

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

Die Erfindung stellt ein Verfahren und Zusammensetzungen zur Verwendung bei der Bindung, dem Nachweis und der Amplifikation des Nachweises von spezifischen Zielnucleinsäuresequenzen in einer Probe mit hoher Zuverlässigkeit und Genauigkeit, selbst in Gegenwart von eng verwandten, aber verschiedenen Nucleinsäuren, bereit. Die Bindung kann das Begleiten und das Zusammenbauen von spezifischen Molekülen zu Zielbindungsanordnungen umfassen, die spezifisch Zielbindungsregionen binden, die durch Hybridisierung von Sondennucleinsäuren und Zielnucleinsäuresequenzen gebildet worden sind. Die Amplifikation kann das Begleiten und/oder den Zusammenbau von spezifischen Molekülen zu Booster-Bindungsanordnungen umfassen, die spezifisch Booster-Bindungsregionen binden, die durch Hybridisierung von Booster-Nucleinsäuren mit Sondennucleinsäuren, Zielnucleinsäuren oder anderen Booster-Nucleinsäuren gebildet worden sind. Der Nachweis beinhaltet die Bereitstellung einer oder mehrerer nachweisbarer Markierungen, einschließlich radioaktiver, licht- oder fluoreszenzemittierender, enzymatischer oder anderer nachweisbarer oder signalerzeugender Moleküle, in Verbindung mit Sondennucleinsäuren, Zielbindungsanordnungen, Booster-Nucleinsäuren oder Booster-Bindungsanordnungen.

2. Hintergrund und Beschreibung des Stands der Technik

Es gibt eine steigende Zahl von Fällen, bei denen es wichtig ist, über die Fähigkeit zu verfügen, Nucleinsäuren mit einem Gehalt an einer spezifischen Sequenz, nachstehend als Zielnucleinsäuren (TNAs) bezeichnet, in einer Probe nachzuweisen. Man ist bestrebt, die TNAs mit der kleinstmöglichen Anzahl an Verarbeitungsstufen, mit den einfachsten Komponenten und unter Ausschluss von anderen ähnlichen, aber unterschiedlichen Nucleinsäuren, nachstehend als Cousin-Nucleinsäuren (CNAs) bezeichnet, nachweisen zu können. Man ist bestrebt, spezifische TNAs unter Ausschluss von etwaigen und sämtlichen CNAs in der Nachweisprobe nachzuweisen, ohne dass eine Amplifikation oder andere dem Nachweis nachgeschaltete Verarbeitungen erforderlich sind.

Es gibt zahlreiche Verfahren, bei denen immobilisierte oder markierte Nucleinsäuren als Sonden für TNAs verwendet werden. Jedoch ist es unter Anwendung bekannter Verfahren schwierig, zwischen einer TNA, die an eine Sondennucleinsäure (PNA) gebunden ist, und einer an die PNA gebundene CNA

zu unterscheiden. Beispielsweise können eine oder mehrere Basenfehlpaarungen zwischen der PNA und einer CNA immer noch zu einer CNA-PNA-Hybridisierung führen, die von einer TNA-PNA-Hybridisierung fast nicht unterscheidbar ist. Somit stellt eine Hybridisierung allein keinen optimalen Indikator dafür dar, dass eine PNA mit einer besonderen TNA eine Hybridisierung eingegangen ist.

Es gibt zahlreiche Situationen, bei denen eine PNA versuchsweise zu der Feststellung verwendet wird, ob eine TNA in einer Probe, die CNAs enthalten kann, vorhanden war. Eine Hybridisierung der PNA mit einer CNA würde in dieser Situation den diagnostischen Wert, den PNA zum Nachweis einer TNA haben könnte, bei Fehlen einer zusätzlichen Bestätigung einschränken. Ferner ist man bestrebt, TNAs mit einer geringen Kopienzahl in Proben, die zahlreiche Kopien von CNAs enthalten können, nachweisen und lokalisieren zu können, ohne dass es erforderlich ist, zusätzliche Kopien der TNA zu erzeugen. Außerdem ist man bestrebt, die Anwesenheit von CNAs - unabhängig von den TNAs - bestätigen zu können, ohne dass es erforderlich ist, die CNAs und die TNAs in der Probe zu trennen.

Ferner ist man bestrebt, das Signal einer Hybridisierung einer speziellen TNA-PNA selbst bei geringer Frequenz amplifizieren zu können. Zu diesem Zweck wäre ein Verfahren zum Polymerisieren von mehrfachen Kopien einer Markierung, nachstehend als Booster-Nucleinsäure (BNA) bezeichnet, mit der TNA-PNA wünschenswert.

Die vorliegende Erfindung stellt Verfahren und Zusammensetzungen zum Erreichen der vorstehend geschilderten Ziele bereit. Wie sich aus dem nachstehenden Überblick ergibt, wurden die vorliegenden Zusammensetzungen und Verfahren im Stand der Technik weder beschrieben noch nahegelegt. Ein allgemeiner und umfassender Überblick über den Stand der Technik des Nucleinsäurenachweises findet sich bei H. Keller und M. M. Manak, DNA Probes, Stockton Press (1989).

Berichtet wird über ein Verfahren zum Nachweisen von Basen-Fehlpaarungen durch chemische Maßnahmen, um festzustellen, ob die Hybridisierung einer PNA mit einer CNA anstelle einer TNA erfolgt ist. Im US-Patent 4 794 075 (Ford et al.) wird ein Verfahren zum Unterscheiden von DNA-Fragmenten, die Einzelbasen-Fehlpaarungen enthalten, von ihren perfekt gepaarten Homologen erörtert. Einzelsträngige Regionen innerhalb eines Duplexfragments werden mit Carbodiimid modifiziert, das mit ungepaarten Guanin (G)- und Thymin (T)-Resten in DNA-Moleküle reagiert. Lineare Duplex-DNA-Moleküle reagieren nicht, während DNA-Moleküle mit Einzelbasen-Fehlpaarungen quantitativ reagieren. Im Anschluss an die Reaktion mit

Carbodiimid werden die DNA-Moleküle an hochprozentigen Polyacrylamidgelen fraktioniert, so dass modifizierte und unmodifizierte Fragmente unterschieden werden können. Ford et al. wandten diese Technik an, um DNA-Sequenzunterschiede zu lokalisieren und zu reinigen, die für eine Phänotypvariation und eine Erbkrankheit verantwortlich sind. Obgleich sich dieses Verfahren zum Verfolgen von Variationen in genetischem Material eignet, weist es eine große Anzahl an Stufen auf, erfordert kostspielige Komponenten und bietet keine direkte Möglichkeit zu der Feststellung, ob eine PNA mit der TNA unter Ausschluss von CNAs in der Probe eine Hybridisierung eingegangen ist.

Es gab zahlreiche Versuche, um sicherzustellen, dass mindestens ein Teil der Hybridisierung zwischen der PNA und einer anderen Nucleinsäure komplementär ist. Ein Verfahren beinhaltet das Überwachen der Transkriptionsprodukte, die erzeugt werden, wenn die PNA mit einer Nucleinsäure in ausreichendem Maße hybridisiert, um von einer Promotorstelle, die in der Sonde enthalten ist, transkribiert zu werden. Das US-Patent 5 215 899 (Dattagupta) führt aus, wie spezifische Nucleinsäuresequenzen durch Verwendung einer Haarnadelsonde amplifiziert werden, die bei Hybridisierung mit einer Zielsequenz und bei Verknüpfung mit dieser transkribiert werden kann. Die Sonde umfasst eine einzelsträngige, selbst-komplementäre Sequenz, die unter Hybridisierungsbedingungen eine Haarnadelstruktur mit einer funktionellen Promotorregion bildet, und ferner eine einzelsträngige Sondensequenz, die sich vom 3'-Ende der Haarnadelsequenz aus erstreckt. Bei Hybridisierung mit einer Zielsequenz, die zur Sondensequenz komplementär ist, und bei Verknüpfung des 3'-Endes der hybridisierten Zielsequenz mit dem 5'-Ende der Haarnadelsonde wird die Zielsequenz in Gegenwart einer geeigneten RNA-Polymerase und geeigneter Ribonucleosid-triphosphate (rNTPs) transkribierbar gemacht. Eine Amplifikation wird erreicht, indem man die erwünschte TNA-Sequenz mit der Sonde hybridisiert, die TNA mit der PNA verknüpft, die RNA-Polymerase und die rNTPs zu den abgetrennten Hybriden gibt und die Transkription so weit ablaufen lässt, bis sich eine erwünschte Menge eines RNA-Transkriptionsprodukts angereichert hat. Dieses Verfahren beinhaltet allgemein und spezifisch die Verwendung von Haarnadel-DNA, die mit einem einzelsträngigen, ungepaarten Ende gebildet ist, um eine Anlagerung an eine Zielsequenz herbeizuführen. Wenn die Zielsequenz gebunden ist, wird die Erzeugung von RNA-Transkriptionsprodukten ermöglicht. Somit beinhaltet das Verfahren den Nachweis von sekundären Transkriptionsprodukten anstelle der Verwendung einer Nucleinsäure-Bindungsanordnung zur direkten Immobilisierung und/oder Lokalisierung einer Zielsequenz. Eine CNA könnte leicht an die Sonde binden und der Mangel an

Komplementarität würde nicht notwendigerweise die Bildung eines CNA-PNA-Hybrids stören, das dann die Erzeugung von unerwünschten Transkriptionsprodukten unterstützen könnte.

Eine an die PNA gebundene CNA könnte nachgewiesen werden, wenn der Mangel an Komplementarität die Empfindlichkeit des hybriden CNA-PNA-Paars, durch eine Restriktionsendonuclease geschnitten zu werden, beeinträchtigt. Im US-Patent 5 118 605 (Urdea) und im US-Patent 4 775 619 (Urdea) werden neue Verfahren zum Testen eines Nucleinsäure-Analyten bereitgestellt, bei denen Polynucleotide mit Oligonucleotidsequenzen verwendet werden, die im wesentlichen homolog zu einer Sequenz von Interesse im Analyten sind, wobei das Vorliegen oder Fehlen einer Hybridisierung mit einer vorgegebenen Stringenz für die Freisetzung einer Markierung aus einem Träger sorgt. Es werden verschiedene Techniken zum Binden einer Markierung an einen Träger angewandt, wobei bei Spaltung eines Einzel- oder Doppelstrangs eine Markierung von einem Träger freigesetzt werden kann und die Freisetzung der Markierung als Anzeichen für das Vorliegen einer bestimmten Polynucleotidsequenz in einer Probe nachgewiesen werden kann. Jedoch hat diese Technik den Nachteil, dass ein CNA-PNA-Paar durch die Restriktionsendonuclease geschnitten werden kann, selbst wenn eine Fehlpaarung vorliegt, sofern sich die Fehlpaarung außerhalb der Endonuclease-Erkennungsstelle befindet. Dies würde dazu führen, dass der Test bei der Identifizierung eines CNA-PNA-Hybrids versagt.

Ein weiteres Verfahren bedient sich einer verzweigten DNA-Sonde zum Nachweis von Nucleinsäuren. Das US-Patent 5 124 246 (Urdea et al.) beschreibt lineare oder verzweigte Oligonucleotid-Multimere, die sich als Amplifikatoren bei biochemischen Tests eignen, wobei die Multimeren folgendes umfassen: (1) mindestens eine erste einzelsträngige Oligonucleotideinheit (PNA), die mit einer einzelsträngigen Oligonucleotidsequenz von Interesse (TNA) komplementär ist, und (2) eine Mehrzahl von zweiten einzelsträngigen Oligonucleotideinheiten, die mit einem einzelsträngigen, markierten Oligonucleotid komplementär sind. Obgleich amplifizierte Sandwich-Nucleinsäure-Hybridisierungen und Immunoassays unter Verwendung der Multimeren beschrieben werden, weist das Verfahren die Einschränkung auf, dass eine PNA-CNA-Hybridisierung auftreten kann und zur Bildung eines unerwünschten Signals führen kann.

Zusätzlich zu Verfahren zur Identifizierung von TNAs wurden Verfahren zur Amplifikation dieser DNA beschrieben. Im US-Patent 5 200 314 (Urdea) wird ein Analyt-Polynucleotidstrang mit einer Analytsequenz (TNA) innerhalb einer Probe mit einem Gehalt an Polynucleotiden nachgewiesen, indem man das Analyt-Polynucleotid mit einer Abfangsonde (PNA) unter Hybridisierungsbedingungen in

Kontakt bringt, wobei die Abfangsonde einen ersten Bindungspartner, der spezifisch für die TNA ist, und eine zweite Bindungssequenz, die spezifisch für einen dritten Festphasen-Bindungspartner ist, aufweist. Der erhaltene Duplex wird sodann durch eine spezifische Bindung zwischen den Bindungspartnern immobilisiert und ungebundene Polynucleotide werden von der gebundenen Spezies abgetrennt. Das Analyt-Polynucleotid wird gegebenenfalls aus der festen Phase verdrängt und anschließend durch PCR amplifiziert. Die PCR-Primer weisen jeweils eine Polynucleotidregion auf, die zur Hybridisierung mit einer Region des Analyt-Polynucleotids befähigt ist, und mindestens einer der Primer weist ferner einen zusätzlichen Bindungspartner auf, der zur Bindung an einen Festphasen-Bindungspartner befähigt ist. Das amplifizierte Produkt wird sodann aus dem Reaktionsgemisch durch spezifische Bindung zwischen den Bindungspartnern abgetrennt und das amplifizierte Produkt wird nachgewiesen. Obgleich es möglich ist, (durch PCR) zu bestätigen, dass eine bestimmte Nucleinsäure mit der PNA eine Hybridisierung eingegangen ist, ist die Bestätigung aufwändig und beinhaltet zahlreiche Stufen.

In bezug auf Berichte, die sich mit der Wechselwirkung einer doppelsträngigen Nucleinsäure und eines DNA-Bindungsproteins befassen, wurde ein Verfahren beschrieben, bei dem eine Sequenz von immobilisierter DNA, die Bindungsstellen für ein einzelnes Protein enthält, zur Reinigung dieses Proteins verwendet wird. Das US-Patent 5 122 600 (Kawaguchi et al.) beschreibt ein Mikrokügelchen mit immobilisierter DNA, wobei das Produkt DNA-Ketten mit Basensequenzen, die spezifisch ein bestimmtes Protein binden, und einen Träger mit einer Teilchengröße von nicht mehr als 50 µm und nicht weniger als 0,01 µm, der keinerlei Protein adsorbiert, umfasst, wobei der Träger und die DNA-Ketten aneinander über eine chemische Bindung gebunden sind. Ferner wird ein Verfahren zur Reinigung eines Proteins unter Verwendung eines derartigen Mikrokügelchens beschrieben. Da es sich hier um ein Reinigungsverfahren für ein Protein handelt, wird weder ein Verfahren zum Nachweisen einer TNA noch ein Verfahren beschrieben, bei dem mehr als ein Protein an eine doppelsträngige Nucleinsäure gebunden ist, und zwar mit dem Ziel des Nachweises und der Lokalisierung von spezifischen TNA-Sequenzen.

EP-A-0 453 301 beschreibt ein Verfahren zum Nachweisen einer Polynucleotid-Zielsequenz in einer Probe, wobei die Sequenzen in einer TNA nachgewiesen werden, indem erste und zweite PNAs mit der TNA hybridisiert werden. Jede PNA enthält einen vorgeformten Duplex oder einen Duplex, der

durch Kettenerweiterung gebildet ist, wobei der Duplex zur Bindung eines Nucleotidsequenz-spezifischen Bindungsproteins befähigt ist.

EP-A-0 147 665 beschreibt ferner die Verwendung von sequenzspezifischen Duplex-DNA-Bindungsproteinen als Nachweismittel in einem Hybridisierungstest. Auch hier wird die Duplexsonde vorgeformt.

EP-A-0 450 594 beschreibt die Möglichkeit der Markierung sogenannter Entwicklermoleküle mit Duplexsequenz-spezifischen Verbindungen, z. B. bestimmten Interkalatoren. Diese Verbindungen werden vor der Hybridisierung an den Entwicklermolekülen angebracht.

US-A-4 556 643 beschreibt den nicht-radioaktiven Nachweis spezifischer Nucleotidsequenzen in einer Probe unter Hybridisierung einer Sonde, die spezifische DNA-Bindungsprotein-Sequenzen enthält.

WO-93/00446 beschreibt einzelsträngige Oligonucleotide, die einen Bereich umfassen, der dann, wenn er doppelsträngig gemacht wird, an das vom Herpes simplex-Virus abgeleitete UL9-Protein bindet, sowie einen weiteren Bereich, der dann, wenn er doppelsträngig gemacht wird, interkalierende Verbindungen bindet.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

Die Erfindung ist in den beigefügten Ansprüchen definiert. Sie stellt Verfahren bereit, durch die spezifische Zielnucleinsäure (TNA)-Sequenzen durch die Verwendung von Sondennucleinsäuren (PNAs) nachgewiesen werden, die bei Hybridisierung mit TNAs zur Bindung von Zielbindungsanordnungen (TBAs) befähigt sind. Jede TBA bindet mindestens eine spezifische Region des PNA-TNA-Hybridpaares der Zielbindungsregion (TBR). Die TBA umfasst ein oder mehr Moleküle, von denen eines oder mehrere die TBR-Sequenzen in einer spezifischen und sequenz- oder konformationsabhängigen Weise binden können. Die TBA kann eine oder mehrere Pilotsequenzen, sogenannte "PILOTS" oder "Asymmetriesequenzen" umfassen, die ein zwanghaftes Zusammensetzen der nucleotidbindenden Komponenten der TBA zu spezifischen Geometrien bewirken. Die PILOTS bewirken ein Zusammensetzen spezifischer Nucleinsäure-Erkennungseinheiten oder anderer PILOTS, an denen spezifische Nucleinsäure-Erkennungseinheiten an den TBAs in einer vorgegebenen Art und Weise angebracht sind. Die TBA kann auch ein oder mehr Moleküle enthalten, die die TBA verankern oder lokalisieren.

Erfindungsgemäße PNAs sind in Anspruch 1 definiert. Anwendungsmöglichkeiten dieser Nucleinsäuren sind in anderen Ansprüchen definiert, z. B. Kits, die diese Nucleinsäuren enthalten.

Die PNAs können neben TNA-spezifischen Sequenzen auch eine oder mehrere Sequenzen, 1/2-BBRs, enthalten, die zur Hybridisierung mit

komplementären 1/2-BBRs in Booster-Nucleinsäuren (BNAs) befähigt sind. Über eine Hybridisierung von an die Starter-1/2-BBRs, die in den PNAs vorhanden sind, addierte BNAs werden Erweiterungen der PNAs in Form von PNA-BNA- und anschließend in Form von BNA-BNA-Hybriden hergestellt. Diese Erweiterungen enthalten eine oder mehrere Booster-Bindungsregionen (BBRs). Jede BBR ist zur Bindung einer Booster-Bindungsanordnung (BBA) befähigt. Die BBA besteht aus Molekülen, von denen eines oder mehrere eine BBR in einer spezifischen und sequenz- oder konformationsabhängigen Art und Weise binden kann. Die BBA kann eine oder mehrere Pilotsequenzen, sogenannte "PILOTS" oder "Asymmetriesequenzen", umfassen, die ein zwanghaftes Zusammensetzen der Nucleotid-Bindungskomponenten der TBA zu spezifischen Geometrien bewirken. Die PILOTS bewirken ein Zusammensetzen von spezifischen Nucleinsäure-Erkennungseinheiten oder anderen PILOTS, an denen spezifische Nucleinsäure-Erkennungseinheiten an den BBAs in einer vorgegebenen Art und Weise angebracht werden. Die BBA kann Moleküle enthalten, die die BBA verankern oder lokalisieren oder die einen Nachweis der gebundenen BBAs und dadurch der TBA-TNA-PNA-Komplexe, an die sie wiederum gebunden sein können, ermöglichen. Es werden Verfahren und Zusammensetzungen zur Verwendung der 1/2-BBRs, BNAs, BBRs, BBAs und BBA-PILOTS, einschließlich deren Verwendung als Komponenten von diagnostischen und gerichtsmedizinischen Testkits, beschrieben.

Es werden Verfahren und Zusammensetzungen für Testverfahren und die Herstellung eines Testkits mit einem Gehalt an PNAs, TBAs, TBRs, BNAs, BBRs, BBAs und HNAs zum Nachweis, zur Lokalisierung und zur Differenzierung spezifischer Nucleinsäuresequenzen beschrieben, unter Einschluss von Nucleinsäuresequenzen, die in humanen Zellen, im humanen Immunschwächevirus (HIV), im humanen Papillomavirus (HPV) und in anderen nucleinsäurehaltigen Systemen, einschließlich Viren und Bakterien, auftreten.

Demzufolge besteht eine Aufgabe der Erfindung in der Bereitstellung von Verfahren und Zusammensetzungen zur Verwendung bei der Bindung, dem Nachweis und der Amplifikation des Nachweises spezifischer Zielnucleinsäuresequenzen in einer Probe in zuverlässiger und genauer Weise, und zwar selbst in Gegenwart von eng verwandten, aber unterschiedlichen Nucleinsäuresequenzen.

Demgemäß besteht eine Aufgabe der Erfindung in der Bereitstellung von Verfahren und Zusammensetzungen zur Schaffung von Zielbindungsanordnungen, die spezifisch Zielbindungsregionen binden, die durch

die Hybridisierung von Sondennucleinsäuren und Zielnucleinsäuresequenzen gebildet worden sind.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens und von Zusammensetzungen zur Schaffung von Booster-Bindungsanordnungen, die spezifisch Booster-Bindungsregionen binden, die durch die Hybridisierung von Booster-Nucleinsäuresequenzen mit Sondennucleinsäuren, Booster-Nucleinsäuren und Haarnadel-Nucleinsäuren gebildet werden.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens und von Zusammensetzungen zur Verwendung bei der Amplifikation des Nachweises von Zielbindungsanordnungen, die an Zielbindungsregionen gebunden sind, unter Verwendung von Booster-Bindungsanordnungen und Booster-Nucleinsäuren.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens und von Zusammensetzungen, die die Anwendung von einer oder mehreren nachweisbaren Markierungen ermöglichen, unter Einschluss (jedoch ohne Beschränkung hierauf) von radioaktiven Markierungen, lichterzeugenden, fluoreszierenden, enzymatischen oder anderen signalerzeugenden Molekülen. Diese Markierungen werden in Verbindung mit Sondennucleinsäuren, Zielbindungsanordnungen, Booster-Bindungsanordnungen, Booster-Nucleinsäuren oder Haarnadelnucleinsäuren verwendet.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

In Fig. 1 sind die folgenden Darstellungen enthalten: Fig. 1-I ist eine PNA mit einem Gehalt an einer 1/2-TBR, bei der es sich um eine einzelsträngige Sequenz handelt, die komplementär zu einer TNA- und einer 1/2-BBR-Sequenz ist. Fig. 1-IIa ist eine TNA, an die die Komponenten von Fig. 1-I addiert sind und die unter Hybridisierungsbedingungen die PNA unter Bildung der Komponenten von Fig. 1-IIIa bindet, ein PNA-TNA-Hybrid mit einem Gehalt an mindestens einer TBR. Fig. 1-IVa ist eine BNA, an die die Komponenten von Fig. 1-IIIa addiert sind und die unter Hybridisierungsbedingungen die 1/2-BBR von Fig. 1-IIIa unter Bildung eines PNA-BNA-Hybrids mit einem Gehalt an einer BBR gemäß Darstellung in Fig. 1-Va bindet.

Fig.1-IIb ist eine BNA, die an die Komponenten von Fig. 1-I addiert ist und die unter Hybridisierungsbedingungen die PNA unter Bildung der Komponenten von Fig. 1-IIIb bindet, ein PNA-TNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer BBR. Fig. 1-IVb ist eine TNA, an die die Komponenten von Fig. 1-IIIb addiert sind und die unter Hybridisierungsbedingungen die 1/2-TBR von Fig.1-IIIb unter Bildung eines PNA-

BNA-Hybrids mit einem Gehalt an einer TBR gemäß Darstellung in Fig. 1-Vb bindet.

Fig. 1-IIc ist eine HNA, an die die Komponenten von Fig. 1-I addiert sind und die unter Hybridisierungsbedingungen die PNA unter Bildung der Komponenten von Fig. 1-IIIc bindet, ein PNA-HNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer BBR. Fig. 1-IVc ist eine TNA, an die die Komponenten von Fig. 1-IIIc addiert sind und die unter Hybridisierungsbedingungen die 1/2-TBR von Fig. 1-IIIc unter Bildung eines PNA-BNA-Hybrids mit einem Gehalt an einer BBR gemäß Darstellung in Fig. 1-Vc bindet.

Die Hybride, die die TBRs und BBRs bilden, sind erfindungsgemäß geeignet. Die PNAs und BNAs, die in Fig. 1 angegeben sind, können ohne befestigten Träger und/oder Indikator (OSA) vorliegen oder einen befestigten Träger oder andere Lokalisierungsmittel enthalten, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) eine Befestigung an Perlen, Polymere und Oberflächen, und/oder Indikatoren.

Fig. 2a ist eine Darstellung von Strategien für die Polymerisation von BNAs an PNAs und eine Maskierung durch HNAs.

Fig. 2b ist eine Darstellung zusätzlicher Strategien zur Amplifikation von PNA-TNA-Signalen über eine Polymerisation von BNAs und eine Maskierung durch HNAs.

Fig. 3 ist eine Darstellung der Verwendung von BNAs mit einem Gehalt an mehrfachen 1/2 BBRs pro BNA.

Fig. 4a ist eine Darstellung der Bindung von TBAs und BBAs an TBRs und BBRs und der Fähigkeit der TBA zur Unterscheidung zwischen TNAs und CNAs. Gemäß dieser Ausführungsform werden dann, wenn die TBA immobilisiert ist, und zwar entweder an einer Perle, einer Mikrotiterplatten-Oberfläche oder an einer beliebigen anderen derartigen Oberfläche, nur Komplexe, wie Komplex X, zurückgehalten und nachgewiesen, während dies bei Komplexen, wie Komplex XI, nicht der Fall ist.

Fig. 4b ist eine Darstellung von beispielhaften Ereignissen, ähnlich denen von Fig. 4a, jedoch in einer geringfügig unterschiedlichen Reihenfolge des Auftretens der Ereignisse.

Fig. 5 ist eine Darstellung von beispielhaften PNAs mit einem Gehalt von einer 1/2-TBR und keiner 1/2-BBR bis zu PNAs mit einem Gehalt an bis zu fünf 1/2-TBRs und einer 1/2-BBR. Die Bestandteile (a) und (b) der einzelnen Ziffern (I, II, III, IV und V) bilden einen Satz, der bei Hybridisierung an eine TNA TBRs ergibt, und zwar mit ((a)-Bestandteile) oder ohne ((b)-Bestandteile) einer verfügbaren 1/2-BBR für die Amplifikation über eine Hybridisierung an BNAs mit komplementären 1/2-BBRs.

Fig. 6a ist eine Darstellung von Beispielen einer bestimmten TNA mit zwei 1/2-TBRs, die bei Bindung an eine geeignete PNA zwei eng assoziierte TBRs bildet, die zur Bindung von zwei TBAs befähigt sind. Ferner wird eine 1/2-BBR für die Amplifikation bereitgestellt.

Fig. 6b ist eine Darstellung der gleichen Ereignisse wie in Fig. 6a, mit der Ausnahme, dass hier eine doppelte TBA verwendet wird, so dass eine Unterscheidung zwischen einzelnen TBRs, die in normalen Zellproben auftreten, von abnormalen, doppelten TBRs möglich ist.

Fig. 6c ist eine Darstellung des gleichen Szenariums wie in Fig. 6a, mit der Ausnahme, dass hier fünf TBRs in der TNA identifiziert sind. Jede TBR kann an eine gleiche oder unterschiedliche TBA gebunden sein und jede TBA kann unterschiedlich markiert sein, was eine Bestätigung ermöglicht, dass sämtliche fünf Stellen in der TNA vorhanden sind.

Fig. 6d ist eine Darstellung der gleichen Ereignisse wie in Fig. 6c, mit der Ausnahme, dass hier eine doppelte TBA dargestellt ist, wodurch der in Fig. 6b dargestellte Sachverhalt auf die Anwendung der doppelten TBA ausgedehnt ist. Ein Beispiel der in Abschnitt II der Figg. 6a, 6b, 6c und 6d dargestellten TNA ist einzelsträngige HIV-DNA oder -RNA.

Fig. 7 zeigt die HIV-LTR als eine TNA sowie zwei PNAs und eine Strategie zum Nachweis der TNA unter Verwendung der PNAs.

Fig. 8 zeigt schematisch eine Ausführungsform der Erfindung, wobei eine Zielbindungsanordnung zur Bindung eines hybriden TNA-PNA verwendet wird und Booster-Bindungsanordnungen zur Bindung von polymerisierten BNAs verwendet werden.

Fig. 9 zeigt schematisch eine modulare TBA, wobei Anordnungssequenzen, Linkersequenzen und Asymmetriesequenzen dazu verwendet werden, erwünschte Nucleinsäure-Erkennungseinheiten miteinander unter Bildung einer TBA zu begleiten.

Fig. 10 zeigt modulare TBAs, die zum Nachweis von HIV-spezifischen Sequenzen geeignet sind.

Fig. 11 zeigt modulare TBAs, die zum Nachweis von humanen Papillomavirus-Sequenzen geeignet sind. Jede Einheit von E2 ist tatsächlich ein Dimeres des DNA-Bindungsgebietes von E2.

Fig. 12a zeigt schematisch eine TNA-Fraktionierung und -Mobilitätsverschiebung aufgrund der Bindung einer TBA.

Fig. 12b zeigt schematisch eine TNA-Fraktionierung und verstärkte Mobilitätsverschiebung aufgrund der Bindung von BBAs neben TBAs.

Fig. 13 zeigt eine Nachweisstrategie für Deletionssequenzen; ein Beispiel zur Anwendung dieser Strategie ist ein Integrationstest auf humanen Papillomavirus.

Fig. 14 zeigt eine Anordnung von TBAs höherer Ordnung durch Verwendung von Nucleinsäure-Erkennungseinheiten, Linker-, Anordnungs- und Asymmetriesequenzen, so dass verschiedene Zielbindungsanordnungen, die spezifisch für die Bindungsstellen in der HIV-LTR sind, gebildet werden.

Fig. 15 zeigt eine Anordnung von TBAs höherer Ordnung durch Verwendung von DNA-Erkennungseinheiten, Linker-, Anordnungs- und Asymmetriesequenzen, so dass verschiedene Zielbindungsanordnungen, die spezifisch für Bindungsstellen im HPV-Genom sind, gebildet werden.

Fig. 16 zeigt die unter Verwendung einer komplexen TBA erzielte Unterscheidung und die Fähigkeit von endogenen Konkurrenz-Zielbindungs-molekülen zur Beseitigung der Bindung der TBA an eine Cousin-Nucleinsäure, jedoch nicht von der TNA, die die geeignete Orientierung von mehr als einer Stelle, die durch die TBA erkannt wird, enthält.

Fig. 17 zeigt die Fähigkeit von TBA zur spezifischen Zielrichtung zur Bindung an Stellen von Sequenz-Fehlpaarungen und zur bevorzugten Bindung solcher Stellen gegenüber Cousin-Stellen, die nicht alle Ziel-Fehlpaarungen enthalten.

Kurze Beschreibung der Sequenzen

SEQ ID NO: 1 entspricht Fig. 5-la-1 und zeigt die Klasse I-MHC-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NO: 2 entspricht Fig. 5 (la) und zeigt die B2-Mikroglobulin-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NO: 3 entspricht Fig. 5 (la) und zeigt die kappa-Immunglobulin-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NO: 4 entspricht Fig. 5 (la) und zeigt eine der HIV-NF-kB-Bindungsstellen.

SEQ ID NO: 5 entspricht Fig. 5 (la) und zeigt eine der HIV-NF-kB-Bindungsstellen.

SEQ ID NO: 6 entspricht Fig. 5 (la) und zeigt die c-myc-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NO: 7 entspricht Fig. 5 (IIa) und zeigt eine doppelte HIV-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NO: 8 entspricht Fig. 5 (IIa) und zeigt eine doppelte HIV-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NOs: 9-16 entsprechen Fig. 5 (IIa) und zeigen eine doppelte Bindungsstelle, wobei es sich bei der einen Stelle um eine HIV-NF-kB-

Bindungsstelle und bei der anderen Stelle um eine HIV-SP-1-Bindungsstelle handelt.

SEQ ID NOs: 17-18 entsprechen Fig. 5 (IIa) und zeigen eine doppelte HIV-SP1-Bindungsstelle.

SEQ ID NOs: 19-31 entsprechen Fig. 5 (IIIa) und zeigen eine doppelte HIV-NF-kB-Bindungsstelle und eine HIV-SP1-Bindungsstelle.

SEQ ID NOs: 32-33 entsprechen Fig. 5 (IVa) und zeigen eine vierfache Bindungsstelle, wobei es sich bei zwei Stellen um HIV-NF-kB-Bindungsstellen und bei zwei Stellen um HIV-SP1-Bindungsstellen handelt.

SEQ ID NO: 34 entspricht Fig. 5 (VIa) und zeigt eine fünffache Bindungsstelle, wobei es sich bei zwei Stellen um HIV-NF-kB-Bindungsstellen und bei drei Stellen um HIV-SP1-Bindungsstellen handelt.

SEQ ID NO: 35 ist ein Beispiel für eine 1/2-BBR, in diesem Fall die OL1-, OL2- und OL3-Elemente des linken lambda-Bacteriophagen-Operators, einschließlich zwischenliegender Sequenzen.

SEQ ID NO: 36 ist ein Beispiel für eine 1/2-BBR, in diesem Fall die OR3-, OR2- und OR1-Elemente des rechten lambda-Bacteriophagen-Operators, einschließlich zwischenliegender Sequenzen.

SEQ ID NO: 37 zeigt die HIV-LTR

SEQ ID NO: 38 zeigt eine PNA, die komplementär zur PNA der HIV-LTR ist.

SEQ ID NO: 39 zeigt eine PNA, die komplementär zu einer im Vergleich zu SEQ ID NO: 38 unterschiedlichen PNA der HIV-LTR ist.

SEQ ID NO: 40 zeigt eine PNA, die komplementär zu einem Teil der HIV-LTR ist und ferner eine 1/2-BBR und eine Überhangsequenz zur Polymerisation von BNAs an die PNA enthält.

SEQ ID NO: 41 zeigt eine BNA, die komplementär zur SEQ ID NO: 40-1/2-BBR ist.

SEQ ID NO: 42 zeigt eine BNA, die eine Polymerisation an der SEQ ID NO: 41-BNA eingeht und zusammen mit SEQ ID NOs: 40 und 41 eine PstI-Erkennungsstelle schafft.

SEQ ID NO: 43 zeigt eine BNA, die komplementär zur SEQ ID NO: 42-BNA ist und die eine BamHI-Erkennungsstelle vervollständigt.

SEQ ID NO: 44 zeigt eine HNA, die eine BamHI-Erkennungsstelle aufweist, die mit der BamHI-Erkennungsstelle die durch SEQ ID NOs: 42 und 43 am wachsenden Polymeren erzeugt worden ist, hybridisiert.

SEQ ID NO: 45 zeigt eine zweite PNA, die ähnlich wie SEQ ID NO: 40 komplementär zu einem Teil der HIV-LTR ist, jedoch nicht mit der gleichen Sequenz wie SEQ ID NO: 40. SEQ ID NO: 45 kodiert ferner für eine 1/2-BBR und

einen Überhang, der eine Polymerisation von BNAs, beginnend mit einer Sphl-Erkennungsstelle, ermöglicht.

SEQ ID NOs: 46-62 zeigen humane Papillomavirus (HPV)-spezifische PNAs, die bei Hybridisierung mit HPV-Sequenzen TBRs bilden, die HPV-DNA-Bindungsproteine binden.

SEQ ID NOs: 63-71 zeigen NF-kB-DNA-Erkennungseinheiten zum Einbau in TBAs.

SEQ ID NO: 72 zeigt eine nukleare Lokalisierungssequenz.

SEQ ID NO: 73 zeigt eine SP1-Sequenzerkennungseinheit.

SEQ ID NO: 74 zeigt eine TATA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NOs: 75-84 zeigen Papillomavirus-E2-DNA-Erkennungseinheiten.

SEQ ID NOs: 85-92 zeigen Asymmetriesequenzen.

SEQ ID NO: 93 zeigt eine Arabidopsis-TATA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NO: 94 zeigt eine HPV-16-E2-1-DNA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NO: 95 zeigt eine HPV-16-E2-2-DNA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NO: 96 zeigt eine HPV-18-E2-DNA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NO: 97 zeigt eine HPV-33-E2-DNA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NO: 98 zeigt eine Rinder-Papillomavirus-E2-DNA-Bindungsprotein-Erkennungseinheit.

SEQ ID NOs: 99-102 zeigen beispielhafte Linkersequenzen.

SEQ ID NO: 103 zeigt ein Beispiel für eine nukleare Lokalisierungssignalsequenz (NLS).

SEQ ID NOs: 104-108 zeigen beispielhafte Begleitersequenzen.

SEQ ID NOs: 109-116 zeigen beispielhafte zusammengesetzte TBA-Sequenzen.

SEQ ID NO: 117 zeigt eine Konsensus-NF-kB-Bindungsstelle.

SEQ ID NO: 118 zeigt eine HIV-Tat-Aminosäuresequenz.

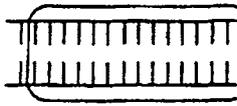
Abkürzungen

TTTTTTTTTT

einzelsträngige Nucleinsäure

TTTTTTTTTT
TTTTTTTTTT

doppelsträngige Nucleinsäure



	Bindungsregion an einer Nucleinsäure
	kein Träger oder Indikatoren oder fester Träger oder andere Lokalisierungsmittel, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) Anbringung an Perlen, Polymere und Oberflächen, oder Indikatoren = OSA
BBA	Booster-Bindungsanordnung
BBR	Booster-Bindungsregion
BNA	Booster-Nucleinsäure
CNA	Cousin-Nucleinsäure
1/2-BBR	einzelsträngige Region, die bei Hybridisierung mit der komplementären Sequenz einer HNA oder einer BNA eine BBA binden kann
1/2-TBR	einzelsträngige Region der PNA, die bei Hybridisierung mit der komplementären Sequenz einer TNA eine TBA binden kann
OSA	fakultativer Träger oder Befestigung, Kreis im Kästchen
PNA	Sondennucleinsäure
TBA	Zielbindungsanordnung
TBR	Zielbindungsregion
TNA	Zielnucleinsäure
HNA	Haarnadelnucleinsäure

Definitionen

Aus der folgenden Beschreibung ist ersichtlich, dass dann, wenn Ausdrücke, wie Zielbindungsanordnungen (TBAs), Booster-Bindungsanordnungen (BBAs), DNA-Bindungsproteine, Nucleinsäurebindungsproteine oder RNA-Bindungsproteine, erwähnt werden, darunter Zusammensetzungen zu verstehen sind, die aus Molekülen bestehen, die DNA- oder RNA-Zielnucleinsäuresequenzen (TNAs) binden, unabhängig von der Spezifität der Kategorie von Bindungsmolekülen, aus denen sie abgeleitet sind. Somit kann beispielsweise eine TBA, die zur Bindung an humane Immunschwächevirus-Sequenzen geeignet ist, sehr ähnlich einem NF-KB-Transkriptionsfaktor sein, der typischerweise DNA-Sequenzen bindet. Jedoch ist der Gebrauch hier so zu verstehen, dass die TBA in optimaler Weise zur Bindung an RNA-Sequenzen einer bestimmten Sequenzzusammensetzung oder -konformation geeignet ist.

Die Zuverlässigkeit des hier beschriebenen Nachweisverfahrens hängt in hohem Maße von der selektiven Bindung von TBAs und BBAs an bestimmte Nucleinsäuremotive ab. Es ist darauf hinzuweisen, dass in der gesamten Beschreibung die Basis für eine TBA- und BBA-Unterscheidung der TNAs von verwandten Sequenzen (Cousin-Nucleinsäuren oder CNAs) in der Bildung von präzisen Sondennucleinsäure (PNA)-Zielnucleinsäure (TNA)-Hybridsegmenten (PNA-TNA-Hybride) liegen kann. Jedoch kann die Basis für die Unterscheidung ebenso in der Bildung einer bestimmten Konformation liegen und erfordert möglicherweise nicht das vollständige Fehlen einer fehlerhaften Basenpaarung im TNA-PNA-Hybrid. Demzufolge ist es ersichtlich, dass die Basis der TBA- oder BBA-Operation durchweg von einer Unterscheidung einer beliebigen Eigenschaft, die einzigartig für das TNA-PNA-Hybrid ist, abhängt, im Gegensatz zu beliebigen Eigenschaften, die bei beliebigen PNA-CNA-Hybriden auftreten, die in einer Testprobe, die mit einer vorgegebenen PNA in Kontakt gebracht wird, gebildet werden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung wird durch die beigefügten Ansprüche definiert. Sie stellt ein Verfahren zur spezifischen Identifikation einer Zielnucleinsäure (TNA) in einer Probe durch Verwendung von Zielbindungsanordnungen (TBAs), die spezifische Nucleinsäure-Bindungsproteine enthalten, bereit. Durch Verwendung von Sondennucleinsäuren (PNAs), die spezifisch für eine gegebene TNA-Sequenz sind, und einer TBA, die spezifisch für die Duplex-Zielbindungsregion (TBR), die bei Bildung von hybriden TNA-PNA-Sequenzen entsteht, ist, wird ein stabiler TBA-TNA-PNA-Komplex gebildet. Durch zusätzliches Bereitstellen spezifischer, amplifizierbarer Sequenzen in der PNA zusätzlich zu Sequenzen, die spezifisch zur Bildung der durch die TBA erkannten TBR beitragen, wird die Bindung der PNA an die TNA nachgewiesen und der Nachweis wird amplifiziert. Zu diesem Zweck können zahlreiche Nucleinsäure-Amplifikationssysteme, einschließlich der Polymerase-Kettenreaktion, oder eine verzweigte DNA, wobei jede Verzweigung eine nachweisbare Markierung enthält, verwendet werden. Insbesondere wird ein neuartiges Verfahren zur Amplifikation beschrieben, bei dem der amplifizierbare Bereich der PNA Sequenzen enthält, an die Booster-Nucleinsäuren (BNAs) polymerisiert werden können. Bei Bildung eines jeden BNA-PNA-Hybrids wird eine Booster-Bindungsregion (BBR) gebildet, an die spezifisch eine Booster-Bindungsanordnung (BBA) bindet. Bei nachweisbarer Markierung sorgen die BBAs oder BNAs für eine im wesentlichen unbegrenzte Amplifikation des ursprünglichen TNA-PNA-Bindungsereignisses.

Erfindungsgemäß ist der Begriff TNA so zu verstehen, dass er spezifische Nucleinsäuresequenzen umfasst. Der Begriff TBA ist als eine beliebige molekulare Anordnung zu verstehen, die eine spezifische und feste Bindung an ein gebildetes TNA-PNA-Hybrid eingehen kann. Die TBA enthält ein oder mehr Moleküle, deren Sequenzen zur Bindung an die TBR ausreichen. Nucleinsäure-Bindungsdomänen, die bekannt sind, können entweder direkt als Komponenten der TBA oder nach Modifikation gemäß der hier vermittelten Lehre verwendet werden. Bei den am leichtesten zugänglichen Molekülen mit derartigen Sequenzen handelt es sich um die DNA-Bindungsdomänen von DNA bindenden Proteinen. Speziell sind zahlreiche DNA- oder RNA-Bindungsproteine bekannt, die entweder direkt wie das bekannte, unmodifizierte Protein verwendet werden können, oder bei der TBA kann es sich um ein Nucleinsäure-Bindungsprotein handeln, das gemäß der hier speziell vermittelten Lehre modifiziert worden ist. Im letztgenannten Fall gehören zu erstrebenswerten Modifikationen eine Optimierung der Bindungsaffinitäten, eine Beseitigung von unerwünschten Aktivitäten (z. B. einer Nuclease-Aktivität und eine Reorganisation der TBA in Gegenwart von anderen Molekülen mit Affinität für Komponenten der TBA), eine Optimierung der Selektivität einer Zielsequenz gegenüber eng verwandten Sequenzen und eine Optimierung der Stabilität.

Zu Beispielen für DNA-Bindungsproteine, die erfindungsgemäß verwendet werden können, gehören die DNA-Bindungsgebiete des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p50 und p65), NF-IL6, NF-AT, rel, TBP, das Papillomavirus-E2-Protein, sp1, die Repressoren cro und CI aus dem lambda-Bacteriophagen. Es sind derartige Proteine bekannt, deren DNA-Bindungsgebiet isoliert, kloniert, sequenziert und charakterisiert worden ist. Ferner gehören hierzu beliebige andere DNA-Bindungsproteine oder Teile eines Proteins, die zur Bindung eines TBR-Hybrids oder einer BBR notwendig und ausreichend sind. Hierzu gehören Proteine oder Teile von Wildtypproteinen mit veränderter DNA-Bindungsaktivität sowie erzeugte Proteine mit veränderter DNA-Bindungsspezifität, z. B. durch Austausch einer DNA-Bindungserkennungshelix aus einem Protein gegen ein anderes Produkt. Außerdem können Proteine, die Nucleinsäure-Bindungsfunktionen und andere Nucleinsäure-Funktionen ausüben, wie Restriktionsendonucleasen, als die Nucleinsäure-Bindungsfunktion verwendet werden. Proteine, die Zielregionen in DNA-RNA-Hybriden sowie in RNA-RNA-Hybriden binden, gehören dazu (vergl. beispielsweise Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). Die Bindungsanordnungen können unter Verwendung eines Moleküls, das Teile der Bindungsanordnung begleitet, so konstruiert werden, dass spezifische Komponentenkombinationen und Geometrien

erreicht werden können. Dieses Molekül wird hier als ein PILOT bezeichnet. Piloten können aus Proteinen oder beliebigen Kombinationen von organischen und anorganischen Materialien bestehen, die eine kombinatorische Auswahl ergeben und/oder spezifische Geometrien zwischen Mitgliedern der TBAs oder BBAs herbeiführen. Ein Begleiter ("chaperon") ist ein stabiles Gerüst, an dem eine TBA oder BBA so konstruiert werden kann, dass die richtige Konformation der TBA oder BBA erreicht wird, während gleichzeitig unerwünschte Eigenschaften eines natürlicherweise vorkommenden Nucleinsäure-Bindungsproteins beseitigt werden. Als spezielles Beispiel für diese Ausführungsform wird eine modifizierte Version des pleiotropen Transkriptionsfaktors NF- κ B unter Verwendung eines modifizierten lambda-Bacteriophagen-cro-Proteins als Begleiter bereitgestellt. Jedes NF- κ B-Bindungsdimere behält die picomolare Bindungsaffinität für die NF- κ B-Bindungsstelle, während gleichzeitig die Bindungsanordnung mehrere vorteilhafte Eigenschaften in Bezug auf Herstellung, Stabilität und Spezifität aufweist.

Unter Berücksichtigung der vorstehenden Ausführungen werden die verschiedenen Aspekte und Ausführungsformen der Erfindung nachstehend ausführlich beschrieben.

1. Sondennucleinsäuren (PNAs) und ihre Herstellung. Die erfindungsgemäßen PNAs umfassen mindestens drei miteinander verbundene Hauptteile. Gemäß Fig. 1(I) der Zeichnungen handelt es sich beim ersten Teil der PNA um eine oder mehrere Sequenzen von Basen mit der Bezeichnung "1/2-TBR". Gemäß Fig. 1(I und IIa) der Zeichnungen ist die 1/2-TBR in der PNA komplementär zu einer Sequenz von Interesse in einer Probe, wobei die TNA eine 1/2-TBR enthält. Gemäß Fig. 1(IIIa) der Zeichnungen bildet die TNA bei Addition an die PNA unter Hybridisierungsbedingungen ein PNA-TNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer TBR. Gemäß Fig. 1(I) der Zeichnungen handelt es sich beim zweiten Teil der PNA um eine Sequenz von Basen mit der Bezeichnung "1/2-BBR". Gemäß Fig. 1(I, IIb, IIc und IVa) der Zeichnungen ist die 1/2-BBR in der PNA komplementär zu einer 1/2-BBR, die in einer BNA oder HNA enthalten ist. Gemäß Fig. 1(IIIb, IIc oder Va) der Zeichnungen bildet die BNA oder HNA bei Zugabe zur PNA unter Hybridisierungsbedingungen ein PNA- oder HNA-Hybrid. Gemäß Fig. 1(I) der Zeichnungen handelt es sich beim dritten Teil der PNA um eine OSA, die als Kreis in einem Kästchen angedeutet ist. Bei der OSA kann es sich um einen Nicht-Träger und/oder Indikator oder festen Träger oder um andere Lokalisierungsmittel handeln, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) um eine Befestigung an Perlen, Polymeren und Oberflächen und/oder Indikatoren, die an die PNA kovalent gebunden oder in nicht-kovalenter, jedoch spezifischer Weise

mit der PNA assoziiert sind. Bei der OSA kann es sich um ein Atom oder ein Molekül handeln, das die Trennung und/oder die Lokalisierung unterstützt, z. B. um eine Festträger-Bindungsgruppe oder Markierung, die durch verschiedene physikalische Maßnahmen nachgewiesen werden kann, einschließlich durch (ohne Beschränkung hierauf) Adsorption oder Abbildung von emittierten Teilchen oder Licht. Verfahren zum Anbringen von Indikatoren an Oligonucleotiden oder zur Immobilisierung von Oligonucleotiden an festen Trägern sind aus dem Stand der Technik bekannt (vergl. Keller und Manak, a.a.O.).

Die erfindungsgemäße PNA kann durch beliebige geeignete Verfahren hergestellt werden. Zu derartigen Verfahren gehören allgemein die Oligonucleotidsynthese und die Klonierung in einem replizierbaren Vektor. Verfahren zur Nucleinsäuresynthese sind aus dem Stand der Technik bekannt. Bei der Klonierung oder Synthese kann eine Reinigung und Abtrennung von Strängen zur Verwendung des Produkts als reine PNA erforderlich sein. Verfahren zur Herstellung von RNA-Sonden sind bekannt (vergl. beispielsweise Blais 1993, Blais 1994, der sich der in vitro-Transkription nach einer PCR-Reaktion unter Einsatz eines T7-RNA-Polymerase-Promotors bedient).

Die Länge und die spezifische Sequenz der PNA sind, wie es für den Fachmann ersichtlich ist, von der Länge und der Sequenz, die in einer TNA nachzuweisen sind, und den Einschränkungen zur Erzielung einer engen und spezifischen Bindung der zu verwendenden speziellen TBA abhängig (vergl. die nachstehende Erörterung über TBAs). Im allgemeinen sind PNAs mit Sequenzlängen von etwa 10 bis etwa 300 Nucleotiden geeignet, wobei Längen von etwa 15-100 Nucleotiden für zahlreiche der hier beschriebenen speziellen Ausführungsformen erstrebenswert sind.

Ferner ist darauf hinzuweisen, dass die PNA so konstruiert sein kann, dass sie mehr als eine 1/2-TBR enthält und mehr als eine TBR für eine oder mehrere TBAs erzeugt, die gleich oder verschieden sind, sowie komplexe TBRs, die durch neue Duplex- und Multiplex-TBAs (vergl. die nachstehenden Ausführungen bezüglich dieser neuartigen TBAs) bei Hybridisierung der PNAs und TNAs erkennt. Fig. 5 zeigt die spezifischen PNAs, die eine oder mehrere 1/2-TBRs enthalten. Spezifische Sequenzen, die den 1/2-TBR-Sequenzen gemäß Darstellung in Fig. 5(Ia, IIa, IIIa, IVa und Va) entsprechen, sind die Sequenzen SEQ ID NOs: 1-34 (vergl. die vorstehende Beschreibung der Sequenzen).

Wie in den Figuren 2a und 2b gezeigt, kann die PNA mit einem Gehalt an einer 1/2-TBR mit einer oder mehreren BNAs (vergl. die nachstehenden Ausführungen) hybridisiert werden und die Kette von BNAs kann zu einer beliebigen potentiellen Länge für die Amplifikation des TNA-PNA-

Hybridisierungsereignisses polymerisiert werden. Vorzugsweise sind 1 bis 10 1/2-BBRs in der PNA vorhanden.

Wie in den Figuren 6a und 6b gezeigt, kann die PNA mehrere 1/2-TBRs, die gleich oder verschieden sind, enthalten, die mit mehreren 1/2-TBRs in einer TNA hybridisieren können. Jedes Mal, wenn eine 1/2-TBR in der PNA zu einer 1/2-TBR in einer TNA passt, wird eine Zielbindungsregion, TBR, gebildet, die eine TBA binden kann. Ferner ist es nicht wesentlich, dass es sich bei sämtlichen TBRs um eine einzelne, zusammenhängende PNA handelt. Somit werden in einer Ausführungsform der Erfindung zwei verschiedene PNAs zum Nachweis von Sequenzen an einer bestimmten TNA verwendet. Als eine Erläuterung dieses Aspekts der Erfindung zeigt Fig. 7 eine Darstellung der langen terminalen Wiederholungssequenz (LTR) des humanen Immunschwächevirus (HIV). Wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, umfasst die HIV-LTR zwei NF- κ B-Bindungsstellen und drei SP1-Bindungsstellen in enger Nachbarschaft, wobei NF- κ B und SP1 bekannte DNA-Bindungsproteine darstellen. Fig. 7 zeigt zwei PNAs, PNA1 (SEQ ID NO: 38) und PNA2 (SEQ ID NO: 39), die jeweils komplementär zum gegenüberliegenden Strang sind, der als eine TNA (SEQ ID NO: 37) dargestellt ist, die die beiden NF- κ B-Bindungsstellen und die drei SP1-Bindungsstellen der HIV-LTR zeigt. Gemäß diesem Aspekt der Erfindung hybridisiert PNA1 spezifisch mit dem Abschnitt der in Fig. 7 gezeigten TNA, bei dem die Basen mit einem "+"-Symbol unterstrichen sind, während PNA2 spezifisch mit dem in Fig. 7 dargestellten Abschnitt der TNA hybridisiert, bei dem die Basen mit einem "="-Symbol unterstrichen sind. Jede PNA1 oder PNA2 kann ferner Sequenzen (mit den Symbolen "#" oder "*" bezeichnet) enthalten, die mit 1/2-BBR-Sequenzen einer BNA hybridisieren (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Ferner kann jede PNA1 und PNA2 unterschiedlich mit einer OSA markiert sein, z. B. einem Fluorophor, wie einer Fluorescein- oder einer Rhodamin-Markierung, was eine Bestätigung ermöglicht, dass beide Sonden an die TNA gebunden worden sind. Wenn nur eine oder gar keine Markierung nachgewiesen wird, lässt dies den Schluss zu, dass die TNA in der getesteten Probe nicht vorhanden ist.

Gemäß einem weiteren Aspekt der in Fig. 7 dargestellten Ausführungsform wird ein Verfahren zur Veränderung der Spezifität des vorliegenden Testverfahrens dargelegt. Durch Veränderung der Länge der Lücke zwischen PNA1 und PNA2 in der Weise, dass die unhybridisiert verbleibende TNA-Region verändert wird, ist man bei der Ausführung der Erfindung dazu befähigt, das Unterscheidungsvermögen des Tests zu verändern.

Um diesen Aspekt der Erfindung klarer durch ein Beispiel zu belegen, muss betont werden, dass die TBR eine helikale Struktur aufweisen kann. Während somit PNA1 auf einer "Seite" der Helix TBRs erzeugt, erzeugt PNA2 entweder auf der gleichen oder auf einer unterschiedlichen Seite der Helix je nach dem Abstand zwischen den Zentren der einzelnen TBRs (in Fig. 7 unterstrichen) eine TBR. Wenn die Mitte jeder Bindungsstelle um ein ganzzahliges Produkt von 10,5 Basen entfernt ist, befinden sich die TBRs auf der gleichen Seite der Helix, während bei einem Abstand mit einem Wert eines nicht-ganzzahligen Produkts von 10,5 Basen die TBRs sich auf gegenüberliegenden Seiten der Helix befinden. Auf diese Weise kann eine Kooperativität der Bindung durch die TBA, die die PNA1-TBR erkennt, und der TBA, die die PNA2-TBR erkennt, manipuliert werden (vergl. A. Hochschild, M. Ptashne, Cell, Bd. 44 (1986), S. 681-687, wo dieser Effekt für die Bindung des lambda-Bacteriophagen-Repressors an zwei verschiedene Operatorstellen, die sich in unterschiedlichen Abständen voneinander an einer DNA-Helix befinden, dargelegt wird). Wie von Perkins et al., EMBO J., Bd. 12 (1993), S. 3551-3558, ausgeführt wird, ist eine Kooperativität zwischen den NF-kB- und SP1-Stellen erforderlich, um eine Aktivierung der HIV-LTR zu erreichen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann das Zweifach-NF-kB-Dreifach-SP1-Bindungsstellenmotiv in der HIV-LTR in vorteilhafter Weise ausgenutzt werden, indem man ein einziges, neuartiges Bindungsprotein bereitstellt, das zur gleichzeitigen Bindung an beide Stellen befähigt ist, jedoch nur, wenn der Abstand zwischen den Stellen geometrisch geeignet ist. Dies wird sowohl durch die Struktur der gewählten TBA als auch durch die verwendeten PNAs gesteuert. Somit können in der in Fig. 7 dargestellten Ausführungsform die beiden Sonden mit einem ausreichend großen Intersondenbereich aus verbleibender einzelsträngiger DNA verwendet werden, so dass selbst dann, wenn sich die NF-kB- und SP1-Bindungsstellen auf gegenüberliegenden Seiten der Helix befinden, die einzelsträngige Region zwischen den Sonden ein ausreichend flexibles "Gelenk" ergibt, so dass die DNA sich sowohl biegen als auch verdrillen kann, um sich der Geometrie der TBA anzupassen. Alternativ kann ein stringenterer Test konzipiert werden, indem man den Intersondenabstand so verengt, dass die DNA nur gebogen, jedoch nicht verdrillt werden kann. Schließlich können die Sonden in so engem Abstand angeordnet werden oder es kann eine einzelne PNA verwendet werden, so dass die DNA sich nur biegen, jedoch nicht verdrillen kann. Somit wird anhand dieser Figur die Herstellung von Nachweissystemen beispielhaft erläutert und ermöglicht, bei denen ein beliebiger vorgegebener Grad der Unterscheidung zwischen Zielnucleinsäuren mit ähnlichen Sequenzen, jedoch mit unterschiedlichen Nebeneinanderstellungen dieser Sequenzen vorliegt.

In Bezug auf ein diagnostisches oder forensisches Kit für HIV ist es für den Fachmann ersichtlich, dass die vorerwähnten Aspekte der Erfindung es ermöglichen, die Komponenten des diagnostischen oder forensischen Kits so maßzuschneidern, dass sie dem entsprechen, was zu einem gegebenen Zeitpunkt über die vorherrschenden Stämme von HIV und andere Pathogene oder Krankheitszustände bekannt ist. Ferner ist es für den Fachmann ersichtlich, dass der Nachweis von HIV-Infektionen zwar nicht die einzige Anwendungsmöglichkeit der vorliegenden Erfindung darstellt, dass dieser Nachweis aber aufgrund der Mutationsfähigkeit des HIV-Genoms vermutlich eine der kompliziertesten Testumgebungen für ein derartiges Diagnostikum darstellt. Aber gerade in einer derartigen veränderlichen Umgebung ist die Flexibilität des vorliegenden Verfahrens in Verbindung mit seiner Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen sehr eng verwandten Sequenzen besonders wertvoll. In weniger veränderlichen Umgebungen brauchen einige der besonders ausgeklügelten Maßnahmen der Erfindung nicht eingesetzt werden. Somit stehen bei einem diagnostischen Kit für eine Papillomavirus-Infektion alle Unterscheidungscharakteristika der TBA-TBR-Wechselwirkung zur Verfügung, zusammen mit der Fähigkeit zur Amplifikation des Signals unter Verwendung der BNAs und BBAs, wobei aber eine einzige, einfache PNA, z. B. eine beliebige der Sequenzen SEQ ID NOs: 46-62, verwendet werden kann, die einzigartige Papillomavirus-Sequenzen identifiziert, von denen auch bekannt ist, dass sie eine TBA binden, z. B. das Papillomavirus-E2-Protein oder geschnittene DNA-Bindungsgebiete davon (vergl. Hegde et al., *Nature*, Bd. 359 (1992), S. 505-512; Monini et al., *J. Virol.*, Bd. 65 (1991), S. 2124-2130).

Bei Anwendung des vorliegenden Verfahrens auf den Nachweis einer bestimmten TNA zur Feststellung der Tatsache, ob bestimmte Nucleinsäuren vorhanden sind, die mit dem Fortschreiten von Melanomen, Hepatomen, Brust-, Zervix-, Lungen-, Kolon-, Prostata-, Pankreas- oder Ovarialkrebs im Zusammenhang stehen, kann die TNA aus Biopsiematerialien, das Organen und Flüssigkeiten mit einem Verdacht auf einen Gehalt an krebsartigen Zellen entnommen worden ist, erhalten werden. Zum Nachweis von genetischen Defekten kann die TNA aus Patientenproben mit einem Gehalt an den betroffenen Zellen erhalten werden. Zum Nachweis von Fermentationsverunreinigungen und -produkten bei der Herstellung von Nahrungsmitteln, chemischen oder biotechnologischen Produkten oder bei der biologischen Aufarbeitung von Abfällen, kann die TNA aus Proben, die in verschiedenen Stadien des Fermentations- oder Behandlungsverfahrens entnommen worden sind, erhalten werden. Zum Nachweis von Nahrungsmittel- oder Arzneistoff-Pathogenen oder -Verunreinigungen kann die TNA-Probe aus folgenden Produkten erhalten

werden: aus den Nahrungsmitteln oder Arzneistoffen, aus Abwischprodukten von Nahrungsmitteln oder von mit Nahrungsmitteln in Kontakt stehenden Oberflächen, aus Flüssigkeiten, die mit Nahrungsmitteln in Kontakt stehen, aus Verarbeitungsmaterialien, Flüssigkeiten und dergl., die bei der Herstellung von Nahrungsmitteln, Arzneistoffen oder biologischen Proben anfallen oder in Kontakt damit stehen, wobei die biologischen Proben Produkten entnommen worden sind, die in Kontakt mit den Nahrungsmitteln oder Arzneistoffen oder dergl. gestanden haben.

2. Booster-Nucleinsäuren (BNAs), Booster-Bindungsregionen (BBRs) und deren Herstellung. Die erfindungsgemäßen BNAs bestehen aus mindestens einem oder mehreren 1/2-BBRs unter Kupplung an eine OSA. Die 1/2-BBRs können mit komplementären 1/2-BBRs, die in der PNA enthalten sind, mit anderen BNAs oder mit einer HNA hybridisieren.

Gemäß Fig. 1(I, IIb und IIIb) der Zeichnungen besteht die einfachste BNA aus zwei Teilen. Gemäß Fig. 1(IIb) der Zeichnungen handelt es sich beim ersten Teil der einfachsten BNA um eine Sequenz von Basen, die komplementär mit der Sequenz in der PNA mit der Bezeichnung "1/2-BBR" ist, die mit einem von einem Kästchen umgebenen Kreis bezeichnet ist. Bei der OSA handelt es sich um einen Nichtträger und/oder Indikator oder festen Träger oder andere Lokalisierungsmittel, einschließlich (ohne Beschränkung hierauf) einer Befestigung an Perlen, Polymeren und Oberflächen und/oder Indikatoren, die kovalent an die BNA gebunden oder in einer nicht-kovalenten, jedoch spezifisch zugeordneten Verbindung zur BNA stehen.

Gemäß Fig. 2a(II und III) der Zeichnungen kann die BNA mehr als eine 1/2-BBR-Sequenz enthalten. Die in Fig. 3(II) dargestellte PNA enthält eine Sequenz, die komplementär zu der in Fig. 3(I) dargestellten PNA ist, und zwei weitere 1/2-BBR-Sequenzen. Die in Fig. 3(III) dargestellte BNA enthält zwei 1/2-BBR-Sequenzen, die komplementär zu zwei der 1/2-BBR-Sequenzen in der in Fig. 3(II) dargestellten BNA ist, zusätzlich bis zu "n" weitere 1/2-BBRs für die Polymerisation von zusätzlichen BNAs.

Unter Hybridisierungsbedingungen erzeugt die in Fig. 3(II) dargestellte BNA bei Kombination mit der in Fig. 3(I) dargestellten PNA das in Fig. 3(IVa) PNA-BNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer BBR und einer unhybridisierten Verlängerung mit zwei zusätzlichen 1/2-BBR-Sequenzen oder "Booster"-Sequenzen. Die durch diese Hybridisierung geschaffenen BBRs können identische, ähnliche oder unähnliche Sequenzen aufweisen. Die durch diese Hybridisierung geschaffenen BBRs können identische, ähnliche oder unähnliche BBAs binden (vergl. die

nachstehenden Ausführungen). Die BNAs können in analoger Weise wie die PNAs hergestellt werden.

Unter Hybridisierungsbedingungen erzeugt das in Fig. 3(IVb) dargestellte BNA-BNA-Hybrid bei Kombination mit der in Fig. 3(Vb) dargestellten PNA das in Fig. 3(VI) dargestellte PNA-BNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer BBR, zwei zusätzlichen BNA-BNA-Hybriden mit einem Gehalt an BBRs und eine unhybridisierte Verlängerung mit einer zusätzlichen 1/2-BBR-Sequenz, einer "Booster"-Sequenz. Die durch die Hybridisierung geschaffenen BBRs können identische, ähnliche oder unähnliche Sequenzen aufweisen. Die durch diese Hybridisierung geschaffenen BBRs können identische, ähnliche oder unähnliche BBAs binden (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Die BNAs können in analoger Weise wie die PNAs hergestellt werden.

3. Zielnucleinsäuren (TNAs) und ihre Herstellung. Die erste Stufe beim Nachweis und bei der Amplifikation von Signalen, die durch den Nachweis einer bestimmten TNA gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt werden, besteht in der Hybridisierung eines derartigen Ziels mit der PNA in einem geeigneten Gemisch. Eine derartige Hybridisierung wird unter geeigneten Bedingungen, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, erreicht.

Die Probe, von der man annimmt oder von der bekannt ist, dass sie die betreffende TNA enthält, kann aus verschiedenen Quellen erhalten werden. Es kann sich um eine biologische Probe, eine Nahrungsmittelprobe oder landwirtschaftliche Probe, eine Probe aus der Umwelt und dergl. handeln. Bei der Anwendung des vorliegenden Verfahrens auf den Nachweis einer bestimmten TNA für die Zwecke der medizinischen Diagnostik oder der Forensik kann die TNA aus einer Biopsieprobe, einer Körperflüssigkeit oder einem Exsudat, wie Urin, Blut, Milch, zerebrospinaler Flüssigkeit, Sputum, Speichel, Stuhl, Lungenaspiraten, Rachen- oder Genitalabstrichen und dergl., erhalten werden. Ferner kann der Nachweis *in situ* erfolgen (vergl. beispielsweise Embretson, 1993; Patterson 1993; Adams 1994).

Demzufolge kommen PNAs, die spezifisch für Wirbeltiere (unter Einschluss von Säugetieren und unter Einschluss des Menschen) oder für beliebige oder sämtliche der nachstehenden Mikroorganismen von Interesse sind, in Betracht und können beim vorliegenden Verfahren verwendet werden:

Corynebacteria

Corynebacterium diphtheriae

Bacillus

Bacillus thuringiensis

Pneumococci

Diplococcus pneumoniae

Streptococci

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

Staphylococcus

Staphylococcus aureus

Staphylococcus albus

Pseudomonas

Pseudomonas stutzeri

Neisseria

Neisseria meningitidis

Neisseria gonorrhoea

Enterobacteriaceae

Escherichia coli

Aerobacter aerogenes

Klebsiella pneumoniae

koliforme Bakterien

Salmonella typhosa

Salmonella choleraesuis

Salmonellen

Salmonella typhimurium

Shigellae dysenteriae

Shigellae schmitzii

Shigellae arabinotarda

Shigellae flexneri

Shigellae

Shigellae boydii

Shigellae sonnei

Weitere enterische Bazillen

Proteus vulgaris

Proteus mirabilis

Proteus-Spezies

Proteus morgani

Pseudomonas aeruginosa

Alcaligenes faecalis

Vibrio cholerae

Haemophilus-Bordetella-Gruppe

Haemophilus influenzae, H. ducreyi

Haemophilus hemophilus

Haemophilus aegypticus

Haemophilus parainfluenzae

Bordetella pertussis

Pasteurellae*Pasteurella pestis**Pasteurella tularensis***Brucellae***Brucella melitensis**Brucella abortus**Brucella suis***Aerobe, sporenbildende Bazillen***Bacillus anthracis**Bacillus subtilis**Bacillus megaterium**Bacillus cereus***Anaerobe, sporenbildende Bazillen***Clostridium botulinum**Clostridium tetani**Clostridium perfringens**Clostridium novyi**Clostridium septicum**Clostridium histolyticum**Clostridium tertium**Clostridium bifermentans**Clostridium sporogenes***Mycobacteria***Mycobacterium tuberculosis hominis**Mycobacterium bovis**Mycobacterium avium**Mycobacterium leprae**Mycobacterium paratuberculosis***Actinomycetes (pilzartige Bakterien)***Actinomyces israeli**Actinomyces bovis**Actinomyces naeslundii**Nocardia asteroides**Nocardia brasiliensis***Spirochäten***Treponema pallidum**Treponema pertenue**Treponema carateum*

Spirillum minus
Streptobacillus moniliformis
Borrelia recurrentis
Leptospira icterohemorrhagiae
Leptospira canicola

Trypanasomen

Mycoplasmen

Mycoplasma pneumoniae

Weitere Pathogene

Listeria monocytogenes
Erysipelothrix rhusiopathiae
Streptobacillus moniliformis
Donovania granulomatis
Bartonella bacilliformis

Rickettsiae (bakterienartige Parasiten)

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

Chlamydia (unklassifizierbare bakterielle/virale Parasiten)

Chlamydia Agentien (Bezeichnung unsicher)

Pilze

Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatidis
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Candida albicans
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifera (Absidia corymbifera)
Rhizopus oryzae
Rhizopus arrhizus

Phycomyceten

Rhizopus nigricans
Sporotrichum schenkii
Fonsecaea pedrosoi
Fonsecaea compact
Fonsecaea dermatidis
Cladosporium carrioni
Phialophora verrucosa
Aspergillus nidulans
Madurella mycetomi
Madurella grisea
Allescheria boydii
Phialophora jeanselmei
Microsporum gypsum
Trichophyton mentagrophytes
Keratinomyces ajelloi
Microsporum canis
Trichophyton rubrum
Microsporum adouini

Viren

Adenoviren

Herpes-Viren

Herpes Simplex

Varicella (Windpocken)

Herpes zoster (Gürtelrose)

Virus B

Cytomegalovirus

Pockenviren

Variola (Pocken)

Kuhpocken

"Poxvirus bovis"

Paravakzine

Molluscum contagiosum

Picornaviren

Poliovirus

Coxsackievirus

Echoviren

Rhinoviren

Myxoviren

Influenza (A, B und C)
Parainfluenza (1-4)
Mumpsvirus
Newcastle-Krankheit-Virus
Masernvirus
Rinderpestvirus
Hundestaubevirus
Respiratorisches Syncytialvirus
Rötelnvirus

Arboviren

Eastern-Pferde-Encephalitisvirus
Western-Pferde-Encephalitisvirus
Sindbisvirus
Chikugunyavirus
Semliki-Forstvirus
Mayoravirus
St. Louis-Encephalitisvirus
Kalifornien-Encephalitisvirus
Colorado-Zeckenfiebertvirus
Gelbfiebertvirus
Dengue-Virus

Reoviren

Reovirus Typen 1-3

Retroviren

Humanes Immunschwächevirus (HIV)
Humanes lymphotropes T-Zellenvirus I & II (HTLV)

Hepatitis

Hepatitis A-Virus
Hepatitis B-Virus
Hepatitis-Nicht A- Nicht B-Virus
Hepatitis C, D, E

Tumoviren

Rauscher-Leukämievirus
Gross-Virus
Maloney-Leukämievirus
Humane Papillomaviren

Methidiumpropyl-EDTA-Fe(II) (gemäß Hertzberg et al., J. Am. Chem. Soc., Bd. 104 (1982), S. 313). Eine Entfernung von Proteinen, z. B. mit einer Protease, ist ebenfalls im allgemeinen erstrebenswert und Verfahren zur Durchführung der Entfernung von Proteinen aus Nucleinsäureproben ohne merklichen Nucleinsäureverlust sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Die erfindungsgemäßen TNAs sollen eine ausreichende Länge aufweisen, so dass eine ausreichende Menge an doppelsträngigem Hybrid, das die TBR flankiert, vorhanden ist, so dass eine TBA ohne Störung durch unligierte Fragmentenden binden kann. Typischerweise werden Fragmente im Bereich von etwa 10 Nucleotiden bis etwa 100 000 Nucleotiden und vorzugsweise im Bereich von etwa 20 Nucleotiden bis etwa 1 000 Nucleotiden als durchschnittliche Größe für TNA-Fragmente verwendet. Zu Beispielen für spezifische TNA-Sequenzen, die nachgewiesen werden können, gehören Sequenzen, die zu PNA-Sequenzen komplementär sind, die hier zum Nachweis von normalen zellulären, abnormalen zellulären (z. B. in aktivierten Onkogenen, integrierten fremden Genen, genetisch defekten Genen) und pathogenspezifischen Nucleinsäuresequenzen, für die spezifische Nucleinsäure-Bindungsproteine bekannt sind oder die gemäß hier beschriebenen Verfahren hergestellt werden können, beschrieben werden. In Fig. 7 ist eine spezifische, mit HIV in Zusammenhang stehende TNA als SEQ ID NO: 37 dargestellt.

4. Verlängerungen der PNA unter Verwendung von BNAs, deren Herstellung und Signalamplifikation. Unter Hybridisierungsbedingungen können BNAs addiert werden, die mit den PNAs, PNA-BNA-Hybriden, BNAs und/oder BNA-BNA-Hybriden hybridisieren. Die vorerwähnten Additionen können in nicht-vektorialer, polymerer Weise oder in vektorialer Weise mit einer bekannten Ordnung von BNAs vorgenommen werden.

In Fig. 2a wird ein einfacher Booster vorgestellt. Ein Booster-Polymeres wird durch Addition von zwei BNAs gemäß Darstellung in Fig. 2a(Ib und Ic), die bei Kombination mit der PNA unter Hybridisierungsbedingungen PNA-BNA-BNA-Hybride bilden, die aus der PNA und "Booster"-Verlängerungen bestehen, wie in Fig. 2a(IIa, IIb, IIc und IIc) dargestellt ist, wobei mindestens eine ungepaarte 1/2-BBR-Sequenz verbleibt. Jede ungepaarte 1/2-BBR-Sequenz gemäß Darstellung in Fig. 2a(IIa, IIb, IIc, IIc) kann mit zusätzlichen BNAs unter Bildung von zusätzlichen "Booster"-Verlängerungen hybridisieren. Jede ungepaarte 1/2-BBR-Sequenz gemäß Darstellung in Fig. 2a(IIa, IIb, IIc und IIc) kann mit addierten HNAs hybridisieren, wie in Fig. 2a(IIIa und IIIb) dargestellt. Die Hybridisierung der HNAs, die nicht mit zusätzlichen BNAs hybridisieren können, bewirkt eine "Maskierung"

der Addition der BNAs an die PNA, wie in Fig. 2a(IVa, IVb, IVc und IVd) dargestellt.

Gemäß Fig. 2b ist es möglich, die Reihenfolge und die Komponenten der Verlängerungen an der PNA zu steuern und zu spezifizieren. Wenn eine einzelne BBR erforderlich ist, wird eine HNA, die die komplementäre Sequenz zur 1/2-BBR in der PNA enthält, an die PNA addiert, um eine einzelne BBR zu erzeugen und um etwaige "Booster"-Verlängerungen an der PNA zu maskieren. Wenn zusätzliche BBRs an die PNA zu addieren sind, kann eine kontrollierte Verlängerung der PNA erreicht werden.

Unter Bezugnahme auf Fig. 2b wird ein einfacher Booster vorgestellt. Eine vektorielle Polymererweiterung wird durch Addition einer BNA, die spezifisch für die PNA ist, erreicht, wie in Fig. 2b(Ia und IIa) dargestellt, die bei Kombination unter Hybridisierungsbedingungen mit der PNA zur Bildung von PNA-BNA-BNA-Hybriden führt, die aus der PNA und den "Booster"-Erweiterungen bestehen. Diese Erweiterungen sorgen bei Markierung mit einer OSA zur starken Amplifikation eines Signals, das bei Bindung einer PNA an eine TNA in einer Probe entsteht. Ferner wird durch Bindung von markierten BNAs an die BBRs im Polymeren eine zusätzliche Amplifikation erreicht.

Zur Herstellung der BNAs kann eine Anzahl von Verfahren herangezogen werden, wozu beispielsweise ein Synthese durch bekannte chemische Verfahren oder rekombinante DNA-Herstellungsverfahren gehören. Beim letztgenannten Verfahren lässt sich eine im wesentlichen unbegrenzte Anzahl an BNAs in einfacher und billiger Weise herstellen, indem man beispielsweise in Prokaryonten (z. B. *E. coli*) eine Plasmid-DNA mit mehrfachen Wiederholungen der spezifischen BNA-Sequenzen, die von Restriktionsstellen mit überhängenden Enden flankiert sind, erzeugt. Auf diese Weise lassen sich beispielsweise die linken oder rechten Operatorstellen des lambda-Bacteriophagen oder eine beliebige andere DNA oder andere Nucleinsäuresequenz, von der bekannt ist, dass sie spezifisch und fest an eine bestimmte BBA, z. B. ein DNA- oder RNA-Bindungsprotein, bindet, in einer im wesentlichen unbegrenzten Anzahl von Kopien erzeugen, wobei jede Kopie von einer EcoRI-, PstI-, BamHI- oder einer beliebigen anderen Stelle einer Anzahl von weiteren üblichen Restriktionsnuclease-Stellen flankiert ist. Alternativ kann ein Polymeres an wiederholten Stellen durch einzigartige Restriktionsstellen, die innerhalb des Polymeren nicht vorliegen, ausgeschnitten werden. Große Mengen an pBR322, pUC-Plasmid oder einem anderen Plasmid mit mehrfachen Kopien dieser Sequenzen werden nach bekannten Verfahren hergestellt, das Plasmid wird mit dem Restriktionsenzym an der Flanke der Polymerisationsstelle geschnitten und die freigesetzten mehrfachen Kopien der Operatoren werden

entweder durch Chromatographie oder durch andere zweckmäßige, aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren isoliert. Die BNA wird sodann vor der Verwendung einer Strangtrennung unterzogen und ist sodann für die Polymerisation an eine PNA, die für eine einzelsträngige, komplementäre Kopie des Operators als eine 1/2-BBR kodiert, zugänglich. Die BNAs können vektoriiell an der PNA polymerisiert werden, wobei man sich verschiedener Restriktionsenzyme bedient, die jede Wiederholungseinheit des Polymeren im Plasmid, das zur Herstellung der mehrfachen Kopien der BNA verwendet wird, flankieren. Alternativ kann das BNA-Polymere mit der PNA über Überhänge an einem oder beiden Enden des BNA-Polymeren hybridisiert werden, ohne dass eine Strangtrennung und Anlagerung der einzelnen BNA-Segmente erforderlich ist. Beispiele für spezifische BNA-Sequenzen sind im vorstehenden Abschnitt mit der Bezeichnung "Beschreibung der Sequenzen" als SEQ ID NOs: 35-36 angegeben. Zur Stabilisierung des BNA-Polymeren kann DNA-Ligase verwendet werden, um die hybridisierten BNAs kovalent zu verknüpfen.

Haarnadelnucleinsäuren (HNAs) und ihre Herstellung. Die hier beschriebenen HNAs umfassen mindestens zwei miteinander verbundene Hauptteile. Eine einzelsträngige Sequenz, die komplementär zu einer 1/2-BBR ist, und eine doppelsträngige Nucleinsäureregion, die unter Hybridisierungsbedingungen durch Selbstassoziation der selbstkomplementären Sequenzen innerhalb der HNA gebildet wird. Gemäß Fig. 1(IIc) der Zeichnungen kann die 1/2-BBR in der HNA so konstruiert werden, dass sie komplementär zur 1/2-BBR-Sequenz in der PNA ist. Gemäß Fig. 1(I, IIc und IIIc) der Zeichnungen bildet die vorerwähnte HNA bei Addition unter Hybridisierungsbedingungen an die PNA ein PNA-HNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer BBR. Gemäß Fig. 1(IIIc, IVc und Vc) der Zeichnungen kann ein PNA-HNA-Hybrid unter Hybridisierungsbedingungen bei Addition an die TNA ein TNA-PNA-HNA-Hybrid mit einem Gehalt an einer TBR und einer BBR bilden.

Gemäß Fig. 2a und 2b können die HNAs zur "Maskierung" oder zur Termination der Addition von BNA-Verlängerungen an die PNA verwendet werden. Die beiden BNAs in Fig. 2a(Ib und Ic) können miteinander unter Bildung des in Fig. 3(IVb) dargestellten Hybrids assoziieren oder direkt und individuell mit der PNA hybridisieren, wie in Fig. 2a(Ia-c, IIa-d) dargestellt. Die beiden HNAs (in Fig. 2a(IIIa und IIIb) dargestellt) können die Hybridisierung der BNA an weitere BNAs, die sich von der PNA aus erstrecken, beenden, wie in Fig. 2a (IVa-d) dargestellt. Die HNA in Fig. 2a(IIIa) kann die PNA-BNA-Hybride beenden, wie in Fig. 2a(IIb und IIc) dargestellt, sowie jegliches PNA-BNA-Hybrid mit einer einzelsträngigen 1/2-BBR, die komplementär zu der 1/2-BBR in der HNA ist, wie in

Fig. 2a(IIIa) dargestellt. Gleichmaßen kann die in Fig. 2a(IIIb) dargestellte HNA die PNA-BNA-Hybride gemäß Darstellung in Fig. 2a(IIa und IIc) und beliebige PNA-BNA-Hybride mit zwei einzelsträngigen 1/2-BBRs, die komplementär zu den 1/2-BBRs in der in Fig. 2a(IIIb) dargestellten HNA sind, beenden.

HNAs werden konstruiert, die die PNA-BNA-Hybride beenden, die durch die sequenzielle Addition von BNAs an die PNA gemäß Darstellung in Fig. 2b konstruiert werden. Die einzelsträngigen 1/2-BBR-Sequenzen, die in Fig. 2b(Ia, IIIa, Va und VIIa) dargestellt sind, sind spezifisch komplementär zu den einzelsträngigen 1/2-BBR-Sequenzen, die in Fig. 2b(Ib, IIIb, Vb und VIIb) dargestellt sind, und erzeugen einzigartige, maskierte PNA-BNA-HNA-Hybride gemäß Darstellung in Fig. 2b(Ic, IIIc, Vc und VIIc).

Die selbstkomplementären Sequenzen in der HNA und die Schleifensequenz, die die selbstkomplementären Haarnadelsequenzen verknüpft, können beliebige Zusammensetzungen und Längen aufweisen, sofern sie nicht in wesentlichem Umfang die Präsentation der einzelsträngigen 1/2-BBR, die Bestandteil der HNA ist, durch die HNA stören oder hemmen oder selektiv die BBA oder die TBA binden. Die Schleifensequenzen sollen so ausgewählt werden, dass die Bildung der Schleife die Bildung der Haarnadel nicht stört. Als ein Beispiel für eine derartige HNA, die sich bei dieser Anwendung eignet, wird SEQ ID NO: 44 vorgelegt (vergl. die vorstehende Beschreibung von Sequenzen).

6. Zielbindungsanordnungen (TBAs) und deren Herstellung. Bei einer TBA kann es sich um eine beliebige Substanz handeln, die eine bestimmte TBR bindet, die durch Hybridisierung bestimmter TNAs und PNAs gebildet worden sind, mit der Maßgabe, dass die TBA die folgenden Eigenschaften aufweisen muss:

(a) Die TBA muss an TBR(s) in einer Weise binden, die hochgradig spezifisch für die TBR(s) von Interesse ist. Dies bedeutet, dass die TBA zwischen TBRs, die im TNA-PNA-Hybrid vorhanden sind, und ähnlichen Duplexsequenzen, die durch PNA-CNA-Hybride gebildet werden, unterscheiden muss. Die TBA muss an das PNA-CNA-Hybrid mit einer ausreichend geringen Avidität binden, dass beim Waschen des TBA-TNA-PNA-Komplexes das PNA-CNA-Hybrid verdrängt wird und das PNA-TNA-Hybrid nicht verdrängt wird.

(b) Die TBA muss in reaktionsfreudiger Weise die TBR(s) die durch die Hybridisierung der TNA mit der PNA erzeugt worden sind, binden. Bindungsaffinitäten im Bereich von 10^{-5} bis etwa 10^{-12} oder mehr werden im allgemeinen als ausreichend angesehen. Wie nachstehend ausgeführt, kann es in einigen Fällen erstrebenswert sein, eine bestimmte TBA zu verwenden, die eine sehr geringe Avidität für eine bestimmte TBR aufweist, die aber eine ausreichend

erhöhte Affinität aufweist, wenn eine bestimmte Konfiguration von mehrfachen TBRs bereitgestellt wird, so dass das Quadrat der Affinität der TBA für jede TBR zu der Affinität wird, die für die bestimmte TBA relevant ist.

Zu Beispielen für DNA-Bindungskomponenten, die sich bei der Bildung von TBAs eignen, gehören (ohne Beschränkung hierauf) NF-kB, Papillomavirus-E2-Protein, Transkriptionsfaktor SP1, inaktive Restriktionsenzyme, Antikörper und dergl. Von jedem dieser Proteine ist aus dem Stand der Technik bekannt, dass es Sequenzen enthält, die bestimmte Nucleinsäuresequenzen binden, wobei die Affinitäten dieser Wechselwirkungen bekannt sind. Natürlicherweise ist das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren nicht auf die Verwendung dieser bekannten DNA-Bindungsproteine oder Fragmente davon beschränkt. Aus der vorliegenden Beschreibung ist es für den Fachmann ersichtlich, dass das vorliegende Verfahren leicht auf den Einsatz neuer TBAs, die mindestens die vorerwähnten erforderlichen Merkmale aufweisen, angewandt werden kann. So ist beispielsweise in WO-92/20698 ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsmolekül beschrieben, das ein Oligonucleotid-Konjugat umfasst, das durch kovalente Bindung eines DNA-Bindungsarzneistoffes an ein triplexbildendes Oligonucleotid bindet. Das Verfahren dieser Druckschrift kann zur Herstellung neuer TBAs verwendet werden, die im vorliegenden Verfahren eingesetzt werden können, vorausgesetzt, dass die auf diese Weise gebildeten TBAs die vorerwähnten Kriterien erfüllen. Ferner können die Verfahren der US-Patente 5 096 815 und 5 198 346 sowie von WO-88/06601 zur Erzeugung neuer TBAs, die für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind, herangezogen werden. Spezielle Antikörper oder Teile davon können eingesetzt werden (vergl. beispielsweise Blais, 1994).

Wenn es sich bei der TBA um ein Protein oder um einen Komplex von Proteinen handelt, ist es ersichtlich, dass beliebige Verfahren aus einer Anzahl von routinemäßigen Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, zur Herstellung der TBA eingesetzt werden können. Die TBA kann aus ihrer natürlich vorkommenden Umgebung in der Natur isoliert werden oder sie kann, wenn dies unzweckmäßig ist, durch übliche Techniken der Molekularbiologie erzeugt werden. Wenn man NF-kB als Beispiel heranzieht, so kann unter Verwendung der DNA-Bindungsgebiete mit p50- oder p65-Untereinheiten diese Bindungsanordnung nach rekombinanten Verfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind hergestellt werden (vergl. beispielsweise Ghosh, Cell, Bd. 62 (1990), S. 1019-1029, der die Klonierung der p50-DNA-Bindungsuntereinheit von NF-kB und die Homologie dieses Proteins zu rel und dorsal beschreibt).

Es sind zahlreiche DNA- und andere Nucleinsäure-Bindungsproteine bekannt, die als oder in erfindungsgemäßen TBAs verwendet werden können. Nachdem die Aminosäuresequenz einer beliebigen DNA-, RNA:DNA-, RNA- oder anderen Nucleinsäure-Bindungsproteinen bekannt ist, kann eine geeignete DNA-Sequenz, die für das Protein kodiert, entweder durch synthetische Maßnahmen hergestellt werden oder es kann eine cDNA-Kopie der mRNA, die für das Protein kodiert, aus einer geeigneten Gewebequelle verwendet werden. Ferner können genomische Kopien, die für das Protein kodieren, erhalten werden und Introns können daraus herausgespleisst werden, wobei man sich bekannter Verfahren bedient. Ferner lassen sich die TBAs auf chemischem Wege synthetisieren.

Nachdem eine geeignete Kodierungssequenz erhalten worden ist, kann eine positionsgerichtete Mutagenese durchgeführt werden, um die kodierte Aminosäuresequenz zu verändern und mutante Nucleinsäure-Bindungsproteine herzustellen, die im Vergleich zum ursprünglichen Nucleinsäure-Bindungsprotein erstrebenswertere Bindungseigenschaften aufweisen. Als ein Beispiel für dieses Verfahren kann die Aminosäuresequenz der DNA-Bindungsgebiete von NF- κ B so verändert werden, dass ein NF- κ B'-Molekül erzeugt wird, das eine engere Bindung mit der NF- κ B-Bindungsstelle eingeht (vergl. die nachstehenden Beispiele - HIV-Nachweis und HIV-Sperre).

Um einen tieferen Einblick in diesen Aspekt der Erfindung zu gewinnen, wird auf folgende Überlegungen hingewiesen. Unter Verwendung von NF- κ B als Beispiel lässt sich eine TBA unter Verwendung des natürlich auftretenden NF- κ B-Moleküls herstellen. Da jedoch dieses Molekül in Zellen in verschwindend geringen Mengen vorliegt und da die Untereinheiten dieses DNA-Bindungsproteins kloniert worden sind, wäre es vernünftiger, große Mengen des Komplexes über rekombinante DNA-Maßnahmen herzustellen, wie es bereits für dieses Protein durchgeführt worden ist (vergl. beispielsweise Ghosh, Cell, Bd. 62 (1990), S. 1019-1029). NF- κ B ist ein pleiotroper Induktor von Genen, der an immunologischen, entzündlichen und wachstumsregulatorischen Reaktionen auf primäre pathogene (virale, bakterielle oder stressbedingte) Belastungen oder sekundäre pathogene (entzündliches Cytokin) Belastungen beteiligt ist. NF- κ B ist ein dimeres DNA-Bindungsprotein, das eine p50- und eine p65-Untereinheit umfasst, die beide mit spezifischen DNA-Sequenzen in Kontakt stehen und diese binden. In einem inaktivierten Zustand befindet sich NF- κ B im zellulären Zytoplasma, komplexiert mit einem spezifischen Inhibitor, I- κ B, unter Bildung eines zytoplasmatischen Heterotrimeren. Bei Aktivierung wird der Inhibitor entkomplexiert und das p50-p65-Dimere positioniert sich über ein spezifisches nukleares Lokalisierungssignal (NLS) wieder in den Zellkern, wo es DNA binden

kann und seine Rolle als ein transkriptioneller Aktivator von zahlreichen Genen ausüben kann (vergl. Grimm and Baeuerle, *Biochem. J.*, Bd. 290 (1993), S. 297-308, bezüglich eines Übersichtsartikels über den Stand der Technik im Hinblick auf NF- κ B).

Das p50-p65-Dimere bindet mit picomolarer Affinität an Sequenzen, die mit dem Konsensus GGGAMTNYCC (SEQ ID NO: 117) übereinstimmen, wobei geringfügig unterschiedliche Affinitäten von der exakten Sequenz abhängen. Es ist bemerkenswert, dass das Auftreten von Homodimeren von p50 und p65 ebenfalls beobachtet worden ist. Diese Homodimeren weisen unterschiedliche biochemische Eigenschaften sowie geringfügig unterschiedliche Affinitäten für Bindungssequenzen innerhalb des vorstehenden Konsensus und ähnlich zum vorstehenden Konsensus auf. Somit können je nach den erwünschten Bindungseigenschaften der TBA ein p50-p65 Heterodimeres, ein p50-p50-Homodimeres oder ein p65-p65-Homodimeres oder Fragmente der vorerwähnten Dimeren verwendet werden.

Ein Weg, gemäß dem verschiedene neue TBAs erzeugt werden können, ist schematisch in Fig. 9 dargestellt. Die Nucleinsäure-Erkennungseinheiten der TBA können mit ähnlichen oder unähnlichen TBA-Nucleinsäure-Erkennungseinheiten über einen "Begleiter" zusammengesetzt und assoziiert werden. Beim Begleiter handelt es sich um eine Struktur, an dem verschiedene TBA-Erkennungselemente angebaut sind und der den Nucleinsäure-Erkennungseinheiten erstrebenswerte Eigenschaften verleiht. Der Begleiter besteht aus einer beliebigen Sequenz, die solche Anordnungssequenzen ergibt, dass gleiche oder verschiedene Nucleinsäure-Erkennungseinheiten in eine enge und stabile Assoziation zueinander gebracht werden. Somit wird beispielsweise im Fall einer TBA, die zur engen Bindung an NF- κ B-TBRs konzipiert ist, eine TBA zusammengebaut, indem man lambda-cro-Sequenzen als Anordnungssequenzen bereitstellt, die mit Nucleinsäure-Bindungssequenzen entweder für NF- κ B-p50 oder -p65 verknüpft sind. Die p50- oder p65-Nucleinsäure-Bindungssequenzen sind mit den cro-Sequenzen entweder am Carboxy- oder am Aminoterminus von cro und entweder am Carboxy- oder Aminoterminus der Nucleinsäure-Erkennungseinheit von p50 oder p65 verknüpft. Die Verknüpfungssequenzen werden gegebenenfalls bereitgestellt, um einen geeigneten Abstand der Nucleinsäure-Erkennungseinheiten für eine optimale TBR-Bindung zu ermöglichen.

Die Anordnungssequenzen, die vorstehend beispielhaft durch die cro- und CI-Sequenzen (SEQ ID NOs: 104-108) beispielhaft belegt worden sind, umfassen beliebige stabile Oligopeptide, die in natürlicher und fester Weise an ähnliche Sequenzen binden. Somit ist es im Fall von cro bekannt, dass ein Dimeres von cro

an die lambda-Bacteriophagen-Operatorstellen bindet (Anderson et al., Nature, Bd. 290 (1981), S. 754-758; Harrison und Aggarwal, Am. Rev. Biochem., Bd. 59 (1990), S. 933-969). Die Monomereinheiten von cro unterliegen einer engen und spezifischen Assoziation miteinander. Somit wird durch Verknüpfung von DNA-Erkennungseinheitssequenzen mit den cro-Sequenzen eine enge und feste Assoziation erreicht.

Die optischen Linkersequenzen umfassen eine beliebige Aminosäuresequenz, die den TBA Zusammenbau oder die Nucleinsäurebindung nicht stört und die nicht so labil ist, dass die Nucleinsäure-Erkennungseinheit aus der vollständigen TBA freigesetzt wird. Es ist erstrebenswert, jedoch nicht erforderlich, dass die Linkersequenzen kovalent mit anderen Bindungsanordnungs-komponenten verknüpft sind. Die Assoziation soll spezifisch sein, so dass der Zusammenbau und die Herstellung der Bindungsanordnungen unterstützt wird. Zu Beispielen für derartige Sequenzen gehören (ohne Beschränkung hierauf) bekannte Sequenzen, wie sie zur Verknüpfung verschiedener Domänen in strukturellen Proteinen auftreten. Beispielsweise befindet sich im lambda-Repressorprotein eine Verknüpfungssequenz zwischen der DNA-Bindungsdomäne und der Dimerisationsdomäne, die sich für diesen Zweck eignet. Es sind zahlreiche weitere Sequenzen bekannt, wobei die genaue Sequenz für die Erfindung nicht kritisch ist, vorausgesetzt, dass eine routinemäßige experimentelle Prüfung durchgeführt wird, um die Stabilität und das störungsfreie Verhältnis zur Zielnucleinsäurebindung zu gewährleisten. Beispiele für derartige Sequenzen werden hier als MetSer und SEQ ID NOs: 99-102 bereitgestellt. Die Insertion von spezifischen, bekannten Proteolysestellen in diese Linker fällt ebenfalls unter den Umfang der Erfindung. Die Anwesenheit derartiger Stellen in den Linkersequenzen bietet Herstellungsvorteile, die es ermöglichen, verschiedene Moleküle am Begleitergerüst zusammenzubauen.

Neben den Nucleinsäure-Erkennungsstellen, fakultativen Verknüpfungssequenzen und Anordnungssequenzen weisen die erfindungsgemäßen neuen TBAs gegebenenfalls Asymmetrie- oder Pilot-TNA-Sequenzen und eine oder mehrere OSA-Einheiten auf. Die Asymmetriesequenzen werden bereitgestellt, um bestimmte erwünschte oder unerwünschte Assoziationen zu begünstigen oder zu verhindern. Beispielsweise werden für den Fall, dass eine TBA mit homodimeren p50-DNA-Erkennungseinheiten erwünscht ist, die Asymmetriesequenzen bereitgestellt, um die natürliche stärkere Assoziation von NF-kB-p50-Untereinheiten und -p65-Untereinheiten aufzubrechen, während die Anordnungssequenzen nicht daran gehindert werden,

p50-Untereinheiten zusammenzubringen. Beispiele für derartige Sequenzen sind als SEQ ID NOs: 85-92 und SEQ ID NOs: 105 und 106 angegeben.

In einer unterschiedlichen Konfiguration werden NF-kB-p50-Untereinheitssequenzen in enge Assoziation mit Transkriptionsfaktor-SP1-DNA-Erkennungseinheitssequenzen gebracht. Dies ist für den Fall erwünscht, dass ein NF-kB-SP1-Bindungsmotiv von Bedeutung ist, wie bei HIV-LTR, wo ein Motiv mit mindestens sechs DNA-Bindungsprotein-Erkennungsstellen, zwei NF-kB-Stellen, drei SP1-Stellen und einer TATA-Stelle bekanntlich vorhanden sind. Da es ferner bekannt ist, dass die zweite NF-kB-Stelle und die erste SP1-Stelle von Bedeutung für die Regulation der HIV-Transkription sind (Perkins et al., Embo J., Bd. 12 (1993), S. 3551-3558), eignet sich diese bestimmte Konfiguration von TBA nicht nur beim Nachweis von HIV, sondern auch als Therapeutikum oder Prophylaktikum gegen HIV-Infektionen (vergl. die nachstehenden Ausführungen). Auf ähnliche Weise kann die lange Kontrollregion (LCR) von humanem Papillomavirus als Schlüsselkontrollregion zur erfindungsgemäßen Sondenbehandlung eingesetzt werden.

Im Hinblick auf die verschiedenen Elemente, die gemäß diesem Verfahren der TBA-Bildung kassettenartig assoziiert werden können, wird eine im wesentlichen unbegrenzte Vielzahl von TBAs erzeugt. In Fig. 10 werden eine Reihe von verschiedenen Molekülen mit der Bezeichnung "HIV-detect-I-IV" beispielhaft aufgeführt, wobei "CHAP" den Begleiter bedeutet, "nfkb" NF-kB-Untereinheiten bedeutet, "sp1" die Nucleinsäureerkennungseinheit des SP1-Transkriptionsfaktors bedeutet und "TATA" ein Dimeres der DNA-Erkennungseinheit eines TATA-Sequenz-DNA-Bindungsproteins (TBP), auch bekannt als TATA-Bindungsprotein oder TBP, bedeutet.

Diese Konfigurationen werden nachstehend beispielhaft erläutert und gehören alle als integrierende Bestandteile zur vorliegenden Erfindung.

In einer weiteren Konfiguration ist die in Fig. 9 dargestellte modulare Struktur zum Nachweis oder zur Behandlung oder zur Prophylaxe eines vollständig unterschiedlichen Pathogens geeignet. Gemäß Fig. 11 wird auf ähnliche Weise wie bei den vorstehend beschriebenen "HIV-detect-I-IV"-Molekülen eine Reihe von "HPV-Detect I-IV"-Molekülen erzeugt. Bei dieser Ausführungsform nützt man in vorteilhafter Weise die DNA-Bindungseigenschaften des E2-Proteins von humanem Papillomavirus (HPV) aus. Ferner werden die Rollen von SP1 und TBP ausgenutzt, indem man spezifische DNA-Erkennungseinheiten bereitstellt, die dazu geeignet sind, diese Sequenzen im HPV-Genom zu binden. Bei der Bildung der E2-spezifischen TBAs zur Verwendung beim Nachweis einer HPV-Infektion kann es erstrebenswert sein, beliebige der Sequenzen SEQ ID NOs: 75-84 oder

93-98 als E2-DNA-Erkennungseinheiten zu verwenden. Eine TBA mit einem Gehalt an einer bovinen dimeren E2-DNA-Bindungsdomäne und einer humanen dimeren E2-DNA-Bindungsdomäne kann besonders wertvoll sein.

Die vorstehend beschriebenen verschiedenen Sequenzen können entweder unter Verwendung von reinen Oligopeptid-Ausgangsmaterialien chemisch verknüpft werden oder sie können durch Bereitstellung von rekombinanten Nucleinsäuren, die über den bekannten genetischen Code die verschiedenen Subelemente kodieren, verknüpft werden. Im Falle einer rekombinanten Erzeugung ist eine Verknüpfung von *cro*-Kodierungssequenzen mit Sequenzen von Nucleinsäure-Erkennungseinheiten unter Bildung von TBAs vorteilhaft, da *cro* im Begleiter nicht nur als eine Aufbausequenz wirkt, sondern auch die einwandfreie Faltung der Nucleinsäure-Erkennungselemente dirigiert. Beispielhafte Sequenzen für Begleiter sind als SEQ ID NOs: 104-108 angegeben. Ferner ermöglicht für den Fall, dass Strukturen höherer Ordnung mit einem Gehalt an mehrfachen Bindungsstellen angestrebt werden, wie es bei pentamerer NF- κ B/NF- κ B/SP1/SP1/SP1-TBA der Fall ist, eine geeignete Konstruktion der Asymmetriesequenzen, dass derartige Strukturen hergestellt werden können.

Auf die vorgenannte Weise werden TBAs hergestellt, die ihre verwandten Bindungsstellen mit hoher Affinität binden. Beispielsweise ist zu erwarten, dass die NF- κ B-DNA-Bindungskomponenten der TBAs von Fig. 10 die HIV-LTR mit einer Affinität von 10^{-8} bis 10^{-12} molar binden. Sequenzen, die sich als DNA-Erkennungseinheiten eignen, sind als SEQ ID NOs: 63-71, 73-84, 93-98 und 104-108 angegeben und werden nachstehend beispielhaft erläutert.

Im Hinblick auf die vorstehende Beschreibung des dirigierten Zusammenbaus von Nucleinsäure-Bindungsproteinen und bei Verwendung von Anordnungs- und Asymmetrie- (oder Pilot)-Sequenzen ist es für den Fachmann ersichtlich, dass erfindungsgemäß ein allgemein anwendbares Verfahren zum Zusammensetzen von Proteinstrukturen bereitgestellt wird. Die Allgemeingültigkeit dieses Verfahrens wird ferner anhand eines weiteren Beispiels durch Berücksichtigung der Verwendung einer Antikörper-Epitop-Wechselwirkung beim Zusammenbau von angestrebten Strukturen nachgewiesen. Aufgrund der Spezifität kann eine DNA-Bindungsproteinstruktur zusammengesetzt werden, indem man eine NF- κ B-p50-Untereinheit mit einem Antigen, z. B. einem zirkularisierten (über Disulfidbindungen) Melanozyten-stimulierenden Hormon (MSH), verknüpft. Dieses pro-MSH-Molekül kann sodann durch einen anti-MSH-Antikörper gebunden werden, um eine neue Nucleinsäure-Bindungsanordnung bereitzustellen, wobei das Antigen und der Antikörper als Anordnungssequenzen wirken.

Die in Fig. 9 dargestellte modulare Struktur zeigt, dass eine große Vielzahl von TBAs unter Verwendung verschiedener Kombinationen von Komponenten zusammengesetzt werden können. Somit sind repräsentative Ausführungsformen dieser allgemeinen Struktur als SEQ ID NOs: 109-116 angegeben.

7. Booster-Bindungsanordnungen (BBAs) und deren Herstellung.

Bei einer BBA kann es sich um eine beliebige Substanz handeln, die eine bestimmte BBR, die durch Hybridisierung von bestimmten PNAs und BNAs gebildet worden ist, bindet, einschließlich dann, wenn mehrfache BNAs (bis zu und einschließlich "n" BNAs, d. h. BNA_n , wobei "n" theoretisch $0-\infty$ bedeutet, in der Praxis aber etwa 1 bis 100 beträgt) an die PNA für die Signalamplifikation polymerisiert werden, vorausgesetzt, dass die BBA die folgenden Eigenschaften aufweist:

(a) Die BBA muss die BBRs in einer Weise binden, die hochgradig spezifisch für die BBR von Interesse ist. Dies bedeutet, die BBA muss zwischen BBRs, die im PNA-BNA-Hybrid vorhanden sind, und ähnlichen Duplexsequenzen in BNA-CNA-Hybriden oder anderen CNAs unterscheiden. Sogar für den Fall, dass eine einzelne Basenfehlpaarung oder Konformationsunterschiede mit oder ohne Basenfehlpaarungen bei der Herstellung des PNA-BNA_n- oder PNA-BNA_n-HNA-Hybrids aufgetreten sind, muss die BBA das Hybrid mit einer ausreichend geringen Avidität binden, dass beim Waschen des TBA-TNA-PNA-BNA_n-Komplexes die BBA von den CNA-Sequenzen verdrängt wird, jedoch nicht die BBR-Sequenzen.

(b) Die BBA muss in reaktionsfreudiger Weise die BBR(s) binden. Bindungsaffinitäten im Bereich von 10^{-5} bis etwa 10^{-9} oder mehr werden im allgemeinen als ausreichend angesehen.

Zu Beispielen für BBAs gehören (ohne Beschränkung hierauf) cro und das lambda-Bacteriophagen-Repressorprotein CI. Ferner wird auf das US-Patent 4 556 643 verwiesen, worin weitere DNA-Sequenzen und spezifische Bindungsproteine, wie Repressoren, Histone, DNA-Modifikationsenzyme und Katabolitgen-Aktivatorprotein, vorgeschlagen werden. Verwiesen wird auch auf EP-0 453 301, wo darauf hingewiesen wird, dass eine Vielzahl von für Nucleotidsequenzen spezifischen Bindungsproteinen (NSSBPs), wie der Tetracyclin-Repressor, der lac-Repressor und der Tryptophan-Repressor, existieren. Von jeder dieser BBAs ist es aus dem Stand der Technik bekannt, dass sie bestimmte, bekannte Nucleinsäuresequenzen bindet. Ferner sind die Affinitäten dieser Wechselwirkungen bekannt. Natürlicherweise ist das erfindungsgemäße Verfahren nicht auf die Verwendung dieser bekannten BBAs beschränkt. Aufgrund der vorliegenden Beschreibung kann der Fachmann leicht

die Verwendung neuer BBAs, die mindestens die vorstehend geschilderten notwendigen Eigenschaften aufweisen, für das vorliegende Verfahren einsetzen.

Zu Beispielen für neue BBAs, die für diesen Aspekt der Erfindung geeignet sind, gehören neue Proteine auf der Grundlage des Motivs eines bekannten DNA- oder RNA- oder DNA:RNA-Bindungsproteins, wie *cro* oder das λ -CI-Repressorprotein. Vorzugsweise werden derartige Modifikationen vorgenommen, um die Handhabung dieser erfindungsgemäßen Komponenten zu verbessern. So kann es erstrebenswert sein, eine hohe Konzentration an *cro* einem Test zuzusetzen. Eine der negativen Eigenschaften von *cro* besteht darin, dass bei hohen Konzentrationen die Bindung von *cro* an sein DNA-Ziel in Konkurrenz mit *cro-cro*-Wechselwirkungen tritt. Somit kann beispielsweise ein begleitetes oder mutiertes *cro* hergestellt werden, das nicht mit diesem Nachteil behaftet ist. Zu Beispielen für derartige veränderte Begleiter gehören SEQ ID NOs: 105-106 und 108. Aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren, wie die Herstellung von neuen Zielbindungsproteinen unter Verwendung verschiedenartiger Populationen von Nucleinsäuren und die Auswahl einer Bacteriophagen-Bindung an bestimmte, vorgewählte Ziele (sogenannte Phagen-Display-Technik, vergl. die Erörterung zur Herstellung neuer TBAs), können dazu herangezogen werden, derartige neue BBAs sowie die vorerwähnten neuen TBAs herzustellen.

Wenn es sich bei der BBA um ein Protein oder um einen Komplex von Proteinen handelt, ist es ersichtlich, dass zahlreiche routinemäßige Verfahren aus dem Stand der Technik zur Herstellung der BBA verwendet werden können. Die BBA kann aus ihrer natürlichen Umgebung isoliert werden oder, wenn dies unzumutbar ist, kann sie durch übliche Techniken der Molekularbiologie isoliert werden. So ist beispielsweise die Sequenz des *cro*-Proteins bekannt und ein beliebiger Molekülklon des λ -Bacteriophagen kann dazu herangezogen werden, geeignete Nucleinsäuren zu erhalten, die für *cro* kodieren, um dessen rekombinante Erzeugung zu ermöglichen. Ferner können die hier beschriebenen TBAs als BBAs verwendet werden, vorausgesetzt, dass verschiedene TBAs zur Bindung von TBRs und BBRs eingesetzt werden.

8. Verwendung von BBAs und BBRs zur Lokalisation und zur Amplifikation der Lokalisation der PNA-TNA-TBA-Komplexe (vergl. Fig. 8). Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird die hochgradig spezifische und äußerst enge Bindung von TBAs, die aus Nucleinsäure-Bindungskomponenten bestehen, zur Bereitstellung eines amplifizierbaren Nucleinsäure-Sandwichtests verwendet. Gemäß einem Aspekt dieser Ausführungsform wird ein fester Träger mit einer ersten TBA beschichtet, wodurch eine immobilisierte TBA erzeugt wird. In Lösung werden eine PNA und eine TNA unter Hybridisierungsbedingungen in

Kontakt gebracht und sodann mit der immobilisierten TBA kontaktiert. Nur die PNA-TNA-Wechselwirkungen, die die spezifische TBR bilden, die durch die immobilisierte TBA erkannt wird, werden beim Auswaschen der festen Oberfläche, die den TBA-TBR-Komplex bindet, zurückgehalten.

Der Nachweis der gebundenen TBR wird durch Bindung von Booster-Nucleinsäuren, BNAs, an die 1/2-BBRs, die an den PNAs unter Hybridisierungsbedingungen vorhanden sind, erreicht. Auf diese Weise kann selbst dann, wenn nur ein einziger TBA-TBR-Komplex an der immobilisierten TBA gebunden ist, ein starkes, amplifiziertes Signal durch Polymerisation von mehrfachen BNAs an der immobilisierten TNA erzeugt werden. Jede BNA, die an die TNA bindet, bildet eine BBR, die durch BBAs gebunden werden kann, die wie die an der festen Oberfläche immobilisierten TBAs in Bezug auf ihre sehr enge und spezifische Bindung an bestimmten Nucleinsäurestrukturen ausgewählt werden können. Somit kann gemäß dieser Ausführungsform die immobilisierte TBA den DNA-Bindungsereich von NF-kB enthalten, der in sehr spezifischer und enger Weise an NF-kB-Bindungsstellen bindet, die bei Hybridisierung der TNA und PNA unter Bildung einer derartigen Stelle gebildet werden.

Da es bekannt ist, dass NF-kB-Bindungsstellen sowohl im normalen humanen Genom als auch in langen terminalen Wiederholungssequenzen des humanen Immunschwächevirus (HIV) auftreten, stellt die Erfindung ein Verfahren zur Unterscheidung zwischen den "normalen" humanen Stellen und den Stellen, die in Zellen aufgrund einer HIV-Infektion vorhanden sind, bereit. Daher können in einem Test, der zur Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von HIV-DNA in einer Probe von humaner DNA bestimmt ist, die HIV-NF-kB-Bindungsstellen als die TNA angesehen werden und die normalen humanen NF-kB-Bindungsstellen können als CNAs angesehen werden. Entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Unterscheidung zwischen diesen TNAs und CNAs erreicht, indem man die Tatsache ausnützt, dass in der HIV-LTR zwei NF-kB-Bindungsstellen vorhanden sind, gefolgt von drei SPI-Stellen (vergl. beispielsweise Koken et al., *Virology*, Bd. 191 (1992), S. 968-972), während zelluläre NF-kB-Bindungsstellen mit den gleichen Sequenzen in Tandemstellung nicht auftreten.

In Fällen, bei denen die TNA mehr als eine 1/2-TBR enthält und es erstrebenswert ist, therapeutische und prophylaktische Anwendungen der TBAs zu verfolgen, kann es erstrebenswert sein, mehr als eine TBA zu verwenden, von denen jede die Fähigkeit hat, eine TBR im TNA-PNA-Komplex zu binden. In diesem Fall kann es vorteilhaft sein, als Komponenten der TBAs DNA-Bindungs- oder RNA-Bindungsdomänen mit einer geringeren Affinität für ihre TBR

auszuwählen, als sie die Wildtyp-DNA-Bindungsdomäne oder -RNA-Bindungsdomäne aufweist. Aufgrund der Tatsache, dass die TBAs, die an der Bindung an den mehrfachen TBRs beteiligt sind, entweder vor der Bindung an ihre TBRs oder nach Bindung an ihre TBRs zusammengebaut werden, blockieren die einzelnen TBRs nicht die entsprechenden TBRs in den Genomen, die vom Zielgenom abweichen, es sei denn, die TBRs sind räumlich dazu befähigt, den zusammengebauten TBA-Komplex zu binden. Ein Merkmal der multimeren Anordnung von TBAs, das spezifisch hier als ein Bestandteil der Erfindung beansprucht wird, besteht darin, dass von einer multimeren Anordnung erwartet wird, dass sie eine wesentlich verringerte Affinität für eine einzelne Stelle innerhalb der TNA aufweist. Da jedoch die Bindung relativ zu jeder TBA drastisch erhöht ist, wäre vom TBA-Komplex zu erwarten, dass er nicht in situ um die Bindung einer einzigen TBR mit den entsprechenden nativen Proteinen konkurriert, sondern eine enge Bindung mit Sequenzen im PNA-TNA-Hybrid, das die TBRs für jede der Nucleinsäure-Bindungskomponenten, die in der TBA zusammengebaut sind, enthält, eingeht. Der TBA-Komplex sollte so zusammengebaut und die Linker so in den einzelnen TBAs eingestellt werden, dass es möglich wird, dass die im TBA-Komplex enthaltenen Nucleinsäure-Bindungsregionen gleichzeitig diese Ziele erreichen und binden.

Nachdem die TNA-PNA-Hybride gebildet worden sind und mit der immobilisierten TBA in Kontakt gelangt sind, wird ungebundene Nucleinsäure von der immobilisierten Oberfläche abgewaschen und die immobilisierten Hybride werden nachgewiesen. Dies wird gemäß einem von verschiedenen Wegen erreicht. Gemäß einem Aspekt der Erfindung wird die PNA mit einer OSA, z. B. einem Radionuclid, gefärbten Perlen oder einem Enzym, das zur Bildung eines gefärbten Reaktionsprodukts befähigt ist, markiert. Ferner kann die PNA zusätzlich zu ihrem Gehalt an einer oder mehreren 1/2-TBRs auch mindestens eine 1/2-BBR enthalten. Die 1/2-BBR-Sequenzen werden so ausgewählt, dass sie komplementär zu einzigartigen 1/2-BBR-Sequenzen in BNAs sind. Bei der vorstehend beschriebenen Ausführungsform, bei der es sich bei der TBA um NF-kB handelt und es sich bei der TBR, die bei der TNA-PNA-Hybridisierung gebildet wird, um eine oder mehrere NF-kB-Bindungsstellen handelt, können beispielsweise die 1/2-BBRs hybridisierbare (d. h. einzelsträngige, komplementäre) Sequenzen der linken oder rechten lambda-Bacteriophagen-Operatoren bereitstellen (vergl. beispielsweise Ptashne, Scientific American, Bd. 247 (1982), S. 128-140, und die darin genannten Literaturstellen bezüglich der Sequenzen für diese Operatoren). Diese Sequenzen können an den PNA-1/2-BBRs in vektormäßiger Weise polymerisiert werden (vergl. die Figg. 2 und 3),

wobei bis zu "n" BBRs bereitgestellt werden und jede BBR eine cro-Bindungsstelle bildet. Enzymatisch, radioaktiv oder anderweitig markiertes cro wird mit dem TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-Komplex in Kontakt gebracht. Auf diese Weise wird ein hochgradig selektives und amplifiziertes Signal erzeugt. Das unter Verwendung einer PNA mit einer einzigen 1/2-TBR erzeugte Signal zeigt den Erfolg des Tests unter Erzielung einer TBA-TBR-Bindung und einer Polymerisation der BNAs unter Erzeugung eines Signals von zellulären Stellen (d. h. von CNAs) an. Das Fehlen eines Signals bei Verwendung einer dimerisierten TBA zeigt, dass in der TNA keine HIV-LTRs als doppelte NF-kB-Bindungsstellen vorhanden waren. Andererseits weist das Vorliegen eines Signals bei Verwendung des dimeren NF-kB auf eine HIV-Infektion hin. Ein spezielles Beispiel der vorstehenden Beschreibung dieser Ausführungsform der Erfindung findet sich in Beispiel 6, in dem ein HIV-Testkit beschrieben wird.

Selbstverständlich ist es für den Fachmann ersichtlich, dass die vorstehende Beschreibung verschiedenen Modifikationen in Bezug auf die Auswahl der PNAs, TNAs, TBAs, BNAs und BBAs unterzogen werden kann. Ferner ist es für den Fachmann ersichtlich, dass in von HIV abweichenden Systemen das vorstehend allgemein beschriebene Verfahren gleichermaßen angewandt werden kann. Jedoch können diese anderen Anwendungen einfacher als das vorstehend beschriebene Verfahren sein, da die verwendeten TBAs möglicherweise keine normalen zellulären Stellen erkennen und daher die Zuhilfenahme einer Dimerisierung oder anderer Verfahren zur Unterscheidung zwischen TNAs und CNAs weniger kritisch ist. Bei der Konzeption von Sonden und Bindungsanordnungen für diese anderen Systeme lässt sich der Fachmann von den folgenden Prinzipien und Überlegungen leiten.

Bei der vorstehend beschriebenen Ausführungsform besteht der Vorteil der Verwendung der DNA-Bindungsgebiete von NF-kB-Protein als die TBA und der NF-kB-Erkennungsbindungselemente als die TBRs darin, dass diese Elemente einen wichtigen "Kontrollpunkt" für die Replikation von HIV darstellen. Es ist nämlich bekannt, dass für HIV die Verwendung von NF-kB als ein kritisches Merkmal in seinem replikativen Lebenszyklus erforderlich ist. Ähnliche Kontrollpunkte für andere Pathogene werden ausgewählt und als Basis zum Nachweis gemäß den vorstehend beschriebenen Verfahren verwendet.

Aus der vorstehenden Beschreibung allgemeiner Merkmale der Erfindung und ihrer Anwendungsmöglichkeiten erkennt der Fachmann, dass es eine Vielzahl von speziellen Ausführungsformen zur Durchführung der Erfindung gibt. Beispielsweise ist das erfindungsgemäße Verfahren auf Verfahren und Vorrichtungen anwendbar, bei denen chromatographische Testkits verwendet

werden, die in den US-Patenten 4 690 691 und 5 310 650 (hier kurz als '691- und '650-Patente bezeichnet) beschrieben sind. Gemäß diesen Patenten wurde ein poröses Medium zur Immobilisierung entweder einer TNA oder einer Abfangsonde verwendet und ein Lösungsmittel wurde dazu eingesetzt, eine mobile Phase, die entweder eine markierte PNA enthielt, wenn die TNA immobilisiert war, oder die TNA enthielt, wenn eine Abfangsonde immobilisiert war, in die "Abfangzone" zu transportieren. Nachdem die TNA in der Abfangzone gebunden worden war, und zwar entweder durch direkte Immobilisierung oder durch Abfangen, wurde eine markierte PNA durch die Abfangzone chromatographiert und eine etwaige gebundene Markierung wurde nachgewiesen.

Durch Anpassung der vorliegenden Erfindung an ein derartiges System ergibt sich eine Verbesserung in Bezug auf die Verwendung einer Zielbindungsanordnung in der Abfangzone und daher das Abfangen nur von perfekt passenden TBR-Sequenzen oder anderen TBRs, die Nucleinsäure-Bestätigungen darstellen, die spezifisch durch die TBA innerhalb der TNA-PNA-Duplexe gebunden sind, und zwar aufgrund der vorstehend beschriebenen empfindlichen Unterscheidung durch die TBA zwischen TNAs und CNAs.

Nachdem die TNA-PMA-Hybride an die immobilisierte TBA gebunden sind, wird das Signal durch Zugabe von BNAs oder durch Chromatographie von BNAs durch die Abfangzone verstärkt. Schließlich kann das Signal weiter durch Zugabe von BBAs oder durch Chromatographie von markierten BBAs durch die Abfangzone verstärkt werden. Auf diese Weise wird die einfache Durchführung der Analysenstufen, die in den '691- und '650-Patenten beschrieben werden, verbessert, indem man die zusätzliche Möglichkeit eröffnet, die Spezifität und durch Amplifikation die Empfindlichkeit des in diesen Patenten beschriebenen Verfahrens zu erhöhen.

Für den Fachmann ist es ersichtlich, dass das Verfahren der vorliegenden Erfindung in Mikrotiterplatten oder automatisiert ausgeführt werden kann. Die Verwendung von Maschinen, bei denen das erfindungsgemäße Verfahren angewandt wird, fällt daher natürlicherweise unter den Umfang der vorliegenden Offenbarung und der beigefügten Ansprüche. Somit ist die Erfindung beispielsweise zur Verwendung in Instrumenten, wie dem IMx-Tischanalysiergerät der Fa. Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) anwendbar. Das IMx-Gerät wird derzeit zur Durchführung eines fluoreszierenden Polarisationsimmunoassays (FPZA, vergl. Kier KCLA, Bd. 3 (1983), S. 13-15) sowie eines Mikroteilchen-Enzymimmunoassays (MEZA, vergl. Laboratory Medicine, Bd. 20, 1. Januar 1989, S. 47-49) eingesetzt. Das MEZA-Verfahren lässt sich leicht in ein Nucleinsäure-Nachweisverfahren unter Anwendung der vorliegenden Erfindung umwandeln,

indem man eine TBA als Abfangmolekül verwendet, das auf ein in Lösung suspendiertes Mikroteilchen von Submikrongröße ($<0,5 \mu\text{m}$ im Durchschnitt) aufgebracht ist. Die mit TBA beschichteten Mikroteilchen werden in eine Reaktionszelle pipettiert. Das IMx pipettiert sodann eine Probe (hybridisierte PNA-TNA) in die Reaktionszelle, wodurch ein Komplex mit der TBA gebildet wird. Nach einer entsprechenden Inkubationsdauer wird die Lösung auf eine inerte Glasfasermatrix übertragen, zu der die Teilchen eine starke Affinität aufweisen und an der die Mikroteilchen haften. Entweder vor oder nach Filtration des Reaktionsgemisches durch die Glasfasermatrix werden BNAs und BBAs zugegeben oder andere Signalamplifikations- und Nachweismittel verwendet, die von der spezifischen Bildung von TNA-PNA-Hybriden abhängen. Der immobilisierte Komplex wird ausgewaschen und das ungebundene Material fließt durch die Glasfasermatrix.

Die gebundenen Komplexe werden mittels BBAs, die mit alkalischer Phosphatase markiert sind, oder mit anderweitig markierten BBAs (radioaktiv, enzymatisch, fluoreszierend) nachgewiesen. Im Fall von mit alkalischer Phosphatase markierten BBAs kann das fluoreszierende Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat oder ein ähnliches Reagenz zugesetzt werden. Alternativ kann das Enzym umgangen werden, indem man BBRs direkt mit diesem oder einem ähnlichen Reagenz markiert. Auf jeden Fall ist die Fluoreszenz oder ein anderes Signal proportional zur Menge der vorhandenen PNA-TNA-Hybride.

Die Fluoreszenz wird auf der Oberfläche der Matrix mittels eines Frontoberflächen-Fluorimeters gemäß den Angaben des Herstellers des IMx-Geräts nachgewiesen. Unter geringfügigen Anpassungen, die aufgrund routinemäßiger Experimente vorgenommen werden können und die zur Optimierung eines Instruments, wie des IMx, für eine Nucleinsäure-Hybridisierung und für Nucleinsäure-TBA-Wechselwirkungen dienen, kann die vorliegende Erfindung vollkommen an automatisierte Analysen von TNA-Proben angepasst werden.

9. Weitere diagnostische Anwendungen der Erfindung. Während die vorstehende Beschreibung es ermöglicht, die vorliegende Erfindung in einer Anzahl von verschiedenen Ausführungsformen anzuwenden, sind zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten ersichtlich, z. B. in einem Mobilitätsverzögerungssystem.

Bei dieser Ausführungsform der Erfindung wird eine Verbesserung des bekannten elektrophoretischen Mobilitätsverschiebungstests (EMSA) folgendermaßen erreicht (vergl. Figg. 12a und 12b):

Eine DNA-Probe wird fragmentiert, entweder durch willkürliche Spaltung oder durch spezifische Restriktionsendonuclease-Behandlung. Die DNA in der Probe wird sodann in zwei gleiche Aliquotanteile aufgeteilt und eine spezifische TNA wird zum ersten Aliquotanteil, jedoch nicht zum zweiten gegeben. Der erste und zweite Aliquotanteil werden sodann in einem Acrylamid- oder Agarosegel der Elektrophorese unterworfen und das Muster von DNA-Banden (entweder durch Ethidiumbromid-Bindung oder durch radioaktive Markierung vor der Elektrophorese sichtbar gemacht) wird sodann für die beiden Aliquotanteile verglichen. DNA-Fragmente mit Bindungsstellen, für die die TBA spezifisch ist, unterliegen einer Verzögerung ihrer Wanderung durch das elektrophoretische Medium. Durch Verwendung einer geeigneten TBA können auf diese Weise eine beliebige Anzahl an DNA- oder anderen Nucleinsäuresequenzen aufgespürt werden.

Bei einer Modifikation des vorstehend beschriebenen EMSA-Tests wird fragmentierte TNA mit einer PNA hybridisiert und in einer ersten Dimension fraktioniert. Die fraktionierte DNA wird sodann mit einer geeigneten TBA umgesetzt und die Mobilitätsänderung der DNA-Fragmente wird festgestellt. Eine Verstärkung der Verzögerung ist durch Zugabe von BBAs auf die vorstehend beschriebene Weise möglich (vergl. beispielsweise Vijg und die darin zitierten Druckschriften für bekannte Techniken der zweidimensionalen Nucleinsäureelektrophorese, auf die das vorliegende Verfahren angewandt werden kann).

Die nachstehenden Beispiele bieten dem Fachmann weitere Richtlinien bezüglich der praktischen Durchführung der Erfindung. Eine Beschreibung üblicher rekombinanter DNA-Techniken findet sich bei Sambrook, Fritsch und Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, sowie in neueren Veröffentlichungen. Diese Techniken werden hier nicht beschrieben, da sie dem Fachmann geläufig sind.

Beispiel 1 - Herstellung von PNAs und Markierung von PNAs

Sondennucleinsäuren, PNAs, lassen sich nach bekannten Verfahren herstellen. So können einzelsträngige Polynucleotid-PNAs mit einer definierten Sequenz durch chemische Festphasensynthese gemäß Merrifield hergestellt werden. PNAs lassen sich durch eine automatisierte Synthese unter Einsatz einer handelsüblichen Technik herstellen, z. B. mit Harzen und Vorrichtungen, die von der Fa. Applied Biosystems, ABI, oder anderen Herstellern erzeugt oder vertrieben werden. Alternativ lassen sich bestimmte PNA-Sequenzen in vivo durch bekannte rekombinante DNA-Verfahren synthetisieren. Beispielsweise lassen sich durch

Klonieren einer Duplex-PNA in einen Vektor, der in *E. coli* replizieren kann, große Mengen der Duplex-PNA herstellen. Multimere der PNA können so in den Vektor kloniert werden, dass pro 1 Mol Vektor mehrere Mol PNA bei Verdau des Vektors freigesetzt werden, wobei ein Restriktionsfragment die PNA-Sequenz flankiert. Im Anschluss an eine Synthese oder rekombinante Herstellung werden die PNAs durch bekannte Verfahren gereinigt, z. B. durch Gelelektrophorese oder Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC). Wenn die PNA als Duplex hergestellt wird, lassen sich die PNA-Stränge vor der Verwendung in einem Hybridisierungstest zum Nachweis von Zielnucleinsäuresequenzen durch Erwärmen oder andere bekannte Verfahren trennen.

Die spezifische Sequenz von Basen in der PNA wird so gewählt, dass sie die in einer TNA nachzuweisende Sequenz widerspiegelt, mit der Maßgabe, dass erfindungsgemäß die PNA eine 1/2-TBR-Sequenz enthält, bei der es sich um eine Sequenz handelt, die bei Hybridisierung der PNA und TNA eine TBR bildet. Da aus dem Stand der Technik eine im wesentlichen unbegrenzte Anzahl an derartigen Sequenzen bekannt ist, wird die Wahl der PNA-Sequenz vom Fachmann für einen beliebigen gegebenen Anwendungszweck getroffen. Bei der Sequenz der HIV-LTR handelt es sich um eine solche Sequenz, die bei Hybridisierung von Bereichen der LTR, die für eine PNA kodieren, mit TNAs, die für die HIV-LTR kodieren, TBRs bilden, die zur Bindung der NF- κ B- oder SP1-DNA-Bindungsproteine befähigt sind.

Zusätzlich zu Sequenzen, die bei Hybridisierung eine TBR bilden, kann die PNA auch eine 1/2-BBR enthalten. Bei dieser Sequenz handelt es sich um eine Sequenz, die bei Hybridisierung mit einer Booster-Nucleinsäure, BNA, eine BBR bildet, die zur Bindung einer BBA befähigt ist. Bei der BBA handelt es sich vorzugsweise um ein DNA-Bindungsprotein mit hoher Affinität für die BBR-Sequenz.

In diesem speziellen Beispiel erfolgt eine Hybridisierung zwischen einer PNA mit einer 1/2-TBR, SEQ ID NO: 4, und am 3'-Ende dieser Sequenz, einer 1/2-BBR-Sequenz, die als SEQ ID NO: 35 dargestellt ist. Die PNA, die für diese Sequenzen kodiert, wird entweder ohne Markierung oder in einer mit einem radioaktiven Isotop, wie P^{32} , S^{35} oder einem ähnlichen Isotop, markierten Form gemäß bekannten Verfahren verwendet. Alternativ wird die PNA an eine Perle mit einer Größe von 0,01 bis 10 μ m gebunden, die für einen leichten visuellen Nachweis gefärbt sein kann. Diese Markierung bildet die OSA gemäß den Angaben in der Beschreibung. Diese Sonde hybridisiert mit HIV-LTR-Sequenzen unter Bildung einer TBR, die NF- κ B bindet. Ferner hybridisiert die PNA mit BNAs mit einer komplementären 1/2-BBR unter Bildung eines linken lambda-

Bacteriophagen-Operators, der entweder cro oder lambda-Repressorproteine bindet.

Auf ähnliche Weise, wie es vorstehend beschrieben wurde, werden PNAs verwendet, bei denen es sich bei der 1/2-TBR um eine beliebige der Sequenzen SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NOs: 7-34 handelt und sich eine 1/2-BBR, wie SEQ ID NO: 35 oder SEQ ID NO: 36 sich am 3'-Ende oder am 5'-Ende der 1/2-TBR befindet.

Beispiel 2 - Herstellung und Markierung von BNAs

Auf ähnliche Weise wie bei den in Beispiel 1 zur Herstellung und Markierung von PNAs beschriebenen Verfahren werden BNAs gemäß bekannten Verfahren hergestellt und markiert. Wie im US-Patent 4 556 643 beschrieben (durch Verweis zum Gegenstand der Beschreibung gemacht; insbesondere Beispiel 1), lassen sich Nucleinsäuresequenzen, die für bestimmte Nucleinsäure-Bindungssequenzen kodieren, in großen Mengen durch Klonieren in einen replizierbaren Vektor herstellen. Ferner lassen sich ähnlich wie gemäß dieser Druckschrift die 1/2-TBR- und 1/2-BBR-Sequenzen auf diese Weise kolinear herstellen, jedoch mit dem Unterschied, dass erfindungsgemäß die 1/2-TBR-Sequenz selbst eine Nucleinsäure-Bindungskomponenten-Erkennungsstelle bildet und die 1/2-BBR zwar eine Nucleinsäure-Bindungskomponenten-Erkennungsstelle bildet, jedoch auch ein Mittel zur Amplifikation des Signals darstellt, das bei Bindung der 1/2-TBR an komplementäre Sequenzen in der TNA entsteht, indem für die Polymerisation von BNAs an der TNA-gebundenen PNA gesorgt wird. Um dies zu ermöglichen, wird eine Sequenz, wie SEQ ID NO: 35, die für den linken Operator des lambda-Bacteriophagen kodiert, mit zusätzlichen Sequenzen versehen, so dass eine Überhangsequenz an einem oder beiden Enden der BNA bei Hybridisierung mit der PNA gebildet wird.

Als ein spezifisches Beispiel wird eine vektorielle Polymerisation von BNAs an einer TNA durch SEQ ID NOs: 40-43 bereitgestellt. In diesem Beispiel kodiert SEQ ID NO: 40 für zwei 1/2-TBRs, die mit zwei 1/2-TBRs in einer TNA unter Bildung von zwei NF- κ B-Bindungsstellen hybridisieren, während gleichzeitig ein linker lambda-Bacteriophagen-Operator 1/2-BBR bereitgestellt wird, der zusätzlich am 3'-Ende mit der Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym PstI terminiert ist. Eine Addition der BNA, SEQ ID NO: 41, mit der 1/2-BBR, die komplementär mit der 1/2-BBR an der PNA ist, SEQ ID NO: 40, vervollständigt die BBR, während gleichzeitig die PstI-Erkennungsstelle vervollständigt wird, wobei ein Überhang von vier Basen für die Hybridisierung mit weiteren BNAs verbleibt. Demgemäß wird SEQ ID NO: 42 addiert, die am 3'-Ende eine Sequenz mit vier Basenpaaren aufweist, die komplementär zum Überhang von vier Basen, die bei der

Hybridisierung von SEQ ID NOs: 40 und 41 verbleiben, ist. Ferner ist SEQ ID NO: 42 mit einer Sequenz von fünf Basen an ihrem 5'-Ende versehen, die einen Teil einer BamHI-Erkennungsstelle bilden. Das wachsende Polymere aus BNAs wird weiter durch Addition der BNA SEQ ID NO: 43 verlängert, die komplementär zu SEQ ID NO: 42 ist, wobei die BBR vervollständigt wird und gleichzeitig die BamHI-Erkennungsstelle vervollständigt wird und ein Überhang von vier Basen verbleibt, der zusätzlich mit BNAs mit komplementären Sequenzen hybridisiert werden kann. Auf diese Weise können die BNAs in umfangreicher Weise hybridisiert werden, so dass das Signal eines einzelsträngigen PNA-TNA-Hybridisierungsereignisses stark amplifiziert wird.

Wie bei den in Beispiel 1 beschriebenen PNAs können die BNAs in einer unmarkierten Form verwendet werden oder sie können gemäß bekannten und in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren markiert werden. Ferner ist es ersichtlich, dass anstelle der Herstellung des BNA-Polymeren durch sequentielle Addition von BNAs an den PNA-TNA-Komplex das BNA-Polymere vorher gebildet und direkt an den PNA-TNA-Komplex addiert werden kann. Ein einfaches Verfahren zur vorherigen Bildung eines derartigen BNA-Polymeren umfasst die rekombinante Erzeugung eines Vektors, in dem Multimere der BNA mit einer einzigen Restriktionsstelle an jedem Ende des Polymeren vorgesehen sind. Dieses Polymere von BNAs mit einem Gehalt an mehrfachen BBRs wird aus dem Vektor geschnitten und hybridisiert mit einer einzelsträngigen 1/2-BBR, die bei Hybridisierung der PNA und der TNA im PNA verbleibt. Dies wird erreicht, indem man eine einzelsträngige Sequenz in der PNA bereitstellt, die mit einem Überhang komplementär ist, der im BNA-Polymeren beim Ausschneiden aus dem Produktionsvektor gebildet wird.

Beispiel 3 - Herstellung von HNAs und deren Verwendung zur Maskierung von BNA-Polymeren

Die erfindungsgemäßen HNAs werden gemäß bekannten Verfahren für die Herstellung von Polynucleotiden gemäß den Angaben in den Beispielen 1 und 2 für PNAs und BNAs hergestellt. Bei der Herstellung von HNAs wird jedoch die Sequenz der HNA spezifisch so konzipiert, dass ein wesentlicher Bereich der HNA ein selbst-komplementäres Palindrom unter Bildung einer Haarnadel bildet, während gleichzeitig in einzelsträngiger Form eine ausreichende Basenzahl zurückbleibt, um eine Hybridisierung mit einzelsträngigen Sequenzen in der wachsenden Kette von BNAs gemäß der Beschreibung in Beispiel 2 zu ermöglichen.

In diesem Beispiel wird eine HNA gemäß SEQ ID NO: 44 bereitgestellt, um die Verlängerung der BNAs an der PNA in Beispiel 2 nach Addition der BNA SEQ

ID NO: 43 zu maskieren. Dies wird erreicht, da SEQ ID NO: 44 zwar eine Palindromsequenz, die eine stabile Haarnadel bildet, aufweist, jedoch auch eine Sequenz am 5'-Ende der HNA aufweist, die die BamHI-Sequenz, die durch die Hybridisierung von SEQ ID NO: 42 und SEQ ID NO: 43 gebildet wird, vervollständigt. Selbstverständlich dient die Termination des Polymeren nach Addition von nur drei BNAs dazu, die Erfindung in einfacher Weise darzustellen. Wie vorstehend ausgeführt, kann diese Polymerisation im wesentlichen in unbegrenzter Weise fortgesetzt werden, um das Signal des PNA-TNA-Hybridisierungsereignisses zu amplifizieren. Nachdem die HNA mit der wachsenden Kette von BNAs hybridisiert hat, wird das Polymere maskiert und es ist keine weitere Verlängerung des Polymeren mehr möglich.

Beispiel 4 - Herstellung von TBAs und BBAs und deren Markierung und Immobilisierung

Die TBAs und BBAs, die erfindungsgemäß verwendet werden können, umfassen beliebige Substanzen, die spezifisch die TBRs und BBRs, die durch Hybridisierung der PNAs, TNAs und BNAs gebildet worden sind, binden. Die Verwendung von DNA-Bindungsproteinen stellt ein Beispiel für derartige Substanzen dar.

Beispielsweise handelt es sich bei der TBA um das Dimere des DNA-Bindungsbereichs von p50 und bei der BBA um das lambda-cro-Protein. Diese Proteine lassen sich nach bekannten Verfahren herstellen. Die Gene für diese beiden Proteine wurden kloniert. Somit werden diese Proteine nach bekannten Verfahren in rekombinanter Weise hergestellt und gereinigt. Ferner werden diese Proteine entweder mit einem Radioisotop, z. B. mit radioaktivem Iod, oder mit einem Enzym, wie beta-Galactosidase oder Meerrettich-peroxidase, oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff, wie Fluorescein oder Rhodamin, gemäß bekannten Verfahren markiert. Außerdem können die TBA und/oder BBA an einer festen Oberfläche immobilisiert werden, z. B. an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte oder an der Oberfläche einer Perle, z. B. einer gefärbten Perle mit einem Durchmesser von 0,01 bis 10 µm. Die Markierungen an den TBAs und BBAs können gleich oder verschieden sein.

In diesem Beispiel wird die TBA mit einem Gehalt an der dimeren p50-DNA-Bindungsdomäne mit Rhodamin markiert, während die BBA, cro, mit Fluorescein markiert wird. Demgemäß werden bei Hybridisierung der PNAs, TNAs, BNAs und HNAs, wie sie in der vorliegenden Beschreibung und den vorstehenden und folgenden Beispielen beschrieben werden, die gegebenenfalls gebildeten Nucleinsäurehybride mit überschüssiger markierter TBA und cro in Kontakt gebracht. Die Fluoreszenz dieser Markierungen wird gemäß bekannten Verfahren

gemessen und der Nachweis beider Signale stellt ein Anzeichen für die Anwesenheit von 1/2-TBR-Sequenzen in der TNA dar. Das durch die Fluoreszenz des NF-kB und cro erzeugte Differenzsignal stellt ein Maß für den Umfang dar, bis zu dem die Polymerisation von BNAs am PNA-TBA-Hybrid zur Amplifikation des Signals geführt hat. Eine Amplifikation von 1- bis über 1 000-fach kommt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren in Betracht.

Beispiel 5 - Hybridisierung von zwei PNAs mit einer TNA und Unterscheidung zwischen einer TNA und einer CNA

Die PNAs, PNA1, SEQ ID NO: 40, und PNA2, SEQ ID NO: 45, werden in einem etwa 10-fachen molaren Überschuss gegenüber der Konzentration an TNAs in einer Testprobe verwendet. In diesem Beispiel wird eine isolierte Duplex-HIV-LTR, bei der ein Strang die in Fig. 7 dargestellte SEQ ID NO: 37 aufweist und der andere Strang komplementär zu der in Fig. 7 dargestellten Sequenz ist, als TNA verwendet. Ferner wird in diesem Beispiel eine isolierte Duplex-CNA verwendet, von der ein Strang die gleiche Sequenz wie SEQ ID NO: 37 aufweist, mit der Ausnahme, dass in der ersten NF-kB-Bindungsstelle, die in Fig. 7 dargestellt ist, in der Mitte der Bindungsstelle in Position 1 in Fig. 7 sich anstelle eines "T" ein "A" befindet, weswegen der komplementäre Strang davon an dieser Position nicht zur SEQ ID NO: 40-PNA passt.

SEQ ID NO: 40 und SEQ ID NO: 45 werden beide zu getrennten Reaktionsgemischen gegeben, wobei das erste die vorstehend beschriebene TNA und das zweite die vorstehend beschriebene CNA enthält. Die Proben werden in einem geeigneten Hybridisierungspuffer, wie 10 mM Tris (pH-Wert 7,5), 1 mM EDTA, solubilisiert. Die Proben werden sodann etwa 5 Minuten auf etwa 90 °C erwärmt, um die Duplex-TNAs und -CNAs in den Proben einer Strangtrennung zu unterwerfen. Anschließend lässt man die Proben abkühlen, um eine Anlagerung der Stränge von PNAs, TNAs und CNAs zu ermöglichen.

Nachdem die Hybridisierung beendet ist, was nach bekannten Verfahren festgestellt werden kann, beispielsweise durch Berechnung der $t_{1/2}$ auf der Grundlage der Basenzusammensetzungen und der Anlagerungstemperatur gemäß bekannten Verfahren, wird die SEQ ID NO: 40-PNA durch Addition von BNAs gemäß Beispiel 2 polymerisiert und die SEQ ID NO: 45-PNA2-Sonde wird mit BNAs beginnend mit dem SphI-Erkennungsstellen-Überhang polymerisiert. Im Anschluss an die Addition der BNAs und eine kurze Hybridisierungsperiode werden die getrennten Proben zu Perlen gegeben, die mit kovalent immobilisiertem NF-kB beschichtet sind. Man lässt das NF-kB an etwaige gebildete TBRs in den TNA- und CNA-Proben binden. Nach etwa 15-minütiger Bindungszeit werden die Proben 2-mal mit etwa 3 Volumenteilen eines

entsprechenden Waschpuffers, wie 10 mM Tris, pH-Wert 7,5, 100 mM NaCl, oder eines anderen Puffers gewaschen, von dem vorher festgestellt worden ist, dass er NF-kB oder die lambda-Bacteriophagen-CI-Repressorprotein-Bindungsaktivität nicht stört. Nach jedem Waschvorgang lässt man die Perlen unter Schwerkrafteinwirkung oder durch kurze Zentrifugation absetzen. Dadurch werden etwaige Nucleinsäuren entfernt, die keine perfekte NF-kB-Bindungsstelle aufweisen, die durch Hybridisierung der PNA1- und TNA-Sequenzen gebildet worden sind.

Nach dem letzten Waschvorgang wird lambda-Bacteriophagen-CI-Repressorprotein, das mit einem radioaktiven Isotop, wie radioaktivem Iod, oder mit einem Enzym, wie Meerrettich-peroxidase, mit gefärbten Perlen oder mit einer fluoreszierenden Markierung markiert ist, zu den einzelnen Proben gegeben. Die Proben werden sodann mehrmals (etwa 3-mal) mit mehreren Volumenteilen (etwa 2) eines geeigneten Waschpuffers, wie 10 mM Tris, pH-Wert 7,5, 100 mM NaCl, oder eines anderen Puffers gewaschen, von dem vorher festgestellt worden ist, dass er NF-kB oder die lambda-Bacteriophagen-CI-Repressorprotein-Bindungsaktivität nicht stört. Nach jedem Waschvorgang lässt man die Perlen unter Schwerkrafteinwirkung oder durch kurze Zentrifugation absetzen. Nach dem letzten Absetzen oder Zentrifugieren wird die gebundene Markierung quantitativ bestimmt, indem man die gebundene Radioaktivität, die bei einem enzymatischen Test freigesetzte Farbe, die Farbe von gebundenen Perlen oder die Fluoreszenz nachweist. Alternativ kann ein anti-CI-Antikörper zugesetzt werden und ein üblicher Sandwich-ELISA- oder Radioimmuntest kann zum Nachweis von gebundenem Repressor durchgeführt werden. Außerdem werden als eine negative Kontrolle (Hintergrund) alle vorstehenden Maßnahmen parallel mit einer Probe durchgeführt, in der Perlen ohne immobilisiertes NF-kB verwendet werden.

Als Ergebnis des vorstehenden Tests weisen die Kontrollproben und die CNA enthaltenden Proben ähnlich geringe Signale auf, während die TNA enthaltende Probe ein Signal aufweist, das deutlich über dem Hintergrund liegt.

Beispiel 6 - Testkit für den Nachweis von HIV

A. Bestandteile des Kits

1. Mikrotiterplatte
2. 1 mg/ml-Lösung von auf rekombinantem Wege hergestelltem NF-kB in Tris-gepufferter Kochsalzlösung
3. Röhrchen mit einem Gehalt an einzelsträngigen HIV-PNAs (ein Gemisch von vorher vermischten Oligonucleotiden, die für zwei NF-kB-1/2-Bindungsstellen kodieren, d. h. ein Gemisch von SEQ ID NOs: 7 und 8).

4. Röhrchen mit einem Gehalt an einzelsträngiger humaner genomischer PNA, SEQ ID NO: 1
5. Röhrchen mit Nuclease (PstI)
6. Röhrchen mit Protease
7. Röhrchen mit einem Gehalt an vorher polymerisierten BNAs, 100 Wiederholungseinheiten von lambda-Bacteriophagen O_r, maskiert mit einer HNA, jedoch mit freien 1/2-BBRs, die für die Bindung an PNA-TNA-Hybride verfügbar sind.
8. Röhrchen mit Meerrettich-peroxidase (hrp), konjugiert mit cro
9. Röhrchen mit hrp-gefärbtem Substrat
10. Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 100 ml
11. Lanzette
12. Reaktionsröhrchen A, B und C, jeweils mit einem Gehalt an 250 µl destilliertem Wasser
13. Medizin-Tropfvorrichtung

B. Testverfahren

- (a) Die Mikrotiterplatte (Gegenstand 1) wird mit der Lösung aus auf rekombinantem Wege hergestelltem NF-kB (Gegenstand 2) in einer Konzentration von 1 mg/ml in Tris-gepuffertes Kochsalzlösung über Nacht bei 4 °C unter Rütteln beschichtet.
- (b) 3 Tropfen Blut der Testperson werden erhalten, indem man mit der Lanzette (Gegenstand 11) in den Finger einer Person einsticht. 1 Blutropfen wird in jedem der Röhrchen A, B und C (Gegenstand 12) verteilt.
- (c) In jedes Röhrchen wird mit der Medizin-Tropfvorrichtung (Gegenstand 12) 1 Tropfen Proteaselösung (Reagenz 6) gegeben. Man bewegt das Röhrchen und lässt es sodann 5 Minuten absetzen.
- (d) Ein Tropfen Nuclease (Reagenz 5) wird in jedes der Röhrchen A-C unter Verwendung der Medizin-Tropfvorrichtung gegeben. Man bewegt die Röhrchen und lässt sie 10 Minuten absetzen.
- (e) 1 Tropfen von Reagenz 3 wird in das Röhrchen A (Testprobe) gegeben. 1 Tropfen von Reagenz 4 wird in das Röhrchen B (positive Kontrolle) gegeben. 1 Tropfen Kochsalzlösung (Reagenz 12) wird als negative Kontrolle dem Röhrchen C zugesetzt. Die Röhrchen werden in heißem Wasser auf 50 °C erwärmt. Sodann lässt man sie innerhalb von 1 Stunde auf Raumtemperatur abkühlen.

- (f) Während der Durchführung der Hybridisierung in Stufe (d) lässt man überschüssiges Protein von der Oberfläche der Mikrotiterplatte von Stufe (a) ablaufen. Die Platte wird mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung (Röhrchen 10) gespült.
- (g) Der Inhalt der Röhrchen A-C von Stufe (e) wird auf drei Vertiefungen der Mikrotiterplatte übertragen und 1 Stunde unter Rütteln stengelassen.
- (h) Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, die den Inhalt der Röhrchen A-C enthalten, werden mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung gespült und entleert.
- (i) 1 Tropfen von Reagenz 7 wird in jede Vertiefung gegeben. Innerhalb von 1 Stunde lässt man die Hybridisierung mit etwaigen 1/2-BBR-Stellen, die an der Platte gebunden sind, ablaufen, wonach 3-mal mit Tris-gepufferter Kochsalzlösung gespült wird.
- (j) 1 Tropfen Reagenz 8 wird in jede Vertiefung gegeben und man lässt *cro* innerhalb von 10 Minuten an etwaige gebundene BNA binden, wonach 5-mal mit je 1 ml Tris-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen wird.
- (k) 1 Tropfen *hrp*-Substrat wird in jede Vertiefung gegeben, wonach man die Farbentwicklung ablaufen lässt.

C. Ergebnisse

Wenn die Vertiefungen A und B beide eine Farbentwicklung zeigen, die in der Vertiefung C nicht auftritt, ist der Test aussagekräftig und das Subjekt leidet an einer HIV-Infektion. Wenn nur die Vertiefung A eine Farbentwicklung zeigt oder wenn nur die Vertiefung C eine Farbentwicklung zeigt, war die Testdurchführung nicht korrekt und der Test ist nicht aussagekräftig. Wenn die Vertiefungen A und C keine Farbentwicklung zeigen, jedoch bei B eine Farbentwicklung auftritt, ist der Test aussagekräftig und das Individuum ist nicht mit HIV infiziert.

Beispiel 7 - Herstellung von verschiedenen neuen TBAs

Neue TBAs zur erfindungsgemäßen Verwendung werden folgendermaßen hergestellt:

(a) NF-kB/NF-kB (HIV-Detect I). Eine Nucleinsäure, die für eine der Sequenzen SEQ ID NOs: 63-71 oder ein ähnliches NF-kB-DNA-Bindungsprotein kodiert, wird im Raster mit einer Nucleotidsequenz, die für eine Anordnungssequenz, wie *cro*, kodiert, so fusioniert, dass die NF-kB-DNA-Erkennungssequenz am Amino- oder Carboxyterminus der *cro*-Sequenz kodiert wird. Gegebenenfalls wird eine Linkersequenz zwischen der NF-kB-Sequenz und der *cro*-Sequenz vorgesehen. Am anderen Terminus von *cro* wird gegebenenfalls

eine nukleare Lokalisierungssignalsequenz, wie SEQ ID NO: 72, vorgesehen. Ferner werden gegebenenfalls Asymmetriesequenzen am cro-Terminus, der von der NF-kB-Erkennungssequenz nicht verwendet wird, vorgesehen. Beispiele für vollständige TBAs sind nachstehend aufgeführt.

(b) NF-kB/SP1 (HIV-Detect II). Auf ähnliche Weise wie im vorstehenden Abschnitt (a) wird eine rekombinante Kodierungssequenz, die für eine NF-kB-Erkennungsdomäne kodiert, hergestellt. In einem getrennten Konstrukt wird anstelle von SEQ ID NOs: 63-72 die Kodierungssequenz für den DNA-Erkennungsbereich von SP1 aufgenommen. Eine derartige Sequenz sollte für die Gesamtheit oder einen funktionellen Teil von SEQ ID NO: 73 kodieren, wobei es sich um den Bereich des SP1-Transkriptionsfaktors handelt, der eine DNA-Bindung zeigt (vergl. Kadonaga et al., Cell, Bd. 51 (1987), S. 1079-1090). Der NF-kB-Kodierungsvektor und der SP1-Kodierungsvektor werden sodann in ein geeignetes Expressionssystem, wie es aus dem Stand der Technik bekannt ist, kotransfiziert. Eine monomere NF-kB-Erkennungseinheit wird an das vollständige NF-kB-Erkennungsdimere nach dem Zusammenbau der SP1- und NF-kB-Erkennungseinheiten durch den Begleiter addiert. Die Asymmetriesequenzen verhindern die Bildung von NF-kB- oder SP1-Dimeren und dirigieren stattdessen die Bildung von NF-kB-SP1-Heterodimeren (d. h. HIV-Detect II), die dann aus dem Expressionssystem (Säugetier- oder Bakterienzellen) durch bekannte Verfahren isoliert werden.

(c) SP1/SP1-TBAs (HIV-Detect III). Wie im vorstehenden Abschnitt (b) beschrieben, wird ein für SP1 kodierendes TBA-Konstrukt hergestellt. Jedoch wird nur dieses Konstrukt in das Expressionssystem transfiziert, und Asymmetriesequenzen, die die Bildung von SP1-SP1-Dimeren ermöglichen, werden aufgenommen.

(d) SP1-TATA (HIV-Detect IV). Wie im vorstehenden Abschnitt (b) beschrieben, wird eine für SP1 kodierende TBA-Rekombinante hergestellt. Ferner wird eine Rekombinante, die für eine TBA mit einer Bindungssequenz kodiert, SEQ ID NO: 74, oder eine ähnliche Sequenz, die für eine TATA-Erkennungseinheit kodiert, mit Asymmetriesequenzen, die komplementär zu denen sind, die im für SP1-TBA kodierenden Konstrukt enthalten sind, hergestellt. Diese Konstrukte werden kotransfiziert und die Heterodimeren werden durch übliche Verfahren isoliert, einschließlich Affinitätsreinigung an einer DNA-Säule mit den entsprechenden SPA1-TATA-Zielbindungsregionen.

(e) SP1-E2 (HPV-Detect I). Ein für SP1 kodierendes Konstrukt wird gemäß dem vorstehenden Abschnitt (b) hergestellt. Ein für E2-TBA kodierendes Konstrukt wird unter Verwendung einer Sequenz, die für eine der Sequenzen SEQ

ID NOs: 75-84 und 94-98, bei denen es sich um Papillomavirus-E2-DNA-Erkennungseinheiten handelt (vergl. Hegde et al., Nature, Bd. 359 (1992), S. 505-512), oder ähnliche Erkennungseinheiten kodiert, hergestellt und mit dem für SP1-TBA kodierenden Konstrukt kotransformiert oder kotransfiziert. Die monomere E2-Erkennungseinheit wird an das vollständige E2-Erkennungsdimere addiert, nachdem der Zusammenbau der E2-SP1-Erkennungseinheit durch den Begleiter erfolgt ist. Das heterodimere HPV-Detect I wird nach bekannten Verfahren isoliert.

(f) E2-E2 (HPV-Detect II). Wie im vorstehenden Abschnitt (e) beschrieben, wird ein für E2-TBA kodierendes Konstrukt hergestellt, mit der Ausnahme, dass Asymmetriesequenzen aufgenommen werden, die die Bildung von E2-Dimeren ermöglichen. Die exprimierten Dimeren werden sodann nach bekannten Verfahren isoliert, unter Einschluss der Affinität für eine dimere E2-Bindungsstelle an einer DNA-Affinitätssäule.

(g) E2-TATA (HPV-Detect III). Wie in den vorstehenden Abschnitten (e) und (d) ausgeführt, werden E2- bzw. TATA-Bindungs-TBAs hergestellt, mit der Ausnahme, dass Asymmetriesequenzen aufgenommen werden, die die Bildung von Heterodimeren anstelle von Homodimeren verstärken. Diese Konstrukte werden sodann koexprimiert und die Heterodimeren werden isoliert.

(h) TATA-TATA (HPV-Detect IV). Wie vorstehend in den Abschnitten (a) und (d) beschrieben, wird ein TATA-bindendes, TBA-kodierendes Konstrukt unter Verwendung von Asymmetriesequenzen hergestellt, die die Bildung dieses Homodimeren begünstigen, und das Homodimere wird isoliert.

(i) Weitere TBAs. Wie vorstehend für HIV- und HPV-TBAs beschrieben, können TBAs für ein beliebiges vorgegebenes Pathogen oder Krankheitszustand hergestellt werden, indem man spezifische DNA-Bindungsproteine identifiziert und ein Expressionskonstrukt unter Verwendung von geeigneten Linker-Anordnungs- und Asymmetriesequenzen bildet.

Beispiel 8

Auf ähnliche Weise wie bei dem in Beispiel 5 beschriebenen Test, ergibt sich ein stringenterer Test durch Verwendung des Duplex-NF-kB-SP1-Bindungsproteins, das gemäß Beispiel 6 hergestellt worden ist. Demgemäß können die in Fig. 7 dargestellten und in Beispiel 5 verwendeten Sonden verlängert werden, um den Intersondenabstand zu verringern und dadurch die Flexibilität der DNA in der TNA zu verringern.

Beispiel 9 - Herstellung von TBAs von "hoher Ordnung"

Durch geeignete Verwendung von Asymmetriesequenzen werden TBAs hergestellt, bei denen es sich um Dimere, Trimere, Tetramere, Pentamere oder Hexamere von bestimmten DNA-Erkennungseinheiten handelt. Auf diese Weise

wird eine hexamere TBA hergestellt, indem man zunächst eine erste dimere NF-kB-p50-TBA unter Verwendung von Asymmetriesequenzen, die die Bildung des Dimeren ermöglichen, herstellt. Ferner ermöglichen die Asymmetriesequenzen die Tetramerisierung des p50-Dimeren mit einem SP1-SP1-Dimeren. Schließlich dirigieren zusätzliche Asymmetriesequenzen die Hexamerisierung mit einem Dimeren, das nukleare Lokalisierungssequenzen aufweist. Dies wird erreicht, indem man beispielsweise Asymmetriesequenzen aus Insulin, das in der Natur Hexamere bildet, aufnimmt. Diese Hexamerbildung wird durch die Sequenzen SEQ ID NOs: 85 (A) und 86 (B), 87 (A) und 88 (B), 89 (A) und 90 (B), und 91 (A) und 92 (B) dirigiert (vergl. die Figg. 13 und 14).

Aufgrund der äußerst hohen Affinität für die HIV-LTR, die unter Verwendung von multimerer TBA erzeugt werden kann, werden die Verbindungen, die diese Struktur aufweisen und die für diesen Zweck verwendet werden können, hier als "HIV-Lock" bezeichnet.

Ein optimales HIV-Lock wird durch "Fußabdruckbildung" (gemäß bekannten Verfahren) von an TBRs gebundenen TBAs in der HIV-LTR definiert, um zu bestätigen, dass die Bindungsaffinität der einzelnen DNA-Bindungsproteine, die zur Bildung des multimeren TBA-Komplexes beitragen, relativ zur Affinität für eine beliebige natürliche Zielsequenz (d. h. CNAs), aus der die DNA-Bindungserkennungseinheit der TBA abgeleitet ist, nach unten verschoben ist. Ein etwaiger gleichzeitiger Verlust an Bindungsaffinität für die HIV-TBRs wird bei Bildung des Multimeren gemäß den vorstehenden Ausführungen überkompensiert.

Es kann eine Konkurrenz zwischen der Bindung der einzelnen Komponenten-TBAs um ihre TBR und Anordnung über Asymmetriesequenzen zur Bildung des Multimeren vorliegen. Dies wird vermieden, indem man die Linker zwischen den Begleiter und den Asymmetriesequenzen in jeder TBA-Komponente so einstellt, dass diese konkurrierenden Ereignisse entkoppelt werden. Die sich ergebende Verringerung der Dimensionalität der Diffusion (effektive Konzentrationszunahme) für die TBA-Asymmetrie und -Anordnungs-komponenten führt zu einer wirksamen Bildung des multimeren Komplexes.

Auf der Basis der "Fußabdruckbildung" werden die Länge und die Zusammensetzung von Linkern so eingestellt, dass eine optimale Unterscheidung zwischen Ziel-HIV-Sequenzen und natürlichen Sequenzen erreicht wird. Auf diese Weise weisen zwar die einzelnen Komponenten-TBAs eine geringe Affinität für CNA- und TBR-Sequenzen auf, jedoch weist der multimerer Komplex eine äußerst hohe Affinität für die nunmehr erweiterte TBR, die durch den multimeren Komplex erkannt wird, auf (Quadrat der Affinität der einzelnen TBRs, die durch jede

Komponenten-TBA der multimeren TBA erkannt wird), während er noch eine geringe Affinität für CNAs besitzt. Auf die gleiche Weise werden weitere multimeren TBA-Komplexe (abgesehen von HIV-Lock) hergestellt.

Zu TBAs, die auf diese Weise hergestellt werden können, gehören die folgenden Sequenzen, die durch Verknüpfung entweder von Proteinuntereinheiten oder von Nucleinsäuresequenzen, die für diese Untereinheiten kodieren, auf folgende Weise zusammengesetzt werden:

Set	Verknüpfung von Sequenzen der Gruppen
A	I + II + III
B	IV + V + III
C	IV + III

wobei die Gruppen I-V aus Sequenzen bestehen, die ausgewählt sind aus:

Gruppe	Ausgewählt aus den Sequenzen
I	Beliebige der Sequenzen SEQ ID NOs: 85-92
II	Met Ser, verknüpft mit einer beliebigen der Sequenzen SEQ ID NOs: 104-106, die jeweils mit SEQ ID NO: 99 verknüpft sind.
III	SEQ ID NO: 100, verknüpft mit einer beliebigen der Sequenzen SEQ ID NOs: 75-84 oder 94-98; SEQ ID NO: 101, verknüpft mit entweder SEQ ID NO: 74 oder SEQ ID NO: 93; oder SEQ ID NO: 102, verknüpft mit SEQ ID NO: 74 oder SEQ ID NO: 93; oder beliebige der Sequenzen SEQ ID NO: 72, 103, 73 oder 63-71.
IV	Beliebige der Sequenzen SEQ ID NOs: 104-106.
V	SEQ ID NO: 99.

Spezielle Beispiele für derartige TBAs sind die Sequenzen SEQ ID NOs: 109-116, die folgendermaßen zusammengesetzt sind:

Set	SEQ ID NO:	Verknüpfung von SEQ IDs:
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

Auf diese Weise lassen sich unter Auswahl zwischen geeigneten Asymmetriesequenzen, Anordnungssequenzen und DNA-Erkennungseinheiten

zahlreiche verschiedene TBAs bilden. Ferner assoziieren Sätze dieser Sequenzen, wie SEQ ID NOs: 114 und 115, miteinander, während Dimere von SEQ ID NO: 114 oder 115 aufgrund der Ladungsabstoßung in den mutierten Anordnungssequenzen nicht gebildet werden (SEQ ID NO: 104 ist cro; SEQ ID NO: 105 ist ein neues mutiertes, negativ geladenes cro und SEQ ID NO: 106 ist ein neues mutiertes, positiv geladenes cro).

Selbstverständlich kann der Fachmann aufgrund der gegebenen Aminosäuresequenz dieser TBAs rekombinante Nucleinsäureklone herstellen, die für diese TBAs kodieren. Derartige rekombinante Klone gehören selbstverständlich zum Gegenstand der Erfindung.

Beispiel 10 - HIV-Test unter Verwendung von "HIV-LOCK"

Im wesentlichen auf die gleiche Weise wie in Beispiel 6 wird das gemäß Beispiel 9 verwendete "HIV-LOCK" als TBA, Reagenz 2, verwendet, wobei ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

Beispiel 11 - HIV-Test unter Verwendung von "HIV-LOCK" beim Testen für Blutspendezwecke

Wenn die zu testende Blutmenge keinen beschränkenden Faktor darstellt, wie es bei Proben von Blut für Blutspendezwecke, die auf HIV-Kontamination zu testen sind, der Fall ist, werden ähnliche Tests wie in Beispiel 6 durchgeführt, wobei aber für jedes der Röhrchen A-C etwa 5 ml Blut in einer Tischzentrifuge pelletisiert werden. Die Mengen der übrigen Reagenzien werden je nach Bedarf vergrößert, um die größere TNA-Menge, die in der Probe vorhanden ist, handzuhaben.

Beispiel 12 - "HIV-LOCK" als therapeutisches anti-HIV-Mittel

Das gemäß Beispiel 9 hergestellte "HIV-LOCK" wird in Form einer 1 mg/ml-Lösung in Liposomen zubereitet und intravenös einem Subjekt injiziert, bei dem ein Test auf HIV durchgeführt und eine entsprechende Infektion bestätigt worden ist. Eine Dosis von etwa 0,1 mg bis 100 mg von "HIV-LOCK"/kg Körpermasse wird innerhalb von 24 Stunden infundiert und die Konzentration an HIV-p24 im Serum des Patienten wird überwacht. Die Behandlung wird so oft als erforderlich wiederholt, z. B. wenn im Serum ein Anstieg von p24 erfolgt.

Beispiel 13 - Verwendung eines HIV-TBA-Konstrukts als Therapeutikum

Ein rekombinanter retroviraler Vektor oder dergl. wird zur Abgabe eines Konstrukts, das für eine HIV-LTR-bindende-TBA kodiert, an einen infizierten Patienten verwendet. Der Vektor kodiert für einen Begleiter, wie cro, und DNA-Sequenzen für Bindungsbereiche von p50. Der gleiche Vektor kodiert auch für einen Begleiter, an dem sich eine SP1-TBA faltet. Asymmetriesequenzen werden bereitgestellt, so dass bei Koexpression der p50-TBA und der SP1-TBA in einer

einzelnen, HIV-infizierten Zelle in vivo es zu einer sofortigen Assoziation zwischen diesen TBAs kommt, während gleichzeitig jegliche Assoziation zwischen dem DNA-Bindungsbereich von p50 und endogenen p50- oder p65-Monomeren verhindert wird. NLS-Sequenzen werden ferner in den TBAs bereitgestellt, so dass bei der Dimerbildung die TBA sofort in den Zellkern umzieht und spezifisch an integrierte HIV-Sequenzen bindet, so dass jegliche Transkription von diesem Locus verhindert wird.

Zu diesem Zweck ist es erstrebenswert, Sequenzen auszuwählen, die für DNA-Bindungsdomänen kodieren, so dass die exprimierten Monomeren in einer TBA zusammengesetzt werden, die nicht an natürliche humane Sequenzen bindet. Somit kommt es nur bei Bindung der TBA-Komponenten an ihre Zielsequenzen zu einer Assoziation zwischen sämtlichen Komponenten der TBA unter Bildung eines Komplexes, der eng und spezifisch an die HIV-LTR bindet.

Beispiel 14 - Diagnostisches Testkit für humanes Papillomavirus

Dieses Diagnostikum für humanes Papillomavirus nützt den bekannten Unterschied zwischen gutartigem und karzinogenem HPV aus, um einen Test bereitzustellen, der bei einem Patienten einen Hinweis auf die Anfälligkeit für einen malignen Zustand gibt. Die Papillomaviren gehören zu einer Gruppe von kleinen DNA-Viren, die mit gutartigen squamösen Epithelzelltumoren in höheren Wirbeltieren assoziiert sind. Es wurden mindestens 27 verschiedene humane Typen von Papillomaviren (HPVs) aufgefunden. Viele davon sind mit spezifischen klinischen Läsionen assoziiert. 4 davon, nämlich HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18 und HPV-33 sind mit humanen Läsionen des Genitaltrakts assoziiert. Im allgemeinen wurde festgestellt, dass HPV-6- und HPV-11-DNAs mit gutartigen Läsionen des Genitaltrakts assoziiert sind. Ferner wurde von HPV-16, HPV-18 und HPV-33 festgestellt, dass sie mit prämaligen und malignen Läsionen assoziiert sind und in den meisten Zelllinien, die aus Zervikalkarzinomen erhalten worden sind, transkribiert werden. HPV-16, HPV-18 und HPV-33 sind vermutlich nur drei Mitglieder einer großen Gruppe von HPV-DNAs, die mit malignen, humanen Zervikalkarzinomen assoziiert sind.

Tiermodelle haben ergeben, dass gutartige Papillomavirus-Läsionen in Gegenwart eines Cokarzinogens sich zu malignen Läsionen entwickeln können. HPV-DNA wurde in Metastasen von Zervikalkarzinomen gefunden. Bei malignen zervikalen Läsionen ist HPV-DNA üblicherweise in das humane Genom integriert, es kann aber auch extrachromosomale HPV-DNA vorhanden sein. Eine Integration von HPV unter Bildung des Provirus führt im allgemeinen zum Aufbrechen des viralen E2-offenen Leserasters (ORF). Trotz des Aufbrechens des E2-ORF hat eine Prüfung von Zelllinien aus mehreren Zervikalkarzinomen das

Vorliegen von transkriptional aktivem und integriertem HPV-16 und HPV-18 ergeben. Wenn HPV-16-Genome, die in den humanen Zervikalkarzinom-Zelllinien SiHa und CaSki vorhanden sind, untersucht werden, treten Unterschiede in der Integration von HPV-16 auf. In der SiHa-Linie erfolgte die einzige HPV-16-Genomintegration an den Basen 3132 und 3384 unter Aufbrechen der E1- und E2-ORFs mit einer Deletion von 0,3 kb. Eine weitere Deletion von 50 Basenpaaren von HPV-16-DNA führte zu einer Fusionierung der E2- und E4-ORFs. Der 5'-Bereich der HPV-16-DNA, der aus dem aufgebrochenen E2-ORF besteht, wird mit kontinuierlichen, humanen, rechten Flankierungssequenzen verknüpft. Ferner wird ein einzelnes zusätzliches Guanin am Nucleotid 1138 in der Mitte des E1-ORF festgestellt. Diese Basenpaaraddition führt zur Fusion der E1a- und E1b-ORFs zu einem einzigen E1-ORF.

Das vollständige Genom von HPV-16 ist bei GenBank unter der Hinterlegungsnummer K02718 erhältlich. Das vollständige Genom von HPV-33 ist bei GenBank unter der Hinterlegungsnummer M12732 erhältlich. Das vollständige Genom von HPV-18 ist bei GenBank unter der Hinterlegungsnummer X05015 erhältlich.

Im Rahmen eines vorläufigen Screenings wird die Tatsache einer HPV-Infektion bei einer gegebenen zervikalen Biopsieprobe durch eine einfache Analyse vom "Ja/Nein"-Typ festgestellt, wobei man beispielsweise beliebige oder sämtliche der PNAs SEQ ID NOs: 46-53 und eine E2-TBA gemäß den vorstehenden Ausführungen verwendet (d. h. Fragmentierung von DNA, Bindung der PNA, Immobilisierung mit der TBA und Nachweis des Signals mit BNAs und BBAs).

Nachdem bei einer Biopsieprobe eine positive Reaktion auf HPV festgestellt worden ist, erhält man zusätzliche Informationen bezüglich des malignen Potentials des HPV durch Analyse des Integrationsstatus des Virus in das humane Genom.

1. Die DNA in der zervikalen Biopsieprobe wird fragmentiert und mit einer Blockierungssonde mit der Sequenz SEQ ID NO: 60 hybridisiert. Diese Sonde bindet an sämtliche Fragmente in der DNA, die nicht aus dem 0,3 kb-Fragment gespleisst worden sind.

2. Die DNA in der Biopsieprobe wird einer PNA mit der Sequenz SEQ ID NO: 61 ausgesetzt. Diese Sonde bindet nur an Fragmente, bei denen das 0,3 kb-Fragment deletiert ist (die Blockierungssonde verhindert die Schleifenbildung der großen, gegebenenfalls vorhandenen Deletionssegmente).

3. Eine PNA mit SEQ ID NO: 62 wird mit SEQ ID NO: 41 unter Bildung einer BBR hybridisiert, die an *cro* oder den λ -CI-Repressor als eine BBA

bindet, wobei ein einzelsträngiger Bereich zurückbleibt, der zur Hybridisierung mit der TATA-Stelle an SEQ ID NO: 61 befähigt ist. Dieser wird an eine TBR am 5'-Ende der großen Deletion addiert.

4. Die TBR wird durch eine TBA mit einer TATA-Bindungsprotein-DNA-Erkennungseinheit immobilisiert.

5. Die gebundenen Fragmente werden durch Addition von BNAs und BBAs gemäß den vorstehenden Ausführungen nachgewiesen.

Der Nachweis eines Signals bei diesem Test zeigt, dass das große Fragment in HPV, das in der TNA vorhanden ist, deletiert ist. Da eine derartige Deletion mit einer malignen Beschaffenheit korreliert, gibt dieser Test Aufschluss über das maligne Potential der HPV-Infektion. Diese Schlussfolgerung kann durch Durchführung eines analogen Tests auf der Basis der Deletion des 52-Basenpaarfragments, das ebenfalls in Korrelation mit einer HPV-induzierten malignen Beschaffenheit steht, bestätigt werden.

Die TBP-Erkennungseinheit, die in der TBA für diesen Test verwendet wird, kann beispielsweise aus einer Sequenz, z. B. den Sequenzen SEQ ID NO: 70 oder SEQ ID NO: 93, ausgewählt werden.

Beispiel 15 - Herstellung des rekombinanten HIV-LOCK^R

Phase 1 - Herstellung der DNA zur Erzeugung des HIV-Lock^R. Es wird eine in vitro-Mutagenese der Kodierungsregion der natürlich vorkommenden, klonierten Komponenten des HIV-Lock^R, das modifiziert werden muss, mit einem MutaGene Phagemid-Kit, durchgeführt. Das modifizierte Verfahren umfasst die Verwendung eines Blue-script-Plasmids, das jede der Bindungskomponenten von HIV-Lock^R enthält. Diese werden in kompetente Zellen transformiert und Uracil enthaltende Phagemide werden gezüchtet. Einzelsträngige DNA wird extrahiert und als Matrize für den mutagenen Strang verwendet. Oligonucleotide, die die erwünschten Mutationen enthalten, einschließlich des Einbaus einer neuen Restriktionsstelle, werden synthetisiert und mit Polynucleotid-kinase und ATP behandelt. Die mit Kinase behandelten Oligonucleotide werden an die einzelsträngige Matrize angelagert und ein mutagener Strang wird gemäß dem MutaGene-Verfahren synthetisiert und ligiert, mit der Ausnahme, dass Sequenase 2.0 die Polymerase darstellt. Bibliotheken werden einem Screening unter Verwendung beider $\gamma^{32}\text{P}$ -endmarkierten Nucleotide mit einem Gehalt an Sequenzen, die zu den eingeführten Mutationen komplementär sind, unterzogen, die Plasmid-DNA wird isoliert und die Mutanten werden auf der Grundlage der eingeführten Restriktionsstelle identifiziert. Die Mutationen werden ferner durch Sequenzierung mit einem Sequenase-Kit bestätigt. Die HIV-Lock^R-DNA wird in das Baculovirus-Expressionssystem mit einem Polyhedron-Promotor kloniert.

Phase 2 - Herstellung von HIV-Lock^R-Proteinen unter Verwendung von Baculovirus. Sf-9-Zellen werden zu einer vorgegebenen Dichte (etwa 1×10^6 Zellen/ml, logarithmische Phase) gezüchtet, mit dem Baculovirus mit einem Gehalt an den HIV-Lock^R-Instruktionen infiziert und geerntet, um die rekombinanten Proteine mit einem Gehalt an HIV-Lock^R zu gewinnen. Bei der Vergrößerung des Verfahrensmaßstabs werden Kulturen aus Kolben auf Rotationsvorrichtungen und anschließend auf Bioreaktoren vergrößert. Im Anschluss an die Infektion wird das Protein der Zellen nach 12, 24, 36 und 48 Stunden gewonnen. Während des gesamten Verfahrens werden die Indices für die Lebensfähigkeit überwacht.

Phase 3 - Reinigung der HIV-Lock^R-Proteine. Die geernteten Proteine werden zunächst durch Ultrafiltration von teilchenförmigen Produkten befreit, um die nachgeschaltete Reinigung zu erleichtern. Das zentrifugierte Produkt wird sodann steril filtriert. Extrakte werden 30 Minuten bei 4 °C mit 40 000 U/min zentrifugiert und Aliquotanteile werden einer Immunopräzipitation mit polyklonalem Kaninchen-Antikörper gegen eine der HIV-Lock^R-Komponenten unterzogen. Immunopräzipitierte Proteine lässt man an SDS-10 %-PAGE-Gel laufen.

Phase 4 - Test auf HIV-Lock^R-Proteine gegen HIV-DNA. Mobilitätsverschiebungstests werden durchgeführt, wobei man eine Oligonucleotidsonde verwendet, die Elemente der langen terminalen HIV-Wiederholungseinheit und Fragmente mit einem Gehalt an NFkB-bindender DNA in Assoziation mit der leichten kappa-Kette unter Mikroglobulin-Regulation umfasst. Das Oligonucleotid wird an seinen komplementären Strang angelagert und mit γ -³²P-ATP endmarkiert.

Ein "Fußabdruck" wird durch Kombination einer geringen Menge (10^{-15} M) an radioaktiv markierter HIV-LTR-DNA mit einer geringfügig größeren Menge an HIV-Lock^R in Puffer 10 Minuten bei Raumtemperatur vorgenommen. Vor der Zugabe von Protein wird Dithiothreitol zugesetzt. Eisen(II), EDTA, Wasserstoffperoxid und Natriumascorbat werden zugesetzt und das Reaktionsgemisch wird inkubiert. Ein Abschreckmittel wird zugegeben und die Produkte werden unter Anwendung von denaturierender Gelelektrophorese analysiert. Dies wird für verschiedene Proteinkonzentrationen durchgeführt. Das erhaltene Gel wird unter Verwendung eines Phosphoimager-Scanners abgebildet und die erhaltene, hoch auflösende Bilddatei wird analysiert, um die Bindungsaffinität für HIV-Lock^R für die HIV-DNA relativ zur zellulären DNA getrennt zu bestimmen.

Mehrfache Konstruktions- und Testwiederholungen können herangezogen werden, um die Bindung von HIV-Lock^R und anderen TBAs für HIV und andere Organismen erneut aufzufinden. Dieses Verfahren ermöglicht die Konstruktion von

Bindungsanordnungen, so dass die Bindungsanordnung nicht mit dem Wildtypproteinen für einzelne Bindungsstellen in den Genomproben konkurrierend ist. Die Entwicklung von TBAs für andere Organismen und TNAs für Sequenzen innerhalb dieser Organismen kann unter Anwendung des vorerwähnten Verfahrens erfolgen. Dieses Verfahren ist bei der Herstellung von Bindungsanordnungen für sämtliche Nucleinsäure-TBRs, einschließlich DNA-DNA-, DNA-RNA- und RNA-RNA-Hybride und Kombinationen dieser Hybride, wertvoll.

Beispiel 16 - Verfahren zum Identifizieren von Nucleinsäure-Bindungsmolekülen zur Herstellung von TBAs und BBAs gemäß der Erfindung

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden Zielbindungsanordnungen und Booster-Bindungsanordnungen zusammengesetzt, indem man Nucleinsäure-Bindungsmoleküle identifiziert und die Nucleinsäure-Bindungsgebiete der Moleküle so verknüpft, dass TBAs erhalten werden, die zwischen bestimmten Zielsequenzen und auch eng verwandten Sequenzen unterscheiden. Ein Verfahren zum Identifizieren der Nucleinsäure-Bindungsmoleküle umfasst die folgenden Stufen:

1. Gewinnen einer biologischen Probe mit einem Gehalt an der Zielnucleinsäure. Es kann sich beispielsweise um einen Organismus oder einen mit einem Pathogen infizierten Gewebeextrakt handeln.
2. Fragmentieren der Probe in der Weise, dass die Nucleinsäuren freigesetzt werden und die Größenkomplexität der Nucleinsäuren in der Probe verringert wird.
3. Kontaktieren eines ersten Aliquotanteils der fragmentierten Nucleinsäuren mit einem Kontrollpuffermedium und Kontaktieren eines zweiten Aliquotanteils der fragmentierten Nucleinsäuren mit dem Kontrollpuffermedium, das ein bekanntes Profil von Nucleinsäure-Bindungsmolekülen enthält.
4. Analysieren der beiden Aliquotanteile zum Identifizieren von Fragmenten, die ein verändertes Verhalten in dem Aliquotanteil aufweisen, der mit den Zielbindungs-molekülen in Kontakt gebracht worden ist, verglichen mit dem Kontrollaliquotanteil. Dies wird durch eindimensionale Gelelektrophorese, zweidimensionale Gelelektrophorese, Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Papierchromatographie oder andere Maßnahmen erreicht, die ein unterschiedliches Verhalten der Nucleinsäurefragmente ergeben, wenn sie an ein Nucleinsäure-Bindungsmolekül gebunden sind, verglichen mit dem Zustand, wenn das Nucleinsäurefragment ungebunden ist.

5. Identifizieren und Isolieren von Fragmenten, die ein verändertes Verhalten zeigen, wenn sie mit dem Nucleinsäure-Bindungsmolekül in Kontakt gebracht werden, und entweder Sequenzieren des Nucleinsäurefragments zur Bestimmung, ob bekannte Nucleinsäure-Bindungsmolekülmotive vorhanden sind, oder direktes Identifizieren des Nucleinsäure-Bindungsmoleküls, das an die Nucleinsäure gebunden ist. Der letztgenannte Vorgang lässt sich beispielsweise durchführen, indem man ein zweidimensionales Gitter der der Elektrophorese unterworfenen Nucleinsäuren mit unterschiedlich markierten Antikörpern in Kontakt bringt, die an die verschiedenen Nucleinsäure-Bindungsmoleküle binden.

Bei diesem Verfahren werden vorzugsweise Nucleinsäuremotive für diagnostische oder therapeutische Zwecke verwendet, wobei die Zielnucleinsäure mehr als ein einziges verwendbares Nucleinsäure-Bindungsmolekülziel aufweist. Auf diese Weise lässt sich eine komplexe Zielbindungsanordnung erzeugen, die die Nachbarschaft von verschiedenen Nucleinsäure-Bindungsmolekülmotiven ausnützt, um die Spezifität der TBA, die aus den einzelnen identifizierten Nucleinsäure-Bindungskomponenten zusammengebaut ist, zu verstärken. Die verschiedenen Nucleinsäure-Bindungsgebiete der Nucleinsäure-Bindungsmoleküle können sodann zu vollständigen TBAs zusammengesetzt werden, wie es vorstehend beispielsweise für HIV-Lock^R beschrieben worden ist.

Beispiel 17 - Verfahren zum Identifizieren von spezifischen RNA-Sequenzen in einer Probe

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen lassen sich beliebige Nucleinsäuresequenzen spezifisch identifizieren. Die Identifizierung einer Ziel-HIV-RNA in einer Probe wird erreicht, indem man vom Patienten eine Probe von Blut oder einer anderen biologischen Flüssigkeit oder einen Extrakt gewinnt, der möglicherweise die HIV-RNA enthält und einen Test auf die Anwesenheit von TAR-Bindungsstellen durchführt. Tat ist ein positiver Regulator der HIV-Replikation, der an die TAR-Region von HIV-RNA bindet. Die kleinste, natürlich auftretende, vollständig aktive Form von HIV-Tat weist eine Länge von 72 Aminosäuren auf, nämlich SEQ ID NO: 118. Tat enthält mindestens zwei funktionelle Domänen und transaktiviert die Genexpression von der langen terminalen HIV-Wiederholungseinheit (HIV-LTR). Tat bindet an eine RNA-Stammschleifenstruktur, die durch Selbsthybridisierung von Sequenzen in TAR gebildet wird, unmittelbar in 5'-Stellung zur HIV-LTR. HIV-TAR-RNA bildet einen Dinucleotid-Vorsprung und zwei Stammschleifenstrukturen (Rhim et al., Virology, Bd. 202 (1994), S. 202-211). Das Tat (SEQ ID NO: 118) bindet diese Struktur mit geringerer Avidität als Tat-Varianten, bei denen es sich bei Ala58 um einen Threoninrest handelt oder bei denen es sich bei His65 um einen Asp-Rest handelt

(Derse et al., Virology, Bd. 194 (1993), S. 530-536). Unter Ausnutzung dieser Tatsachen wird das erfindungsgemäße Verfahren durch folgende Maßnahmen durchgeführt:

1. Fragmentieren einer biologischen Probe, um die Nucleinsäuren freizusetzen und die Größenkomplexität der Nucleinsäuren zu verringern.

2. Kontaktieren einer TBA mit der Probe, die eine Hybrid-TAR-Bindungsproteinsequenz und eine benachbarte flankierende Sequenz im HIV-Genom identifiziert. Die zu diesem Zweck verwendete TBA wird an cro als Begleiter zusammengesetzt, wobei Tat als das spezifische HIV-RNA-Bindungsmolekül verwendet wird. Um Spezifität zu gewährleisten, so dass ein "Crosstalk" zwischen der HIV-TAR-Stelle und eng verwandten TAR-Stellen, die aufgrund von anderen Pathogenen, wie Cytomegalovirus, vorhanden sein können, vermieden wird, weist die TBA ferner eine Antikörper-Komponente auf, die die DNA-RNA-Hybrid-Zielbindungsregion erkennt, die gebildet wird, wenn eine Sondennucleinsäure die HIV-LTR-RNA bindet.

3. Beseitigen eines jeglichen "Crosstalk", das durch die Bindung von Tat an die TAR-Region der HIV-RNA aufgrund von Verunreinigungen (Cousin-RNAs), wie die CMV-TAR-Sequenz, entsteht, durch Kontaktieren des Reaktionsgemisches mit überschüssiger Tat-Varianten (entweder die Ala58-Variante anstelle von Thr oder die His65-Variante anstelle von Asp), die mit größerer Avidität binden. Auf diese Weise werden einzelne Bindungsereignisse aufgrund der TBA-Bindung an Cousin-RNAs aus der Nucleinsäureprobe durch die Tat-Variante bekämpft. Andererseits wird durch entsprechende Auswahl der Affinität der Doppelbindung, die als Ergebnis von Antikörper und Tat erreicht wird, die TBA nicht von echten Zielen verdrängt. Dieses Verfahren wird in Fig. 16 erläutert. Gemäß einem weiteren Aspekt des gleichen Verfahrens kann es sich bei der TBA um ein Produkt handeln, bei dem anstelle der Verwendung einer Variante von Tat ein Antikörper verwendet wird, der dieses Nucleinsäuresegment erkennt, und die TBA wird als Doppelantikörper-TBA verwendet.

Bei einer alternativen Version dieses Verfahrens kann eine Sondennucleinsäure verwendet werden, die mit der HIV-LTR-RNA hybridisiert. Demgemäß kann ein Duplexsegment der LTR-sp1-Stellen als Bestandteil der Zielbindungsregion geschaffen werden. Diese Region der HIV-RNA flankiert die TAR-Region, die in 5'-Stellung zur LTR steht, sich aber in enger Nachbarschaft hierzu befindet. Eine TBA mit einem Gehalt an Tat und zwei Sp1-Bindungseinheiten wird begleitet, um eine Tat-Bindung an TAR und eine Sp1-Bindung an die Sp1-Bindungsstellen zu erreichen. Anschließend werden eine Amplifikation und ein Nachweis durch Addieren geeigneter BNAs, BBAs und

HNAs durchgeführt. Gemäß einer weiteren Alternative können PNAs mit SEQ ID NO: 38 und SEQ ID NO: 39 (vergl. Fig. 7) verwendet werden. Eine TBA wird verwendet, die eine oder mehrere Sp1-Bindungseinheiten und eine Antikörpereinheit enthält, die an das DNA-RNA-Hybrid bindet, das aus der Proben-RNA und SEQ ID NO: 38-PNA erzeugt worden ist. Sodann werden zur Amplifikation des Signals geeignete BNAs, BBAs und HNAs addiert.

Selbstverständlich erkennt der Fachmann, dass andere TBA- und TNA-Kombinationen zur Optimierung der hier beispielhaft aufgeführten Verfahren verwendet werden können.

Es ist ersichtlich, dass die hier bereitgestellten Sequenzen nur beispielhaften Charakter haben und dass andere ähnliche Sequenzen, die dadurch nahegelegt werden, in den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können. Ferner ist es ersichtlich, dass zwar beliebige Sequenzen, die hier bereitgestellt werden, als linear anzusehen sind, diese aber auch in kreisförmiger oder anderweitig abgeänderter Form verwendet werden können. Ferner werden die Sequenzen als nicht-antisense bezeichnet, sie können aber in der kodierenden oder nicht-kodierenden Form oder zur Bindung an kodierende oder nicht-kodierende komplementäre Sequenzen verwendet werden.

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE ANGABEN:
- (i) ANGABEN ZUM ANMELDER:
 - NAME: The Gene Pool, Inc.
 - STRASSE: 300 Queen Anne Ave. N., Suite 392
 - STADT: Seattle
 - STAAT: Washington
 - LAND: US
 - POSTLEITZAHL: 98109-4599
 - TELEFON: (206) 526-8617
 - (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Method of Detection of Nucleic
Acids with a Specific Sequence Composition
 - (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 118
 - (iv) KORRESPONDENZADRESSE
 - (A) Adressat: Saliwanchik & Saliwanchik
 - (B) Straße: 2421 N.W. 41st St., Suite A-1
 - (C) Ort: Gainesville
 - (D) Staat: Florida
 - (E) Land: USA
 - (F) Postleitzahl: 32606
 - (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy Disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
 - (vi) DATEN DER ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER:
 - (B) ANMELDETAG:
 - (C) KLASSIFIKATION:
 - (viii) ANGABEN ÜBER DEN ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: Bencen, Gerard H
 - (B) REGISTRIERNUMMER: 35,746
 - (C) AKTENZEICHEN: GP-100.C1
 - (ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:
 - (A) TELEFON: (904) 375-8100

(B) TELEFAX: (904) 372-5800

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TGGGGATTCC CCA

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AAGGGACTTT CCC

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGGGGACTTT CCG

13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
 GCTGGGGACT TTCCA 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
 ACAAGGGACT TTCCG 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:
 CCGGGTTTTTC CCC 13

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen

(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:
AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA 27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: beide Formen
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:
AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG 27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: beide Formen
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:
GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: beide Formen
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:
GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG 26

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:
GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGGC 26

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:
GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG 26

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:
GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG 26

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:
 GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GCGGTG 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:
 GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:
 GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC 26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen

- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:
TTTCCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGACT GGG 33
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:
CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC 33
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:
CTACAAGGGA CTTTCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT 45
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:
CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGTG TGGCCT 46

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:
CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:
CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:
CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCAT 45

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 44 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC GGGAGCGTG GCCT 44

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC GGGGAGCGC GGCT 44

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGAGAGCGT GGACT 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCG TGGACT 46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:
 CTACAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGGGAG 46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:
 CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCTG CCT 43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:
 CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG 48

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:
TTTCCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGGACT GGGAGTGGC GTCCC 45
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:
CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGG 59
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:
TTTCCGCTGG GGACTTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG TGGCGTCCC 59
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 70 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60
 GTGGCGTCCC 70

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 61 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:
 TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTTATCAC CGCAGATGGT 60
 T 61

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 64 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:
 TATCACCGCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT 60
 GATA 64

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 70 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen

(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:
CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60
GTGGCGTCCC 70

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 37 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: beide Formen
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:
CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGG 37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: beide Formen
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:
CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 103 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRANGFORM: beide Formen
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
(iii) HYPOTHETISCH: nein
(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG 60
 TCAACACCGC CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA 103

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP:

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA 60
 TA 62

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

GATCCAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCC 60
 GTGATACTGC A 71

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 63 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

GATCACCGC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG 60
 TTG 63

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

GATCCGGGGG GATACCCCC G

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 91 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGATAA ATATCTAACA CCGTGC GTGT
TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G

60

91

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 53 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTGTAACCG AAACCGGTTA GTATAAAAGC AGA

53

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 54 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:
 AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCGGGACC GAAAACGGTG TATATAAAAG ATGT 54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:
 AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTTCAACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA 54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:
 GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

- (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:
 TGTGCAACCG ATTTCCGGTTG CCTT 24
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:
 TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA 24
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:
 TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTTG 24
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:
 GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT 24

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 52 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:
 GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC 52
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 53 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:
 GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AACAGCTAC AGCACACCCC CTC 53
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:
 GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG 60
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:
- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:
 CATACCAAAG CCGTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTG TTGCACAGAG 60
 ACTCAGTG 68

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 77 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:
 TAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTATTCC AGCACCGTGT 60
 CCGTGGGCAC CGCAAAG 77

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 80 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:
 ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGCCAAGC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60
 ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 266 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: beide Formen
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

CATATGCAAT ACAATGCATT ATACAACTG GACACATATA TATATTTGTG AAGAAGCATC 60
AGTAACTGTG GTAGAGGGTC AAGTTGACTA TTATGGTTA TATTATGTTT ATGAAGGAAT 120
ACGAACATAT TTTGTGCAGT TTAAAGATGA TGCAGAAAAA TATAGTAAAA ATAAAGTATG 180
GGAAGTTCAT GCGGGTGGTC AGGTAATATT ATGTCCTACA TCTGTGTTTA GCAGCAACGA 240
AGTATCCTCT CCTGAAATTA TTAGGC 266

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 95 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleinsäure
 - (C) STRANGFORM: beide Formen
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

CATGTTTTTT TATACATCCA TATCACC GCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT 60
AATTTATCAC CGCAGATGGT T 81

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 325 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 268 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 263 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 263 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 299 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 69:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 261 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 70:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 262 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 70:

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 Met 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

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

Glu Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu
 115 120 125

Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu
 130 135 140

Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg
 145 150 155 160

Ala Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly
 165 170 175

Phe Arg Lys Thr Thr
 180

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 75:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 85 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 76:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 87 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 84 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 79:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 84 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (v) FRAGMENTTYP: intern
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 80:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 84 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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
 65 70 75 80
 Leu His Leu Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 81:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 84 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (A) LÄNGE: 80 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 83:

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

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 84:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 81 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (v) FRAGMENTTYP: intern
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 84:

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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 87:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 88:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 89:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 94:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 84 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 94:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 95:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 84 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 95:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 96:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 83 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (v) FRAGMENTTYP: intern
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 97:
 (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 84 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (iii) HYPOTHETISCH: nein
 (iv) ANTI-SENSE: nein
 (v) FRAGMENTTYP: intern
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 98:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 89 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 99:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: C-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 99:

Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 100:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 100:

Asn Ser Asn Thr

1

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 101:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (v) FRAGMENTTYP: intern
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 101:

Ser Gly Asn Thr

1

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 102:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein
 - (iv) ANTI-SENSE: nein
 - (v) FRAGMENTTYP: intern
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 102:

Ser Ser Gly Ser Ser Gly

1

5

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 103:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 103:

Cys Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg
1 5 10 15

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 104:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 66 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: N-terminal
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 105:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 66 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: N-terminal
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 105:

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 108:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 96 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 109:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 180 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: N-terminal
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 110:
 - (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 113 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 - (iii) HYPOTHETISCH: nein

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

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 273 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: N-terminal
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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	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	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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 113:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 421 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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
 145 150 155 160

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 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 114:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 391 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 115:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 391 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein
- (iii) HYPOTHETISCH: nein
- (iv) ANTI-SENSE: nein
- (v) FRAGMENTTYP: N-terminal
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 115:

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 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 116:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 241 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 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) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 117:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 10 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: beide Formen
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 117:

GGGAMTNYCC

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 118:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 72 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

Patentansprüche

1. Sondennucleinsäure (PNA), umfassend zwei verschiedene Sequenzen, bei denen es sich handelt um

(a) eine einzelsträngige Sequenz (1/2-TBR), die unter Hybridisierungsbedingungen zur Bildung eines Hybrids (TBR) mit einer Zielnucleinsäure (TNA) befähigt ist; und

(b) eine einzelsträngige Sequenz (1/2-BBR), die unter Hybridisierungsbedingungen zur Bildung eines Hybrids (BBR) mit einer in einer Booster-Nucleinsäure (BNA) vorhandenen einzelsträngigen Sequenz befähigt ist;

wobei die TBR mit hoher Affinität zur Bindung an eine Substanz (TBA) befähigt ist, die zur Unterscheidung zwischen einem gepaarten Hybrid (TBR) und einem Hybrid mit ungepaarten Nucleotiden befähigt ist, und wobei die BBR mit hoher Affinität zur Bindung an eine Substanz (BBA) befähigt ist, die zur Unterscheidung zwischen einem gepaarten Hybrid (BBR) und einem Hybrid mit ungepaarten Nucleotiden befähigt ist.

2. PNA nach Anspruch 1, wobei die TBR aus einer oder mehreren Erkennungsstellen für ein Nucleinsäure-Bindungsprotein, ein DNA-Bindungsprotein, ein DNA-RNA-Hybrid-Bindungsprotein oder ein RNA-Bindungsprotein besteht.

3. PNA nach Anspruch 2, wobei die TBR eine Nucleinsäure-Bindungsprotein-Erkennungsstelle ist, die im Genom eines Pathogens vorhanden ist, oder eine Bindungsstelle, die mit einem pathogenen Zustand in einem Wirbeltiergenom assoziiert ist, oder eine Nucleinsäure-Bindungsprotein-Erkennungsstelle, die im Genom eines Organismus, der einen Fermentationsvorgang kontaminiert, vorhanden ist.

4. PNA nach Anspruch 2, wobei es sich bei der TBR um HIV-LTR oder einen Teil davon handelt.

5. Verfahren zum Nachweisen oder Lokalisieren einer spezifischen TNA-Sequenz, umfassend die folgenden Stufen:

(a) Hybridisieren der TNA mit der PNA von Anspruch 1;

(b) Hybridisieren der PNA mit einer BNA mit einem Gehalt an 1/2-BBR, dessen Sequenz zu einer 1/2-BBR-Sequenz in der PNA komplementär ist;

(c) Zugeben der Produkte der Stufen (a) und (b) mit einem Gehalt an einer TBR und einer BBR zu einer Oberfläche, einer Flüssigkeit oder einem anderen Medium mit einem Gehalt an einer TBA;

(d) Zugeben von BBAs zu dem Gemisch von Stufe (c), wobei die BBA folgendes umfasst:

(i) ein Molekül oder einen Teil eines Moleküls, die zur selektiven Bindung an ein BBR befähigt sind;

(ii) einen nachweisbaren Indikator; und

(c) Nachweisen eines Signals, das durch den an die BBA befestigten Indikator erzeugt worden ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei es sich beim Indikator um ein Protein, unter Einschluss von Enzymen, die zur Katalyse von Reaktionen befähigt sind, die zur Bildung von gefärbten Reaktionsprodukten führen; ein Radionuclid; oder gefärbte Perlen handelt.

7. In vitro-Verfahren zum Amplifizieren des durch Bindung der PNA von Anspruch 1 an eine TNA erhaltenen Signals, umfassend die Bindung von BNAs an das PNA-TNA-Hybrid und die Bindung von markierten BBAs an die BNAs.

8. Verfahren zum Nachweisen oder Lokalisieren von spezifischen Nucleinsäuresequenzen mit hochgradiger Empfindlichkeit und Spezifität, umfassend:

(a) das Zugeben von PNAs gemäß der Definition in Anspruch 1 mit einem Gehalt an einer 1/2-BBR und einer 1/2-TBR zu einer Probe, die 1/2-TBR-Sequenzen enthält oder bei der ein solcher Gehalt vermutet wird, unter Bildung eines Komplexes mit Zielbindungsregionen, TBRs, die durch die Hybridisierung von komplementären 1/2-TBRs, die in den PNAs bzw. TNAs vorhanden sind, gebildet worden sind;

(b) Binden der in Stufe (a) gebildeten TBRs an eine immobilisierte TBA unter Bildung eines TBA-TNA-PNA-Komplexes;

(c) Zugeben von Booster-Nucleinsäuren, BNAs, mit einem Gehalt an Booster-Bindungsregionen, 1/2-BBRs, zu dem in Stufe (b) gebildeten Komplex, so dass die 1/2-BBRs in den BNAs mit den 1/2-BBR-Sequenzen, die in den PNAs vorhanden sind, oder mit 1/2-BBRs, die in den BNAs bereits an die PNA

gebunden sind, hybridisieren, um BBRs zu bilden, so dass TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-Komplexe gebildet werden;

(d) Zugabe von Haarnadel-Nucleinsäuren, HNAs, mit einem Gehalt an 1/2-BBR-Sequenzen zu dem in Stufe (c) gebildeten Komplex, so dass die 1/2-BBRs in den HNAs mit etwaigen verfügbaren 1/2-BBR-Sequenzen, die in den BNAs des Komplexes von Stufe (c) vorhanden sind, hybridisieren, wodurch die Erweiterung der BNAs an den TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-Komplexen von Stufe (c) unter Bildung von TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA-Komplexen verknüpft werden;

(e) Zugabe von Booster-Bindungsanordnungen, BBAs, die mit Indikatorresten verknüpft sind, zu den in Stufe (d) gebildeten TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA-Komplexen unter Bildung von TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA-Komplexen; und

(f) Nachweisen der Signale, die durch die Indikatorreste erzeugt worden sind, die mit den TBAs, PNAs, BNAs, BBAs oder HNAs in den TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA-Komplexen von Stufe (e) verknüpft sind;

wobei die TNA folgendes umfasst:

(i) eine oder mehrere spezifische 1/2-TBR-Nucleinsäuresequenzen, deren Anwesenheit oder Abwesenheit in einer bestimmten Probe zu bestätigen ist;

wobei die BNA folgendes umfasst:

(i) ein 1/2-BBR gemäß Darstellung in Fig. 1(IIb), die eine Sequenz aufweist, die komplementär zu einer 1/2-BBR-Sequenz in einer PNA ist und die unter Hybridisierungsbedingungen zur Bildung eines Hybrids, HBR, mit der PNA befähigt ist;

(ii) eine OSA, bei der es sich um einen nicht befestigten Träger oder Indikator oder um einen befestigten Träger oder eine andere Lokalisierungseinrichtung handelt, einschließlich, aber ohne Beschränkung hierauf, eine Befestigung an Perlen, Polymeren und Oberflächen, und/oder Indikatoren;

(iii) zusätzliche Hybridisierungsstellen, 1/2-BBRs, für andere BNAs; und

(iv) Sequenzen, 1/2-BBRs, die mit BNAs, die bereits mit der PNA hybridisiert sind, hybridisieren könnten;

wobei die BBA folgendes umfasst:

(i) ein Molekül oder ein Teil eines Moleküls, die zur selektiven Bindung an eine BBR befähigt sind; und

(ii) eine OSA, bei der es sich um einen nicht befestigten Träger und/oder Indikator oder einen befestigten Träger oder eine andere Lokalisierungseinrichtung handelt, einschließlich, aber ohne Beschränkung

hierauf, eine Befestigung an Perlen, Polymeren und Oberflächen, und/oder Indikatoren;

und die TBA folgendes umfasst:

(i) ein Molekül oder ein Teil eines Moleküls, die zur selektiven Bindung an eine TBR befähigt sind; und

(ii) einen nicht befestigten Träger und/oder Indikator oder einen befestigten Träger oder eine andere Lokalisierungseinrichtung, unter Einschluss, aber ohne Beschränkung hierauf, einer Befestigung an Perlen, Polymere und Oberflächen, und/oder Indikatoren.

9. Festphasen-Hybridisierungsverfahren zum Nachweis der Anwesenheit eines Zielpolynucleotids unter Verwendung einer PNA nach Anspruch 1, beinhaltend das Immobilisieren eines Zielpolynucleotids, sofern es in einer Testprobe vorhanden ist, auf direktem Wege oder über eine Zwischenabfangstruktur an einer festen Phase an einer Abfangstelle; vor, während oder nach der Immobilisierung das Befestigen einer nachweisbaren Markierung am Zielpolynucleotid, sofern vorhanden; und das Nachweisen dieser Markierung, sofern vorhanden, an der Abfangstelle; wobei die Immobilisierung die Verwendung einer Ziel-Bindungsanordnung (TBA) umfasst, die nur an ein besonderes Hybrid der Zielnucleinsäure und einer Sondennucleinsäure (PNA) bindet, die eine 1/2-BBR umfasst, die zur Bindung einer Booster-Nucleinsäure (BNA) befähigt ist, die ein einzelsträngiges, komplementäres 1/2-BBR enthält, das bei Hybridisierung mit der 1/2-BBR in der PNA eine BBR bindet, die zur Bindung von markierten Booster-Bindungsanordnungen (BBAs) befähigt ist, wobei die Ausdrücke TBA, BNA, BBR und BNA der Definition in Anspruch 1 entsprechen.

10. Diagnostisches oder forensisches Testkit zum Nachweisen einer Zielnucleinsäuresequenz in einer Probe einer Nucleinsäure, umfassend erste und zweite Nucleinsäuresonden und erste und zweite Nucleinsäure-Bindungsproteine, wobei die erste Sonde eine zur Zielsequenz komplementäre Sequenz und eine zusätzliche Sequenz aufweist;

wobei das erste Bindungsprotein spezifisch für den erste Sonde-Ziel-Duplex ist;

wobei die zweite Sonde komplementär zur zusätzlichen Sequenz an der ersten Sonde ist; und

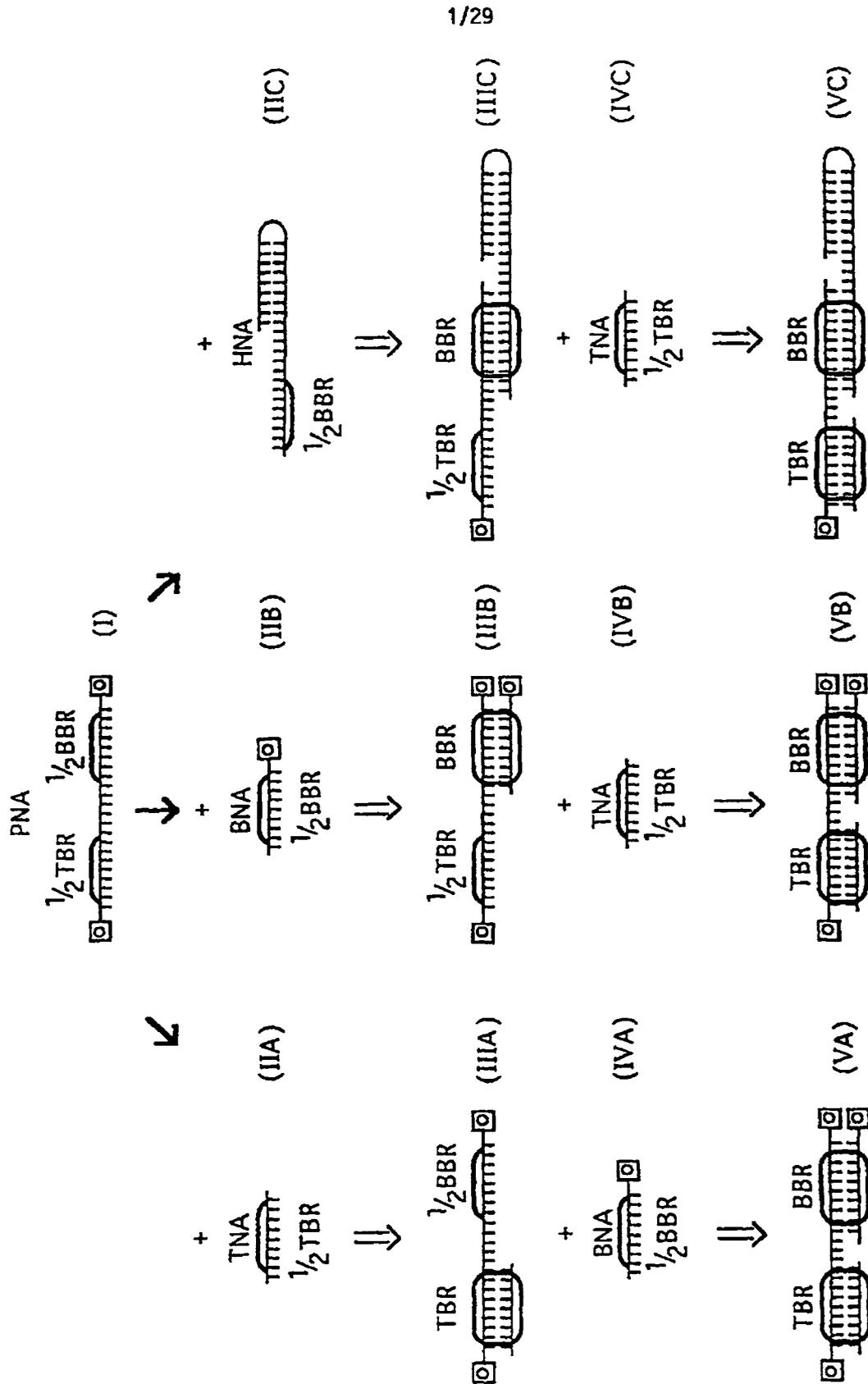
wobei das zweite Bindungsprotein spezifisch an den erste Sonde-zweite Sonde-Duplex bindet und mit einer nachweisbaren Markierung markiert ist.

11. Kit nach Anspruch 10, wobei die erste Sonde komplementär zu HIV-LTR ist und bei Hybridisierung der ersten Sonde mit HIV-LTR eine Bindungsstelle für NF-kB oder eine Untereinheit davon, SP1, TATA-Bindungsprotein, HIV-Detect I, II, III oder IV oder HIV-Lock, gebildet wird.

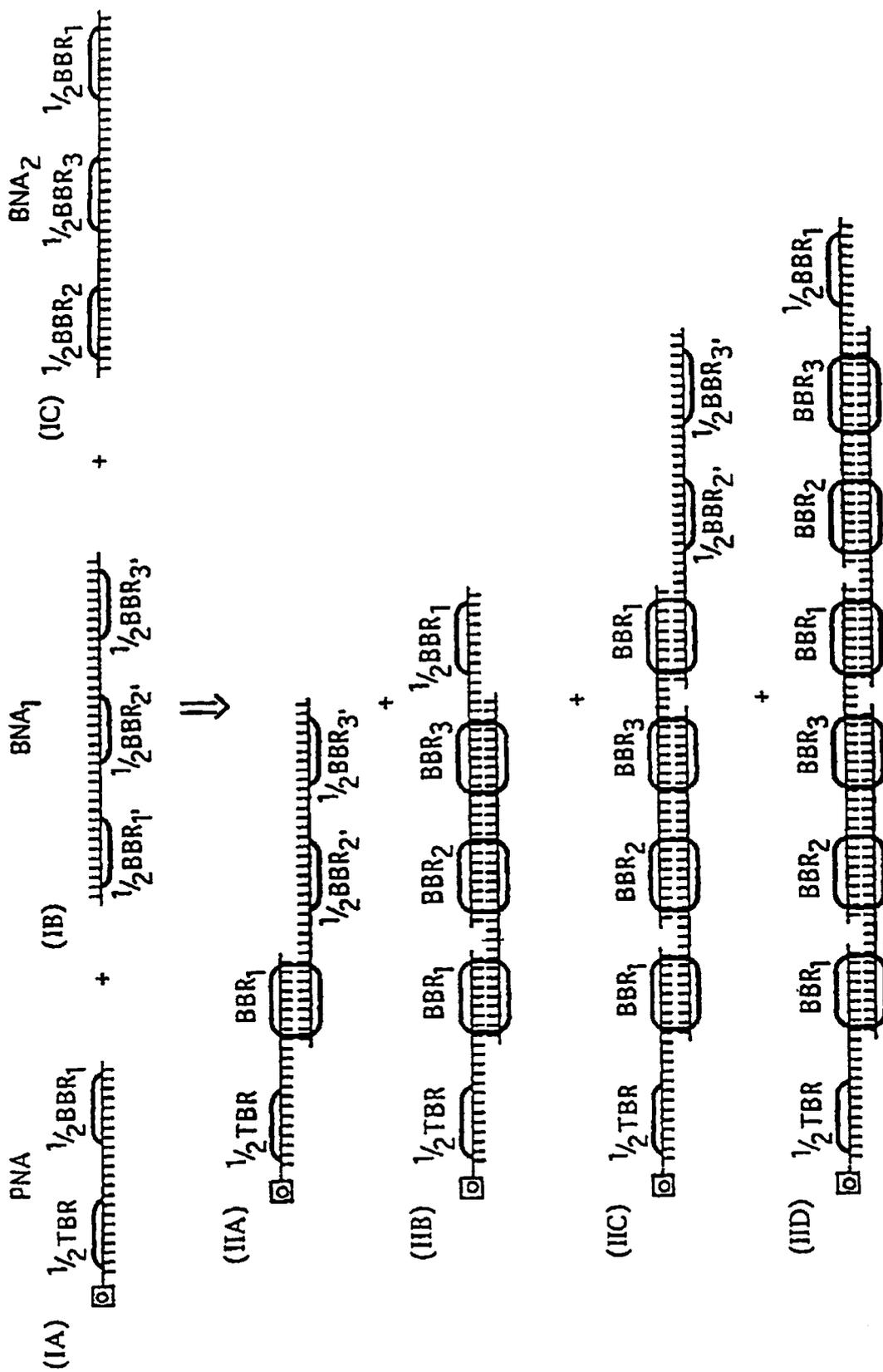
12. Kit nach Anspruch 11, wobei es sich beim ersten Bindungsprotein um NF-kB oder eine Untereinheit davon, SP1, TATA-Bindungsprotein, HIV-Detect I, II, III oder IV oder HIV-Lock, handelt.

13. Kit nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei die erste Sonde zusätzlich zu ihrer komplementären Beschaffenheit zu HIV-LTR eine Sequenz umfasst, die für den linken oder rechten Operator des lambda-Bakteriophagen kodiert, und die zweite Sonde eine Sequenz umfasst, die zur linken oder rechten Operatorsequenz des lambda-Bakteriophagen komplementär ist, so dass bei Hybridisierung der ersten und zweiten Sonde eine Bindungsstelle für das CI-Repressorprotein des lambda-Bakteriophagen, das cro-Protein des lambda-Bakteriophagen oder ein Derivat oder ein Homologes davon gebildet wird.

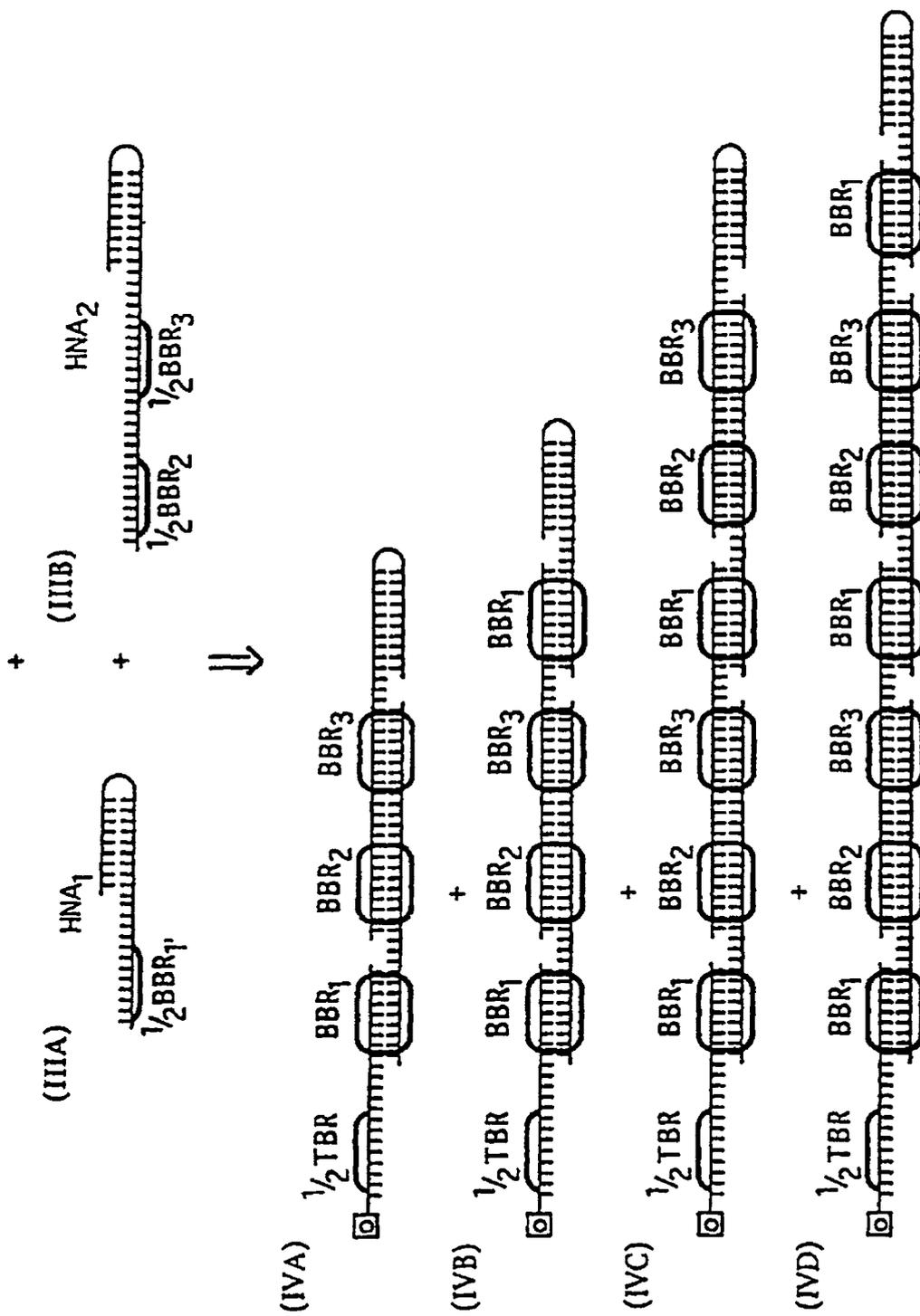
14. Kit nach Anspruch 13, wobei es sich beim zweiten Bindungsprotein um das CI-Repressorprotein des lambda-Bakteriophagen, das cro-Protein des lambda-Bakteriophagen oder ein Derivat oder ein Homologes davon handelt.



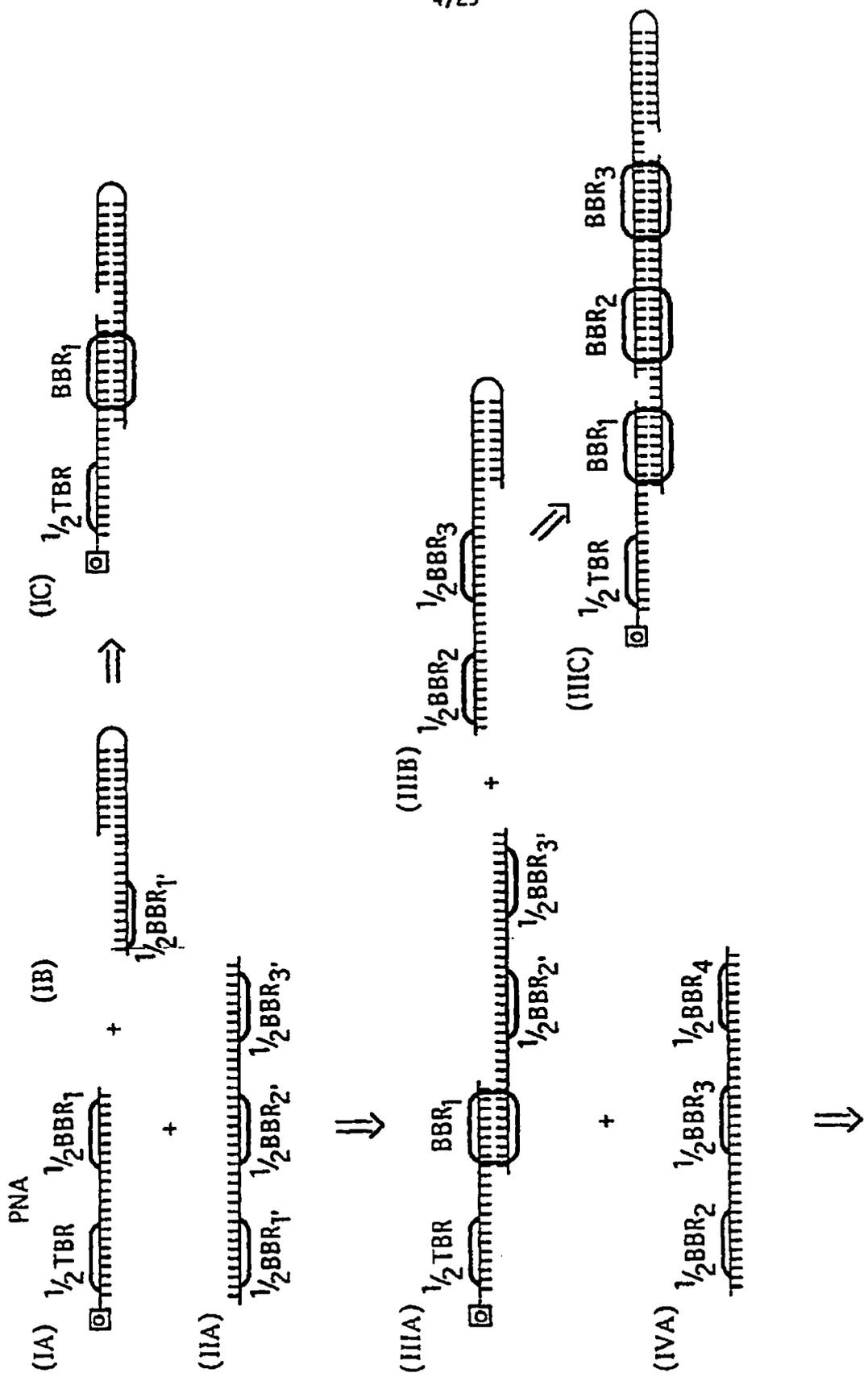
FIGUR 1



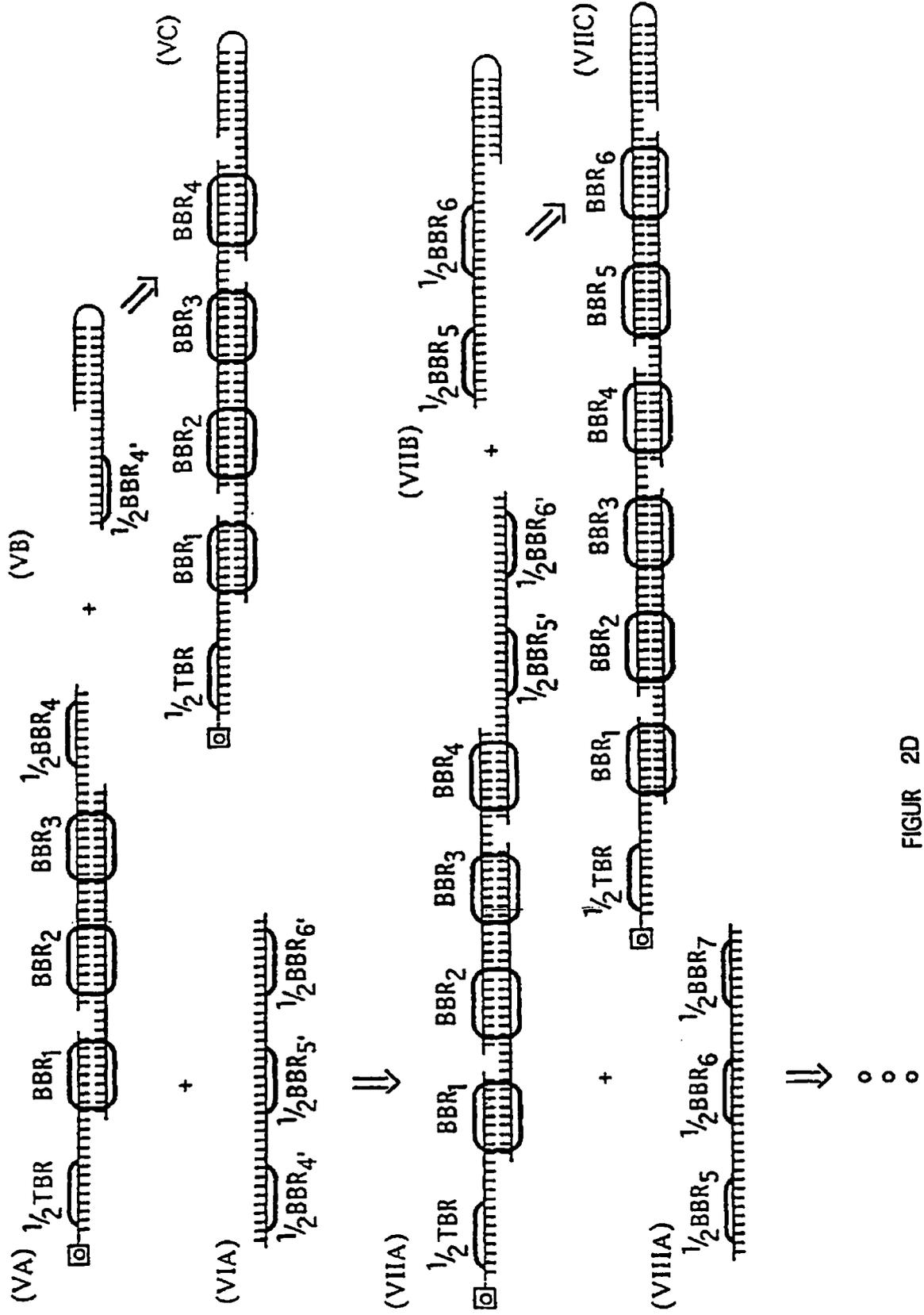
FIGUR 2 A



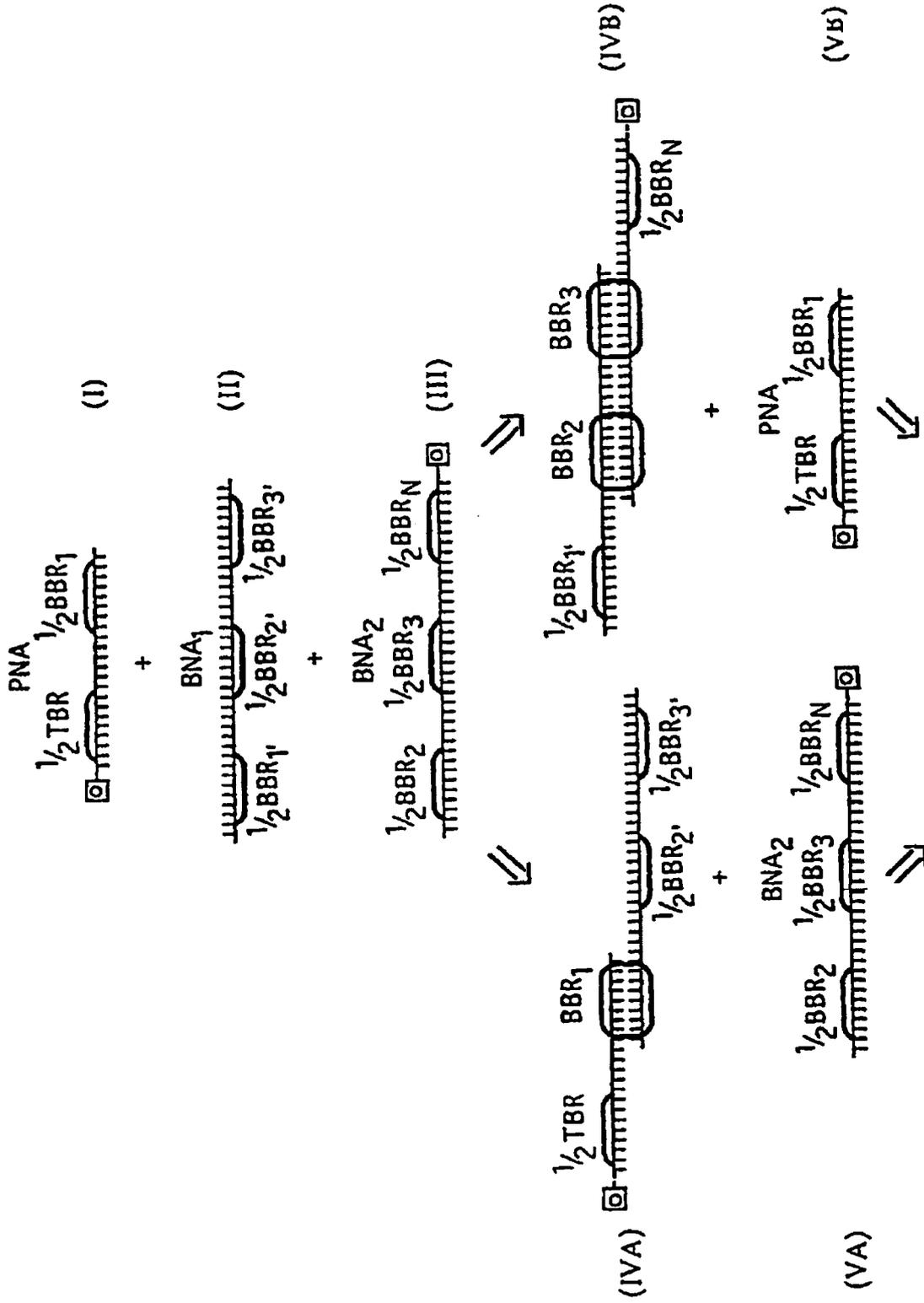
FIGUR 2B



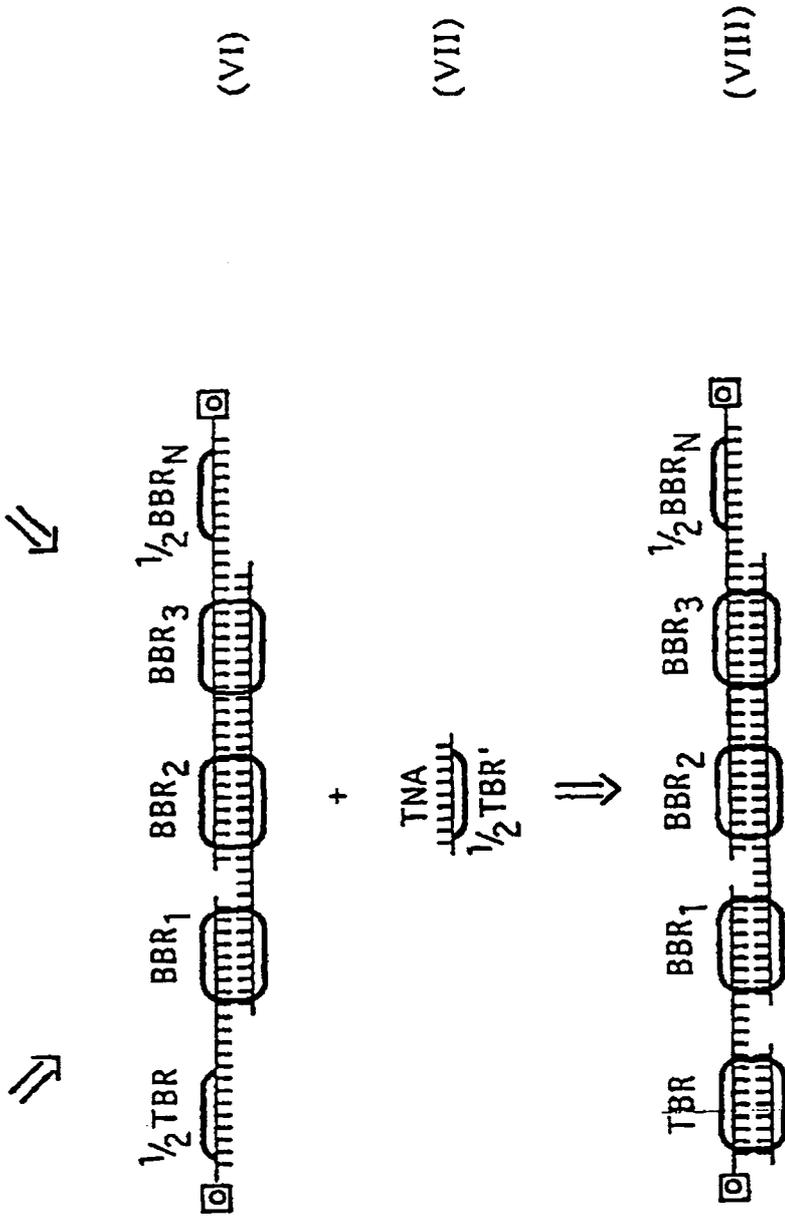
FIGUR 2C



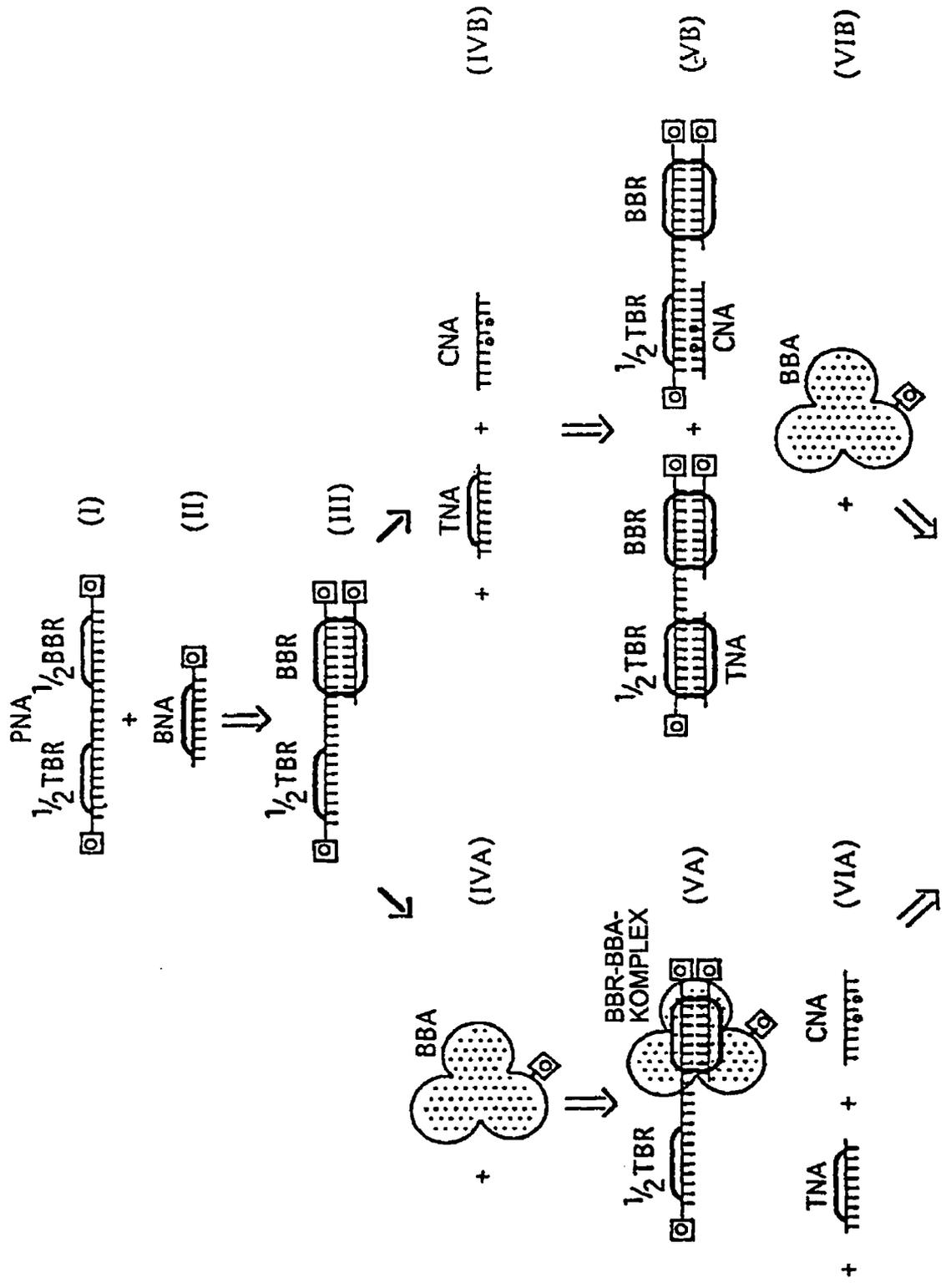
FIGUR 2D



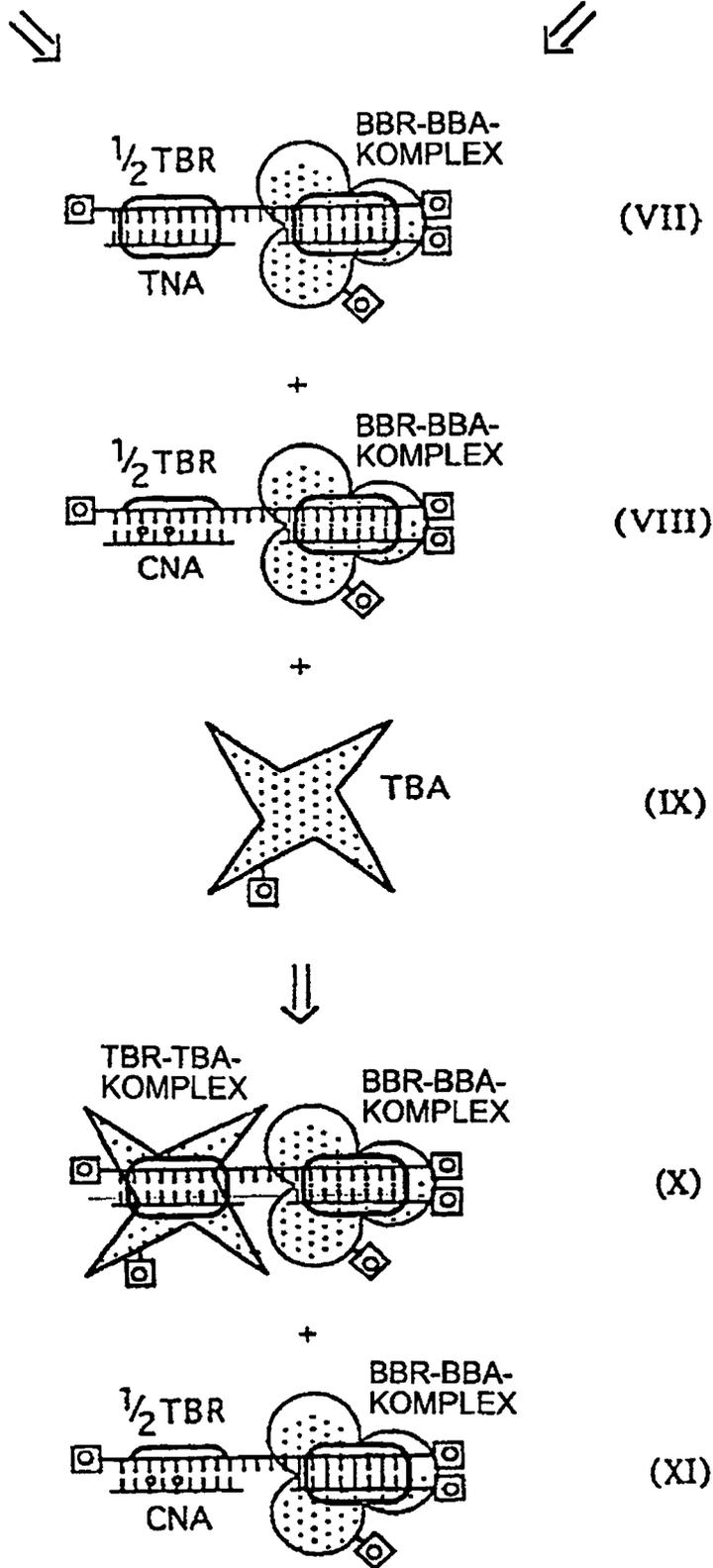
FIGUR 3A



FIGUR 3 B

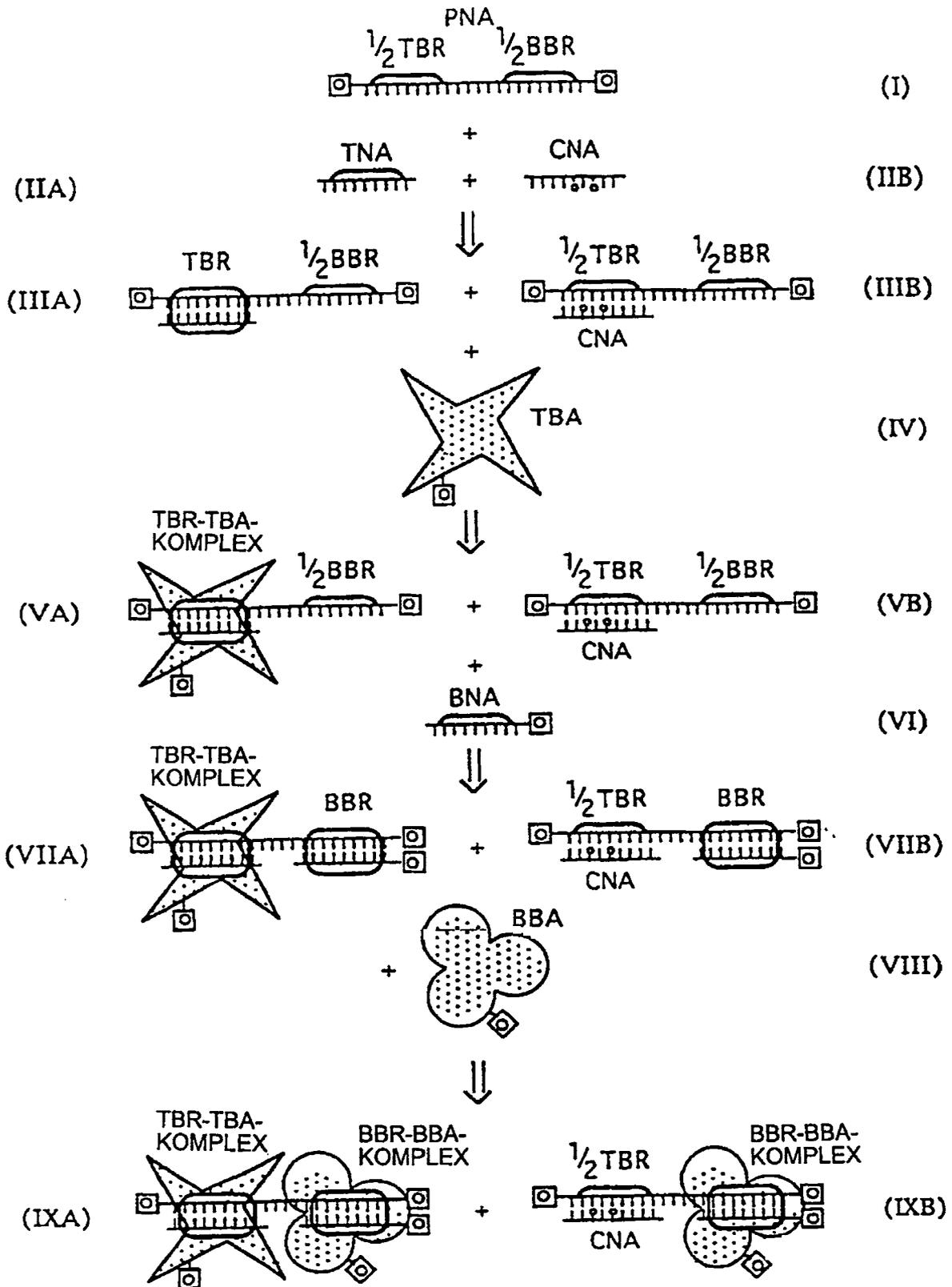


FIGUR 4A

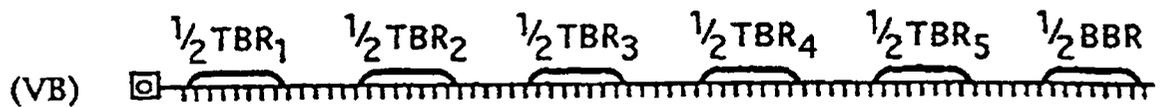
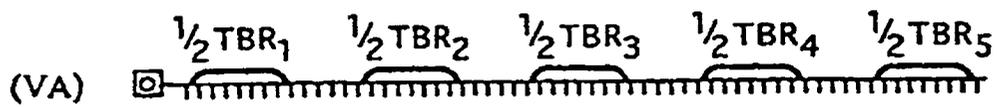
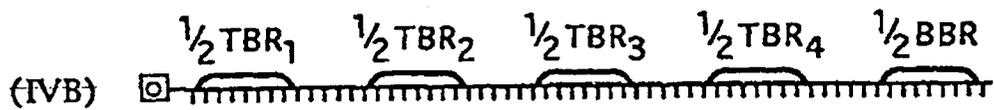
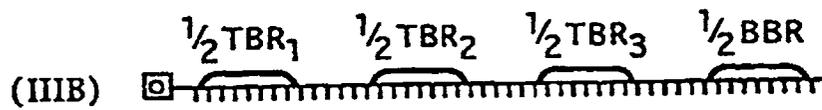
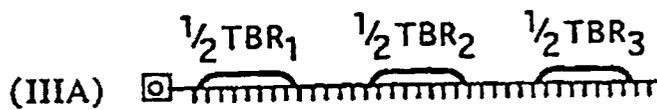
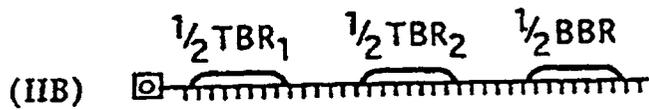
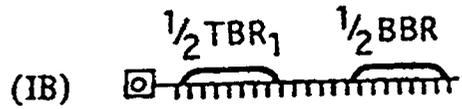
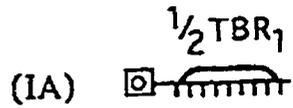


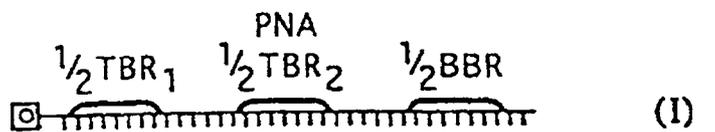
FIGUR 4B

10/29

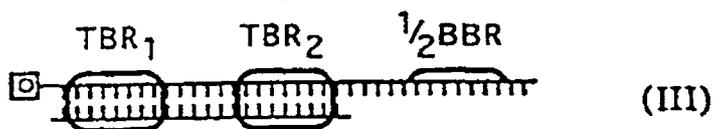
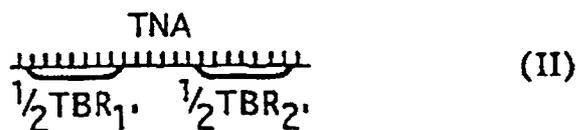


FIGUR 4C

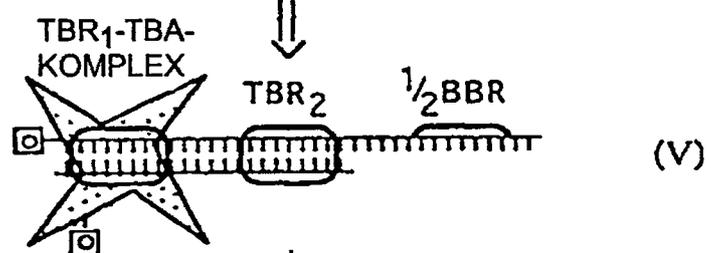




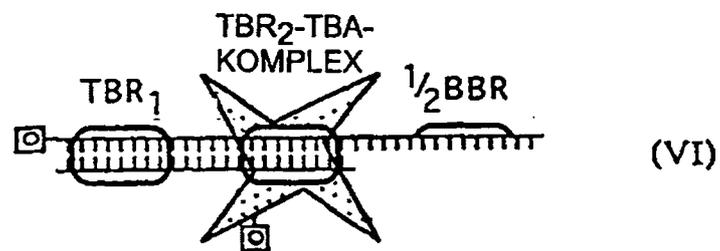
+



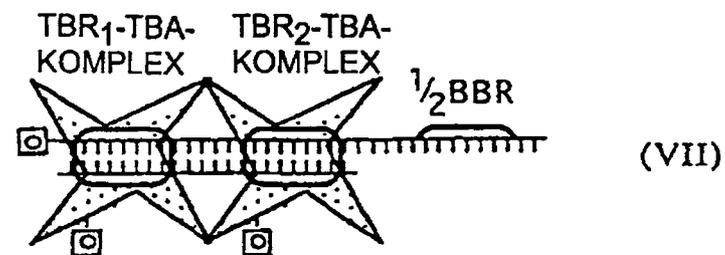
+



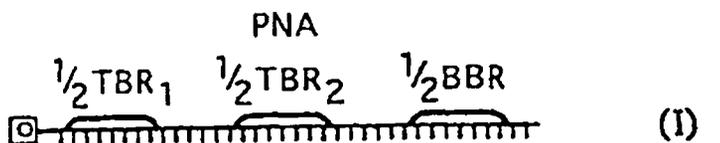
+



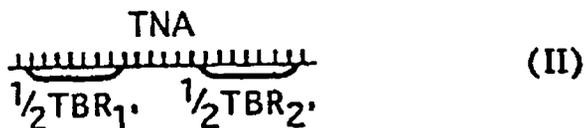
+



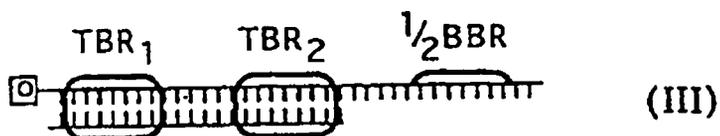
FIGUR 6A



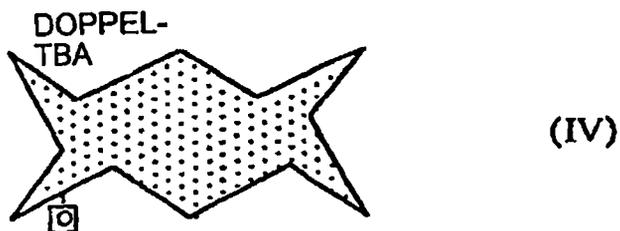
+



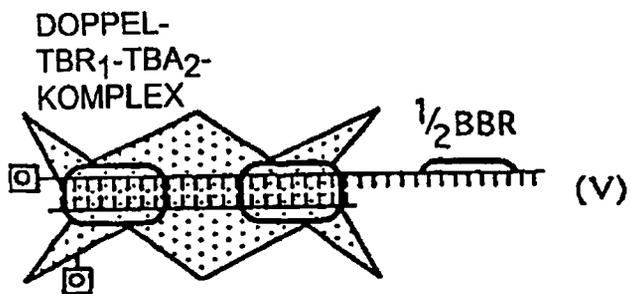
⇓



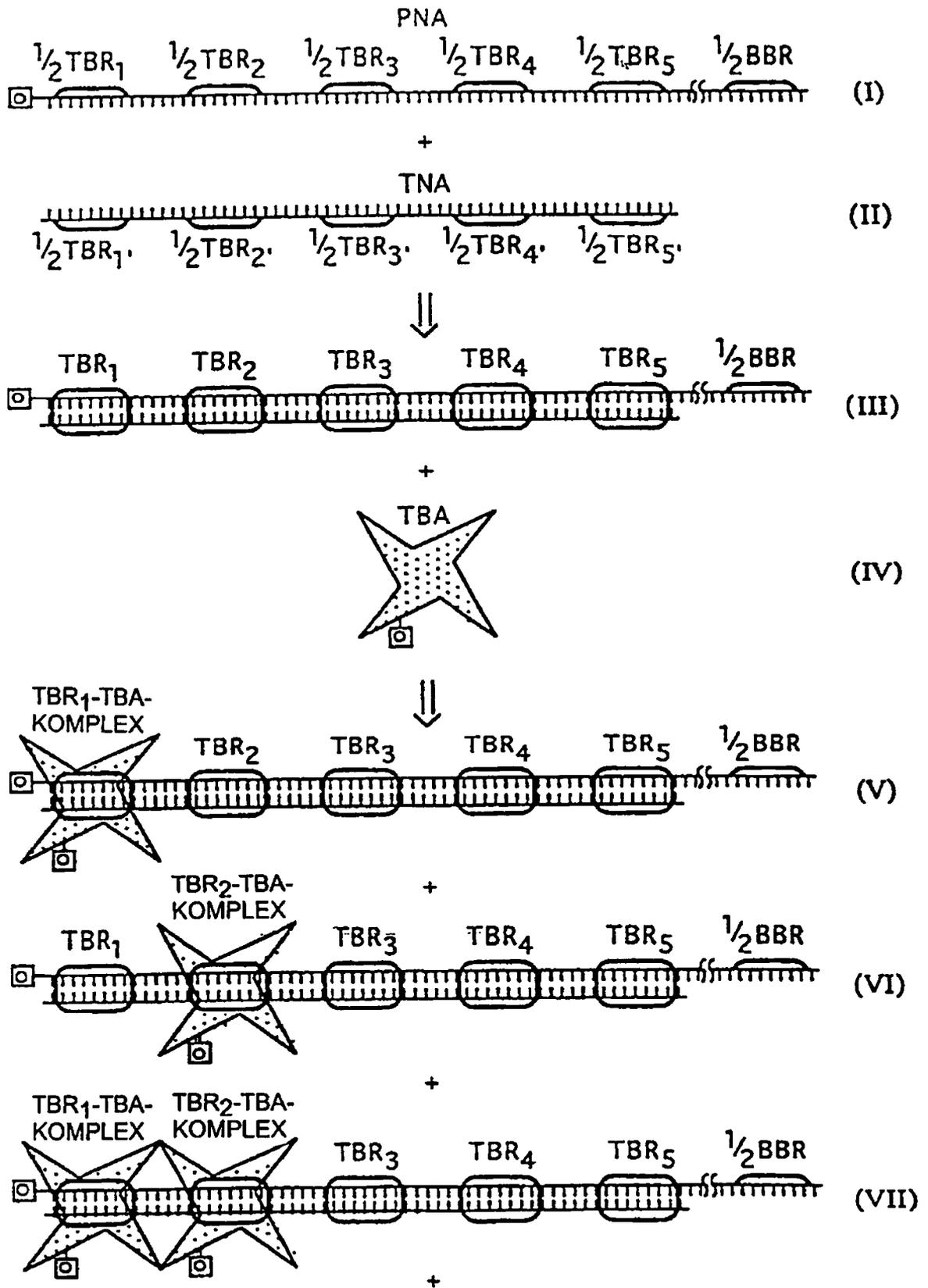
+



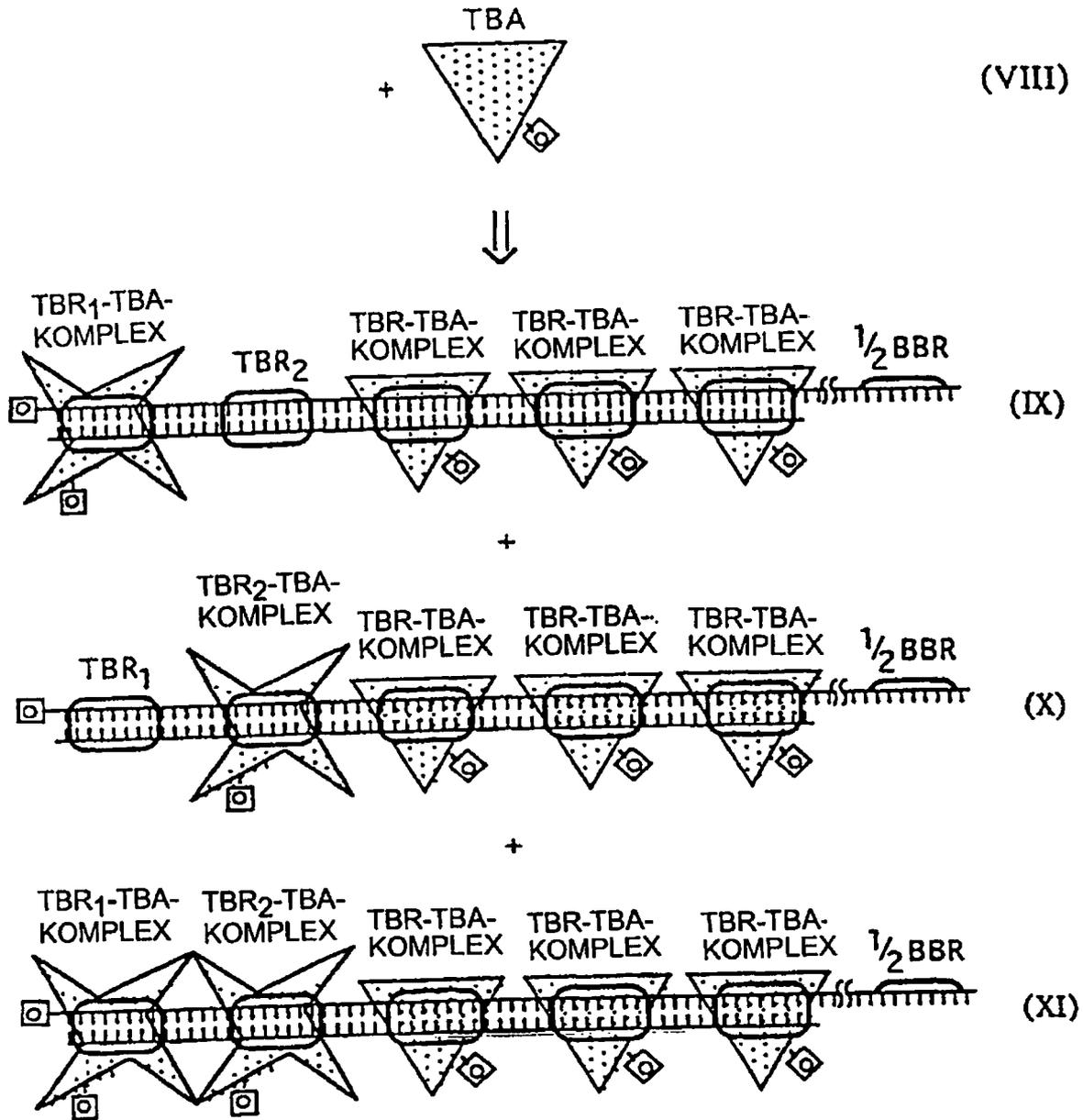
⇓



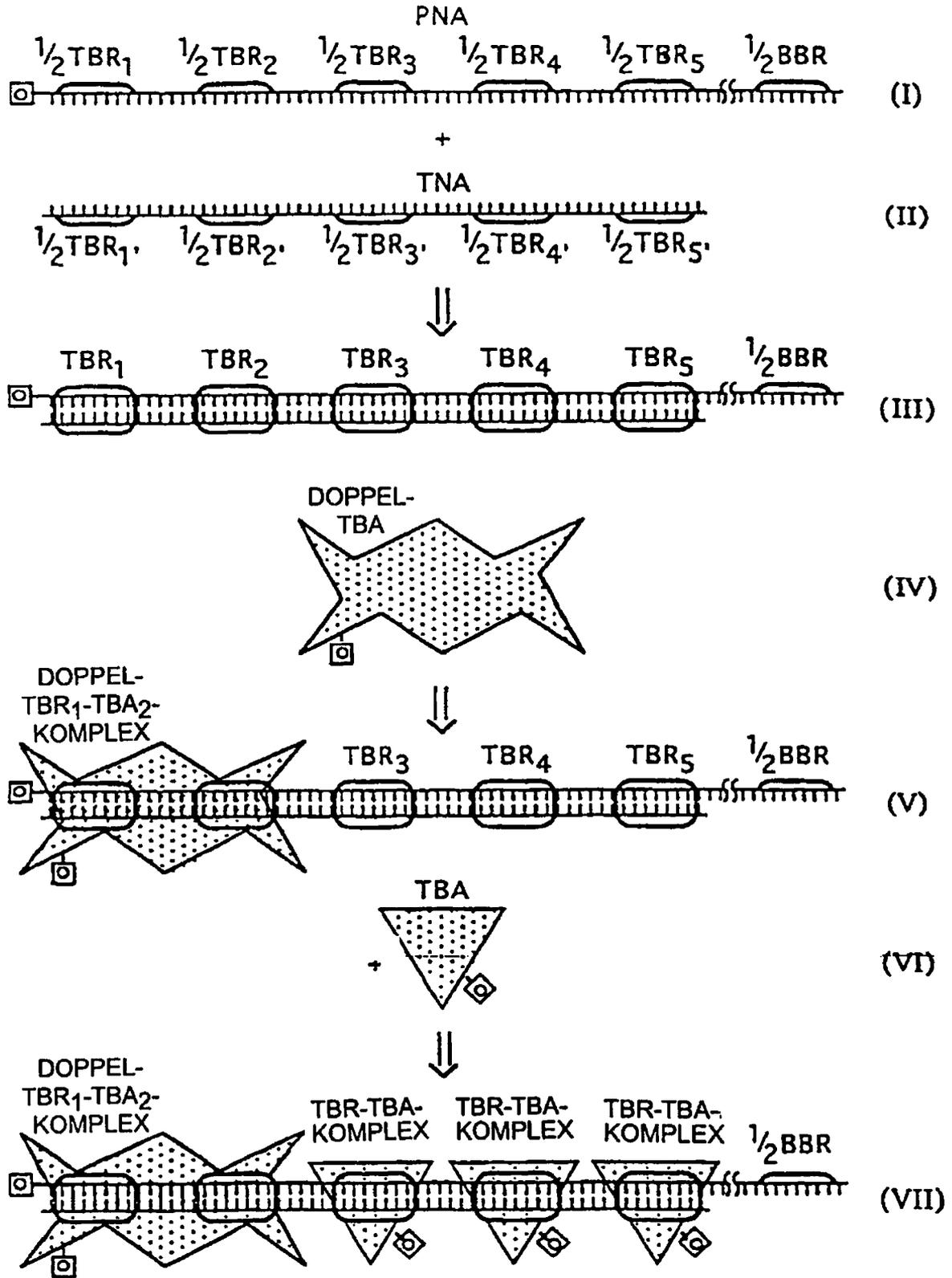
FIGUR 6B



FIGUR 6C



FIGUR 6D



FIGUR 6E

SEQ. ID: 37:
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 CTACAAGGACITTCGGCTGGGACTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
 ++++++NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1 SP1
 =====

HIV-TESTKIT PNA1 (+++ von oben), SEQ.ID:38:

CTACAAGGACTTCCGCTGGGACTTCCAGGGAGG

HIV-TESTKIT PNA2 (=== von oben), SEQ.ID:39:

##CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC##

Die klebrige Endsequenz in PNA2 ist komplementär zu einem der Enden der Operator-DNA, gebildet aus:

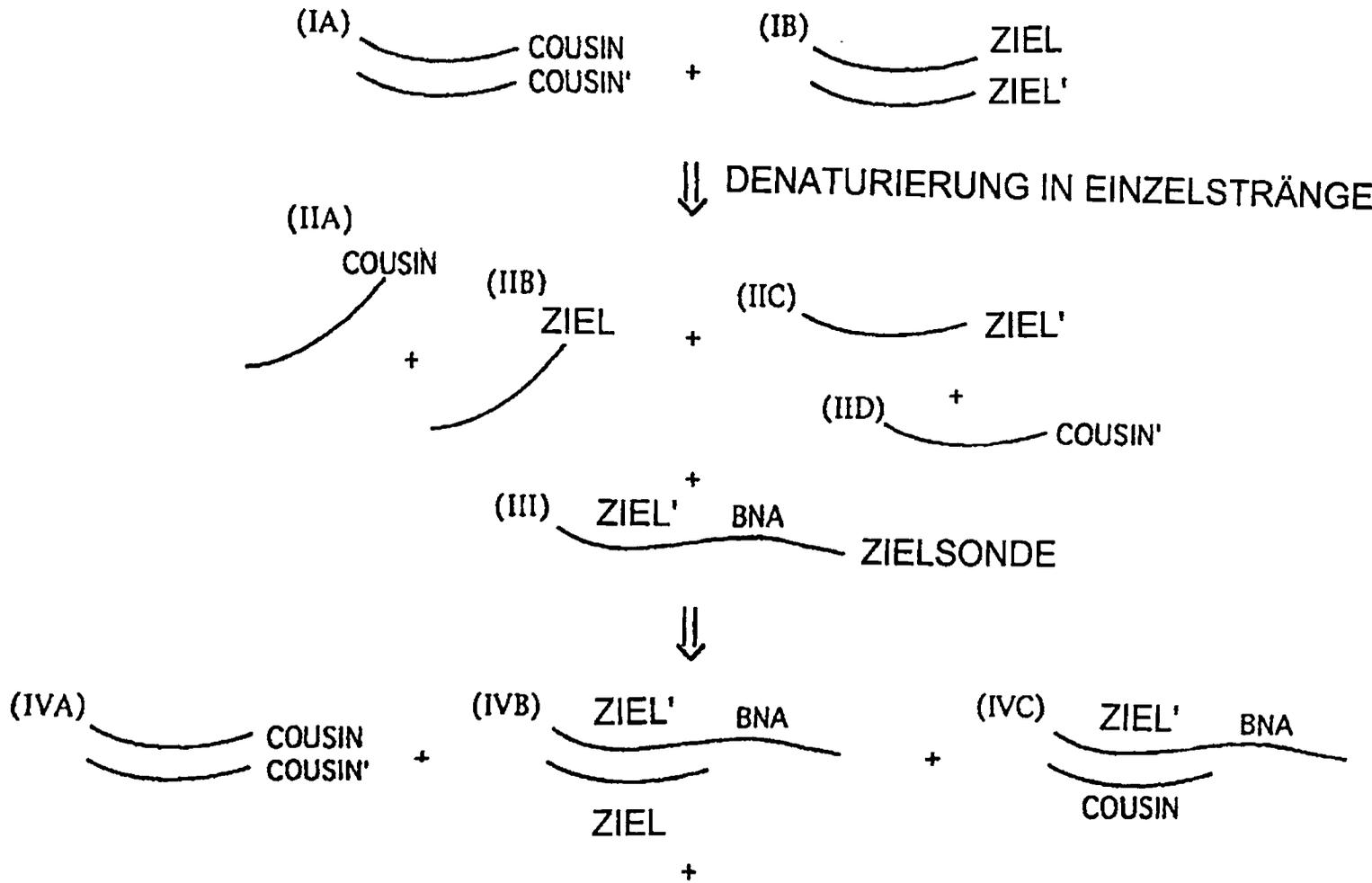
###0L1-0L2-0L3
 0L1'-0L2'-0L3'***

oder

###OR3-OR2-OR1
 OR3'-OR2'-OR1'***

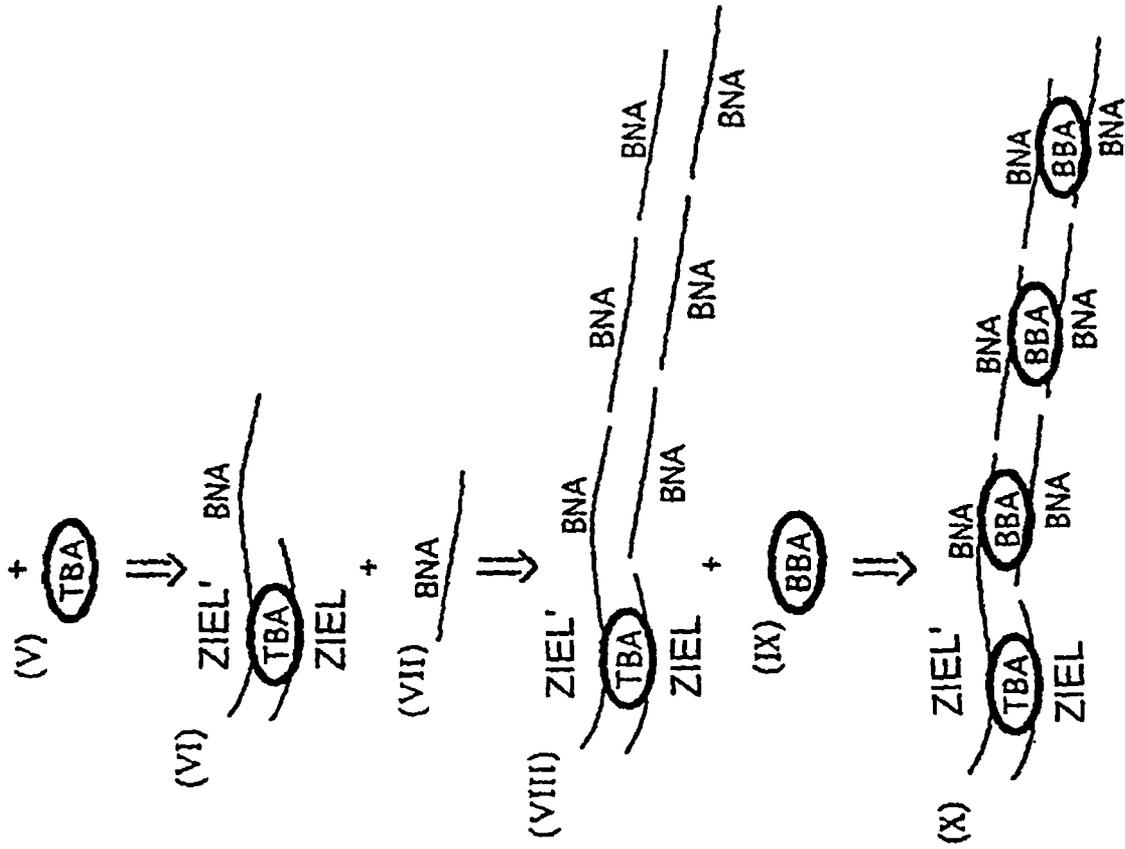
FIGUR 7

FRAGMENTIERTE DOPPELSTRÄNGIGE
NUCLEINSÄUREPROBE



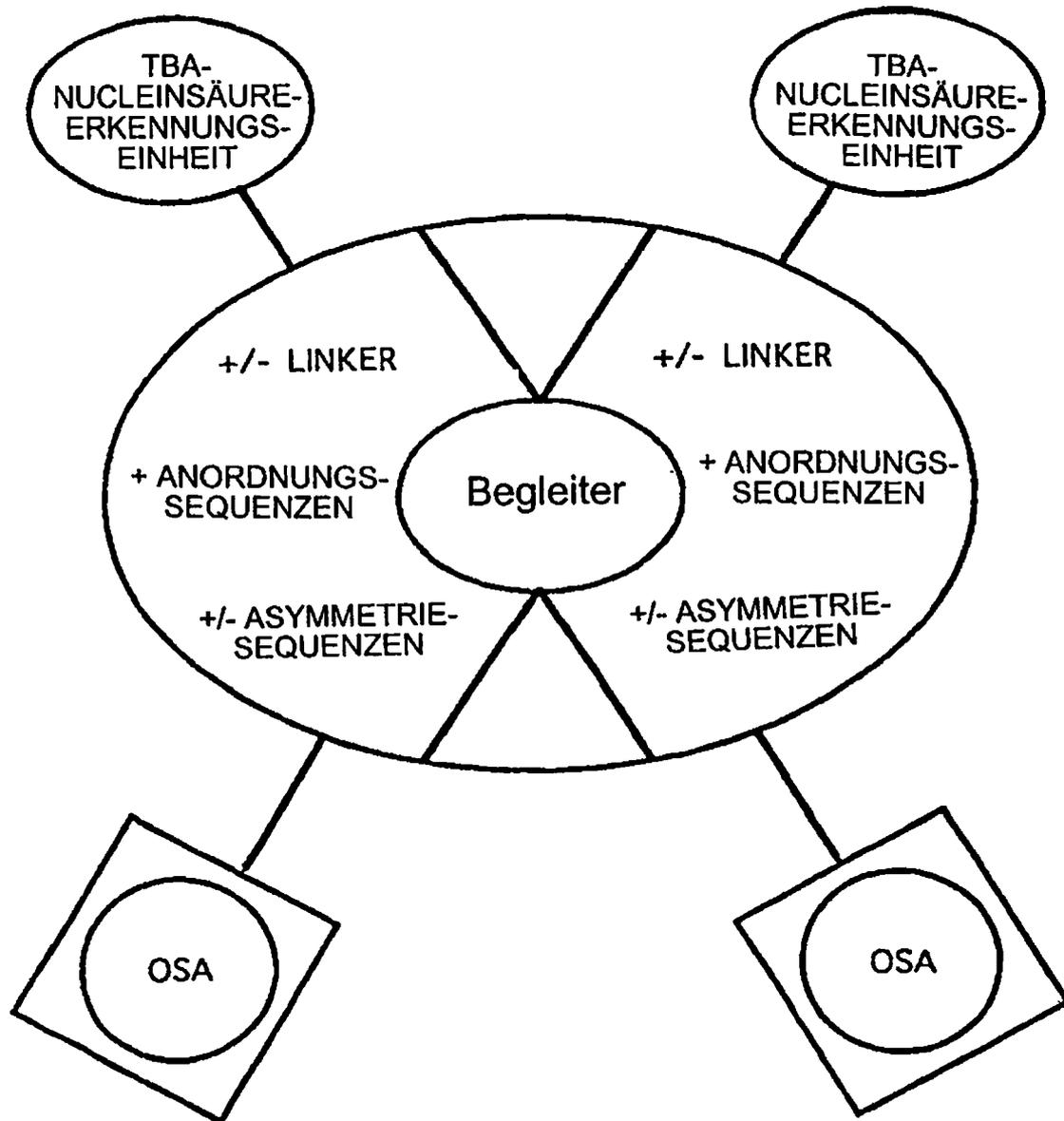
18/29

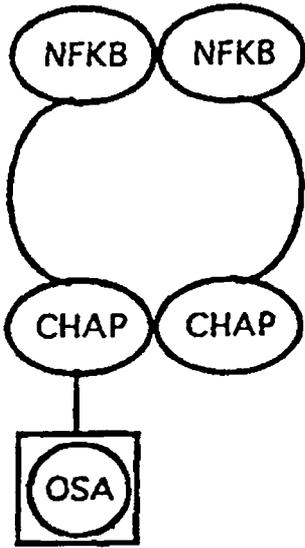
FIGUR 8A



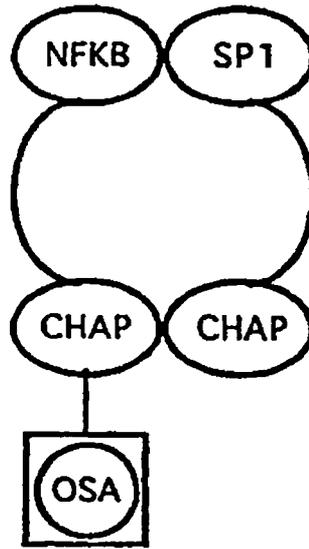
FIGUR 8B

TBA: ZIELBINDUNGSANORDNUNG

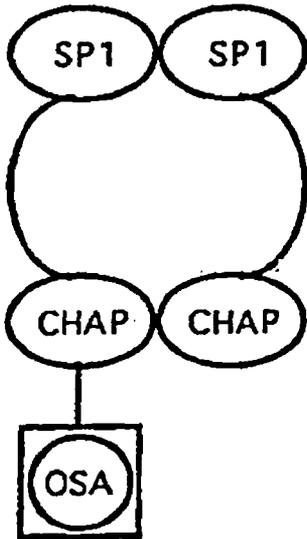




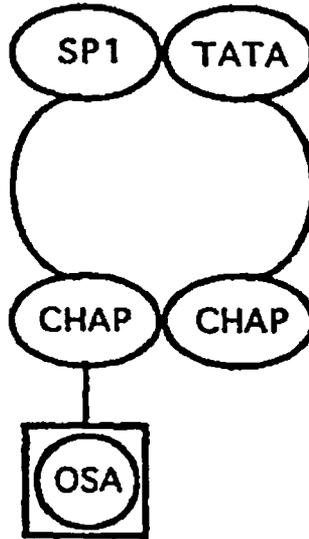
HIV-DETECT I



HIV-DETECT II

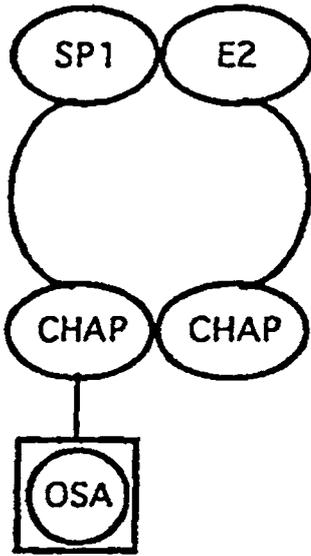


HIV-DETECT III

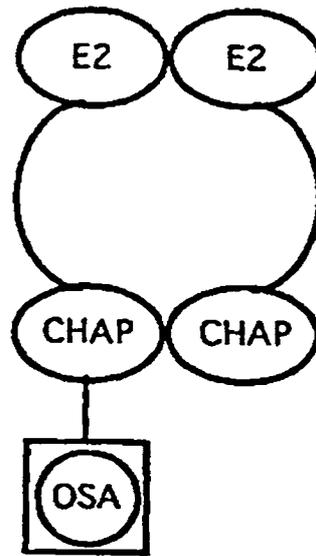


HIV-DETECT IV

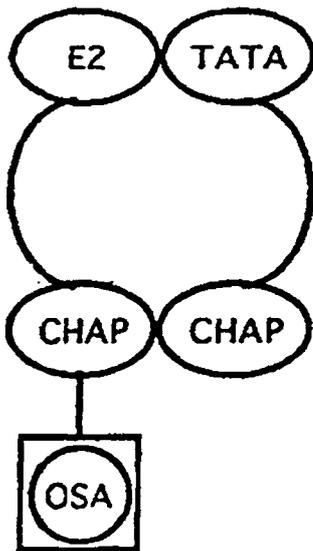
FIGUR 10



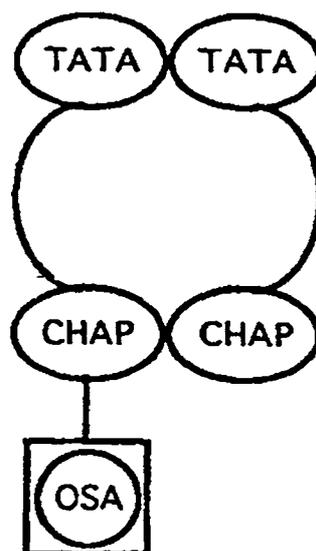
HPV-DETECT I



HPV-DETECT II

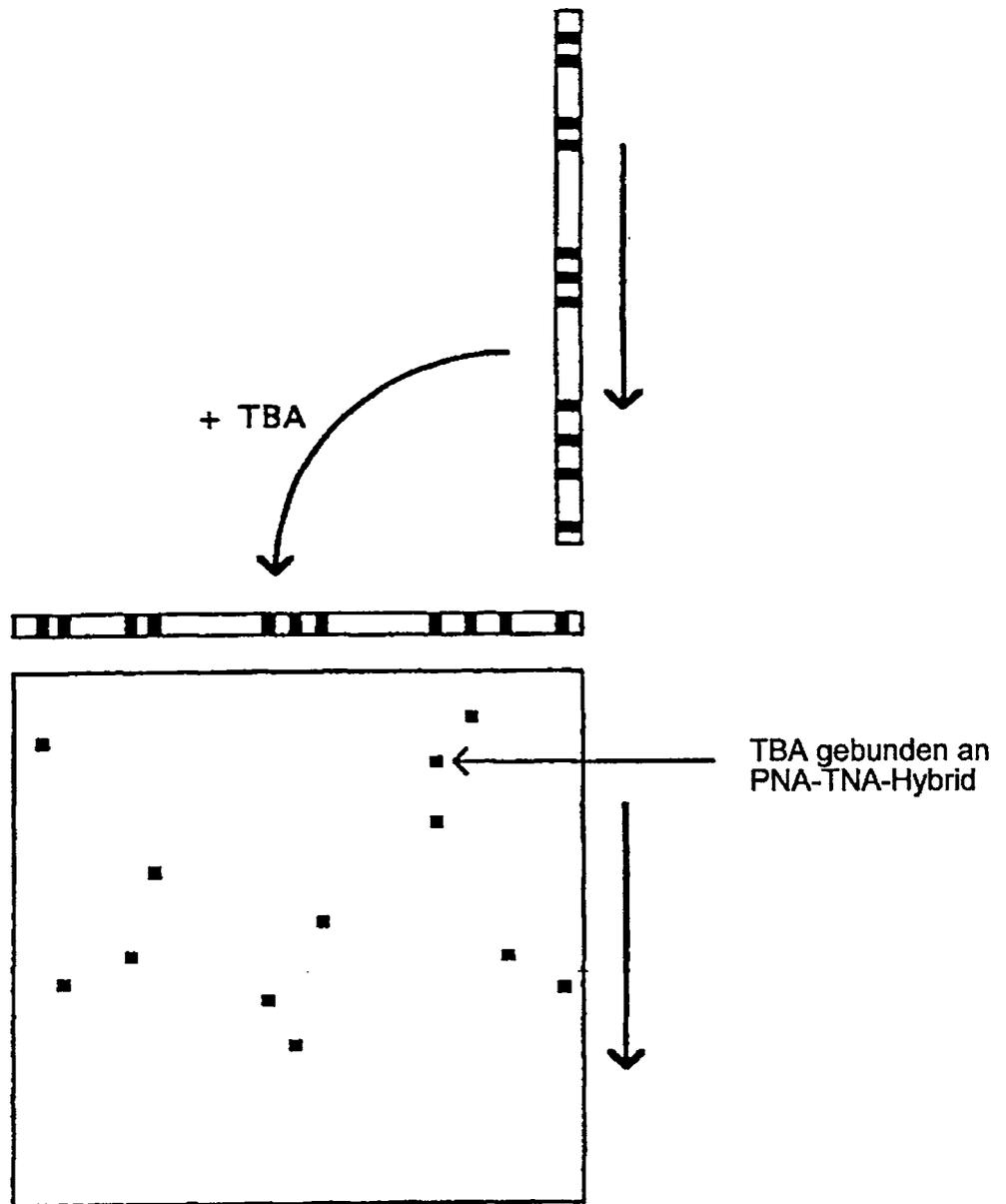


HPV-DETECT III

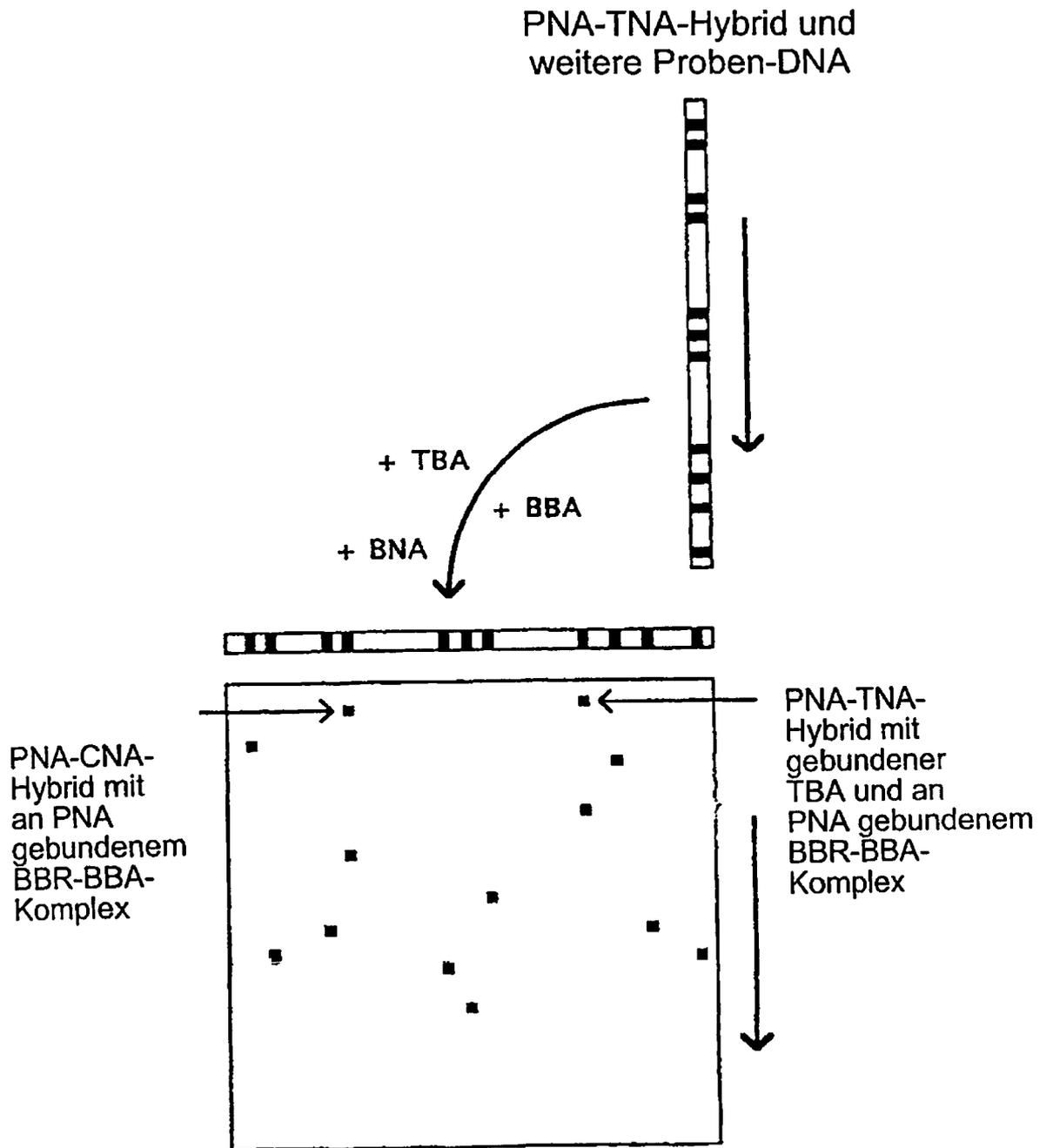


HPV-DETECT IV

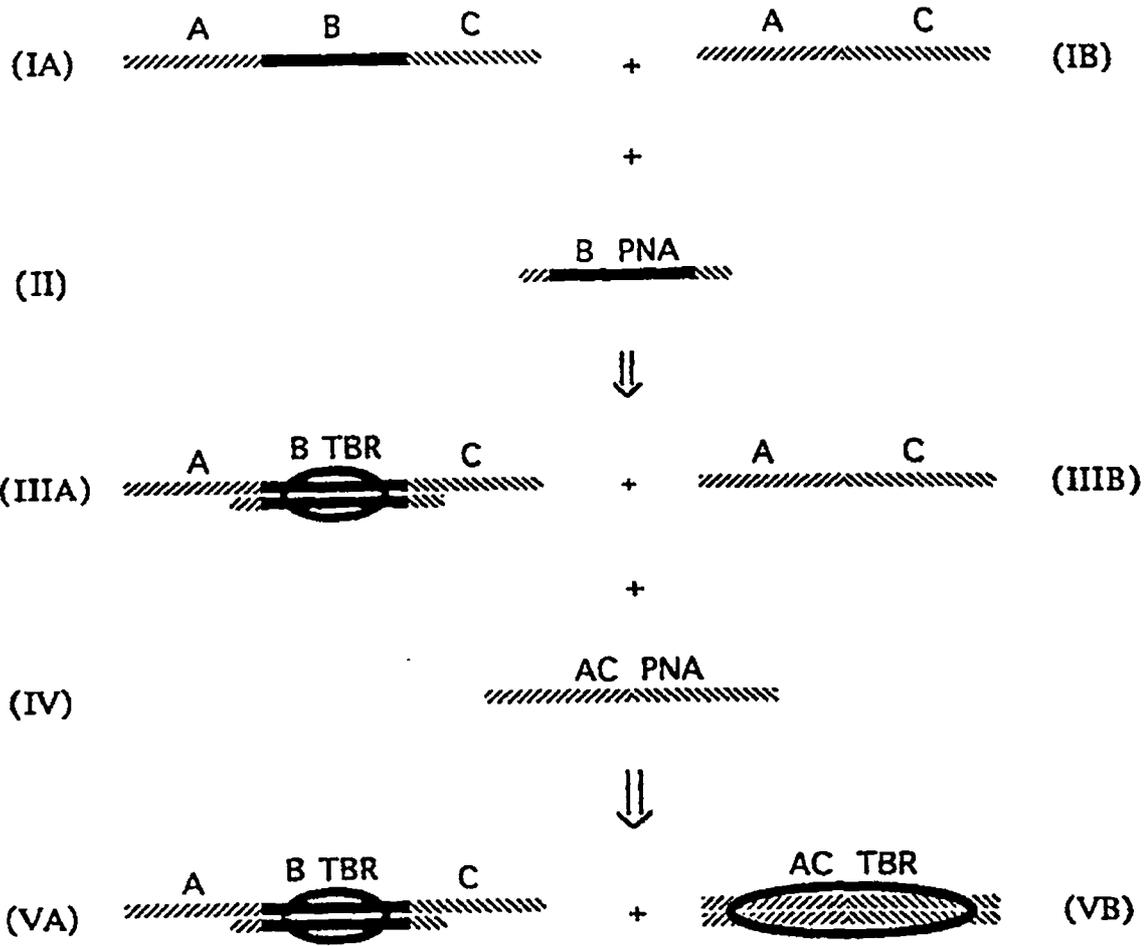
FIGUR 11

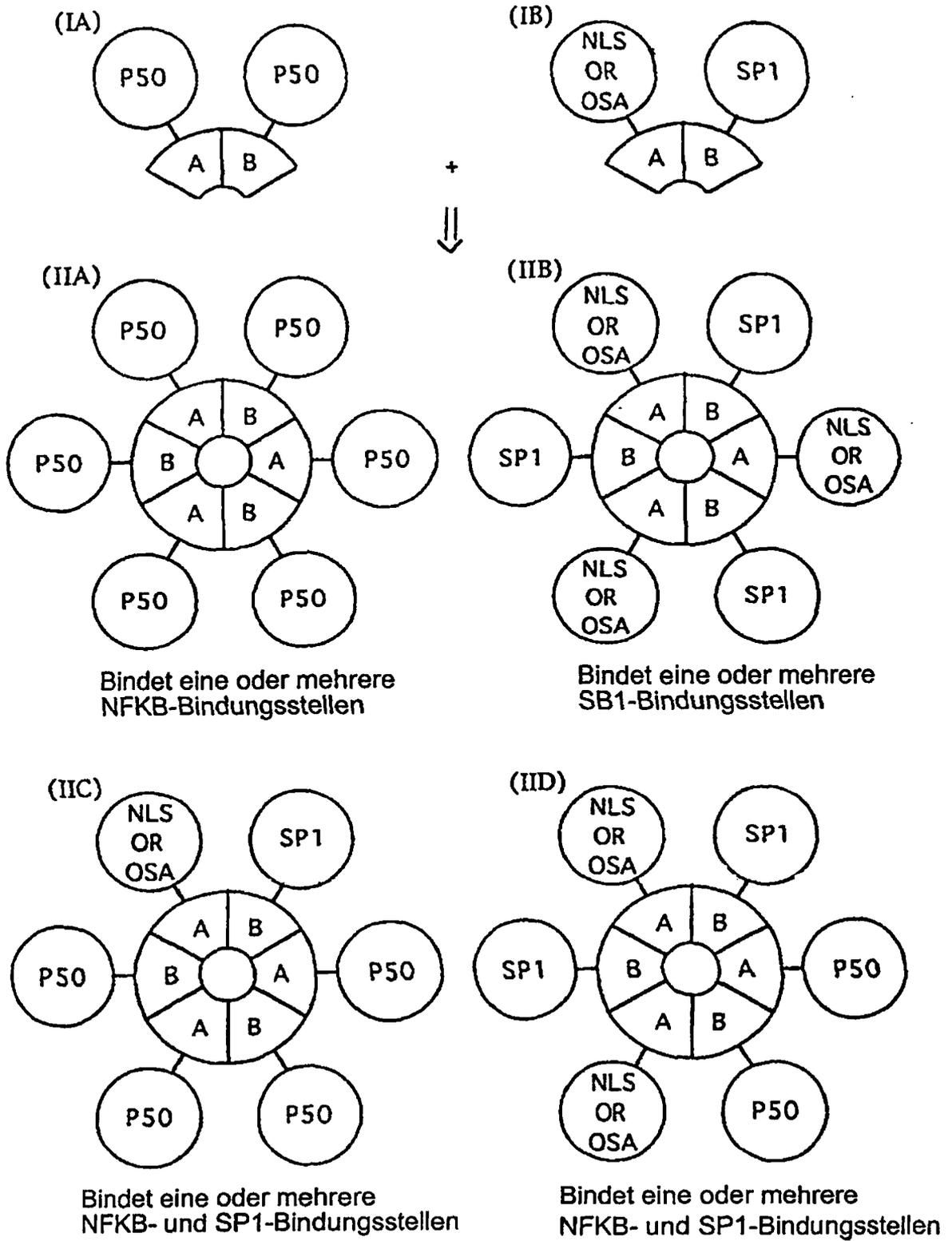


FIGUR 12A

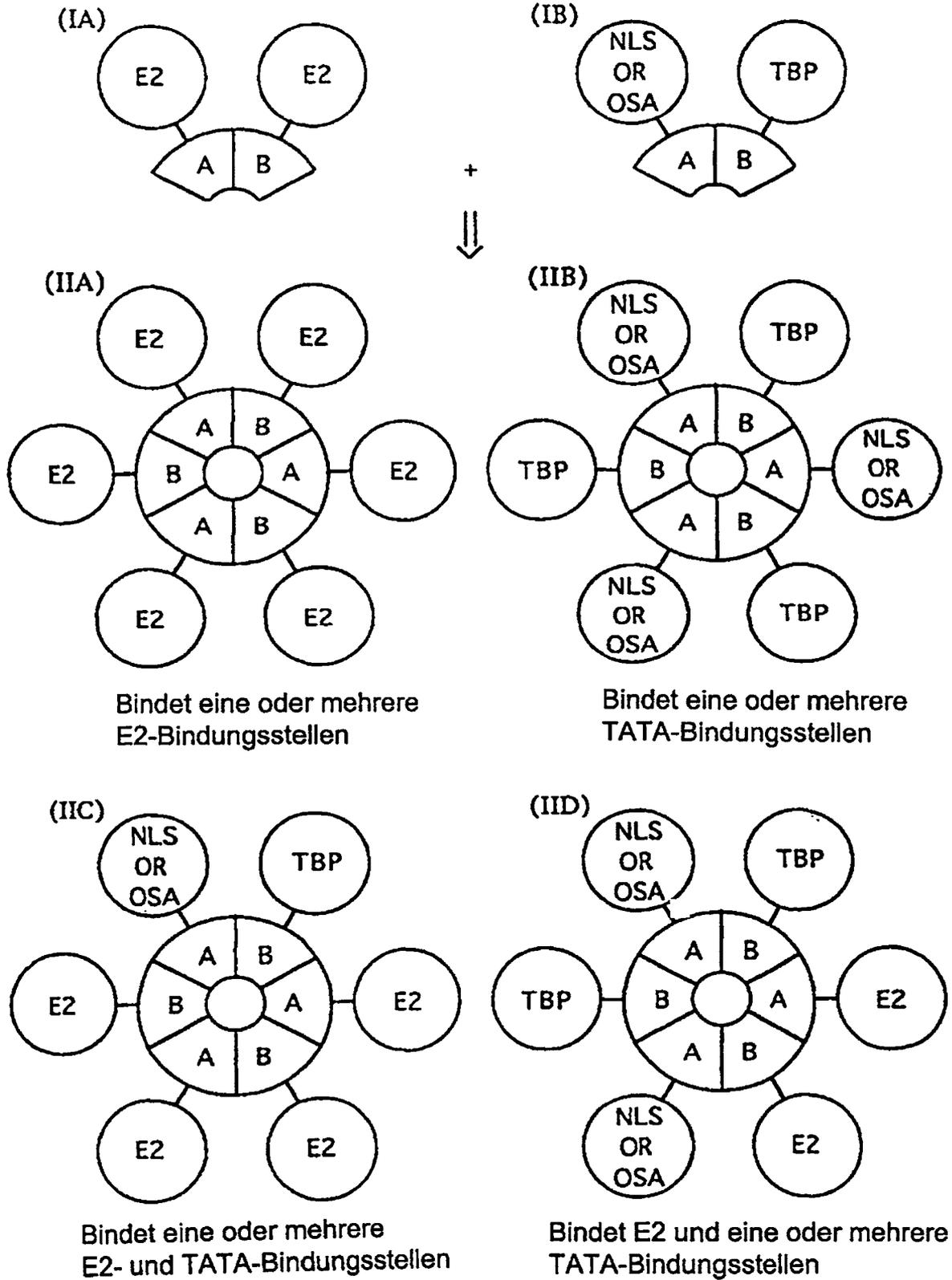


FIGUR 12B

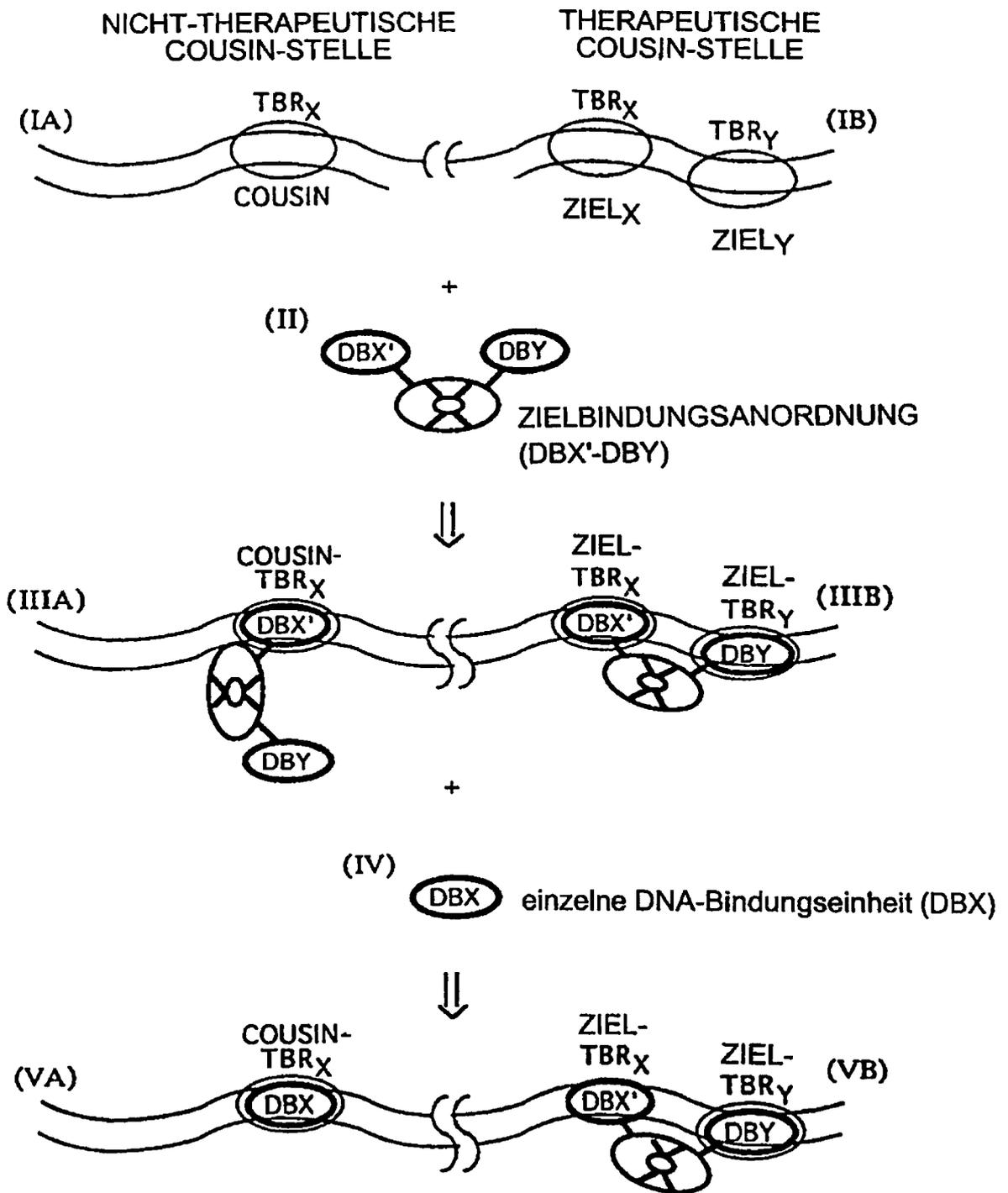




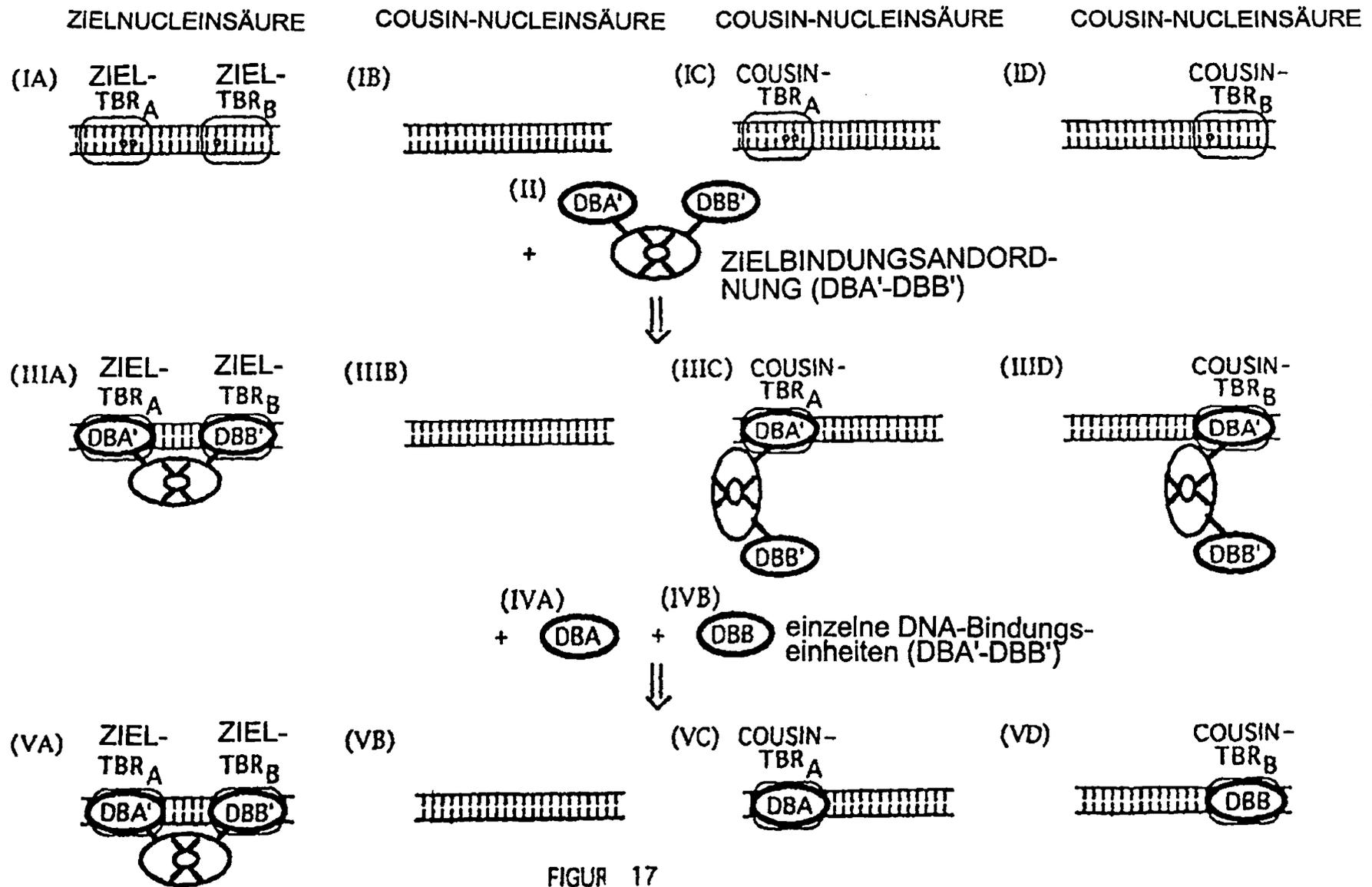
FIGUR 14



FIGUR 15



FIGUR 16



FIGUR 17