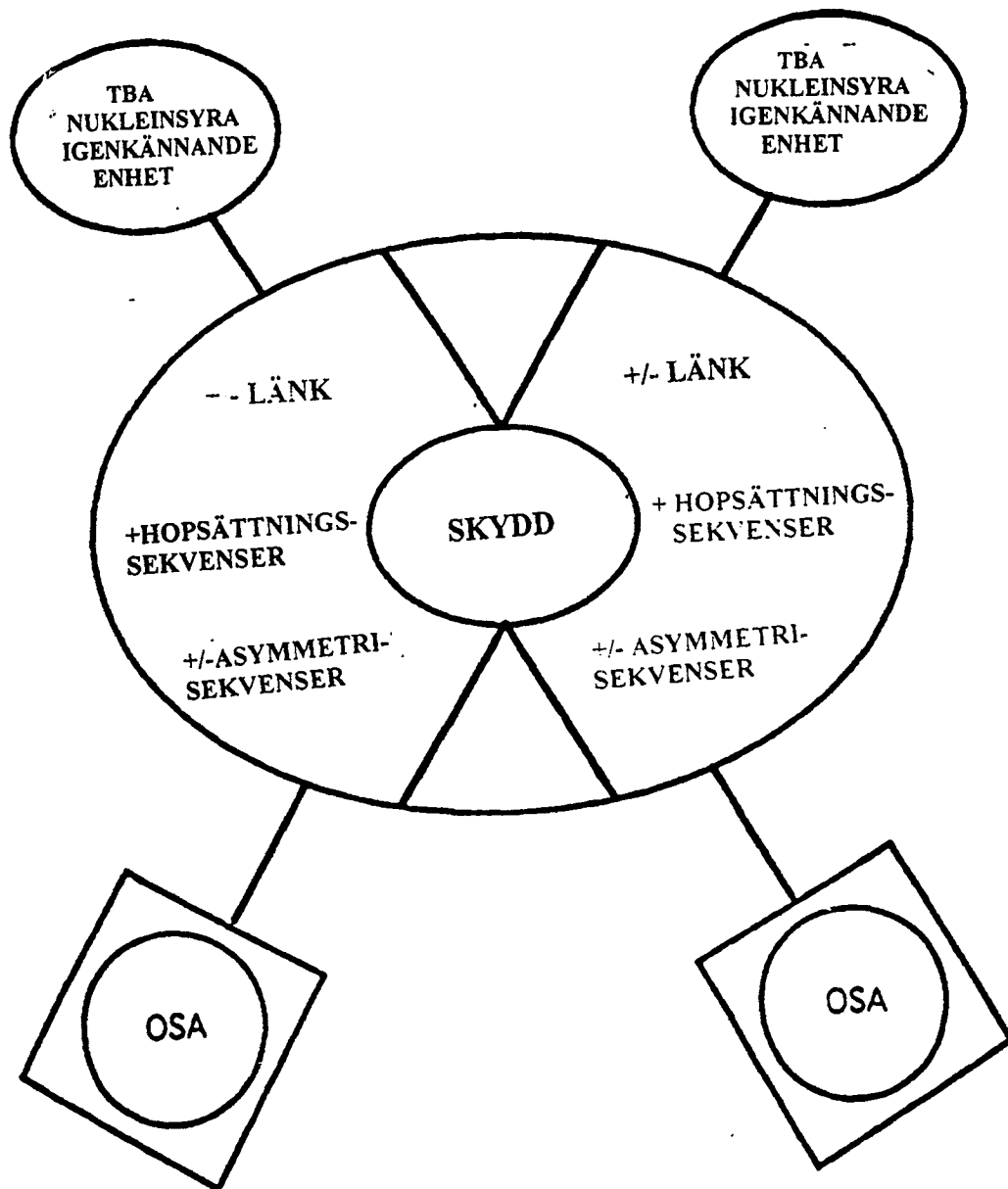


FIGUR 8A

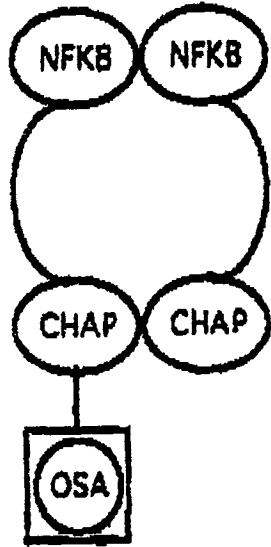


FIGUR. 8B

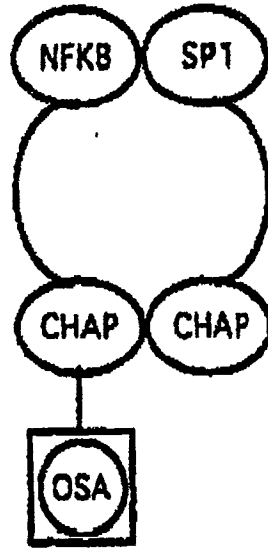
## TBA: MÅLBINDANDE HOPSÄTTNING



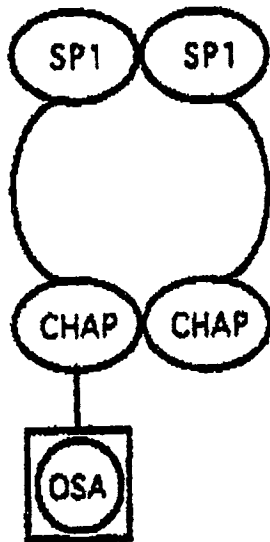
FIGUR 9



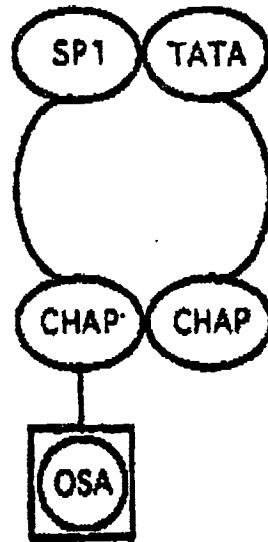
HIV-BESTÄMNING I



HIV-BESTÄMNING II

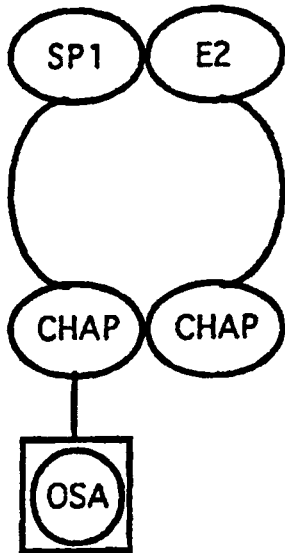


HIV-BESTÄMNING III

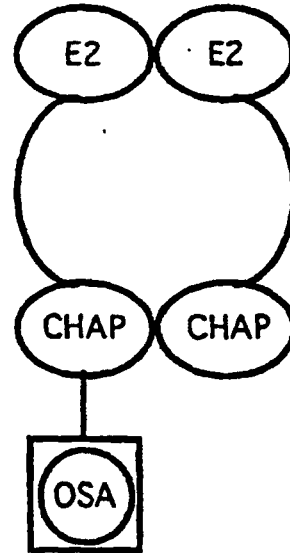


HIV-BESTÄMNING IV

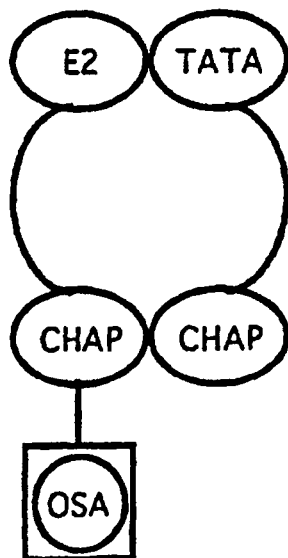
FIGUR 10



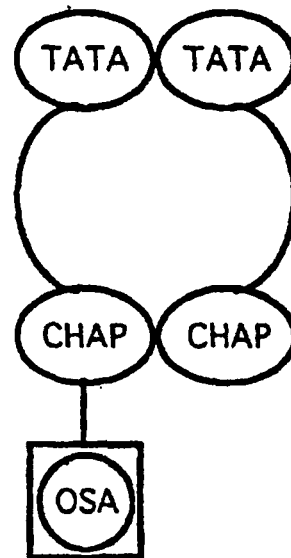
HPV-BESTÄMNING I



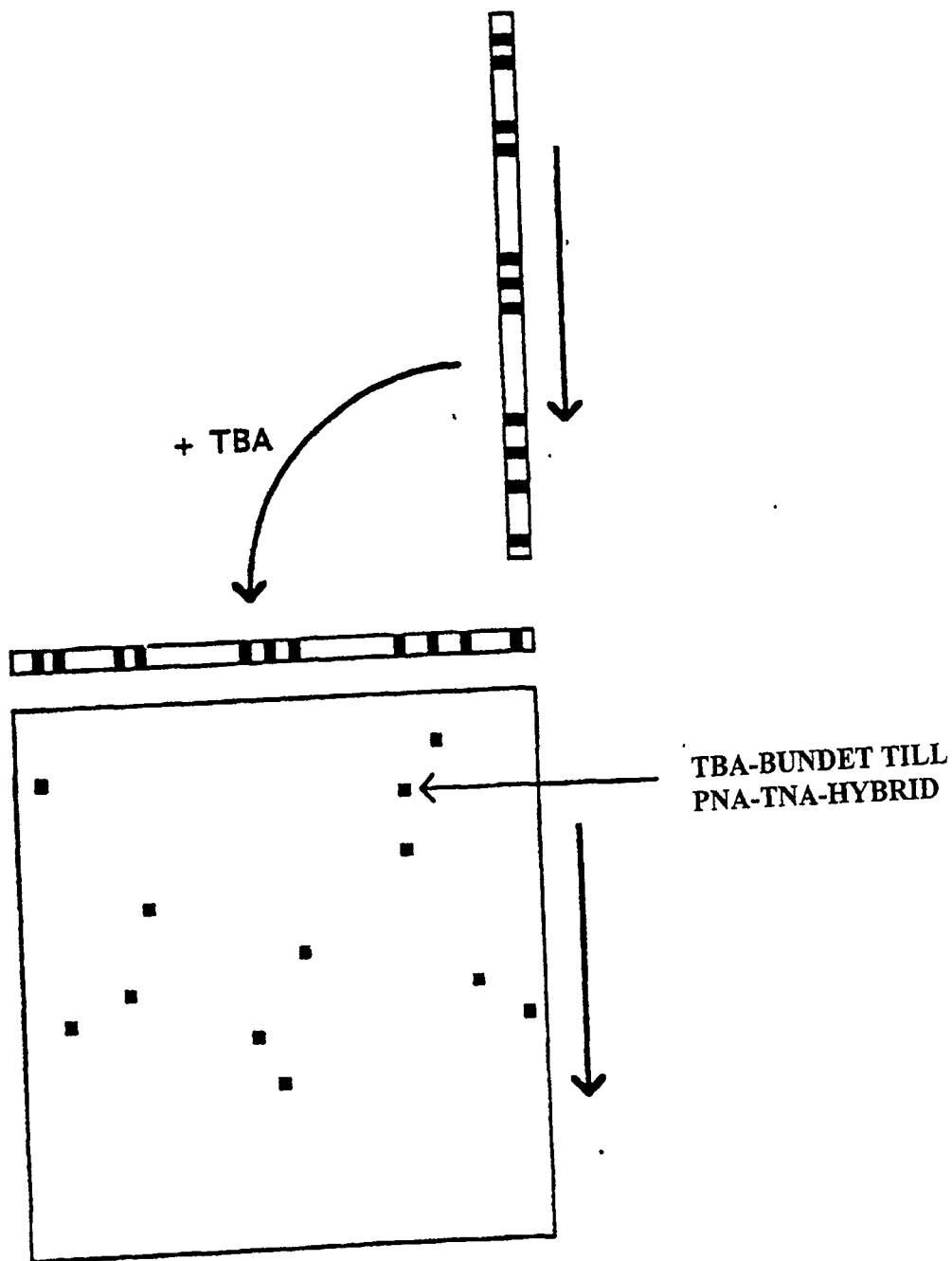
HPV-BESTÄMNING II



HPV-BESTÄMNING III

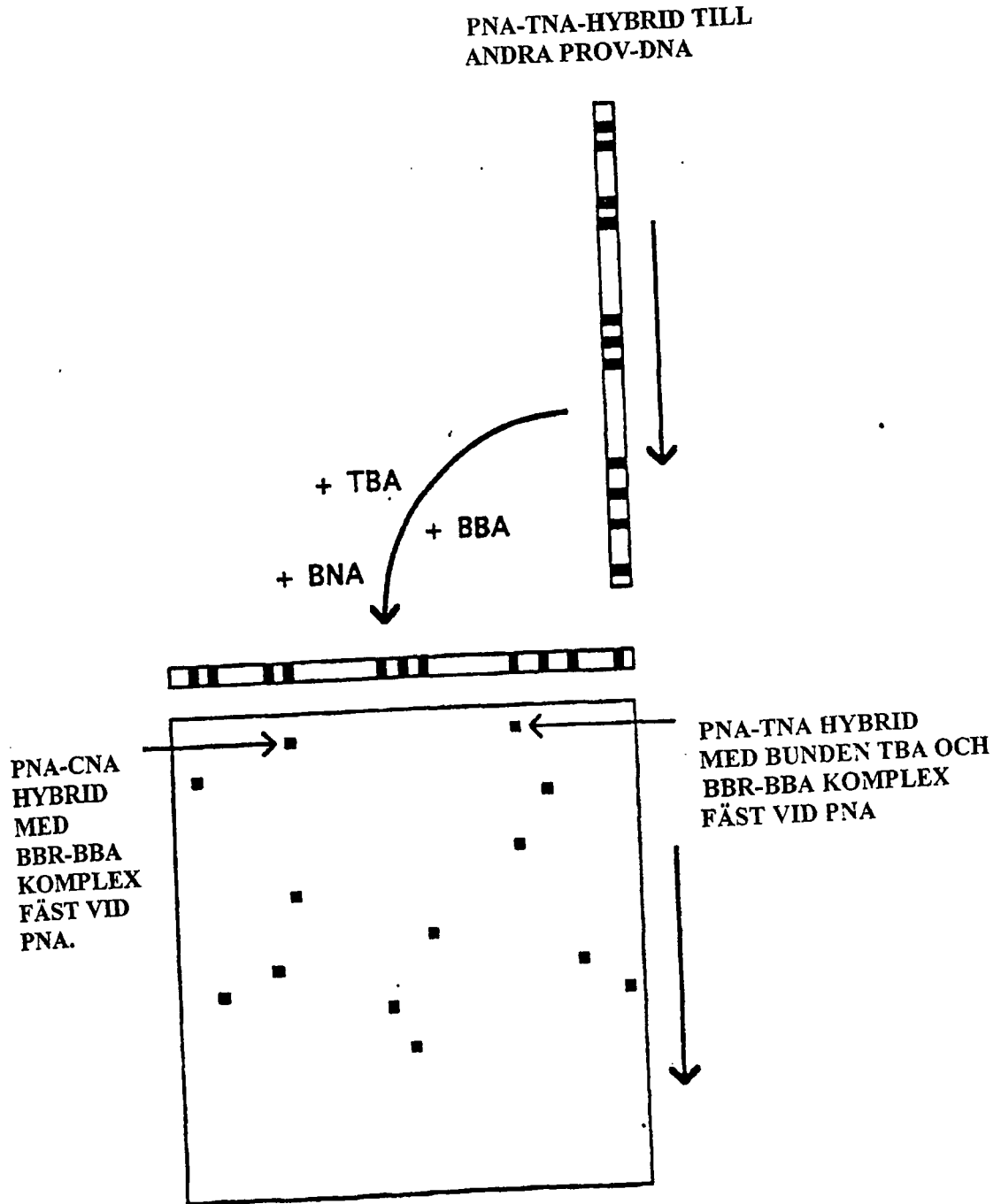


HPV-BESTÄMNING IV

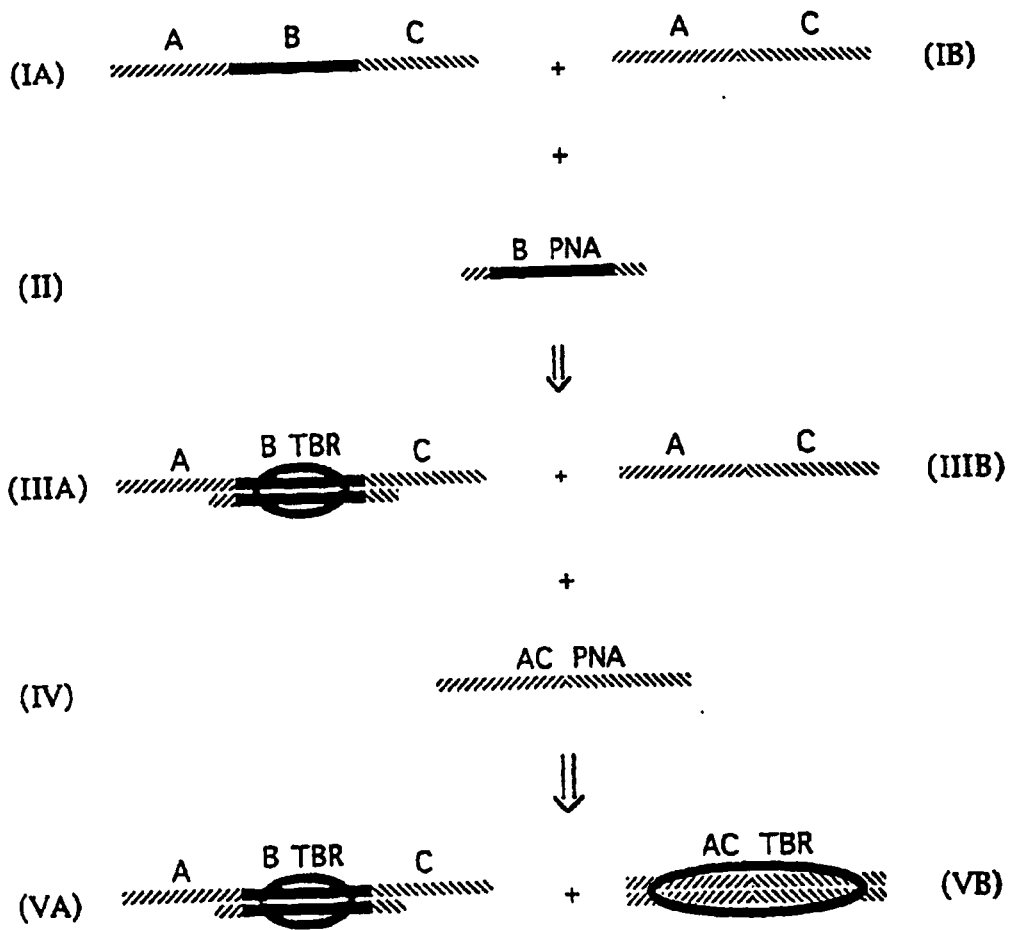


FIGUR 12A

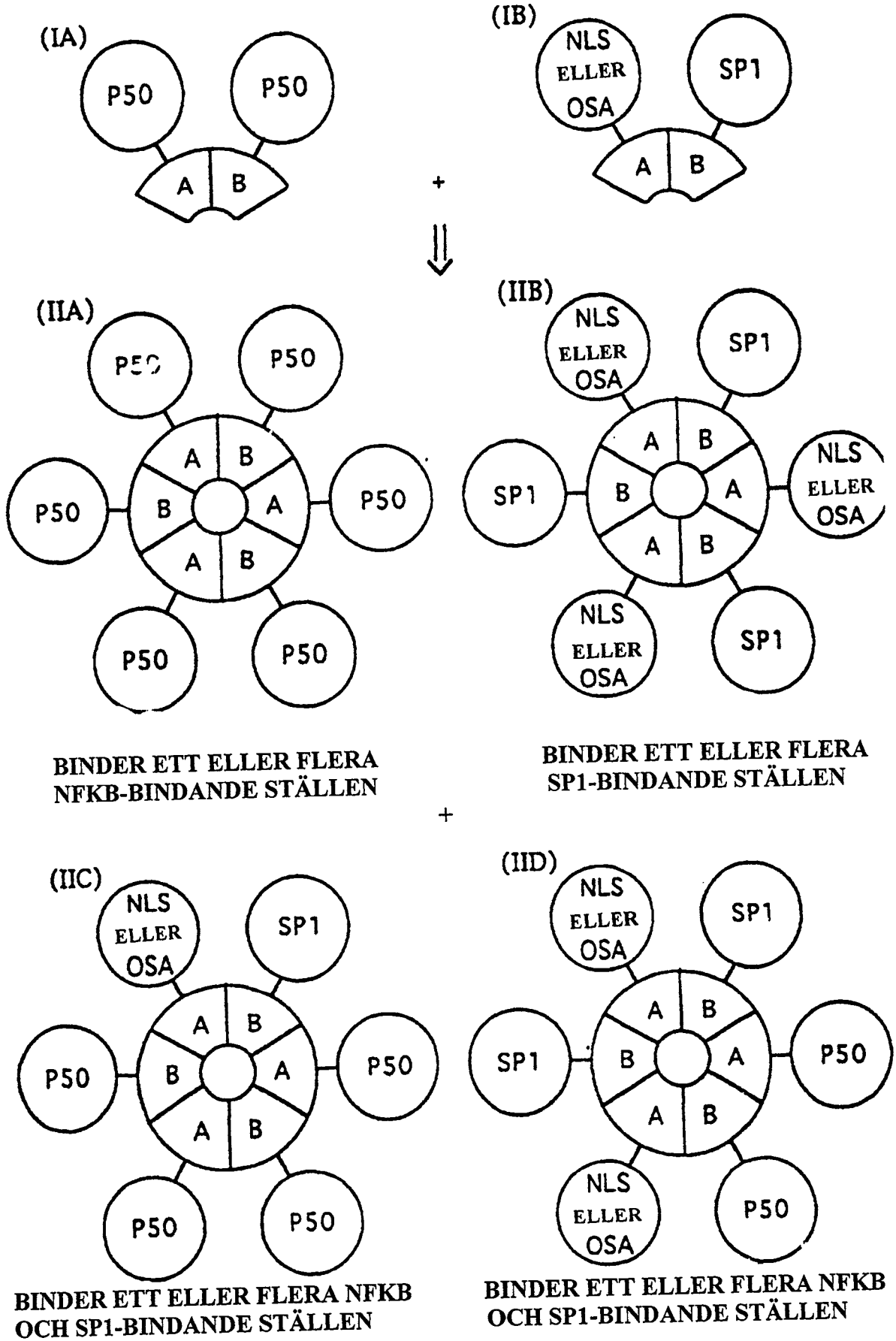




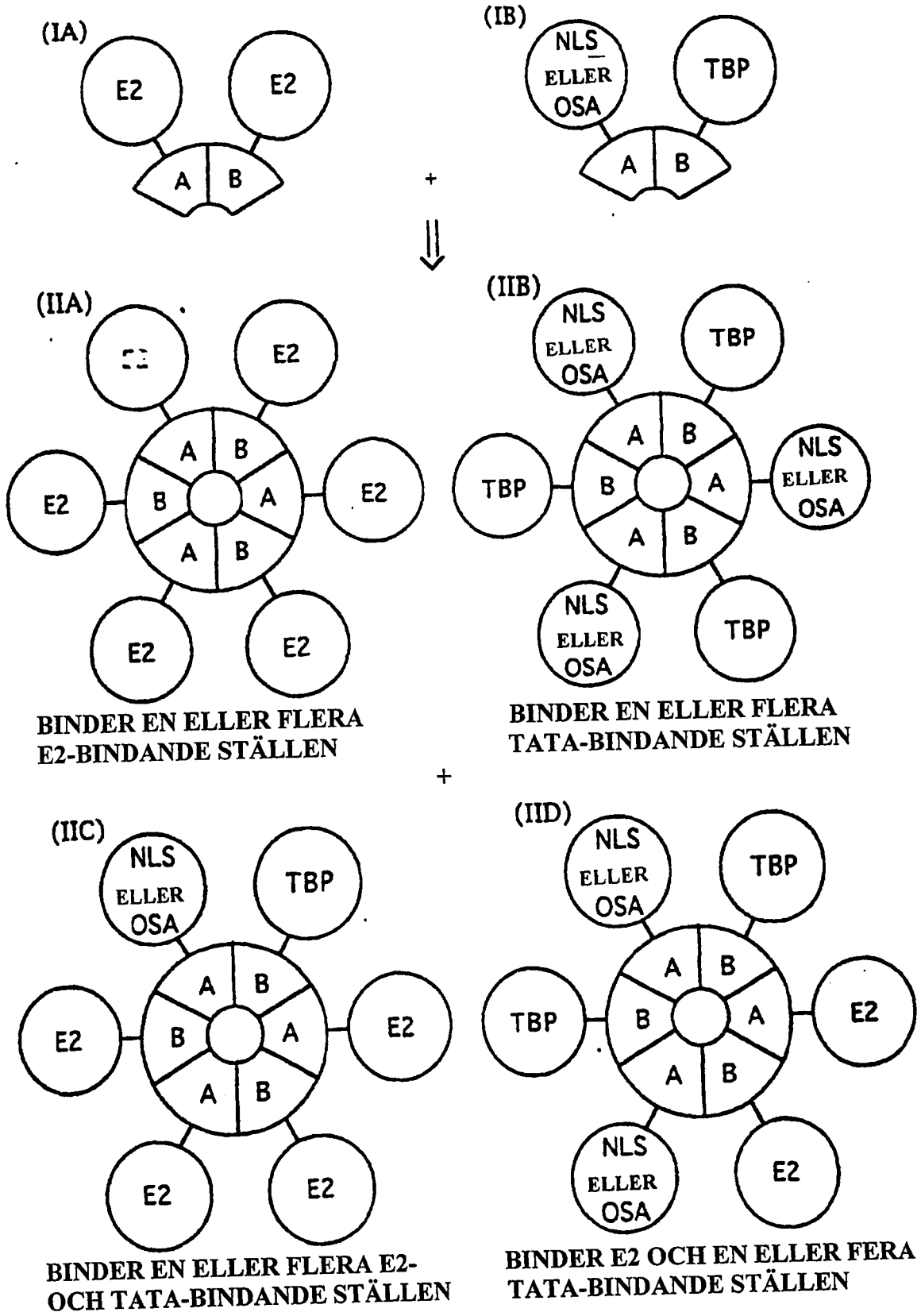
FIGUR 12B



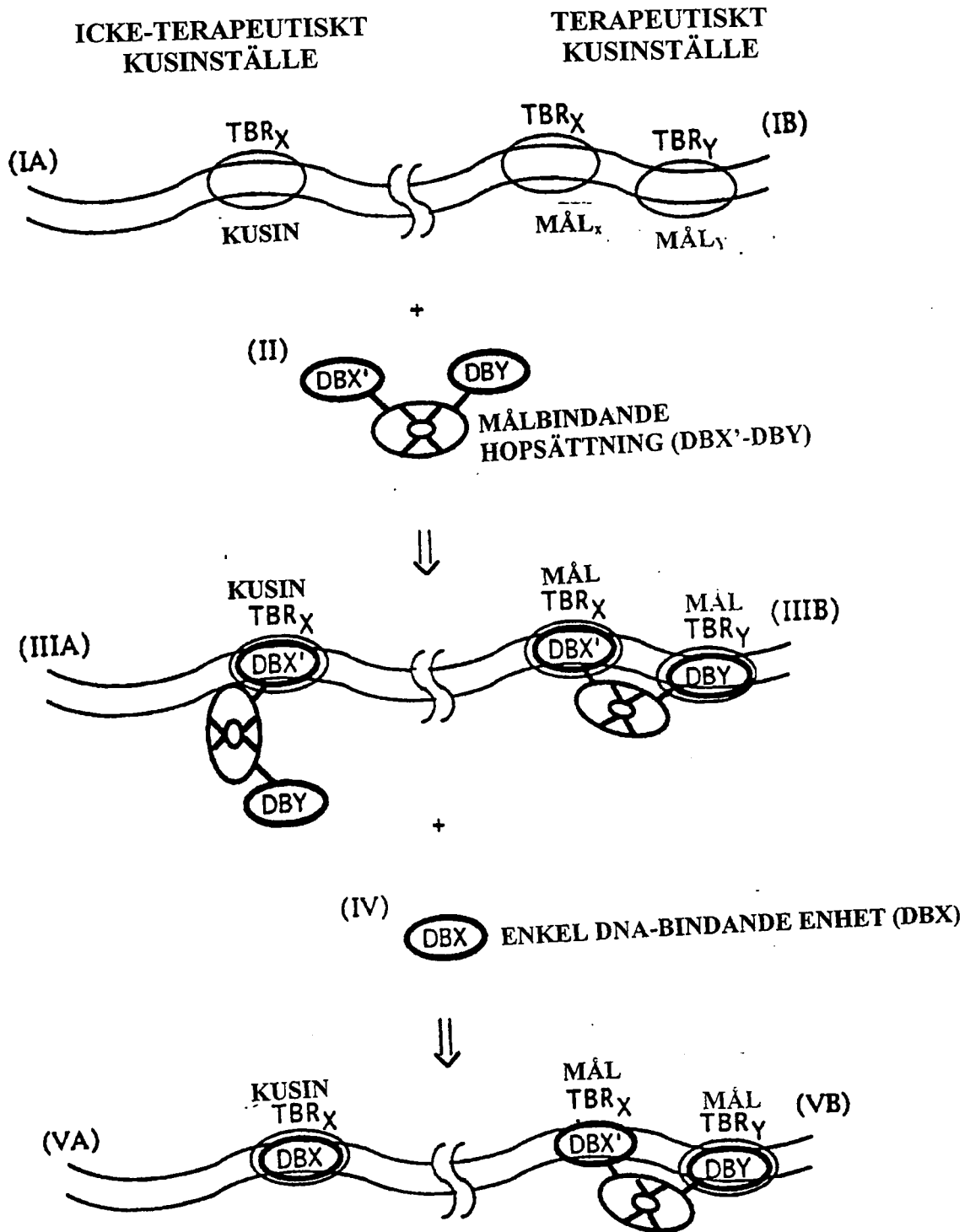
FIGUR 13



FIGUR 14



FIGUR 15



FIGUR 17

