

EU 0 796 344 (95943035.6)

Werkwijze voor de detectie van nucleïnezuren met een specifieke sequentiecompositie

Beschrijvingsinleiding

Achtergrond van de uitvinding

1. Technisch gebied van de uitvinding

Deze uitvinding verschaft een werkwijze en composities voor gebruik bij de binding, detectie en amplificatie van de detectie van specifieke Target Nucleïnezuur sequenties in een monster op een betrouwbare en accurate wijze en zelfs in de aanwezigheid van zeer gerelateerde maar zeer verschillende nucleïnezuren. De binding kan betrekking hebben op de chaperonnatie en constructie van specifieke moleculen in de Target Binding Constructies die specifiek binden aan Target Binding Gebieden die gevormd worden door middel van hybridisatie van Probe Nucleïnezuren en Target Nucleïnezuur sequenties. De amplificatie kan het chaperonneren en/of de constructie betreffen van specifieke moleculen in Booster Binding Constructies die specifiek binden aan Booster Binding gebieden die gevormd worden door de hybridisatie van Booster Nucleïnezuren met Probe Nucleïnezuren, Target Nucleïnezuren of andere Booster Nucleïnezuren. Het detecteren betreft het verschaffen van één of meer detecteerbare labels waaronder radioactieve, licht- of fluorescentie-uitstralende,

enzymatische of andere detecteerbare of signaal-genererende moleculen samen met het Probe Nucleïnezuur de Target Binding Constructie, het Booster Nucleïnezuur of de Booster Binding Constructie.

5

2. Achtergrond en beschrijving van de stand der techniek

Er bestaat een groeiend aantal gevallen waarin het belangrijk is tot het detecteren van nucleinezuren die een
10 specifieke sequentie bevatten en deze worden hierna aangeduid als Target Nucleinezuren (TNAs), in een monster. Het is gewenst om in staat te zijn tot het detecteren van de TNAs met behulp van een zo klein mogelijk aantal
15 bewerkingsstappen, door gebruik te maken van simpele componenten en de uitsluiting van andere vergelijkbare maar verschillende nucleinezuren die hierna worden aangeduid als Neef Nucleinezuren (CNAs). Het is gewenst om in staat te zijn tot het detecteren van specifieke TNAs waarbij sommige of
20 alle CNAs in het detectiemonster worden uitgesloten zonder dat amplificatie of andere post-detectiebewerkingen noodzakelijk zijn.

Er bestaan vele werkwijzen die gebruikmaken van geïmmobiliseerde of getagde nucleinezuren als probes voor TNAs. Het is echter moeilijk indien gebruik wordt gemaakt van
25 bekende werkwijzen om onderscheid te maken tussen een TNA gebonden aan het Probe Nucleïnezuur (PNA) ten opzichte van een CNA die gebonden is aan de PNA. Een of meer base-misparingen tussen bijvoorbeeld de PNA en de CNA kunnen nog steeds resulteren in een PNA en een CNA hybridisatie die
30 bijna niet te onderscheiden is van een TNA-PNA hybridisatie. Hybridisatie alleen is dus niet een optimale indicator dat een PNA gehybridiseerd heeft met een unieke TNA.

Er bestaan vele situaties waarin een PNA moet worden gebruikt om te pogen om onderscheid te maken of een TNA

aanwezig was in een monster dat CNAs kan bevatten.

Hybridisatie van de PNA aan enige CNA in deze situatie zal de diagnostische waarde limiteren die de PNA kan hebben voor de detectie van een TNA in de afwezigheid van een additionele
 5 verificatie. Daarnaast is het wenselijk om in staat te zijn tot het detecteren en lokaliseren van de TNAs met lage kopie-aantallen in monsters die vele kopieën van CNAs bevatten zonder genoodzaakt te zijn tot het creëren van additionele kopieën van de TNA. Het zou ook wenselijk zijn in staat te
 10 zijn om de aanwezigheid van CNAs te bevestigen onafhankelijk van de TNAs zonder dat het noodzakelijk is de CNAs en TNAs in het monster te scheiden.

Daarnaast zou het wenselijk zijn in staat te zijn tot het amplificeren van het signaal of zelfs een lage
 15 frequentiehybridisatie van een specifiek TNA-PNA. Voor dit doel zou een werkwijze voor het polymeriseren van meerdere kopieën van een label, die hierna worden aangeduid als Booster Nucleïnezuur (BNA) op de TNA-PNA wenselijk zijn.

De onderhavige uitvinding verschaft werkwijzen en
 20 composities voor het verschaffen van de hiervoor genoemde en gewenste doelen. Zoals wordt beschreven in de volgende beschrijving, zijn de onderhavige composities en werkwijzen niet eerder gerapporteerd of gesuggereerd in het vakgebied. Een algemeen en volledig overzicht van de stand der techniek
 25 met betrekking tot nucleïnezuurdetectie wordt verschaft in Keller, H., M.M. Manak (1989) *DNA Probes*, Stocton Press.

Een werkwijze is beschreven voor het detecteren van basepaar misparingen met behulp van chemische middelen met als doel het in staat zijn tot het bepalen of een PNA
 30 gehybridiseerd is aan een CNA in plaats van aan een TNA. In het Amerikaanse octrooi No. 4,794,075 van Ford et al., wordt een werkwijze beschrijven voor het onderscheid maken tussen DNA fragmenten die enkele basepaar misparingen bevatten en hun perfect gepaarde homologen. Enkel-strengs gebieden in een
 35 duplex fragment worden gemodificeerd met carbodiimide, welke

reageert met niet-gepaarde guanine (G) en thymine (T) residuen in DNA. Lineaire duplex DNA moleculen zullen niet reageren, terwijl DNA moleculen met enkele base misparingen kwantitatief zullen reageren. Volgend op de reactie van

5 carbodiimide worden de DNA moleculen gefractioneerd op polyacrylamide gelen met een hoog percentage zodanig, dat de gemodificeerde en niet-gemodificeerde fragmenten kunnen worden onderscheiden. Ford et al., paste deze techniek toe met als doel het lokaliseren en zuiveren van DNA

10 sequentieverschillen die verantwoordelijk zijn voor fenotypevariatie en over-geërfde ziekten. Hoewel deze werkwijze bruikbaar is voor het volgen van variaties in genetisch materiaal, bestaat deze uit een groot aantal stappen, zijn er voor deze dure componenten nodig en

15 verschaft deze geen directe middelen voor het bepalen of een PNA gehybridiseerd heeft aan een TNA, waarbij CNAs in het monster worden uitgesloten.

Er zijn verschillende pogingen ondernomen om er zeker van te zijn dat ten minste een gedeelte van de hybridisatie

20 tussen de PAN en andere nucleinezuren complementair is. Een werkwijze betreft het monitoren van de transcriptie producten die worden geproduceerd indien de PNA hybridiseert aan een nucleïnezuur die voldoende wordt getranscribeerd vanaf een promotorpositie die aanwezig is in de probe. Het Amerikaanse

25 octrooi No. 5,215,899 van Dattagupta beschrijft hoe specifieke nucleïnezuur sequenties worden geamplificeerd door gebruik te maken van een hairpin probe die, na hybridisatie met een ligatie aan een target sequentie, in staat is om te worden getranscribeerd. De probe omvat een enkel-strengs

30 zelf-complementaire sequentie die, onder hybridisatie-omstandigheden, een hairpin structuur vormt met een functioneel promotorgebied en deze omvat verder een enkel-strengs probe sequentie die zich uitstrekt vanaf het 3'-uiteinde van de hairpin sequentie. Na hybridisatie met een

35 target sequentie die complementair is aan de probe, en legatie van het 3' uiteinde van de gehybridiseerde target

sequentie aan het 5' uiteinde de hairpin probe, wordt de target sequentie transcribeerbaar gemaakt in de aanwezigheid van een geschikte RNA polymerase en geschikte ribonucleoside trifosfaten (rNTPs). De amplificatie wordt verschaft door middel van een hybridisatie van gewenste TNA sequentie met de probe, het ligeren van de TNA aan de PNA en het toevoegen van de RNA polymerase rNTPs aan de gescheiden hybriden, en het verschaffen dat de transcriptie voortgang vindt totdat een gewenste hoeveelheid van het RNA transcriptieproduct geactiveerd is. Deze werkwijze betreft in het algemeen en specifiek het gebruik van hairpin DNA dat wordt gevormd met een enkel-strengs niet-gepaard uiteinde dat geanneald is aan een target sequentie. Indien de target sequentie gebonden is wordt de productie van RNA transcriptieproducten verschaft. De werkwijze betreft dus de detectie van secundaire transcriptieproducten in plaats van het gebruik van de nucleïnezuur binding constructie voor het direct immobiliseren en/of lokaliseren van een target sequentie. Een CNA kan eenvoudig binden aan de probe en het gebrek aan complementatie interfereert niet noodzakelijk met de vorming van een CNA/PNA hybride welke op zijn beurt hierna de productie kan ondersteunen van niet-gewenste transcriptieproducten.

Een CNA gevonden aan de PNA kan worden gedetecteerd indien het gebrek aan complementariteit interfereert met de ontvankelijk van het hybride CNA-PNA paar dat moet worden geknipt met behulp van restrictie-endonuclease. In het Amerikaanse octrooi No. 5,118,605 van Urdea en het Amerikaanse octrooi No. 4,775,619 van Urdea worden nieuwe werkwijzen voor het testen van een nucleïnezuur analyt verschaft welke gebruik maken van polynucleotiden met oligonucleotidesequenties die in hoofdzaak homoloog zijn aan een bepaalde sequentie in het monster waarbij de aanwezigheid of afwezigheid van de hybridisatie met een voorafbepaalde stringentie de vrijmaking verschaft van een label vanaf een ondersteuning. Verschillende technieken worden gebruikt voor

het binden van een label aan een ondersteuning waarbij na splitsing van ofwel een enkele of een dubbele streng een label kan worden vrijgemaakt vanaf een ondersteuning en de vrijmaking van het label kan worden gedetecteerd als zijnde
 5 indicatief voor de aanwezigheid van een specifieke polynucleotide sequentie in het monster. Deze techniek heeft echter het nadeel dat een CNA-PNA paar kan worden geknipt door de restrictie-endonuclease zelfs in het geval van een misparing indien de misparing zich buiten het endonuclease
 10 herkenningsgebied bevindt. Dit zou leiden tot het falen van de test voor het identificeren van een CNA-PNA hybride.

Een andere werkwijze maakt gebruik van een vertakte DNA probe voor het detecteren van nucleinezuren. Het Amerikaanse octrooi No. 5,124,246 van Urdea et al., betreft
 15 lineaire of vertakte oligonucleotide multimeren die bruikbaar zijn als versterkers in biochemische testen welke omvatten (1) ten minste één eerste enkel-strengs nucleotide-eenheid (PNA) die complementair is aan een bepaalde enkel-strengs oligonucleotide sequentie (TNA), en (2) een veelvoud van
 20 tweede enkel-strengs oligonucleotide eenheden die complementair zijn aan een enkel-strengs gelabeld oligonucleotide. Hoewel de geamplificeerde sandwich nucleotidezuur hybridisaties en immuno-assays die gebruikmaken van multimeren, worden beschreven, heeft de
 25 werkwijze de beperking dat PNA-CNA hybridisatie kan optreden en die zou resulteren in een productie van een ongewild signaal.

Naast de werkwijzen voor de identificatie van TNAs zijn werkwijzen beschreven voor de amplificatie van dit DNA.
 30 In het Amerikaanse octrooi No. 5,200,314 van Urdea, wordt een analyt polynucleotide streng met een analyt sequentie (TNA) gedetecteerd in een monster dat polynucleotide bevat door middel van het in contact brengen van de analyt polynucleotide met een vang probe (PNA) onder hybridisatie-
 35 omstandigheden waarbij de vang probe een eerste

bindingspartner bezit die specifiek is voor de TNA en een tweede bindingssequentie die specifiek is voor een vaste fase derde bindingspartner. De resulterende duplex wordt hierna geïmmobiliseerd door middel van een specifieke binding tussen
5 de bindingspartners en de niet-gebonden polynucleotiden worden gescheiden van de gebonden soorten. Het analyt polynucleotide wordt optioneel verplaatst van de vaste fase en hierna geamplificeerd met behulp van PCR. De PCR primers bezitten elk een polynucleotide gebied dat in staat is tot
10 het hybridiseren aan een gebied van het analyt polynucleotide en ten minste één van de primers bezit daarnaast verder een additionele bindingspartner die in staat is tot het binden aan een vaste fase bindingspartner. Het geamplificeerde product wordt hierna gescheiden van het reactiemengsel door
15 middel van een specifieke binding tussen de bindingspartners en het geamplificeerde product wordt gedetecteerd. Hoewel het mogelijk is om te bevestigen (door middel van PCR) dat een specifiek nucleïnezuur heeft gehybridiseerd met de PNA is een bevestiging duur en betreft meerdere stappen.

20 Met betrekking tot beschrijvingen die betrekking hebben op de interactie van een dubbel-strengs nucleïnezuur en een DNA-bindend eiwit wordt een werkwijze beschreven waarbij een sequentie van geïmmobiliseerd DNA welke bindingsplaatsen bevat voor een enkel eiwit gebruikt voor het
25 zuiveren van het eiwit. Het Amerikaanse octrooi No. 5,122,600 van Kawaguchi et al., betreft een DNA-immobiliserende microsfeer die DNA ketens omvat met basesequenties die specifiek binden aan een specifiek eiwit en een drager met een deeltjesgrootte van niet meer dan 50 μm en niet minder
30 dan 0,01 μm welke geen enkel eiwit absorbeert waarbij de genoemde drager en de genoemde DNA ketens aan elkaar zijn gebonden door middel van een chemische binding, en een werkwijze voor het zuiveren van een eiwit door gebruik te maken van de genoemde microsfeer. Omdat dit een
35 zuiveringswerkwijze is voor een eiwit betreft dit niet een werkwijze voor de detectie van een TNA noch een werkwijze

waarbij meer dan één eiwit wordt gebonden aan een dubbel-strengs nucleïnezuur voor het detecteren en lokaliseren van specifieke TNA sequenties.

EP-A-0453301 beschrijft een werkwijze voor het
5 detecteren van een polynucleotide target sequentie in een monster waarbij de sequenties in een TNA worden gedetecteerd door middel van het hybridiseren van eerste en tweede TNAs aan de PNAs. Elke PNA omvat een vooraf-gevormde duplex, of een duplex die gevormd is door middel van ketenextensie welke
10 in staat is tot binding van een nucleïne sequentie-specifiek bindend eiwit.

EP-A-0147665 beschrijft ook het gebruik van sequentie-specifieke duplex-bindende eiwitten als detectiemiddelen in een hybridisatie assay. Opnieuw is de
15 duplex probe vooraf gevormd.

EP-A-0450594 betreft een mogelijkheid tot het labelen van zogenaamde ontwikkelingsmoleculen met duplex sequentie-specifieke bindingen, zoals bijvoorbeeld bepaalde intercollators. Deze verbindingen worden bevestigd aan de
20 ontwikkelmoleculen voor de hybridisatie.

US-A-4556643 betreft de niet-radioactieve detectie van specifieke nucleotidesequenties in een monster en betreft de hybridisatie van een probe die DNA-binding eiwit-specifieke sequenties bevat.

25 WO93/00446 betreft enkel-strengs oligonucleotiden die een gedeelte omvatten welke, indien deze dubbel-strengs wordt gemaakt, bindt aan het UL9 eiwit verkregen uit het Herpes simplex virus en verder een gedeelte dat, indien dit dubbel-strengs wordt gemaakt, bindt aan intercollaterende
30 verbindingen.

Samenvatting van de uitvinding

Deze uitvinding die wordt gedefinieerd in de hierbij behorende conclusies verschaft werkwijzen waarbij specifiek Target Nucleïne Zuur (TNA) sequenties worden gedetecteerd door gebruik te maken van Probe Nucleïne Zuren (PNAs) die, na
 5 hybridisatie met de TNAs, in staat zijn tot het binden aan Target Binding Structuren (TBAs). Elk TBA bindt ten minste één specifiek gebied van het PNA-TNA hybridepaar in het Target Binding Gebied (TBR). De TBA omvat één of meer moleculen, waarvan één of meer kunnen binden aan de TBR
 10 sequenties op een specifieke sequentie- of conformatie-afhankelijke wijze. De TBA kan één of meer piloot sequenties omvatten "PILOTS" of "Asymmetrische Sequenties" die de nucleotide binding componenten van de TBA assembleren en beperken tot specifieke geometrie. De PILOTS dienen voor het
 15 samenstellen van specifieke nucleïnezuur herkenningseenheden of andere pilots waaraan specifieke nucleïnezuur herkenningseenheden zijn bevestigd in de TBAs op een vooraf bepaalde wijze. De TBA kan ook één of meer moleculen bevatten die de TBA verankeren of lokaliseren.

20 De PNAs volgens de uitvinding worden gedefinieerd in conclusie 1. Het gebruik van deze nucleinezuren wordt gedefinieerd in andere conclusies als ook de kits die deze omvatten.

De PNAs, naast de TNA-specifieke sequenties, bevatten
 25 ook één of meer sequenties, $\frac{1}{2}$ BBRs die in staat zijn tot het hybridiseren met complementaire $\frac{1}{2}$ BBRs in Booster Nucleïne Zuren (BNAs). Door middel van hybridisatie van toegevoegde BNAs aan de uitgang $\frac{1}{2}$ BBRs aanwezig in de PNAs, worden extensies van de PNAs uitgevoerd in de vorm van PNA-BNA en
 30 hierna BNA-BNA hybriden. Deze extensies omvatten één of meer Booster Binding Gebieden (BBRs). Elke BBR is in staat tot het binden van een Booster Binding Constructie (BBA). De BBA omvat moleculen waarvan één of meer in staat zijn tot het binden van een BBR op een specifieke sequentie- of
 35 conformatie-afhankelijke wijze. De BBA kan één of meer piloot

sequenties omvatten aangeduid als "PILOTS" of "Asymmetrische Sequenties" welke kunnen assembleren en beperken de nucleotide bindingscomponenten van de TBA tot specifieke geometrie. De PILOTS dienen voor het assembleren van

5 specifieke nucleïnezuur herkenningseenheden of andere pilots waaraan specifieke nucleïnezuur herkenningseenheden zijn bevestigd in de BBAs op een voorafbepaalde wijze. De BBA kan moleculen die de BBA verankeren of lokaliseren of welke de detectie verschaffen van de gebonden BBAs en daarmee van de

10 TBA-TNA-PNA complexen waaraan zijn, op hun beurt, gebonden zijn. Er worden werkwijzen en composities beschreven voor gebruik van de $\frac{1}{2}$ BBRs, BNAs, BBRs, BBAs en BBA PILOTS, waaronder hun gebruik als componenten van diagnostische of forensische test kits.

15 Werkwijzen en composities worden beschreven voor testprocedures en de productie van een test kit welke PNAs bevat, TBAs, TBRs, BNAs, BBRs en BBAs en HNAs voor de detectie, lokalisatie en differentiatie van specifieke nucleïnezuur sequenties waaronder nucleïnezuur sequenties die

20 worden gevonden in humane cellen, in het Humane Immunodeficiëntie Virus (HIV), het Humane Papillomavirus (HPV), en in andere nucleïnezuur-bevattende systemen, waaronder virussen en bacteriën.

 In overeenstemming hiermee is het een doel van de

25 uitvinding het verschaffen van werkwijzen en composities voor gebruik bij de binding, detectie, en amplificatie van de detectie van specifieke Target Nucleïne Zuur sequenties in een monster met betrouwbaarheid en accuratesse zelfs in de aanwezigheid van zeer gerelateerde maar verschillende

30 nucleïnezuur sequenties.

 In overeenstemming hiermee is het een doel van deze uitvinding het verschaffen van werkwijzen en composities van de creatie van Target Binding Structuren die specifiek binden aan Target Binding Gebieden die worden gevormd door de

hybridisatie van Probe Nucleïne Zuren en Target Nucleïne Zuur sequenties.

Een ander doel van deze uitvinding is het verschaffen van een werkwijze en composities van de creatie van Booster
 5 Binding Structuren die specifiek binden aan Booster Binding Gebieden die worden gevormd door de hybridisatie van Booster Nucleïne Zuur sequenties met Probe Nucleïne Zuur, Booster Nucleïne Zuren en Hairpin Nucleïne Zuren.

Een ander doel van deze uitvinding is het verschaffen
 10 van een werkwijze en composities voor gebruik bij het amplificeren van de detectie van Target Binding Structuren die gebonden zijn aan Target Binding Gebieden waarbij gebruik wordt gemaakt van Booster Binding Structuren en Booster Nucleïne Zuren.

Een ander doel van deze uitvinding is het verschaffen van een werkwijze en composities die het gebruik verschaffen van één of meer detecteerbare labels waaronder, maar niet
 15 limiterend, radioactieve labels, licht-uitstralende labels, fluorescerende labels, enzymatische of andere signaal-genererende moleculen. Deze labels worden gebruikt samen met
 20 de Probe Nucleïne Zuren, de Target Binding Structuren, de Booster Binding Structuren, de Booster Nucleïne Zuren of de Hairpin Nucleïne Zuren.

25 Korte Beschrijving van de tekeningen

De volgende illustraties zijn aanwezig in Figuur 1:
 Figuur 1-I is een PNA die een $\frac{1}{2}$ TBR bevat welke een enkel-
 strengs sequentie is die complementair is aan een TNA en een
 30 $\frac{1}{2}$ BBR sequentie. Figuur 1-IIa is een TNA waaraan de componenten zijn toegevoegd van Figuur 1-I, en, onder hybridisatie-omstandigheden, bindt de PNA zodat gevormd wordt de componenten volgens Figuur 1-IIIa, een PNA-TNA hybride die ten minste één TBR bevat. Figuur 1-IVa is een BNA welke wordt

toegevoegd aan de componenten van Figuur 1-IIIa en, onder hybridisatie-omstandigheden, bindt deze de $\frac{1}{2}$ BBR volgens Figuur 1-IIIa zodat gevormd wordt een PNA-BNA hybride die een BBR bevat die getoond wordt in Figuur 1-Va.

5 Figuur 1-IIb is een BNA welke wordt toegevoegd aan de componenten volgens Figuur 1-I, en welke verder, onder hybridisatie-omstandigheden bindt aan de PNA zodat gevormd wordt de componenten volgens Figuur 1-IIIb, een PNA-TNA hybride die een BBR Figuur 1-IVb bevat is een TNA waaraan
10 toegevoegd wordt de componenten volgens Figuur 1-IIIb en welke, onder hybridisatie-omstandigheden bindt aan de $\frac{1}{2}$ TBR volgens Figuur 1-IIIb zodat gevormd wordt een PNA-BNA hybride die een TBR bevat die getoond wordt in Figuur 1-Vb.

 Figuur 1-IIc is een HNA welke wordt toegevoegd aan de
15 componenten volgens Figuur 1-I en welke, onder hybridisatie-omstandigheden, bindt aan de PNA zodat gevormd wordt de componenten volgens Figuur 1-IIIc, een PNA-HNA hybride die een BBR Figuur 1-IVc bevat is een TNA welke is toegevoegd aan de componenten volgens Figuur 1-IIIc en welke, onder
20 hybridisatie-omstandigheden, bindt aan $1/2$ TBR volgens Figuur 1-IIIc zodat gevormd wordt een PNA-BNA hybride die een BBR bevat die getoond wordt in Figuur 1-Vc.

 De hybriden die de TBRs en BBRs vormen zijn bruikbaar volgens de onderhavige uitvinding. De PNAs en BNAs, zoals
25 aangeduid wordt in Figuur 1, kunnen geen bevestigde ondersteuning en/of indicator (OSA) bevatten, of een bevestigde ondersteuning of andere middelen van lokalisatie waaronder, maar niet limiterend, een bevestiging aan korrels, polymeren en oppervlakten en/of indicatoren.

30 Figuur 2a is een strategiediagram voor polymerisatie van BNAs op PNAs en "capping" van HNAs.

 Figuur 2b is een diagram van additionele strategieën voor de amplificatie van PNA-TNA signalen door middel van polymerisatie van BNAs en "capping" door middel van HNAs.

Figuur 3 is een diagram welke het gebruik toont van DNAs die meerdere $1/2$ BBRs bevatten per BNA.

Figuur 4a is a diagram welke de binding toont van TBAs en BBAs aan TBRs en BBRs en het in staat zijn van de TBA onderscheid te maken tussen TNAs en CNAs. Volgens deze uitvoeringsvorm, indien de TBA is geïmmobiliseerd ofwel op een korrel, een microtiterplaat oppervlakte of dergelijk ander oppervlak complexeert slechts als complex X welke wordt vastgehouden en gedetecteerd terwijl complexen zoals complex XI dit niet doen.

Figuur 4b is een diagram welke een voorbeeld geeft van gebeurtenissen die vergelijkbaar zijn aan diegene die worden getoond in Figuur 4a maar in een verschillende volgorde van optreden.

Figuur 5 is een diagram die een voorbeeld geeft van PNAs die tussen één $1/2$ TBR bevatten en geen $1/2$ BBRs tot PNAs die tot en met vijf $1/2$ TBRs bevatten en één $1/2$ BBR. De (a) en (b) leden van elk geheel getal (I, II, III, IV, V) vormen een reeks welke, na hybridisatie aan de TNA, TBRs verschaft ofwel met ((a) leden) of zonder ((b) leden) een beschikbare $1/2$ BBR voor amplificatie door middel van hybridisatie van de BNAs die complementair zijn aan de $1/2$ BBRs.

Figuur 6a is een diagram die een voorbeeld geeft van een specifieke TNA met een $1/2$ TBRs die, na binding aan een geschikte PNA, twee zeer gerelateerde TBRs vormt die in staat zijn tot binding aan twee TBAs. Een $1/2$ BBR wordt ook verschaft voor amplificatie.

Figuur 6b is een diagram welke dezelfde gebeurtenissen toont als in Figuur 6a, behalve dat in dit geval een dubbele TBA wordt gebruikt zodat een onderscheid kan worden verschaft tussen enkele TBRs wat optreedt in normale cellulaire monsters tussen abnormale dubbele TBRs.

Figuur 6c is een diagram welke hetzelfde scenario toont als in Figuur 6a, behalve dat in dit geval 5 TBRs

worden geïdentificeerd in de TNA. Elke TBR kan zijn gebonden aan dezelfde TBR of een verschillende en elke TBA kan verschillend zijn gelabeld wat de bevestiging verschaft dat vijf posities aanwezig zijn in de TNA.

5 Figuur 6d is een diagram van dezelfde gebeurtenissen zoals in Figuur 6c, behalve dat in dit geval een dubbele TBA wordt getoond die zich uitstrekt ten opzichte van wat wordt getoond in Figuur 6b ten opzichte van het gebruik van de dubbele TBA. Een voorbeeld van de TNA die wordt getoond in
10 onderdeel II in de Figuren 6a, 6b, 6c en 6d is een HIV enkelstrengs DNA of RNA.

Figuur 7 toont de HIV LTR als een TNA, en twee PNAs en een strategie voor het detecteren van de TNA waarbij gebruik wordt gemaakt van de PNAs.

15 Figuur 8 is een schematische weergave van één uitvoeringsvorm volgens de uitvinding waarbij een target binding constructie wordt gebruikt voor het binden van een hybride TNA-PNA en booster binding constructies worden gebruikt voor het binden van de gepolymeriseerde BNAs.

20 Figuur 9 is een schematische weergave van een modulaire TBA waarin constructiesequenties, verbindingsequenties en asymmetrische sequenties worden gebruikt voor het chaperonneren van de gewenste nucleïnezuur herkenningseenheden en deze vormen samen een TBA.

25 Figuur 10 toont modulaire TBAs die bruikbaar zijn voor de detectie van HIV-specifieke sequenties.

Figuur 11 toont modulaire TBAs die bruikbaar zijn voor de detectie van humane Papillomavirus sequenties. Elke eenheid E2 is in feite een dimeer van het DNA-bindend
30 gedeelte van E2.

Figuur 12a is een schematische weergave van een TNA scheiding en een verschuiving van de mobiliteit vanwege de binding van een TNA.

Figuur 12b is een schematische weergave van een TNA scheiding en een versterkte verschuiving van de mobiliteit vanwege de binding van BBAs naast die van TBAs.

Figuur 13 toont een detectiestrategie voor
5 deletiesequenties; een voorbeeld van het gebruik van deze strategie is voor een humane papillomavirus integratie assay.

Figuur 14 toont een constructie van hogere orde TBAs door gebruik te maken van nucleïnezuur herkenningseenheden, bindingssequenties, structuur-vormende sequenties, en
10 asymmetrische sequenties, zodanig dat verschillende target binding structuren die specifiek zijn voor bindingsplaatsen van de HIV LTR worden gevormd.

Figuur 15 toont de constructie van hogere orde TBAs door gebruik te maken van DNA herkenningseenheden,
15 bindingssequenties, constructiesequenties en asymmetrische sequenties, zodanig dat verschillende target bindingsconstructies die specifiek zijn voor bindingsplaatsen van het HPV genoom worden gevormd.

Figuur 16 toont het onderscheid dat wordt verschaft
20 door gebruik te maken van een complexe TBA en het in staat zijn van een endogene competitie target bindingsmoleculen tot het elimineren van de binding aan de TBA aan een neven nucleïnezuur maar niet die van de TNA welke aanwezig is in de geschikte oriëntatie van meer dan één of meer posities die
25 worden herkend door de TBA.

Figuur 17 toont het in staat zijn van een TBA tot het specifiek targeten zodat posities worden gebonden waar sequentie-misparing optreedt en deze preferentieel die posities ten opzichte van nevenposities die niet alle
30 getargete misparingen bevatten.

Korte beschrijving van de sequenties

SEQ ID NO. 1 komt overeen met Figuur 5-Ia-1 en toont de klasse I MHC NF-kB bindingspositie.

SEQ ID NO. 2 komt overeen met Figuur 5(Ia) en toont de B2-microglobuline NF-kB bindingspositie.

5 SEQ ID NO. 3 komt overeen met Figuur (Ia) en toont de kappa immunoglobuline NF-kB bindingspositie.

SEQ ID NO. 4 komt overeen met Figuur 5 (Ia) en toont één van de HIV NF-kB bindingsposities.

10 SEQ ID NO. 5 komt overeen met Figuur 5 (Ia) en toont één van de HIV NF-kB bindingsposities.

SEQ ID NO. 6 komt overeen met Figuur 5 (Ia) en toont de c-myc NF-kB bindingspositie.

SEQ IDNO.7 komt overeen met Figuur 5 (IIa) en toont een dubbele HIV NF-kB bindingspositie.

15 SEQ ID NO.8 komt overeen met Figuur 5 (IIa) en toont een dubbele HIV NF-kB bindingspositie.

20 SEQ ID NOS. 9-16 komen overeen met Figuur 5 (IIa) en tonen een dubbele bindingspositie waarbij één positie een HIV NF-kB bindingspositie is en de andere positie is een HIV SP 1 bindingspositie.

SEQ ID NOS. 17-18 komen overeen met Figuur 5(IIa) en tonen een dubbele HIV SP1 bindingspositie.

25 SEQ ID NOS. 19-31 komen overeen met Figuur 5 (IIIa) en tonen een dubbele HIV NF-kB bindingspositie en een HIV SP1 bindingspositie.

SEQ ID NOS. 32-33 komen overeen met Figuur 5 (IVa) en tonen een viervoudige bindingspositie waarbij twee posities HIV NF-kB bindingspositief zijn en twee posities zijn HIV SP1 bindingsposities.

30 SEQ ID NO. 34 komt overeen met Figuur 5 (VIa) en toont een vijfvoudige bindingsplaats waarbij twee posities HIV NF-kB bindingsposities zijn en drie posities zijn HIV SP1 bindingsposities.

SEQ ID NO. 35 is een voorbeeld van een 1/2 BBR, in dit geval OL1, OL2 en OL3 elementen van de bacteriofaag lambda linker operator waaronder de tussenliggende sequenties.

5 SEQ ID NO. 36 is een voorbeeld van een 1/2 BBR, in dit geval de OR3, OR2 en OR1 elementen van de bacteriofaag lambda rechter operator, waaronder de tussenliggende sequenties.

SEQ ID NO: 37 is de HIV LTR.

10 SEQ ID NO. 38 is a PNA complementair aan de PNA van de HIV LTR.

SEQ ID NO. 39 is een PNA complementair aan een verschillende PNA van de HIV LTR ten opzichte van SEQ ID NO.38.

15 SEQ ID NO. 40 is een PNA complementair aan een gedeelte van de HIV LTR en deze bevat ook een 1/2 BBR en een overlap sequentie voor het polymeriseren van de BNAs aan de PNAs.

20 SEQ ID NO. 41 is een BNA complementair aan de SEQ IDNO.40 ½ BBR.

SEQ ID NO. 42 is een BNA die zal polymeriseren op de SEQ ID NO. 41 BNA en welke, met SEQ ID NOS. 40 en 41, een *Pst*I herkenningsplaats.

25 SEQ ID NO. 43 is een BNA die complementair is aan de SEQ ID NO: 42 BNA en welke een *Bam*HI herkenningsplaats complementeert.

30 SEQ ID NO. 44 is een HNA welke een *Bam*HI herkenningsplaats bevat welke kan hybridiseren met de *Bam*HI herkenningsplaats die wordt gecreëerd met behulp van SEQ ID NOS. 42 en 43 op de groeiende polymeer.

SEQ ID NO. 45 is een tweede PNA, die, zoals SEQ ID NO. 40, complementair is aan een gedeelte van de HIV LTR maar niet aan dezelfde sequentie zoals in SEQ ID NO. 40. SEQ ID

NO. 45 codeert ook voor een 1/2 BBR en een overlap welke polymerisatie zal verschaffen van de BNAs startend vanaf een Sph1 herkenningsplaats.

5 SEQ ID NOS. 46-62 zijn humane papillomavirus (HPV) specifieke PNAs die, na hybridisatie met HPV sequenties, TBRs vormen, die binden aan HPV DNA bindingseiwitten.

SEQ ID NOS. 63-71 zijn NF-kB DNA herkenningseenheden voor incorporatie in TBAs.

SEQ ID NO. 72 is een nucleaire lokalisatiesequentie.

10 SEQ ID NO.73 is een SP1 sequentie herkenningseenheid.

SEQ ID NO. 74 is een TATA bindingseiwit herkenningseenheid.

SEQ ID NOS. 75-84 zijn papillomavirus E2 DNA herkenningseenheden.

15 SEQ ID NOS. 85-92 zijn asymmetrische sequenties.

SEQ ID NO. 93 is een arabidopsis TATA bindingseiwit herkenningseenheid.

SEQ ID NO. 94 is een HPV-16-E2-1 DNA bindingseiwit herkenningseenheid.

20 SEQ ID NO. 95 is een HPV-16-E2-2 DNA bindingseiwit herkenningseenheid.

SEQ ID NO. 96 is een HPV-18-E2 DNA bindingseiwit herkenningseenheid.

25 SEQ ID NO. 97 is een HPV-33-E2 DNA bindingseiwit herkenningseenheid.

SEQ ID NO. 98 is een bovine papillomavirus E2 DNA bindingseiwit herkenningseenheid.

SEQ ID NOS. 99-102 zijn voorbeeld-bindingssequenties.

30 SEQ ID NO. 103 is een voorbeeld-nucleaire lokalisatiesignaalsequentie (NLS).

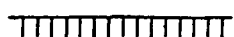
SEQ ID NOS. 104-108 zijn voorbeeld-chaperonne sequenties.

SEQ ID NOS. 109-116 zijn voorbeeld-samengestelde TBA sequenties.

SEQ ID NO. 117 is een consensus NF-kB bindingspositie.

5 SEQ ID NO. 118 is een HIV Tat aminozuursequentie.

Afkortingen



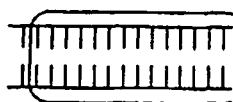
10

enkel-strengs nucleinezuur



15

dubbel-strengs nucleinezuur



20

bindingsgebied op nucleinezuur



25 geen ondersteuning of indicators, of vaste ondersteuning of andere middelen van lokalisatie, waaronder, maar niet limiterend, een bevestiging aan korrels, polymeren en oppervlakten of indicators = OSA

30 BBA booster binding constructie

	BBR	booster binding gebied
	BNA	booster nucleinezuur
	CNA	neven-nucleinezuur
5	1/2 BBR	enkel-strengs gebied dat, indien deze gehybridiseerd is aan de complementaire sequentie van een HNA of een BNA, in staat is tot het binden van een BBA
10	1/2 TBR	enkel-strengs gebied van de PNA die, indien hybridiseert aan de complementaire sequentie van een TNA, in staat is tot het binden van een TBA
	OSA	Optionele ondersteuning of bevestiging, cirkel met vierkant
	PNA	probe nucleinezuur
	TBA	target binding constructie
15	TBR	target binding gebied
	TNA	target nucleinezuur
	HNA	Hairpin Nucleinezuur

Definities

20

Er moet ook worden begrepen uit de beschrijving die hierna volgt dat indien wordt vermeld dat dergelijke termen zoals target binding constructies (TBAs), booster binding constructies (BBAs), DNA bindende eiwitten, nucleinezuur
 25 bindende eiwitten of RNA bindende eiwitten, composities worden bedoeld die moleculen bevatten welke binden aan DNA of RNA target nucleinezuur sequenties (TNAs) onafhankelijk van de specificiteit van de categorie van bindingsmoleculen waarvan zij zijn verkregen. Een TBA uitgevoerd voor het
 30 binden aan humane immunodeficiëntie virus sequenties kan dus bijvoorbeeld bijna gelijkwaardig zijn aan een NF-KB transcriptionele factor welke in het algemeen DNA sequenties

bindt. Zoals hierin echter wordt gebruikt moet worden begrepen dat de TBA kan zijn uitgevoerd voor optimaal gebruik tot het binden van RNA sequenties van een specifieke sequentiecompositie of conformatie.

5 De betrouwbaarheid van de detectiewerkwijze die hierin wordt beschreven is in grote mate afhankelijk van de selectieve binding van de TBAs en BBAs aan specifieke nucleïnezuur motieven. Het moet worden begrepen dat in deze hele beschrijving de basis van TBA en BBA discriminatie van
 10 TNAs ten opzichte van gerelateerde sequenties (neven-nucleinezuren of CNAs) de vorming kan zijn van exacte probe nucleïnezuur (PNA)-target nucleïnezuur (TNA) hybridesegmenten (PNA-TNA hybriden). De basis van onderscheid echter kan ook de vorming zijn van een specifieke conformatie en hiervan kan
 15 niet de complete afwezigheid of misparing baseparing nodig zijn in de TNA-PNA hybriden. In overeenstemming hiermee moet worden begrepen dat de basis van de TBA of BBA werking hierin afhankelijk is van het onderscheid van elke unieke eigenschap van de TNA-PNA hybride ten opzichte van elke eigenschap die
 20 wordt verschaft door elke PNA-CNA hybride die kan worden gevormd in een testmonster dat in contact is gebracht met een bepaalde PNA.

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding

25 De onderhavige uitvinding wordt gedefinieerd in de bijgevoegde conclusies. Er wordt een werkwijze verschaft voor het specifiek identificeren van een target nucleïnezuur (TNA) in een monster door gebruik te maken van target binding
 30 structuren (TBAs) in welke specifieke nucleïnezuur-bindende eiwitten zijn geïncorporeerd. Door gebruik te maken van probe nucleinezuren (PNAs) die specifiek zijn voor een bepaalde TNA sequentie en een TBA welke specifiek is voor het duplex target binding gebied (TBR) dat gevormd wordt door de
 35 formatie van hybride TNA-PNA sequenties, wordt een stabiel

TBA-TNA-PNA complex gevormd. Door het additioneel verschaffen van specifiek amplificeerbare sequenties in de PNA, naast de sequenties die specifiek bijdragen aan de vorming van de TBR die wordt herkend door de TBA, wordt de binding van de PNA aan de TNA gedetecteerd en de detectie wordt geamplificeerd. Voor dit doel kan gebruik worden gemaakt van elk van een aantal nucleïnezuur amplificatiesystemen waaronder de polymerase kettingreactie of het gebruik van vertakte DNA, waarbij elke vertakking daarvan een detecteerbaar label bevat. Specifiek wordt een nieuwe werkwijze voor amplificatie hierin beschreven waarbij het amplificeerbare gedeelte van de PNA sequenties bevat waarop booster nucleinezuren (BNAs) kunnen worden gepolymeriseerd. Na de vorming van elke BNA-PNA hybride wordt een booster binding gebied (BBR) gevormd waarop een booster binding constructie (BBA) specifiek bindt. Indien detecteerbaar gelabeld verschaffen de BBAs of BNAs in hoofdzaak een niet-gelimiteerde amplificatie van de originele TNA-PNA bindingsgebeurtenis.

Volgens deze uitvinding moet worden begrepen dat de TNA omvat specifieke nucleïnezuursequenties. De TBA moet worden begrepen te zijn elke moleculaire constructie welke in staat is tot het specifiek en straf binden aan een gevormde TNA-PNA hybride. De TBA zal één of meer moleculen bevatten wiens sequenties voldoende zijn voor het binden aan de TBR nucleïnezuur-bindende domeinen waarvan bekend is dat deze ofwel direct kunnen worden gebruikt als componenten van de TBA ofwel worden gemodificeerd afhankelijk van wat hierin wordt geleerd. De meest eenvoudig beschikbare moleculen met dergelijke sequenties zijn de DNA-bindende domeinen van DNA-bindende eiwitten. Specifiek zijn vele DNA of RNA bindende eiwitten bekend die ofwel direct kunnen worden gebruik als ook als het bekende, niet-gemodificeerde eiwit of de TBA kan een nucleïnezuur-bindend eiwit zijn dat gemodificeerd is volgens hetgeen hierin specifiek wordt geleerd. In het laatste geval omvatten specifieke modificaties die zijn gewenst een optimalisatie van de bindingsaffiniteiten, de

verwijdering van ongewenste activiteiten (zoals een nuclease activiteit en reorganisatie van de TBA in de aanwezigheid van andere moleculen met een affiniteit voor componenten van de TBA), een optimalisatie van de selectiviteit van een target
 5 sequentie ten opzichte van zeer gerelateerde sequenties, en een optimalisatie van de stabiliteit.

Voorbeelden van DNA-bindende eiwitten die kunnen worden gebruikt volgens deze uitvinding zijn DNA-bindende gedeelten van de transcriptiefactor NF-kB (p50 en p65), NF-
 10 IL6, NF-AT, rel, TBP, het papillomavirus E2 eiwit, sp1, de repressors *cro* en *CI* van de bacteriofaag lambda, en hierop gelijkend eiwitten zijn goed bekende eiwitten wiens DNA-bindend gedeelte is geïsoleerd, gekloneerd, de sequentie is bepaald en gekarakteriseerd. Daarnaast bevat de uitvinding
 15 elk ander DNA-bindend eiwit of een gedeelte van een eiwit dat noodzakelijk is en voldoende voor het binden van een TBR hybride of een BBR. Deze omvat eiwitten of gedeelten van wild-type eiwitten met een veranderde DNA-bindende activiteit als ook eiwitten die zijn gecreëerd met een veranderde DNA-
 20 bindende specificiteit zoals een uitwisseling van een DNA-bindende herkenningshelix tussen één eiwit en een ander eiwit. Daarnaast kunnen eiwitten die een nucleïnezuur binding verschaffen en andere nucleïnezuurfuncties zoals restrictie-
 endonucleasen worden gebruikt als de nucleïnezuur-bindende
 25 functie. Eiwitten die binden aan target gebieden in DNA-RNA hybriden als ook RNA-RNA hybriden behoren tot de uitvinding. (Zie bijvoorbeeld, Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). De
 30 bindingsconstructies kunnen worden geconstrueerd door gebruik te maken van een molecuul dat helpt bij de vorming van gedeelten van de bindingsstructuur zodat specifieke component combinaties en geometrie kunnen worden verschaft. Dit molecuul wordt hierin aangeduid als een PILOT. Pilots kunnen
 35 eiwitten omvatten of elke combinatie van organische en anorganische materialen die de combinatoriele selectie en/of

het induceren verschaffen van specifieke geometrie tussen leden van de TBA of BBAs. Een chaperonne is een stabiel raamwerk waarop een TBA of een BBA kan worden geconstrueerd zodanig dat de correcte conformatie van de TBA of BBA wordt
 5 verschaft terwijl tegelijkertijd niet gewenste eigenschappen van een natuurlijk voorkomend nucleïnezuur-bindend eiwit worden geëlimineerd. Als een specifiek voorbeeld van deze uitvoeringsvorm wordt een gemodificeerde versie van de pleiotropische transcriptiefactor NF-kB verschaft waarbij
 10 gebruik wordt gemaakt van een gemodificeerde bacteriofaag lambda cro eiwit als de chaperonne. Elke NF-kB bindingsdimeer behoudt de picomolaire bindingsaffiniteit voor de NF-kB bindingspositie terwijl tegelijkertijd de bindingsconstructie verschillende voordeel verschaffende bereiding-,
 15 stabiliteits- en specificiteitskarakteristieken verschaft.

Gelet op wat hiervoor is beschreven, worden verschillende aspecten en uitvoeringsvormen van deze uitvinding hieronder in detail beschreven.

1. De Probe Nucleïne Zuren (PNAs) en hun bereiding. De PNAs
 20 volgens de onderhavige uitvinding omvatten ten minste drie principiële gedeelten die samen zijn gevoegd. Refererend aan Figuur 1(I) van de tekeningen, is het eerste gedeelte van de PNA één of meer sequenties of basen die worden aangeduid als "1/2 TBR". Refererend aan Figuur 1 (I en IIa) van de
 25 tekeningen is de 1/2 TBR in de PNA complementair aan een bepaalde sequentie in een monster, de TNA bevat een 1/2 TBR. Refererend aan Figuur 1 (IIIa) van de tekeningen vormt de TNA indien deze wordt toegevoegd aan de PNA onder hybridiserende omstandigheden een PNA-TNA hybride die een TBR bevat.
 30 Refererend aan Figuur 1 (I) van de tekeningen, is het tweede gedeelte van de PNA een sequentie van basen die worden aangeduid als "1/2 BBR". Refererend aan Figuur 1 (I, IIb, IIc en IVa) van de tekeningen, is de 1/2 BBR in de PNA complementair aan een 1/2 BBR die aanwezig is in een BNA of
 35 een HNA. Refererend aan Figuur 1(IIIb, IIIc en Va) van de

tekeningen, vormt de BNA of HNA, indien deze wordt toegevoegd aan de PNA onder hybridiserende omstandigheden, respectievelijk een PNA-BNA hybride of PNA-HNA hybride welke een BBR bevat. Refererend aan Figuur 1(I) van de tekeningen, is het derde gedeelte van de PNA de OSA, die wordt aangeduid door een cirkel met een vierkant daarom heen. De OSA is geen ondersteuning en/of een indicator, of een vaste ondersteuning, of enig ander middel voor lokalisatie, waaronder, maar hieraan niet gelimiteerd, een bevestiging aan korrels, polymeren en oppervlakten en/of indicatoren welke covalent is of zijn bevestigd aan of niet-covalent, maar specifiek geassocieerd met de PNA. De OSA kan een atoom zijn of een molecuul welke helpt bij de scheiding en/of lokalisatie zoals een vaste ondersteuning binnen de groep of een label dat kan worden gedetecteerd door gebruik te maken van verschillende fysische middelen, waaronder, maar niet limiterend, absorptie of beeld-vormende uitstralende deeltjes of licht. Werkwijzen voor de bevestiging van indicatoren aan oligonucleotiden of voor het immobiliseren van oligonucleotiden aan vaste ondersteuning zijn goed bekend in het vakgebied (zie Keller en Manak, *supra*).

De PNA volgens de onderhavige uitvinding kan worden bereid door gebruik te maken van elke geschikte werkwijze. Dergelijke werkwijzen in het algemeen, zullen omvatten een oligonucleotide sythese en klonering in een repliceerbare vector. Werkwijzen voor nucleinezuursynthese zijn goed bekend in het vakgebied. Indien gekloneerd of gesynthetiseerd kan strengzuivering en scheiding noodzakelijk zijn voor gebruik van het product als zuivere PNA. Werkwijzen voor de bereiding van RNA probes zijn goed bekend (zie bijvoorbeeld Blais 1993, Blais 1994, welke gebruik maken van *in vitro* transcriptie vanaf een PCR reactie waarbij geïncorporeerd wordt een T7 RNA polymerase promoter).

De lengte en specifieke sequentie van de PNA zal zoals begrepen wordt door de gemiddeld geschoolde vakman

afhankelijk zijn van de lengte en de sequentie die moet worden gedetecteerd in een TNA en beperkingen voor het verschaffen van een strakke en specifieke binding aan de specifieke TBA moeten worden gebruikt (zie discussie met
 5 betrekking tot TBAs hieronder). In het algemeen zijn PNAs met sequentielengten tussen ongeveer 10 en ongeveer 300 nucleotiden in lengte adequaat, waarbij lengten van ongeveer 15-100 nucleotiden wenselijk zijn voor vele van de uitvoeringsvormen die specifiek hierin worden beschreven.

10 Er moet ook worden begrepen dat de PNA zodanig kan worden geconstrueerd dat zij meer dan $\frac{1}{2}$ TBR bevatten en voor het produceren van meer dan één TBR voor één of meer TBAs die hetzelfde zijn of verschillend als ook complexe TBRs die worden herkend door nieuwe duplex en multiplex TBAs (zie
 15 beschrijving hieronder met betrekking tot deze nieuwe TBAs) na hybridisatie van de PNAs en TNAs. Figuur 5 laat specifieke PNAs zien welke één of meer $\frac{1}{2}$ TBRs omvatten. Specifieke sequenties die overeenkomen met de $\frac{1}{2}$ TBR sequenties worden weergegeven in Figuur 5 (Ia, IIa, IIIa, IVa en Va) zijn SEQ
 20 ID NOS. 1-34 (zie beschrijving van de sequenties hierboven).

Zoals getoond wordt in de Figuren 2a en 2b kan de PNA die een $\frac{1}{2}$ TBR bevat worden gehybridiseerd met één of meer BNAs (zie beschrijving hieronder), en de keten van BNAs kan worden gepolymeriseerd tot elke gewenste potentiële lengte
 25 voor amplificatie van de TNA-PNA hybridisatiegebeurtenis. Bij voorkeur zullen tussen 1 en 10 $\frac{1}{2}$ BBRs aanwezig zijn in de PNA.

Zoals getoond wordt in Figuren 6a en 6b kan de PNA verscheidene $\frac{1}{2}$ TBRs bevatten, die hetzelfde zijn of
 30 verschillend en welke kunnen hybridiseren met verscheidene $\frac{1}{2}$ TBRs in een TNA. Elke keer dat een $\frac{1}{2}$ TBR in de PNA overeenkomt met een $\frac{1}{2}$ TBR in een TNA wordt een Target Binding Gebied gevormd dat kan binden aan een TBA. Daarnaast is het niet essentieel dat elke TBR aanwezig is op een
 35 enkele, aaneensluitende PNA. In één uitvoeringsvorm van de

uitvinding worden de twee verschillende PNAs gebruikt voor het detecteren van sequenties op een specifieke TNA. Als een illustratie van dit aspect van de uitvinding toont Figuur 7 één weergave van de humane immunodeficiëntie virus (HIV) lange terminale herhaling (LTR). Zoals bekend is in het vakgebied omvat de HIV LTR twee NF-kB bindingsposities en drie SP1 bindingsposities die zich in de dichte nabijheid waarbij NF-kB en SP1 bekend staan als DNA bindende eiwitten. Figuur 7 verschaft PNAs, PNA1 (SEQ ID NO: 39) en PNA 2 (SEQ ID NO: 39) en elk daarvan is complementair aan de tegengestelde streng zoals getoond wordt als een TNA (SEQ ID NO: 37), welke twee NF-kB bindingsposities verschaft en drie bindingsposities van de HIV LTR. Volgens dit aspect van de uitvinding hybridiseert PNA1 specifiek met dat gedeelte van de TNA dat getoond wordt in Figuur 7 waarvan de basen onderstreept zijn met een "+" symbool, terwijl PNA2 hybridiseert met dat gedeelte van de TNA dat getoond wordt in Figuur 7 waarbij de basen zijn onderstreept met een "=" symbool. Elk van de PNA1 of PNA2 kan ook sequenties omvatten (aangeduid door de symbolen "#" of "**") die zullen hybridiseren met een BNA 1/2 BBR sequenties (zie hieronder). Daarnaast kan elke PNA1 en PNA2 verschillend zijn getagged met een OSA, zoals een fluorofoor zoals een fluoresceïne of een rhodamine label wat een bevestiging zal verschaffen dat beide probes zich hebben gebonden aan de TNA. Indien slechts één label of geen label wordt gedetecteerd, moet worden geconcludeerd dat de TNA niet aanwezig is in het monster dat wordt getest.

Volgens een verder aspect van de uitvoeringsvorm die wordt getoond in Figuur 7, wordt een werkwijze voor het veranderen van de specificiteit van de onderhavige assay werkwijze getoond. Door het veranderen van de lengte van de opening tussen PNA1 en PNA2, zodanig dat een gebied van de TNA dat niet gehybridiseerd is wordt veranderd, is iemand die deze uitvinding in de praktijk brengt in staat tot het veranderen van het onderscheidingsvermogen van de test.

Met als doel het duidelijker verschaffen van een voorbeeld van dit aspect van de uitvinding is het noodzakelijk om te benadrukken dat de TBR een helicale structuur kan bezitten. Terwijl dus PNA1 TBRs creëert op één "vlak" van de "helix" creëert PNA2 een TBR op ofwel hetzelfde ofwel een verschillend vlak van de helix afhankelijk van de afstand tussen het midden van elke TBR (onderstreping in Figuur 7). Indien het midden van elke bindingsplaats dat zich bevindt op een afstand van 10,5 basen, zullen de TBRs zich bevinden op dezelfde kant van de helix terwijl niet-integere producten van 10,5 basen apart de TBR zou plaatsen op de tegenoverliggende zijden van de helix, kan elke coöperatieve binding door de TBA die de PNA1 TBR herkent en de TBA die de PNA2 TBR herkent, kunnen worden gemanipuleerd (zie Hochschild, A., M. Ptashne [1986] *Cell* 44:681-687, welke dit effect toont voor de binding van bacteriofaag lambda repressor op twee verschillende operator posities die zich bevinden op verschillende afstanden van elkaar in een DNA helix). Zoals beschreven wordt door Perkins et al. ([1993] *EMBO J.* 12:3551-3558) is een samenwerking tussen NF-kB en de SP1 posities nodig voor het verschaffen van de activatie van de HIV LTR. Voor het doel echter van de onderhavige uitvinding kan het dubbel NF-kB-triplet SP1 bindingspositie motief in de HIV LTR voordeel verschaffend zijn bij het verschaffen van een enkel, nieuw bindingseiwit dat in staat is tot het gelijktijdig binden van beide plaatsen maar dit alleen in het geval indien de afstand tussen de plaatsen geometrisch mogelijk is. Dit wordt gecontroleerd door zowel de structuur van de geselecteerde TBA en de gebruikte PNAs. In de uitvoeringsvorm die aldus wordt getoond in Figuur 7, kunnen dus twee probes worden gebruikt waarbij een voldoende groot interprobe gebied van enkel-strengs DNA achterblijft, zelfs indien de NF-kB en SP1 bindingsposities zich bevinden op tegenoverliggende posities op de helix, het enkel-strengs gebied tussen de probes een voldoende flexibele verbinding

verschafft zodanig, dat het DNA zowel kan buigen en draaien om zich aan te passen aan de geometrie van de TBA.

Als alternatief kan een meer stringente test worden ontworpen door het verminderen van de interprobe afstand
5 zodanig dat het DNA alleen kan buigen maar niet draaien. Tenslotte kunnen de probes zodanig dicht bij elkaar worden geplaatst of kan gebruik worden gemaakt van een enkele PNA, dat het DNA niet slechts kan buigen maar niet draaien. Deze Figuur geeft dus een voorbeeld en verschafft de productie van
10 detectiesystemen met elke gewenste mate van onderscheid tussen target nucleïnezuren met vergelijkbare sequenties maar verschillende juxta posities van deze sequenties.

Gelet op de diagnostische of forensische kit voor HIV zal de gemiddeld geschoolde vakman begrijpen dat de hiervoor
15 vermelde aspecten van deze uitvinding het aanpassen verschaffen van de componenten van de diagnostische of forensische kit om overeen te komen met wat bekend is op elk gegeven tijdstip over de prevalentie stammen van HIV of andere pathogene of ziekte-aandoening. Er zal ook worden
20 geapprecieerd door de gemiddeld geschoolde vakman dat het waarschijnlijk is, hoewel de detectie van een HIV infectie niet het enige gebruik is van de onderhavige uitvinding vanwege het muteren van het HIV genoom, dit waarschijnlijk één van de meest complexe testmilieus is voor een dergelijke
25 diagnostiek. Het is exact in een dergelijk muterend milieu dat de uitvinding het meest duidelijk wordt geapprecieerd vanwege de flexibiliteit van de onderhavige uitvindinge gekoppeld met zijn mogelijkheid om onderscheid te maken tussen zeer gerelateerde sequenties. In minder muteerbare
30 milieus, is het niet nodig om enige verfijning waarvoor deze uitvinding geschikt, te gebruiken. In een diagnostische kit voor papillomavirus infectie zijn dus alle onderscheidende karakteristieken van de TBA-TBR interactie beschikbaar samen met het in staat zijn tot het amplificeren van het signaal
35 door gebruik te maken van de BNAs en BBAs, maar een enkele,

eenvoudige PNA, zoals elke van de SEQ ID NOS. 46-62 kan worden gebruikt welke de unieke papillomavirus sequenties identificeert, waarvan ook bekend is dat deze binden aan een TBA zoals het papillomavirus E2 eiwit of ingekorte DNA-
 5 bindende gedeelten daarvan (zie Hegde et al. [1992] *Nature* 359:505-512; Monini et al. [1991] *J. Virol.* 65:2124-2130).

Bij het toepassen van de onderhavige werkwijze voor de detectie van een specifieke PNA voor het doel om te bepalen of bepaalde nucleïnezuren aanwezig zijn die zijn
 10 geassocieerd met de progressie van melanoma, hepatoma, borst, cervicale, long, darm, prostaat, pancreas of eierstok kankers kan de TNA worden verkregen uit biopsiematerialen die zijn afgenomen uit organen of vloeistoffen die verdacht worden van kankercellen. Voor de detectie van genetische deficiënties,
 15 kan de TNA worden verkregen uit monsters van de patiënt die de beïnvloede cellen bevatten. Voor de detectie van fermentatie besmettingen en producten in de voedingsmiddelen, chemische of biotechnologische producten, of in de biologische conversie van afvalstoffen, kan de TNA worden
 20 verkregen uit monsters die worden afgenomen in verschillende stadia van het fermentatie- of behandelingsproces. Voor de detectie van voeding- of geneesmiddelpathogenen of besmettingen, kan het TNA monster worden verkregen uit het voedsel of het geneesmiddel, wattenstaafjes monsters van
 25 voedingsmiddelen of oppervlakten die in contact staan met het voedsel, vloeistoffen die in het contact staan met het voedsel, bewerkingsmaterialen, vloeistoffen en dergelijke die geassocieerd zijn met de bereiding van of in contact staan met het voedingsmiddel, geneesmiddel of de biologische
 30 monsters die worden afgenomen van diegene die in contact staan met de voedingsmiddelen of geneesmiddelen of dergelijke.

2. De Booster Nucleïne Zuren (BNAs), Booster Binding Gebieden (BBRs) en hun bereiding. De BNAs volgens de onderhavige
 35 uitvinding omvatten ten minste één of meer 1/2 BRRs gekoppeld

aan een OSA. De 1/2 BBRs kunnen hybridiseren aan complementaire 1/2 BBRs die aanwezig zijn in de PNA, andere BNAs of een HNA.

Refererend aan Figuur 1(I, IIb en IIIb) van de tekeningen, omvat de eenvoudigste BNA twee gedeelten. Refererend aan Figuur 1(IIb) van de tekeningen is het eerste gedeelte van de eenvoudigste BNA een sequentie van basen die complementair zijn aan de sequentie in de PNA die wordt aangeduid als de "1/2 BBR". Refererend aan Figuur 1(IIb) van de tekeningen is het tweede gedeelte van de eenvoudigste BNA de OSA, die aangeduid wordt door een cirkel met een vierkant hierom heen. De OSA is geen ondersteuning en/of indicator, of een vaste ondersteuning of andere middelen voor lokalisatie, waaronder, maar hieraan niet gelimiteerd, een bevestiging aan korrels, polymeren en oppervlakten en/of indicatoren welke hieraan covalent zijn verbonden of niet-covalent, maar specifiek zijn geassocieerd met de BNA.

Refererend aan Figuur 2a(II en III) van de tekeningen kan de BNA meer dan één 1/2 BBR sequentie bevatten. De BNA die wordt weergegeven in Figuur 3(II) bevat een sequentie die complementair is aan de PNA die wordt weergegeven in Figuur 2(I) en de andere 1/2 BBR sequenties. De BNA die wordt weergegeven in Figuur 3(III) bevat twee 1/2 BBR sequenties die complementair zijn aan twee van de 1/2 BBR sequenties in de BNA die wordt weergegeven in Figuur 3(II), plus tot en met "n" additionele 1/2 BBRs voor polymerisatie van additionele BNAs.

Onder hybridisatie-omstandigheden creëert de BNA die wordt weergegeven in Figuur 3(II), indien deze wordt gecombineerd met de PNA die wordt weergegeven in Figuur 3(I), de PNA-BNA hybride die wordt weergegeven in Figuur 3(IVa) welke een BBR bevat en een niet-gehybridiseerde extensie met twee additionele 1/2 BBR sequenties of "booster" sequenties. De BBRs die worden gecreëerd met behulp van de genoemde hybridisatie kunnen identiek zijn, vergelijkbaar of niet-

vergelijkbaar met betrekking tot hun sequentie. De BBRs die worden gecreëerd door middel van de genoemde hybridisatie kunnen identieke, vergelijkbare of niet-vergelijkbare BBAs binden (zie hieronder). De BBAs kunnen worden bereid analoog
 5 aan de PNAs.

Onder hybridisatie-omstandigheden creëert de BNA-BNA hybride die wordt weergegeven in Figuur 3(IVb), indien in combinatie met de PNA weergegeven in Figuur 3(Vb), de PNA-BNA hybride die wordt weergegeven in Figuur 3(VI) welke een BBR
 10 bevat, twee additionele BNA-BNA hybriden welke BBRs bevatten en een niet-gehybridiseerde extensie met additionele 1/2 BBR sequentie, een "booster" sequentie. De BBRs die worden gecreëerd met behulp van de genoemde hybridisatie kunnen identiek zijn, vergelijkbaar of niet vergelijkbaar met
 15 betrekking tot de sequentie. De BBRs die worden gecreëerd door middel van hybridisatie kunnen binden aan identieke, vergelijkbare of niet-vergelijkbare BBAs (zie hieronder). De BNAs kunnen worden bereid op een wijze die analoog is aan de bereiding van de PNAs.

20 3. De Target Nucleïne Zuur (TNAs) en hun bereiding. De eerst stap voor het detecteren en amplificeren van signalen die worden geproduceerd door middel van de detectie van een specifieke DNA volgens de onderhavige werkwijze, is de hybridisatie van een dergelijke target met de PNA in een
 25 geschikte mengsel. Een dergelijke hybridisatie wordt verschaft onder omstandigheden die goed bekend zijn in het vakgebied.

Het monster waarvan wordt gedacht of waarvan bekend is dat deze de bedoelde TNA bevat, kan worden verkregen uit
 30 een veelvoud van bronnen. Deze kunnen een biologische monster zijn, een voedingsmiddel of een landbouw monster, een milieu monster, enz. Door het toepassen van de onderhavige werkwijze voor de detectie van de specifieke TNA voor medische diagnostica of forensen, kan de TNA worden verkregen uit een
 35 biopsiemonster, een lichaamsvloeistof of een exudaat zoals

urine, bloed, melk, cerebrospinale vloeistof, sputum, speeksel, stoelgang, long aspiraten, keel en genitale wattenstaaf monsters en dergelijke. Daarnaast kan de detectie *in situ* zijn (zie bijvoorbeeld Embretson 1993; Patterson 1993; Adams 1994).

In overeenstemming hiermee kan men PNAs voorstellen die specifiek zijn voor vertebraten (waaronder zoogdieren en waaronder mensen) of specifiek voor elk of alle van de volgende interessante micro-organismen en deze kunnen worden gebruikt volgens de onderhavige werkwijze:

Corynebacteria

Corynebacterium diphtheria

Bacillus

15 *Bacillus thuringiensis*

Pneumococci

Diplococcus pneumoniae

Streptococci

Streptococcus pyogenes

20 *Streptococcus salivarius*

Staphylococcus

Staphylococcus aureus

Staphylococcus albus

Pseudomonas

25 *Pseudomonas stutzen*

Neisseria

Neisseria meningitidis

Neisseria gonorrhea

Enterobacteriaceae

30 *Escherichia coli*

Aerobacteria aerogenes

Klebsiella pneumoniae De coliforma bacteriën

Salmonella typhosa

Salmonella choleraesuis De *Salmonellae*

5 *Salmonella typhimurium*

Shigellae dysenteriae

Shigellae schmitzii

Shigellae arabinotarda

Shigellae flexneri De *Shigellae*

10 *Shigellae boydii*

Shigellae sonnei

Andere enterische bacillen

Proteus vulgaris

Proteus mirabilis *Proteus species*

15 *Proteus morgani*

Pseudomonas aeruginosa

Alcaligenes faecalis

Vibrio cholerae

Hemophilus-Bordetella groep

20 *Hemophilus influenza, H. ducryi*

Hemophilus hemophilus

Hemophilus aegypticus

Hemophilus parainfluenzae

Bordetella pertussis

25 Pasteurellae

Pasteurella pestis

Pasteurella tularensis

Brucellae

Brucella melitensis

Brucella abortus

Brucella suis

Aerobe Sporen-Vormende Bacillen

5 *Bacillus anthracis*

Bacillus subtilis

Bacillus megaterium

Bacillus cereus

Anaerobe Sporen-Vormende Bacillen

10 *Clostridium botulinum*

Clostridium tetani

Clostridium perfringens

Clostridium novyi

Clostridium septicum

15 *Clostridium histolyticum*

Clostridium tertium

Clostridium bifermentans

Clostridium sporogenes

Mycobacterien

20 *Mycobacterium tuberculosis hominis*

Mycobacterium bovis

Mycobacterium avium

Mycobacterium leprae

Mycobacterium paratuberculosis

25 Actinomycetes (op schimmel-gelijkende bacteriën)

Actinomyces israeli

Actinomyces bovis

Actinomyces naeslundii

Nocardia asteroides

Nocardia brasiliensis

De Spirocheten

Treponema pallidum

5 *Treponema pertenue*

Treponema carateum

Spirillum minus

Streptobacillus moniliformis

Borrelia recurrentis

10 *Leptospira icterohemorrhagiae*

Leptospira canicola

Trypanosomes Mycoplasmas

Mycoplasma pneumoniae

Andere pathogenen

15 *Listeria monocytogenes*

Erysipelothrix rhusiopathiae

Streptobacillus moniliformis

Donovania granulomatis

Bartonella bacilliformis

20 *Rickettsiae* (op bacteriën-gelijkende parasieten)

Rickettsia prowazekii

Rickettsia mooseri

Rickettsia rickettsii

Rickettsia conori

25 *Rickettsia australis*

Rickettsia sibiricus

Rickettsia akari

Rickettsia tsutsugamushi

Rickettsia burnetti

Rickettsia quintana

Chlamydia (niet-geklasseerde parasieten
bacterieel/viraal)

5 Chlamydia stoffen (benaming niet zeker)

Schimmels

Cryptococcus neoformans

Blastomyces dermatidis

Histoplasma capsulatum

10 *Coccidioides immitis*

Paracoccidioides brasiliensis

Candida albicans

Aspergillus fumigatus

Mucor corymbifera (*Absidia corymbifera*)

15 *Rhizopus oryzae*

Rhizopus arrhizus *Phycomycetes*

Rhizopus nigricans

Sporotrichum schenkii

Fonsecaea pedrosoi

20 *Fonsecaea compact*

Fonsecaea dermatidis

Cladosporium carrioni

Phialophora verrucosa

Aspergillus nidulans

25 *Madurella mycetomi*

Madurella grisea

Allescheria boydii

Phialophora jeanselmei

Microsporum gypsum

Trichophyton mentagrophytes

Keratinomyces ajelloi

Microsporum canis

Trichophyton rubrum

5 *Microsporum adouini*

Virussen

Adenoviruses

Herpes Virussen

Herpes simplex

10 *Varicella* (Kippen pokken)

Herpes zoster (Shingles)

Virus B

Cytomegalovirus

Pokken Virussen

15 *Variola* (kleine pokken)

Vaccinia

Pokkenvirus bovis

Paravaccinia

Molluscum contagiosum

20 Picornavirussen

Poliovirus

Coxsackievirus

Echovirussen

Rhinovirussen

25 Myxovirussen

Influenza (A, B, en C)

Parainfluenza (1-4)

Bof virus

Newcastle ziekte virus

Mazelen virus

Runderpest virus

Canine distemper virus

5 Respiratory syncytial virus

Rubella virus

Arbovirussen

Oostelijk equine encefalitis virus

Westelijk equine encefalitis virus

10 Sindbis virus

Chikugunya virus

Semliki forest virus

Mayora virus

St. Louis encefalitis virus

15 California encefalitis virus

Colorado tick fever virus

Yellow fever virus

Dengue virus

Reovirussen

20 Reovirus types 1-3

Retrovirussen

Humane immunodeficiëntie virussen (HIV)

Humane T-cel lyfotrofische virus I & II
(HTLV)

25 Hepatitis

Hepatitis A virus

Hepatitis B virus

Hepatitis niet-A-niet-B virus

Hepatitis, C, D, E

Tumor virussen

Rauscher leukemia virus

Gross virus

5 Maloney leukemia virus

Humane papilloma virussen

Er moet worden begrepen door de gemiddeld geschoolde vakman dat het in het algemeen nodig is om monsters te

10 behandelen waarvan gedacht wordt dat deze een specifieke TNA bevatten op een zodanige wijze dat fragmenten worden verkregen die eenvoudig kunnen hybridiseren met de PNA. Het kan noodzakelijk zijn om het testmonster te behandelen voor het verschaffen van de afgifte of extractie van de Tna voor

15 hybridisatie zoals door het blootstellen van bloed of andere cellen aan een hypotonisch milieu of een andere wijze verstoren van het monster door gebruik te maken van krachtigere middelen. Indien wordt gedacht dat het DNA aanwezig is in een dubbel-strengs vorm, dan zou het

20 natuurlijk wenselijk zijn om de strengen te scheiden teneinde de TNA hybridiseerbaar te maken in een enkel-strengs vorm door gebruik te maken van werkwijzen die goed bekend zijn in het vakgebied, waaronder maar niet limiterend, verwarming of een beperkte blootstelling aan basische omstandigheden welke

25 kunnen worden geneutraliseerd na de toevoeging van de enkel-strengs PNA voor het verschaffen van het optreden van hybridisatie. Werkwijzen voor de bereiding van RNA targets zijn goed bekend (zie Waterhouse 1993, Mitchell 1992).

Fragmentatie van nucleïnezuur monsters die TNAs

30 bevatten is meestal noodzakelijk voor het verminderen van de viscositeit van het monster voor het verhogen van de toegankelijkheid van de TNAs voor de PNAs. Een dergelijke fragmentatie wordt verschaft door middel van willekeurige of specifieke middelen die bekend zijn in het vakgebied. Het is

dus bijvoorbeeld bekend dat specifieke nucleasen met een bepaalde frequentie knippen in een bepaald genoom dat wordt geanalyseerd en dit kan worden gebruikt voor het produceren van fragmenten met een bekende gemiddelde moleculaire

5 grootte. Daarnaast zijn andere nucleasen, fosfodiesterasen, exonucleasen en endonucleasen, fysische afschuiving en sonificatie bekende werkwijzen die geschikt zijn voor dit doel. Deze processen zijn goed bekend in het vakgebied. Het gebruik van de restrictie-enzymen voor het doel van DNA

10 fragmentatie, geniet in het algemeen de voorkeur. DNA kan ook worden gefragmenteerd door gebruik te maken van een veelvoud van chemische middelen zoals het gebruik van de volgende reagentia typen: EDTA-Fe(II) (volgens Stroebel et al. [1988]

J. Am. Chem. Soc. 110:7927; Dervan [1986] Science 232:464);

15 Cu(II)-fenanthroline (volgens Chen en Sigman [1987] Science 237:1197); classe IIS restrictie enzym (volgens Kim et al. [1988] Science 240:504); hybride DNase (volgens Corey et al. [1989] Biochem. 28:8277); bleomycine (volgens Umezawa et al. [1986] J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A, 19:200);

20 neocarzinostatine (Goldberg et al. [1981] Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research, Academic Press, New York, pag. 163); en methidiumpropyl-EDTA-Fe(II) (volgens Hertzberg et al. [1982] J. Am. Chem. Soc. 104:313). De verwijdering van eiwitten, zoals het geval is bij de

25 behandeling met een protease, is ook in het algemeen wenselijk een werkwijze voor het verschaffen van eiwitverwijdering uit nucleïnezuur monsters zonder een significant verlies aan nucleïnezuren, zijn goed bekend in het vakgebied.

30 De TNAs volgens de onderhavige uitvinding moeten zodanig lang zijn dat er een voldoende hoeveelheid dubbelstrengs hybride aanwezig is die de TBR flankiert zodat een TBA in staat is tot onverstoorde binding met behulp van de niet-geligeerde fragmentuiteinden. In het algemeen worden

35 fragmenten in de orde van ongeveer 10 nucleotiden tot en met ongeveer 100.000 nucleotiden, en meer de voorkeur in de orde

van ongeveer 20 nucleotiden tot ongeveer 1.000 nucleotiden gebruikt als gemiddelde grootte voor de TNA fragmenten.

Voorbeelden van specifieke TNA sequenties die kunnen worden gedetecteerd zijn sequenties die complementair zijn aan de
 5 TNA sequenties zoals die hierin worden beschreven voor de detectie van normale cellulaire, abnormale cellulaire (zoals in geactiveerde oncogenen, geïntegreerde niet-eigen genen, genetische defectieve genen), en pathogeen-specifieke nucleïnezuur sequenties, voor welke specifieke nucleïnezuur-
 10 bindende eiwitten bekend zijn, of welke kunnen worden geproduceerd met behulp van de werkwijzen die in de beschrijvingsinleiding worden beschreven. Refererend aan Figuur 7 wordt een specifieke HIV-gerelateerde TNA getoond als SEQ ID NO: 37.

- 15 4. Extensies van de PNA door gebruik te maken van BNAs, hun bereiding en signaalamplificatie. Onder hybridisatie-omstandigheden kunnen BNAs worden toegevoegd die hybridiseren aan de PNAs, PNA-BNA hybriden, BNAs en/of BNA-BNA hybriden. De hiervoor vermelde toevoegingen kunnen worden uitgevoerd op
 20 een niet-vectoriele polymere wijze of op een vectoriele wijze met een bekende orde aan BNAs.

Refererend aan Figuur 2a, wordt een eenvoudige booster weergegeven. Een booster polymeer wordt geproduceerd door het toevoegen van twee BNAs die worden weergegeven in
 25 Figuur 2a(Ib en Ic) welke hierna worden gecombineerd onder hybridisatie-omstandigheden met de PNA en deze vormen PAN-BNA-BNA hybriden omvattende de PNA en "booster" "extensies" zoals weergegeven wordt in Figuur 2a(IIa, IIb, IIc en IId) waarbij ten minste één niet-gepaarde 1/2 BBR sequentie
 30 overblijft. Elke niet-gepaarde 1/2 BBR sequentie, zoals geïllustreerd wordt in Figuur 2a(IIa, IIb, IIE, IId) kan hybridiseren met additionele BNAs zodat additionele "booster" extensies worden gevormd. Elke niet-gepaarde 1 /2 BBR sequentie, zoals weergegeven wordt in Figuur 2a(IIa,IIb,IIc
 35 en IId) is in staat tot hybridisatie met de toegevoegde HNAs

zoals weergegeven wordt in Figuur 2a(IIIa en IIIb). De hybridisatie van de HNAs, die niet in staat zijn tot hybridisatie aan additionele BNAs, dienen als "cap" voor de toevoeging van de BNAs aan de PNA, zoals weergegeven wordt in
 5 Figuur 2a(IVa, IVb, IVc en IVd).

Refererend aan Figuur 2b, is het mogelijk om de orde en de componenten van extensies van de PNA te controleren en te specificeren. Indien een enkele BBR nodig is, wordt een HNA die de complementaire sequentie ten opzichte van 1/2 BBR
 10 bevat in de PNA toegevoegd aan de PNA voor het verschaffen van een enkele BBR en als "cap" voor elke "booster" extensies tot de PNA. Indien de additionele BBRs worden toegevoegd aan de PNA, kan een gecontroleerde extensie van de PNA worden verschaft.

Refererend aan Figuur 2b wordt een eenvoudige booster gepresenteerd. Vectoriele polymeer extensie wordt verschaft door middel van de toevoeging van een BNA welke specifiek is voor de PNA zoals weergegeven wordt in Figuur 2b (Ia en IIa), welke hierna wordt gecombineerde onder hybridisatie-
 20 omstandigheden met de PNA, zodat gevormd wordt PNA-BNA-BNA hybriden, omvattende de PNA en de "booster" extensies. Deze extensies, indien gelabeld met een OSA verschaffen een werkwijze voor het zeer sterk amplificeren van elk signaal dat geproduceerd wordt na de binding van een PNA aan een TNA
 25 in het monster. Daarnaast, door het binden van gelabelde BBAs aan de BBRs in de polymeer wordt een additionele amplificatie verschaft.

Elk aantal werkwijzen kan worden gebruikt voor het bereiden van de BNAs, waaronder bijvoorbeeld de synthese van
 30 bekende chemie of door middel van recombinant DNA productie werkwijzen. Met betrekking tot de laatste werkwijze, kunnen bijna een niet-gelimiteerd aantal BNAs worden geproduceerd op eenvoudige en goedkope wijze zoals bijvoorbeeld door middel van de productie in prokaryoten (*E. coli*, bijvoorbeeld) van
 35 een plasmide DNA met meerdere herhalingen van de specifieke

BNA sequenties geflankeerd door restrictieposities met overhangende uiteinden. Op deze wijze kunnen bijvoorbeeld de bacteriofaag lambda linker of rechter operatorposities of elk ander DNA of nucleïnezuursequentie waarvan bekend is dat deze specifiek en strak bindt aan een specifieke BBA, zoals een DNA of RNA bindend eiwit worden geproduceerd in een in hoofdzaak niet gelimiteerd aantal kopieën waarbij elke kopie wordt geflankeerd door een *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* of elk van een aantal andere algemene restrictie nuclease posities. Als alternatief kan een polymeer op herhalende posities worden uitgesneden door middel van unieke restrictieposities die niet aanwezig zijn in de polymeer. Grote hoeveelheden pBR322, pUC plasmide of een ander plasmide met meerdere kopieën van deze sequenties worden geproduceerd met behulp van werkwijzen die goed bekend zijn in het vakgebied waarbij het plasmide geknipt met het restrictie-enzym dat de gepolymeriseerde positie flankeert en de vrijgekomen meerdere kopieën van de operatoren worden geïsoleerd ofwel door middel van chromatografie of elke andere eenvoudig toepasbare wijze die bekend is in het vakgebied. De BNA, voordat deze wordt gebruikt, wordt hierna streng gescheiden en deze is hierna geschikt voor polymerisatie op een PNA die codeert voor een enkel-strengs complementaire kopie van de operator zoals een ½ BBR. De BNAs kunnen vectorieel worden gepolymeriseerd op de PNA door gebruik te maken van de verschillende restrictie-enzymen die elke herhaling flankeren van de polymeer in het plasmide dat wordt gebruikt voor het produceren van meerdere kopieën van de BNA. Als alternatief kan de BNA polymeer hybridiseren aan de PNA door middel van overlappende uiteinden aan één of beide uiteinden van de BNA polymeer zonder dat er de behoefte bestaat aan streng-scheiding en deze annealen aan elk BNA segment. Voorbeelden van specifieke BNA sequenties worden hierboven verschaft in het gedeelte dat wordt aangeduid als Beschrijving van de Sequenties in de vorm van SEQ ID NOS. 35-36. Voor het stabiliseren van de BNA

polymeer kan DNA ligase worden gebruikt voor het covalent verbinden van de gehybridiseerde BNAs.

5. De Hairpin Nucleïne Zuren (HNAs) en hun bereiding. De HNAs die hierin worden beschreven omvatten ten minste twee hoofd-
5 gedeelten die samen zijn gevoegd. Een enkel-strengs sequentie welke complementair is aan een 1/2 BBR, en een dubbel-strengs nucleïnezuur gebied gevormd, onder hybridisatie-omstandigheden, door middel van zelf-associatie van zelf-associeren en complementeren van sequenties in de HNA.

10 Refererend aan Figuur 1(IIc) van de tekeningen, kan de 1/2 BBR in the HNA zodanig worden geconstrueerd dat deze complementair is aan de 1/2 BBR sequentie in de PNA.

Refererend aan Figuur 1(I, IIc en IIIc) van de tekeningen, vormt de hiervoor vermelde HNA, indien deze wordt toegevoegd
15 aan de PNA onder hybridisatie-omstandigheden een PNA-HNA hybride die een BBR bevat. Refererend aan Figuur 1(IIIc, IVc en Vc) van de tekeningen, kan een PNA-HNA hybride, onder hybridisatie-omstandigheden na de toevoeging van TNA, een TNA-PNA-HNA hybride vormen die een TBR en een BBR bevat.

20 Refererend aan de Figuren 2a en 2b, kunnen de HNAs worden gebruikt als "cap" of als beëindiging van de toevoeging van de BNA extensies aan de PNA. De twee BNAs in Figuur 2a(Ib en Ic) zijn in staat tot associëren zodat een hybride wordt gevormd die getoond wordt in Figuur 3(IVb) of
25 deze kunnen direct en individueel hybridiseren aan de PNA die wordt weergegeven in Figuur 2a(Ia-c, IIa-d). De twee HNAs (zoals getoond in Figuur 2a(IIIa en IIIb)) kunnen de hybridisatie beëindigen van de BNA tot andere BNAs welke zich uitstrekken vanaf de PNA zoals weergegeven wordt in Figuur
30 2a(IVa-d). De HNA volgens Figuur 2a(IIIa) kan de PNA-BNA hybriden beëindigen die worden getoond in Figuur 2a(IIb en IId) en elke PNA-BNA hybride met een enkel-strengs 1/2 BBR welke complementair is aan de 1/2 BBR in de HNA, die wordt weergegeven in Figuur 2a(IIIa). Op vergelijkbare wijze is de
35 HNA in Figuur 2a(IIIb) in staat tot het beëindigen van de

PNA-BNA hybriden die worden getoond in Figuur 2a(IIa en IIc) en elke PNA-BNA hybride met twee enkel-strengs 1/2 BBRs welke complementair zijn aan de 1/2 BBRs in de HNA die wordt weergegeven in Figuur 2a(IIIb).

- 5 Er worden HNAs gemaakt die de PNA-BNA hybriden beëindigen welke worden gemaakt van de opeenvolgende toevoeging van BNAs aan de PNA zoals weergegeven wordt in Figuur (2b). De enkel-strengs 1/2 BBR sequenties die worden weergegeven in Figuur 2b(Ia, IIIa, Va, en VIIa) zijn
 10 specifiek complementair aan de enkel-strengs 1/2 BBR sequenties die worden weergegeven in Figuur 2b(Ib, IIIb, Vb en VIIb) en produceren de unieke gecapte PNA-BNA-HNA hybriden die worden weergegeven in Figuur 2b(Ic, IIIc, Vc en VIIC).

- De zelf-complementaire sequenties in de HNA en de
 15 loopsequentie welke de zelf-complementaire hairpin sequenties linkt, dan er één zijn van elke samenstelling en lengte onder de voorwaarde dat zij niet in hoofdzaak de weergave verhinderen of remmen van de enkel-strengs 1/2 BBR die een onderdeel vormt van de HNA door het selectief binden van de
 20 HNA aan de BBA of de TBA. De loop sequenties moeten zodanig worden geselecteerd dat de vorming van de loop niet de vorming van de hairpin verhindert. Een voorbeeld van een HNA die bruikbaar is voor deze toepassing wordt verschaft in SEQ ID NO: 44 (zie Beschrijving van de Sequenties, hierboven).

25 6. De Target Binding Constructies (TBAs) en hun bereiding.

Een TBA kan elke substantie zijn die bindt met een specifieke TBR die wordt gevormd door middel van hybridisatie van specifieke TNAs en PNAs, onder de voorwaarde dat ten minste TBA de aan de volgende voorwaarden moet voldoen:

30

- (a) De TBA moet binden aan de TBR(s) op een wijze die zeer specifiek is aan de bepaalde TBR(s). Dat wil zeggen dat de TBR onderscheid moet maken tussen de TBRs die aanwezig zijn in de TNA-PNA hybride en vergelijkbare duplexsequenties die
 35 worden gevormd door de PNA-CNA hybriden. De TBA moet de PNA-

CNA hybride binden met een voldoende lage affiniteit dat na he wassen van het TBA-TNA-PNA complex de PNA-CNA hybride wordt onderbroken en de PNA-TNA hybride niet wordt onderbroken.

- 5 (b) De TBA moet voldoende binden aan de TBR(s) die gecreëerd worden door middel van de hybridisatie van de TNA met de PNA. De bindingsaffiniteiten in de orde 10^{-5} tot ongeveer 10^{-12} of meer worden in het algemeen beschouwd als zijnde voldoende. Zoals hieronder wordt opgemerkt, kan het in sommige gevallen
 10 wenselijk zijn om gebruik te maken van een specifieke TBR met een voldoende lage affiniteit voor een specifieke TBR maar welke een sterk verhoogde affiniteit bezit indien een specifieke configuratie van meerdere TBRs wordt verschaft zodanig dat het kwadraat van de affiniteit van de TBA voor
 15 elke TBR de relevantie-activiteit wordt voor dit specifieke TBA.

Voorbeelden van de DNA-bindende componenten die bruikbaar zijn voor de vorming van TBAs omvatten, maar zijn niet-
 20 limiterend, NF-kB, papillomavirus E2 eiwit, transcriptiefactor SP1, geïnactiveerde restrictie-enzymen, antilichamen, enz. Van elk van deze eiwitten is bekend in het vakgebied dat deze eiwitten sequenties bevatten welke binden aan specifieke nucleïnezuursequenties en affiniteiten van
 25 deze interacties zijn bekend. De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is natuurlijk niet gelimiteerd aan het gebruik van deze bekende DNA-bindende eiwitten of fragmenten daarvan. Uit de onderhavige beschrijving zal het duidelijk zijn aan de gemiddeld geschoolde vakman dat de onderhavige
 30 werkwijze eenvoudig kan worden toegepast op het gebruik van nieuwe TBAs die ten minste één van de benodigde eigenschappen bezitten die hierboven worden opgemerkt. In bijvoorbeeld, WO 92/20698, wordt dus bijvoorbeeld een sequentie-specifiek DNA-bindend molecuul beschreven omvattende een oligonucleotide
 35 conjugaat gevormd door middel van covalente bevestiging van

een DNA-bindend geneesmiddel aan een triplex-vormend oligonucleotide. De werkwijze van die beschrijving kan worden gebruikt voor het produceren van nieuwe TBAs voor gebruik volgens de onderhavige beschrijving onder de voorwaarde dat
 5 de op deze wijze verkregen TBAs voldoen aan de hierboven beschreven criteria. Daarnaast kunnen de werkwijzen van de Amerikaanse octrooien Nos. 5,096,815, 5,198,346, en WO88/06601, worden gebruikt voor het genereren van nieuwe TBAs voor gebruik in de werkwijze volgens deze uitvinding.
 10 Specifieke antilichamen of gedeelten daarvan kunnen worden gebruikt (zie bijvoorbeeld Blais 1994).

In het geval dat de TBA een eiwit is, of een complex van eiwitten, zal worden onderkend dat elk aantal werkwijzen die routinematig zijn voor het vakgebied, kunnen worden
 15 gebruikt voor het produceren van de TBA. De TBA kan worden geïsoleerd uit zijn natuurlijk voorkomend milieu in de natuur of indien dit niet praktisch is, worden geproduceerd door gebruik te maken van de standaard technieken van de moleculaire biologie. Indien als voorbeeld gebruik wordt
 20 gemaakt van NF-kB, kan dus deze bindingsconstructie door gebruik te maken van het DNA-bindend gedeelte van de p50 of p65 sub-eenheden, worden geproduceerd door gebruik te maken van recombinant werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied (zie bijvoorbeeld Ghosh [1990] Cell 62:1019-1029, welke de
 25 klonering beschrijft van de p50 DNA-bindende sub-eenheid van NF-kB en de homologie van dat eiwit ten opzichte van rel en dorsal).

Vele DNA en andere nucleïnezuur-bindende eiwitten zijn bekend welke worden gebruikt als of in TBAs volgens deze
 30 uitvinding. Op het moment dat de nucleïnezuursequentie van enig DNA, RNA:DNA, RNA of ander nucleïnezuur-bindend eiwit bekend is, kan een geschikte DNA sequentie die codeert voor het eiwit ofwel worden bereid door middel van synthetische middelen ofwel een cDNA kopie van het mRNA dat codeert voor
 35 het eiwit uit een geschikte weefselbron worden gebruikt.

Daarnaast kunnen genomische kopieën die coderen voor het eiwit worden verkregen en de intronen kunnen hieruit gesplitst worden door gebruik te maken van werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied. Daarnaast kunnen de TBAs
 5 chemisch worden gesynthetiseerd.

Op het moment dat een geschikt coderende sequentie is verkregen, kan positie-gerichte mutagenese worden gebruikt voor het veranderen van de coderende aminozuursequentie voor het produceren van mutant nucleinezuur-bindende eiwitten die
 10 meer wenselijke bindingseigenschappen verschaffen in vergelijking met die bindingseigenschappen van het originele nucleinezuur-bindend eiwit. Als een voorbeeld van dit proces kan de aminozuursequentie van de DNA-bindende gedeelten van NF-kB worden veranderd zodat een NF-kB' molecuul wordt
 15 geproduceerd wat sterker bindt aan de NF-kB bindingsplaats (zie de hieronder gegeven voorbeelden - HIV-Detectie en HIV-Lock).

Voor het verschaffen van meer details met betrekking tot dit aspect van de uitvinding worden de volgende
 20 overwegingen opgemerkt. Indien gebruik wordt gemaakt van NF-kB als een voorbeeld, kan een TBA worden bereikt door gebruik te maken van een natuurlijk voorkomend NF-kB molecuul. Omdat echter dit molecuul aanwezig is in zeer kleine hoeveelheden in cellen en omdat de subeenheden van dit DNA-bindend eiwit
 25 zijn gekloneerd zou meer waarschijnlijk zijn om grote hoeveelheden van het complex te bereiden door middel van recombinante DNA middelen zoals reeds is uitgevoerd voor dit eiwit (zie bijvoorbeeld Ghosh [1990] Cell 62:1019-1029). NF-kB is een pleiotropische induceerder van genen die betrokken
 30 zijn bij de immuun-, ontstekings- en groei-regulatoire reacties op primaire pathogene (viraal, bacterieel of stress) blootstellingen of secundaire pathogene (ontstekingscytokine) blootstellingen. NF-kB is een dimeer DNA-bindend eiwit omvattende een p50 en een p65 subeenheid, welke beiden
 35 specifieke DNA sequenties identificeren en binden. In een

niet-geactiveerde toestand bevindt NF-kB zich in het cellulaire cytoplasma gecomplexeerd met een specifieke remmer I-kB, zodat gevormd wordt een cytoplasmische heterotrimeer. Na activatie wordt de remmer ontbonden uit het complex en de p50-p65 dimeer verplaatst zich door middel van een specifiek nucleair lokalisatiesignaal (NLS) naar de kern van de cel waar het in staat is tot binden van DNA en het uitvoeren van zijn rol als transcriptie-activator van vele genen (zie Grimm en Baeuerle [1993] Biochem. J. 290:297-308, voor een overzicht van de stand der techniek met betrekking tot NF-kB).

De p50-p65 dimeer bind met een picomolaire affiniteit aan sequenties die overeenkomen met de consensus GGGAMTNYCC (SEQ ID NO. 117), met licht verschillende affiniteiten afhankelijk van de exacte sequentie. Het is waard om op te merken dat van de homodimeren van p50 en p65 ook is waargenomen dat deze optreden. Deze homodimeren verschaffen verschillende biochemische eigenschappen als ook licht verschillende affiniteiten voor bindingssequenties in en vergelijkbaar met de hierboven beschreven consensus. Afhankelijk dus van de gewenste bindingseigenschappen van de TBA kunnen een p50-p65 heterodimeer, een p50-p50 homodimeer, of een p65-p65 homodimeer of fragmenten van de hiervoor vermelde dimeren worden gebruikt.

Een manier waarop de verschillende nieuwe TBAs kunnen worden geproduceerd wordt schematisch weergegeven in Figuur 9. De nucleïnezuur herkenningseenheden van de TBA kunnen worden gemaakt en geassocieerd met vergelijkbare of niet-vergelijkbare TBA nucleïnezuur herkenningseenheden door middel van een "chaperonne". De chaperonne is een structuur waarop de verschillende TBA herkenningselementen zijn gebouwd en welke gewenste eigenschappen verschaft aan de nucleïnezuur herkenningseenheden. De chaperonne omvat elke sequentie welke de constructie verschaft van sequenties zodanig dat dezelfde of verschillende nucleïnezuur herkenningseenheden met elkaar

in contact worden gebracht en stabiel worden geassocieerd. In het geval bijvoorbeeld van een TBA ontworpen om strak te binden aan NF-kB TBRs, wordt dus een TBA gemaakt door het verschaffen van lambda *cro* sequenties als structuursequenties

5 gebonden aan de nucleïnezuur-bindende sequenties van ofwel NF-kB p50 of p65. De p50 of p65 nucleïnezuur-bindende sequenties zijn verbonden aan de *cro* sequenties aan ofwel de carboxy ofwel de amino terminus van *cro* en ofwel de carboxy ofwel de amino terminus van de nucleïnezuur

10 herkenningseenheid van de p50 of p65. Verbindende sequenties worden optioneel verschaft voor het verschaffen van een geschikte afstand tussen de nucleïnezuur herkenningseenheden voor een optimale TBR binding.

De structuursequenties, met als voorbeeld de

15 hierboven beschreven *cro* and CI sequenties (SEQ ID NOS. 104-108), omvatten elk stabiel oligopeptide wat natuurlijk en sterk bindt aan dergelijke sequenties. In het geval dus van *cro* is het goed bekend dat een dimeer van *cro* bindt aan de bacteriofaag lambda operatorposities (Anderson et al. [1981]

20 Nature 290:754-758; Harrison en Aggarwal [1990] Ann. Rev. Biochem. 59:933-969). De monomere eenheden van *cro* associëren strak en specifiek met elkaar. Door dus het verbinden van DNA herkenningseenheidssequenties aan de *cro* sequenties, wordt een nauwe en strakke associatie verschaft.

25 De optionele verbindingssequenties omvatten elke aminozuursequentie welke niet interfereert met de TBA structuur of de nucleïnezuurbinding en deze zijn niet kwetsbaar zodat de nucleïnezuur herkenningseenheid niet vrijkomt van de complete TBA. Het is wenselijk maar niet

30 noodzakelijk dat de verbindingssequenties covalent zijn verbonden aan andere bindingsstructuur componenten. De verbinding moet specifiek zijn zodat de constructie en de bereiding van de bindingsstructuren wordt bevorderd.

Voorbeelden van dergelijke sequenties omvatten, maar zijn

35 niet limiterend, zulke goed bekende sequenties die worden

gevonden bij het verbinden van verschillende domeinen in structurele eiwitten. In bijvoorbeeld dus het lambda repressor eiwit bestaat er een verbindende sequentie tussen het DNA-bindend domein en het dimerisatie domein dat
 5 bruikbaar is voor dit doel. Vele andere van der gelijke sequenties zijn bekend en de exacte sequentie daarvan is niet kritiek voor deze uitvinding onder de voorwaarde dat routine-experimenten kunnen worden uitgevoerd voor het vaststellen van de stabiliteit en het niet-interfereren van het de target
 10 nucleïnezuur binding. Voorbeelden van dergelijke sequenties worden hierin verschaft als Met Ser en SEQ ID NOS. 99-102. De insertie van specifieke, bekende proteolytische posities in deze verbinders is ook een integraal onderdeel van deze uitvinding. De aanwezigheid van dergelijke posities in de
 15 verbindingssequenties zal bereidingsvoordelen verschaffen wat verschaft dat verschillende moleculen kunnen worden gemaakt op het chaperonne raamwerk.

Naast de nucleïnezuur herkenningseenheden, de optionele verbindingssequenties, en de structuursequenties,
 20 bezitten de nieuwe TBAs volgens deze uitvinding optioneel een asymmetrische of PILOT TNA sequenties of één of meer OSA eenheden. De asymmetriesequenties worden verschaft voor het bevorderen of het voorkomen van bepaalde gewenste of niet-gewenste associaties. In het geval bijvoorbeeld dat TBA
 25 homodimere p50 DNA herkenningseenheden gewenst zijn, worden de asymmetrische sequenties verschaft die van nature stringentere associatie van NF-kB p50 sub-eenheden en p65 sub-eenheden onderbreekt, terwijl de structuursequenties niet worden onderbroken van het samenbrengen van de p50 sub-
 30 eenheden. Voorbeelden van dergelijke sequenties worden hierin verschaft als SEQ ID NOS. 85-92 en SEQ ID NOS. 105 en 106.

In een verschillende configuratie worden de NF-kB p50 sub-eenheid sequenties in nauw contact gebracht met transcriptie factor SP1 DNA herkenningseenheidssequenties.
 35 Dit is gewenst in het geval dat een NF-kB/SP1 bindingsmotief

van belang is zoals in het geval van de HIV LTR waarvan een motief van ten minste zes DNA bindingseiwit herkenningsplaatsen, twee NF-kB, drie SP1, en een TATA plaats die bekend zijn, bestaan. Omdat ook bekend is dat de tweede
 5 NF-kB en eerste SP1 plaats significant zijn voor het reguleren van de HIV transcriptie (Perkins et al. [1993] Embo J. 12:3551-3558), is deze specifieke configuratie van het TBA bruikbaar niet alleen voor de detectie van HIV, maar ook als
 10 hieronder). Op een vergelijkbare wijze kan het lange controlegebied (LCR) van het humane papillomavirus worden gebruikt als een sleutelcontrole gebied voor probing volgens deze werkwijze.

Gelet op de verschillende elementen die geassocieerd
 15 kunnen zijn op een cassette-achtige wijze volgens deze werkwijze van TBA vorming, worden een in hoofdzaak niet-gelimiteerde variëteit van TBAs geproduceerd. In Figuur 10, terwijl gerefereerd wordt naar "HIV-detectie I-IV" wordt een voorbeeld gegeven waarbij "CHAP" de chaperonne aanduidt,
 20 "nfkb" duidt de NF-kB sub-eenheden aan, "sp1" duidt de nucleïnezuur herkenningseenheid aan van de SP1 transcriptie factor en "TATA" duidt een dimeer aan van een DNA herkenningseenheid van een TATA sequentie DNA-bindend eiwit (TBP), welke ook bekend staat als een TATA bindingseiwit, of
 25 TBP. Deze configuraties worden verder als voorbeeld hieronder verschaft en deze vormen allen integrale onderdelen van de onderhavige uitvinding.

In nog een andere configuratie wordt de moleculaire structuur die wordt getoond in Figuur 9 aangepast voor de
 30 detectie en/of behandeling of profylaxe van een compleet verschillend pathogeen. In Figuur 11, op vergelijkbare wijze zoals hierboven beschreven, met betrekking tot "HIV-Detect I-IV" moleculen, wordt een serie van "HPV-Detect I-IV" moleculen geproduceerd. In deze uitvoeringsvorm wordt gebruik
 35 gemaakt van de DNA-bindende eigenschappen van het E2 eiwit

van het humane papillomavirus (HPV). Daarnaast wordt gebruik gemaakt van de rollen van SP1 en TBP door middel van het verschaffen van specifieke DNA herkenningseenheden die zijn aangepast voor binding aan deze sequenties in het HPV genoom.

5 Bij de vorming van de E2-specifieke TBAs voor gebruik bij het detecteren van een HPV infectie, kan het wenselijk zijn gebruik te maken van iedere SEQ ID NOS. 75-84 of 93-98 als de E2 DNA herkenningseenheden. Een TBA die een bovine E2 dimeer en een humane E2 dimeer DNA-bindend domein bevat, kan met

10 name bruikbaar zijn.

De verschillende sequenties die hierboven worden beschreven kunnen ofwel chemisch zijn verbonden door gebruik te maken van zuivere oligopeptide uitgangsmaterialen of zij kunnen worden verbonden door het verschaffen van recombinant

15 nucleïnezuren die coderen, met behulp van de goed bekende genetische code, de verschillende sub-elementen. In het geval van een recombinante bereiding verschaft het voordeel om de cro-coderende sequenties te verbinden met sequenties van nucleïnezuur herkenningseenheden zodat TBAs worden gevormd

20 omdat niet alleen de cro dient als een structuursequenties in de chaperonne, maar deze werkt ook direct wat betreft de goede vouwing van de nucleïnezuur herkenningselementen. Voorbeeldsequenties voor chaperonnes worden hierin verschaft als SEQ ID NOS. 104-108. Daarnaast, in het geval van

25 structuren van een hogere orde, omvattende meerdere bindingsplaatsen, is het gewenst zoals in het geval van een pentamere NF-kB/NF-kB/SP1/SP1/SP1 TBA, dat het goede ontwerp van de asymmetrische sequenties verschaft dat dergelijke structuren kunnen worden gemaakt.

30 Indien de hiervoor beschreven werkwijze wordt gevolgd, worden TBAs bereid die binden aan hun corresponderende bindingsplaatsen met een hoge affiniteit. Er wordt bijvoorbeeld verwacht van de NF-kB DNA bindingscomponenten van de TBAs volgens Figuur 10, dat deze

35 binden aan de HIV-LTR met een affiniteit van ongeveer 10^{-8} >en

10^{-12} molair. Sequenties die bruikbaar zijn als de DNA herkenningseenheden worden verschaft als SEQ ID NOS. 63-71, 73-84, 93-98, en 104-108 zoals hieronder verder als voorbeeld wordt beschreven.

5 Gelet op de hiervoor verschaft beschrijving van de directe constructie van nucleïnezuur bindende eiwitten waarbij gebruik wordt gemaakt van structuren en asymmetrische (of piloting) sequenties, zal de gemiddeld geschoolde vakman onderkennen dat een algemeen toepasbare werkwijze voor het
10 vormen van eiwitstructuren hierin wordt verschaft met deze uitvinding. De algemene toepasbaarheid van deze werkwijze wordt verder aangetoond, door te overwegen als een verder voorbeeld, het gebruik van een antilichaam-epitop interactie met betrekking tot de constructie van de gewenste structuren.
15 Bij wijze van een verdere specificatie kan een DNA-bindende eiwitstructuur worden samengesteld door middel van het verbinden van NF-kB p50 sub-eenheid aan een antigeen, zoals een gecirculeerd (door middel van di-zwavelbruggen) melanocyt-stimulerend hormoon (MSH). Dit pro-MSH molecuul kan
20 hierna worden gebonden met behulp van een anti-MSH antilichaam voor het verschaffen van een nieuwe nucleïnezuur bindingsconstructie waarbij het antigeen en het antilichaam werken als structuurvormende sequenties.

De modulaire structuur die wordt verschaft door
25 Figuur 9 onthult dat een grote variëteit aan TBAs kunnen worden samengesteld waarbij gebruik wordt gemaakt van verschillende combinaties aan componenten. Representatieve uitvoeringsvormen van deze algemene structuur worden dus verschaft als SEQ ID NOS. 109-116.

30 7. De Booster Bindings Constructies (BBAs) en hun bereiding.
Een BBA kan elke substantie zijn die bindt aan een specifieke BBR die wordt gevormd door middel van hybridisatie van een specifieke PNAs en BNAs, waaronder het geval indien meerdere BNAs (tot en met en omvattende "n" BNAs, dat wil zeggen,
35 BNAN, waarbij "n" theoretisch 0 tot oneindig is, maar in de

praktijk tussen ongeveer 0 en 100) worden gepolymeriseerd op de PNA voor signaalamplificatie onder de voorwaarde dat de BBA ten minste moet voldoen aan de volgende kenmerken:

- 5 (a) De BBA moet binden aan de BBRs op een wijze die zeer specifiek is voor een bepaalde BBR. Dat wil zeggen dat de BBA onderscheid moeten maken tussen BBRs aanwezig in de PNA-BNA hybride en vergelijkbare duplex sequenties die in BNA-CNA hybriden of andere CNAs. Indien er dus zelfs een enkele
- 10 basepaar misparing is of dat er conformatieverschillen zijn met of zonder basepaar misparingen bij de productie van de PNA-BNA_n of PNA-BNA_n-HNA hybride, dan moet de BBA de hybride binden met een voldoende lage affiniteit dat bij het wassen van het TBA-TNA-PNA-BNA_n complex, de BBA wordt verwijderd van
- 15 de CNA sequenties maar niet van de BBR sequenties.

(b) De BBA moet voldoende de BBR(s) binden.

Bindingsaffiniteiten in de orde van 10^{-5} tot ongeveer 10^{-9} of hoger worden in het algemeen beschouwd als voldoende te zijn.

- 20 Voorbeelden van BBAs omvatten, maar zijn hieraan niet limiterend, *cro* en het bacteriofaag lambda repressor eiwit CL. Daarnaast wordt verwezen naar het Amerikaanse octrooi No. 4,556,643, welke suggereert dat andere DNA sequenties en specifiek bindende eiwitten zoals repressors, histonen, DNA
- 25 modificerende enzymen, en het catabolyt gen activator eiwit. Zie ook EP 0 453 301, welke een veelvoud suggereert aan nucleotidesequentie specifiek bindende eiwitten (NSSBPs) zoals de tetracycline repressor, de lac repressor, en de tryptofaan repressor. Van elk van deze BBAs is onderkend in
- 30 het vakgebied dat deze binden aan specifieke en bekende nucleïnezuursequenties en de affiniteiten van deze interacties zijn bekend. Natuurlijk is de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding niet gelimiteerd aan het gebruik van deze bekende BBAs. Uit de onderhavige beschrijving is een
- 35 gemiddeld geschoolde vakman eenvoudig in staat om het gebruik

van nieuwe BBAs toe te passen die ten minste voldoen aan de voorwaarden die hierboven zijn weergegeven in de onderhavige werkwijze.

Voorbeelden van nieuwe BBAs die bruikbaar zijn
 5 volgens die aspect van de eiwitten omvatten nieuwe eiwitten die gebaseerd zijn op het motief van een bekend DNA of RNA of DNA:RNA bindend eiwit zoals *cro* of de λ C1 repressor eiwit. Bij voorkeur worden dergelijke modificaties uitgevoerd met als doel het verbeteren van de bewerking van deze componenten
 10 volgens de uitvinding. Het kan dus wenselijk zijn om een hoge concentratie *cro* te voegen aan een assay. Een van de negatieve kwaliteiten van *cro* is dat bij hoge concentraties de binding van *cro* aan zijn target DNA in competitie gaat met *cro-cro* interacties. Een *cro* met een chaperonne of een
 15 gemuteerde *cro* kan worden gemodificeerd welke niet deze tekortkoming bezit. Voorbeelden van dergelijke veranderde chaperonnes zijn SEQ ID NOS. 105-106 en 108. Werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied zoals de productie van nieuwe target bindingseiwitten die gebruikmaken van een gevarieerde
 20 populatie van nucleïnezuren en selectie van bacteriofaag binding aan specifiek vooraf geselecteerde targets (dat wil zeggen, zogenaamde faag-display technologie, zie de discussie hierboven met betrekking tot de productie tot nieuwe TBAs) kan worden gebruikt voor het produceren van dergelijke nieuwe
 25 BBAs als ook de hiervoor vermelde nieuwe TBAs.

Indien de BBA een eiwit is, of een complex van eiwitten, zal worden onderkend dat elk van een aantal werkwijzen welke routinematig wordt toegepast in het vakgebied, kunnen worden gebruikt voor het produceren van de
 30 BBA. De BBA kan worden geïsoleerd uit zijn natuurlijk voorkomend milieu in de natuur, of indien dit niet praktisch is, worden geproduceerd door gebruik te maken van standaard technieken van de moleculaire biologie. De sequentie van bijvoorbeeld het *cro* eiwit is dus bekend en elke moleculaire
 35 kloon van bacteriofaag λ kan worden gebruikt voor het

verkrijgen van de geschikte nucleïnezuren die coderen voor
cro met als doel de recombinante productie daarvan. Daarnaast
kunnen de TBAs die hierin worden beschreven gebruikt worden
als BBAs onder de voorwaarde dat verschillende TBAs worden
5 gebruikt voor het binden van de TBRs en BBRs.

8. Het gebruik van BBAs en BBRs voor het lokaliseren en
amplificeren van de lokalisatie van de PNA-TNA-TBA complexen

(zie Figuur 8). In één uitvoeringsvorm van deze uitvinding
worden de zeer specifieke en uitzonderlijk sterk bindende
10 TBAs omvattende nucleïnezuur-bindende componenten gebruikt
voor het produceren van een amplificeerbaar nucleïnezuur
sandwich assay. Volgens dit ene aspect van de uitvoeringsvorm
wordt een vaste ondersteuning bekleed met een eerste TBA
waardoor gecreëerd wordt een geïmmobiliseerde TBA. Een PNA en
15 TNA worden in oplossing met elkaar in contact gebracht onder
hybridisatie-omstandigheden en hierna in contact gebracht met
geïmmobiliseerde TBA. Slechts die PNA-TNA interacties die de
specifieke TBR vormen die wordt herkend door de
geïmmobiliseerde TBA worden vastgehouden tijdens het
20 uitwassen van het vaste oppervlak welke het TBA-TBR complex
bindt.

De detectie van de gebonden TBR wordt verschaft door
het binden van Booster Nucleïne Zuren, BNAs, aan de 1/2 BBRs
die aanwezig zijn op de PNAs onder hybridisatie-
25 omstandigheden. Op deze manier, zelfs in het geval dat
slechts één enkel TBA-TBR complex is gebonden aan de
geïmmobiliseerde TBA, kan een hoog geamplificeerd signaal
worden geproduceerd door middel van het polymeriseren van
meerdere BNAs op de geïmmobiliseerde TNA.

30 Elke BNA die bindt aan de TNA vormt vormt een BBR
welke kunnen worden gebonden door de BBAs, welke, net zoals
de TBAs geïmmobiliseerd op het vaste oppervlak, kunnen worden
gekozen vanwege hun zeer sterke en specifieke binding aan
specifieke nucleïnezuur structuren. Volgens deze
35 uitvoeringsvorm kan de geïmmobiliseerde TBA dus het DNA-

bindend gedeelte bevatten van NF-kB, welke erg specifiek en sterk bindt aan de NF-kB bindingsplaatsen die zijn gevormd na hybridisatie van de TNA en PNA zodat een dergelijke plaats wordt gevormd.

5 Omdat het zeer bekend is dat er NF-kB bindingsplaatsen zijn zowel in het normale humane genoom en in de lange terminale herhaling van het humane immunodeficiëntie virus (HIV), verschaft deze uitvinding een werkwijze voor het onderscheid maken tussen de "normale"

10 humane plaatsen de plaatsen die aanwezig zijn in de cellen vanwege een HIV infectie. Daarom kan een test die ontworpen is voor het bepalen van de aanwezigheid of afwezigheid van HIV DNA in een monster van humaan DNA, de HIV NF-kB bindingsplaatsen worden gezien als de TNA, en de normale

15 humane NF-kB bindingsplaatsen kunnen worden gezien als de CNAs. Volgens de werkwijze van deze uitvinding kan een onderscheid tussen deze TNAs en CNAs worden verschaft door gebruik te maken van het feit dat in de HIV LTR, er twee NF-kB bindingsplaatsen zijn, gevolgd door drie SP1 plaatsen (zie

20 bijvoorbeeld, Koken et al. [1992] Virology 191:968-972), terwijl cellulaire NF-kB bindingsplaatsen met dezelfde sequenties niet in tandem worden gevonden.

In de gevallen waarin de TNA meer dan één $\frac{1}{2}$ TBR bevat is het wenselijk om gebruik te maken van de therapeutische en

25 profylactische toepassingen van de TBAs, kan het wenselijk zijn om gebruik te maken van meer dan één TBA die elk in staat zijn tot het binden van TBR in het TNA-PNA complex. In dit geval kan het voordeel verschaffend zijn om als componenten van de TBAs, te selecteren DNA-bindende of RNA-

30 bindende domeinen met een mindere affiniteit voor hun TBR in vergelijking met de wild-type DNA-bindende of RNA-bindende domeinen. Gelet op het feit dat de TBAs die zijn betrokken bij de binding van mindere TBRs ofwel samen kunnen assembleren voordat binding optreedt aan hun TBR of samen

35 kunnen assembleren na binding aan hun TBR zullen de

individuele TBAs niet overeenkomstige TBRs blokkeren in de andere genomen dan de doelgenomen tenzij de TBRs ruimtelijk in staat zijn tot binding aan het samengestelde TBR complex.

Een eigenschap van de multimere constructie van de
 5 TBAs die specifiek hierin wordt geclaimd als onderdeel van de uitvinding, is dat van een dergelijke multimere structuur wordt verschaft dat deze een sterk gereduceerde affiniteit bezit voor een enkele positie in de TNA. Omdat echter de binding dramatisch is verhoogd ten opzichte van elke ene TBA,
 10 wordt van het TBA complex verwacht dat deze niet een competitie aangaat voor binding van elke enkele TBR met overeenkomstige native eiwitten *in situ* maar dat deze strak bindt aan sequenties in de PNA-TNA hybride die de TBRs bevat voor elk van de nucleïnezuur bindende componenten die zijn
 15 geassembleerd in de TBA. Het TBA complex moet worden geassembleerd en linkers moeten worden aangepast in de individuele TBAs zodat wordt verschaft dat de nucleïnezuur bindende gebieden die aanwezig zijn in het TBA complex gelijktijdig deze targets bereiken en binden.

Op het moment dat de TNA-PNA hybriden zijn gevormd en in contact zijn gebracht met geïmmobiliseerde TBA, wordt het niet-gebonden nucleïnezuur weggewassen van het geïmmobiliseerde oppervlak en de geïmmobiliseerde hybriden worden gedetecteerd. Dit wordt verschaft door elk van een
 25 aantal verschillende wijzen. Volgens één aspect van deze uitvinding wordt de PNA gelabeld met een OSA zoals een radionucleotide, gekleurde korrels, of een enzym dat in staat is tot het vormen van een gekleurd reactieproduct. Daarnaast, naast het hebben van één of meer 1/2 TBRs, kan de PNA ten
 30 minste ook ten minste één 1/2 BBR omvatten. De 1/2 BBR sequenties worden zodanig gekozen dat deze complementair zijn aan de unieke 1/2 BBR sequenties in de BNAs. In de uitvoeringsvorm die hierboven wordt beschreven, bijvoorbeeld in het geval waarbij de TBA is NF-kB en de TBR die gevormd
 35 wordt na TNA-PNA hybridisatie één of meer NF-kB

bindingsplaatsen bevat, dan kunnen de 1/2 BBRs
 hybridiseerbare (dat wil zeggen enkel-strengs complementaire)
 sequenties verschaffen bestaande uit een linker of rechter
 bacteriofaag lambda operators (zie bijvoorbeeld Ptashne
 5 [1982] Scientific American 247:128-140, en de referenties die
 hierin worden geciteerd voor sequenties van deze operators).
 Deze kunnen worden gepolymeriseerd op de PNA 1/2 BBRs in een
 een vectoriele wijze (zie Figuren 2 en 3) waarbij tot en met
 "n" BBRs worden verschaft en elke BBR vormt een *cro*
 10 bindingsplaats. Enzymatisch, radioactief of anderszins
 gelabeld *cro* wordt in contact gebracht met het TBA-TNA-PNA-
 (BNA)_n complex. Op deze wijze wordt een zeer selectief en
 geamplificeerd signaal geproduceerd. Het signaal dat wordt
 geproduceerd door gebruik te maken van een PNA met een enkele
 15 1/2 TBR duidt succes aan van het assay met betrekking tot het
 verschaffen van TBA-TBR binding en polymerisatie van de BNAs
 zodat een signaal wordt geproduceerd afkomstig van cellulaire
 plaatsen (dat wil zeggen van CNAs). De afwezigheid van een
 signaal indien een gedimeriseerde TBA wordt gebruikt duidt
 20 aan dat in de TNA, op plaatsen geen HIV LTRs als ook geen
 dubbele NF-kB bindingsplaatsen aanwezig waren. Aan de andere
 kant duidt de aanwezigheid van een signaal indien gebruik
 wordt gemaakt van de NF-kB op een HIV infectie. Als een
 specifiek voorbeeld van de hiervoor verschaft beschrijving
 25 van deze uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt verwezen
 naar Voorbeeld 6 die een HIV test kit beschrijft.

Natuurlijk zal de gemiddeld geschoolde vakman
 onderkennen dat de hiervoor verschaft beschrijving kan
 worden onderworpen aan verscheidene modificaties met
 30 betrekking tot de keuze van PNAs, TNAs, TBAs, BNAs, en BBAs.
 Daarnaast, met betrekking tot systemen anders dan HIV, zal de
 gemiddeld geschoolde vakman onderkennen dat de algemene
 werkwijze die hierboven wordt beschreven evenzo kan worden
 toegepast. Deze andere toepassingen echter kunnen eenvoudiger
 35 zijn dan de hierboven beschreven werkwijze omdat de TBAs die
 worden gebruikt niet noodzakelijk elke normale cellulaire

plaats hoeven te herkennen en daarom kan het gebruik van dimerisatie of andere werkwijze voor het onderscheid maken tussen TNAs en CNAs minder kritisch zijn. Bij het ontwerpen van probes in bindingsstructuren voor deze andere systemen zal de gemiddeld geschoolde vakman worden geleid door de volgende principes en overwegingen.

In de hierboven beschreven uitvoeringsvorm vormt de aantrekkingskracht voor het gebruik van de DNA-bindende gedeelten van het NF-kB eiwit als de TBA en de NF-Kb bindingselementen als de TBRs dat deze elementen een belangrijk "controlepunt" vormen voor de replicatie van HIV. Dat wil zeggen dat bekend is dat HIV vereist is voor het gebruik van NF-kB als een kritische eigenschap van zijn replicatieve levenscyclus. Vergelijkbare controlepunten van andere pathogenen worden gekozen en gebruikt als een basis voor de detectie in overeenstemming met de werkwijzen die hierin worden beschreven.

Uit de hier voorgaande beschrijving van algemene eigenschappen van deze uitvinding en de wijzen van zijn toepassing zal de gemiddeld geschoolde vakman erkennen dat er een veelvoud van specifieke wijzen bestaat voor het in praktijk brengen van de uitvinding. Bij wijze van voorbeeld is de werkwijze volgens deze uitvinding aan te passen aan werkwijzen en inrichtingen die gebruik maken van chromatografische test kits die worden beschreven in de Amerikaanse octrooien Nos. 4,690,691 en 5,310,650 (de '691 en '650 octrooien). In deze octrooien werd een poreus medium gebruikt voor het immobiliseren van ofwel een TNA of een vang probe en een oplosmiddel werd gebruikt voor het transporteren van de mobiele fase die ofwel bevatte een gelabelde PNA, in het geval dat het TNA was geïmmobiliseerd ofwel de TNA indien een vang probe was geïmmobiliseerd op de "capture zone." Op het moment dat het TNA werd gebonden in de capture zone ofwel door middel van direct immobilisatie ofwel door invanging

werd een gelabelde PNA gechromatografeerd door de capture zone en elk gebonden label werd gedetecteerd.

Het aanpassen van de onderhavige uitvinding aan een dergelijk systeem verschaft verbeteringen met betrekking tot
5 het gebruik van een Target Binding Structuur in de capture zone en daarom worden slechts perfect overeenkomende TBR sequenties gevangen of andere TBRs die nucleïnezuur configuraties weergeven specifiek gebonden door de TBA in de TNA-PNA duplexen vanwege het eerder beschreven gevoelige
10 onderscheidingsvermogen door de TBA tussen TNAs en CNAs.

Op het moment dat de TNA-PNA hybriden worden gebonden aan de geïmmobiliseerde TBA, dan wordt het signaal geamplificeerd door middel van het toevoegen van BNAs of gechromatografeerde BNAs door de capture zone. Tenslotte kan
15 het signaal verder worden versterkt door middel van het toevoegen van BBAs of gechromatografeerde gelabelde BBAs door de capture zone. Op deze wijze wordt het gemak van het uitvoeren van de analysestappen die worden beschreven in de '691 en '650 octrooien verbeterd door middel van het
20 verschaffen van het additioneel in staat zijn tot het verhogen van de specificiteit, en door amplificatie de gevoeligheid van de werkwijze beschreven in deze octrooien.

De gemiddeld geschoolde vakman zal ook onderkennen dat de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding kan worden
25 uitgevoerd in microtiter platen of deze kan geautomatiseerd worden. Het gebruik van machines die gebruik maken van de werkwijze volgens deze uitvinding vallen daarom van nature binnen de beschermingsomvang van de onderhavige beschrijving en de conclusies die hieraan zijn toegevoegd. Deze uitvinding
30 is dus bijvoorbeeld aanpasbaar voor gebruik in dergelijke instrumenten zoals Abbott Laboratories (Abbott Park, IL.) IMx tabletop analyzer. De IMx wordt op dit moment ontworpen om gebruikt te worden voor zowel fluorescentie polarisatie immunoassay (FPZA, zie Kier [1983] KCLA 3:13-15) en
35 microdeeltjes enzym immunoassay (MEZA, zie Laboratory

Medicine, Vol. 20, No. 1, januari 1989, pag. 47-49). De MEZA werkwijze wordt eenvoudig getransformeerd naar een nucleïnezuur detectiewerkwijze door gebruik te maken van de onderhavige uitvinding door gebruik te maken van TBA als een
 5 vangmolecuul bekleed op een submicron ($<0,5 \mu\text{m}$ gemiddeld) grootte microdeeltje gesuspenderd in oplossing. De microdeeltjes bekleed met de TBA worden gepipetteerd in een reactiecel. De IMx pipetteert hierna het monster (gehybridiseerde PNA-TNA) in de reactiecel waardoor een
 10 complex wordt gevormd met het TBA. Na een geschikte incubatieperiode wordt de oplossing overgebracht naar een inerte glasvezelmatrix voor welke de deeltjes een sterke affiniteit bezitten en waaraan de microdeeltjes plakken. Ofwel voor ofwel na het filteren van het reactiemengsel door
 15 de glasvezelmatrix worden BNAs en BBAs toegevoegd of enige andere signaal-amplificatie detectiemiddelen worden gebruikt wat afhankelijk is van de specifieke vorming van de TNA-PNA hybriden. Het geïmmobiliseerde complex wordt gewassen en het niet-gebonden materiaal vloeit door de glasvezelmatrix.

20 De gebonden complexen worden gedetecteerd door middel van op alkaline fosfatase gelabelde BBAs of andere (radioactief, enzymatisch, fluorescent) gelabelde BBAs. In het geval van alkaline fosfatase gelabelde BBAs, kan het fluorescente substraat 4-methyl umbelliferyl fosfaat of
 25 dergelijk reagens worden toegevoegd. Als alternatief kan om het enzym heen worden gegaan door middel van het direct labelen van de BBAs met dit of een hierop gelijkend reagens. In elk geval is de fluorescentie of een ander signaal proportioneel aan de hoeveelheid PNA-TNA hybriden die
 30 aanwezig zijn.

De fluorescentie wordt gedetecteerd op het oppervlak van de matrix door middel van een voor-oppervlak fluorometer zoals beschreven wordt door de fabrikant van de IMx. Met kleine aanpassingen die kunnen worden uitgevoerd door middel
 35 van routine experimenten voor het optimaliseren van een

instrument zoals de IMx voor nucleïnezuur hybridisatie en nucleïnezuur TBA interacties is de onderhavige uitvinding compleet toepasbaar voor het geautomatiseerd analyseren van TNA monsters.

5 9. Andere diagnostische toepassingen van deze uitvinding.

Hoewel de hiervoor verschaft beschrijving het gebruik verschaft van de onderhavige uitvinding op een aantal verschillende wijzen, worden vele additionele gebruiken van deze uitvinding eenvoudig afgeleid zoals bijvoorbeeld in een
10 mobiliteit-vertragingssysteem.

Volgens deze uitvoeringsvorm van de uitvinding wordt een verbetering van de zeer bekende elektroforetische beweging-verschuivingstest (EMSA) als volgt uitgevoerd (zie Figuren 12a en 12b):

15 Een DNA monster wordt gefragmenteerd ofwel door middel van willekeurige splitsing ofwel door middel van een specifieke restrictie endonucleasebehandeling. Het DNA in het monster wordt hierna gesplitst in twee gelijke hoeveelheden en een specifieke TNA aan een eerste hoeveelheid maar niet
20 aan de tweede. De eerste en tweede hoeveelheid worden hierna geelektroforeerd in een acrylamide of agarose gel, en het patroon van de DNA banden (ofwel gevisualiseerd door middel van ethidium bromide binding ofwel door middel van radioactieve labeling voordat de elektroforese wordt
25 uitgevoerd, wordt hierna vergeleken voor de twee hoeveelheden. DNA fragmenten met bindingsplaatsen waarvoor de TBA specifiek is, worden vertraagd met betrekking tot hun migratie door het elektroforetisch medium. Door gebruik te maken van een geschikte TBA kan elk aantal DNA of andere
30 nucleïnezuur sequenties worden gevolgd op deze wijze.

In een modificatie van de EMSA die hierboven wordt beschreven, wordt gefragmenteerd TNA gehybridiseerd met een PNA en gefractioneerd in een eerste dimensie. Men laat hierna het gefractioneerde DNA reageren met een geschikte TBA en een
35 verandering van de mobiliteit van DNA fragmenten wordt

waargenomen. Een versterking van de vertraging is mogelijk door het toevoegen van BBAs zoals hierboven wordt beschreven (zie bijvoorbeeld, Vijg en de referenties die hierin worden geciteerd met betrekking tot bekende technieken van twee (2) 5 dimensionale nucleïnezuur elektroforese, waarop de onderhavige uitvinding kan worden toegepast.

De volgende Voorbeelden worden verschaft voor het verder leiden van een gemiddeld geschoolde vakman met betrekking tot de uitvoeringswerkwijzen van deze uitvinding. 10 Standaard recombinant DNA technieken worden beschreven in Sambrook, Fritsch, en Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^e Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, en recentere teksten worden niet beschreven omdat zij nu behoren tot de algemene kennis 15 van de gemiddeld geschoolde vakman.

Voorbeeld 1 - Bereiding van PNAs en de labeling van PNAs

Probe nucleinezuren, PNAs, kunnen worden bereid met 20 behulp van middelen die goed bekend zijn in het vakgebied. Een enkel-strengs polynucleotide PNAs met een gedefinieerde sequentie kunnen worden bereid door middel van vaste fase chemische synthese volgens Merrifield. PNAs kunnen worden bereid door middel van geautomatiseerde synthese waarbij 25 gebruik wordt gemaakt van commercieel beschikbare technologie zoals harsen en machines die geproduceerd of op de markt worden gebracht door Applied Biosystems, ABI, of andere fabrikanten. Als alternatief, door gebruik te maken van bekende recombinant DNA werkwijzen worden specifieke PNA 30 sequenties *in vivo* gesynthetiseerd zoals bijvoorbeeld door middel van het kloneren van een duplex PNA in een vector welke in staat is tot replicatie in *E. coli*, en op deze wijze kunnen grote hoeveelheden van het duplex PNA worden bereid. Multimeren van de PNA kunnen worden gekloneerd in de vector 35 zodat voor elke mol vector verscheidende molen PNAs worden

vrijgemaakt na digestie van de vector met een restrictiefragment wat de PNA sequentie flankteert. Volgend op de synthese of de recombinant productie worden de PNAs gezuiverd door gebruik te maken van werkwijzen die goed
 5 bekend zijn in het vakgebied zoals door middel van gelelektroforese of hogedruk vloeistofchromatografie (HPLC). Indien de PNA wordt geproduceerd als een duplex, voor het gebruik in een hybridisatie assay voor de detectie van target nucleïnezuur sequenties, worden de strengen van de PNA
 10 gescheiden door middel van verwarming of andere werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied.

De specifieke sequenties van de basen in de PNA worden zodanig gekozen dat deze de sequentie reflecteren die moet worden gedetecteerd in een TNA onder de voorwaarde dat,
 15 volgens deze uitvinding, de PNA een 1/2 TBR sequentie bevat, zodanig dat dit er één is die bij hybridisatie van de PNA en TNA een TBR vormt. Omdat er bijna een niet-gelimiteerd aantal van dergelijke sequenties bekend is in het vakgebied, is de keuze van de PNA sequentie afhankelijk van de selectie door
 20 de gemiddeld geschoolde onderzoeker voor elke bepaalde toepassing. De sequentie van de HIV LTR is er één van een dergelijke sequentie die na hybridisatie van een PNA die codeert voor gedeelten van de LTR met de TNAs die coderen voor de HIV LTR, TBRs worden gevormd die in staat zijn tot
 25 binding aan de NF-kB of SP1 DNA bindende eiwitten.

Naast de sequenties die de TBR vormen na hybridisatie kan de PNA ook een 1/2 TBR bevatten. Deze sequentie is er één die, na hybridisatie met een booster nucleïnezuur, BNA, een BBR vormt welke in staat is tot binding van een BBA. De BBA
 30 is bij voorkeur een DNA bindend eiwit met een hoge affiniteit voor de BBR sequentie.

In dit specifieke voorbeeld treedt er een hybridisatie op tussen een PNA met als een 1/2 TBR SEQ ID NO. 4 en, aan het 3' uiteinde van die sequentie een 1/2 BBR
 35 sequentie en dit wordt getoond als SEQ ID NO. 35. De PNA die

codeert voor deze sequenties wordt ofwel gebruikt zonder labeling of deze is gelabeld met een radioactieve isotoop zoals P^{32} , S^{35} , of een vergelijkbare isotoop waarbij gebruik wordt gemaakt van werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied. Als alternatief wordt de PNA gebonden aan een korrel met een grootte van tussen 0,01 tot 10 μm welke kan worden gekleurd voor een eenvoudige visuele detectie. Dit label vormt de OSA die wordt beschreven in de specificatie. Deze probe hybridiseert met de HIV LTR sequenties zodat gevormd wordt een TBR die NF-kB bindt. Daarnaast hybridiseert de PNA met BNAs met een complementaire 1/2 BBR zodat gevormd wordt een bacteriofaag lambda linker operator die ofwel *cro* bindt ofwel lambda repressor eiwitten.

Op een vergelijkbare wijze zoals hierboven wordt beschreven worden PNAs gebruikt waarbij de 1/2 TBR er elk één is van SEQ ID NO. 5 of SEQ ID NOS. 7-34 en een 1/2 BBR, zoals SEQ ID NO. 35 of SEQ ID NO. 36 bevindt zich ofwel aan het 3' uiteinde ofwel aan het 5' uiteinde van de 1/2 TBR.

20 Voorbeeld 2 - Bereiding en labeling van de BNAs

Vergelijkbaar met de werkwijzen die in Voorbeeld 1 worden beschreven voor de bereiding en labeling van PNAs, worden BNAs bereid en gelabeld waarbij gebruik wordt gemaakt van werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied. Zoals beschreven wordt in het Amerikaanse octrooi No. 4,556,643, welke hierin wordt opgenomen door middel van een referentie (zie specifiek Voorbeeld 1), kunnen nucleïnezuursequenties die coderen voor specifieke nucleïnezuur bindende sequenties in massa worden geproduceerd door middel van een klonering in een repliceerbare vector. Daarnaast, vergelijkbaar met die beschrijving, kunnen de 1/2 TBR en 1/2 BBR sequenties co-lineair worden geproduceerd op deze wijze met het onderscheid echter dat volgens de onderhavige uitvinding de 1/2 TBR sequentie zelf een nucleïnezuur-bindende component

herkenningsplaats vorm en de 1/2 BBR, terwijl deze een nucleïnezuur-bindende component herkenningsplaats vormt, ook middelen verschaft voor het amplificeren van het signaal dat wordt geproduceerd na binding van de 1/2 TBR aan

5 complementaire sequenties in de TNA door middel van het verschaffen van de polymerisatie van de BNAs op de TNA gebonden PNA. Om dit te verschaffen wordt een sequentie zoals SEQ ID NO. 35 verschaft welke codeert voor de linker operator van de bacteriofaag lambda met additionele sequenties zodat
10 een overlappende sequentie wordt gecreëerd aan één of beide uiteinden van de BNA na hybridisatie met de PNA.

Als een specifiek voorbeeld wordt vectoriele polymerisatie van de BNAs op een TNA verschaft met behulp van SEQ ID NOS. 40-43. In dit voorbeeld, codeert SEQ ID NO. 40
15 1/2 TBRs die zullen hybridiseren met twee 1/2 TBRs in een TNA zodat gevormd worden twee NF-kB bindingsplaatsen terwijl tegelijkertijd een bacteriofaag lambda linker operator 1/2 BBR wordt verschaft welke additioneel eindigt aan het 3' uiteinde met de herkenningsplaats voor het restrictie enzym
20 *Pst*I. Naast de BNA complementeert SEQ ID NO. 41, met de 1/2 BBR complementair aan de 1/2 BBR op de PNA, SEQ ID NO. 40, completeert de BBR terwijl tegelijkertijd de *Pst*I herkenningsplaats wordt gecomplementeerd, wat overlaat een vier basepaar overlap voor hybridisatie met additionele BNAs.
25 In overeenstemming hiermee wordt SEQ ID NO. 42 toegevoegd welke een vier basepaar sequentie bezit aan het 3' uiteinde welke complementair is aan de vier base overlap die overblijft na de hybridisatie van SEQ ID NOS. 40 en 41. Daarnaast wordt SEQ ID NO. 42 uitgerust met een vijf base
30 sequentie aan zijn 5' uiteinde welke een gedeelte vormt van een *Bam*HI herkenningsplaats. De groeiende polymeer van BNAs wordt verder uitgebreid door middel van de toevoeging van de BNA SEQ ID NO. 43, welke complementair is aan SEQ ID NO. 42, waarbij de BBR wordt gecomplementeerd terwijl tegelijkertijd
35 de *Bam*HI herkenningsplaats wordt gecomplementeerd en wat een vier base overlap achterlaat welke verder kan worden

gehybridiseerd met BNAs met complementaire sequenties. Op deze wijze kunnen de BNAs zeer uitgebreid worden gehybridiseerd zodat het signaal van een enkele PNA-TNA hybridisatiegebeurtenis sterk wordt geamplificeerd.

- 5 Zoals het geval is met de PNAs die worden beschreven in Voorbeeld 1, kunnen de BNAs worden gebruikt in een niet-gelabelde vorm of deze kunnen zijn gelabeld waarbij gebruik wordt gemaakt van werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied en welke worden beschreven in Voorbeeld 1. Er zal ook worden
- 10 geapprecieerd dat, in plaats van het hierna produceren van een BNA polymeer door middel van een opeenvolgende toevoeging van BNAs aan het PNA-TNA complex, de BNA polymeer vooraf kan zijn gevormd en deze kan direct worden toegevoegd aan het PNA-TNA complex. Een eenvoudige werkwijze voor het voorvormen
- 15 van een dergelijke BNA polymeer omvat de recombinant productie van een vector waarin multimeren van het BNA worden verschaft met een unieke restrictieplaats aan elk uiteinde van de polymeer. Deze polymeer van BNAs welke BBRs bevat wordt uit de vector gesneden en hybridiseert aan een enkel-
- 20 strengs 1/2 BBR die achterblijft in de PNA na hybridisatie van de PNA en de TNA. Dit wordt bereikt door het verschaffen van een enkel-strengs sequentie in de PNA die complementair is aan een overlap geproduceerd in de BNA polymeer op het moment dat deze wordt uitgesneden uit de productievector.
- 25 Voorbeeld 3 - Productie van HNAs en hun gebruik voor het cappen van BNA polymeren

De HNAs volgens deze uitvinding worden geproduceerd in overeenstemming met werkwijzen die bekend zijn in het

30 vakgebied voor polynucleotide productie zoals beschreven wordt in de Voorbeelden 1 en 2 voor PNAs en BNAs. Met betrekking tot de productie van HNAs echter, is de sequentie van de HNA specifiek ontworpen dat een substantieel gedeelte van de HNA een zelf-complementair palindroom vormt zodat

35 gevormd wordt een hairpin, terwijl tegelijkertijd een enkel-

strengs gedeelte wordt gevormd met voldoende base om in staat te zijn tot hybridisatie met enkel-strengs sequenties in groeiende keten van BNAs die worden beschreven in Voorbeeld 2.

5 In dit Voorbeeld wordt een HNA volgens SEQ ID NO. 44 verschaft voor het vormen van een cap op de extensies van BNAs op de PNA in Voorbeeld 2 na de toevoeging van de BNA, met SEQ ID NO. 43. Dit wordt verschaft omdat SEQ ID NO. 44, terwijl deze een palindromische sequentie bezit die een
10 stabiele hairpin vormt ook een sequentie aan het 5' uiteinde van de HNA bevat welke de *Bam*HI sequentie complementeert die wordt gevormd door middel van hybridisatie van SEQ ID NO. 42 en SEQ ID NO. 43. Natuurlijk wordt de terminatie van de polymeer na de toevoeging van slechts 3 BNAs beschreven
15 vanwege het eenvoudig aantonen van de uitvinding. Zoals hier wordt beschreven, kan deze polymerisatie in essentie eeuwig worden voortgezet voor het amplificeren van het signaal van de PNA-TNA hybridisatiegebeurtenis. Op het moment dat de HNA hybridiseert aan de groeiende keten van BNAs, wordt een cap
20 gevormd op de polymeer en er is geen verdere uitbreiding van de polymeer mogelijk.

Voorbeeld 4 - Bereiding van TBAs en BBAs. Labeling en immobilisatie daarvan

25

De TBAs en BBAs welke kunnen worden gebruikt volgens de onderhavige uitvinding omvatten elke substantie die in staat is tot het specifiek binden aan de TBRs en BBRs die worden gevormd door middel van hybridisatie van de PNAs, TNAs
30 en BNAs. Het gebruik van DNA-bindende eiwitten vormt één voorbeeld van dergelijke substanties.

Voor dit voorbeeld is de TBA de dimeer van het DNA-bindend gedeelte van p50 en de BBA is het lambda *cro* eiwit. Deze eiwitten kunnen worden geproduceerd met behulp van

werkwijzen die bekend zijn in het vakgebied. De genen voor beide van deze eiwitten zijn gekloneerd. Deze eiwitten worden dus recombinant geproduceerd en gezuiverd waarbij gebruik wordt gemaakt van werkwijzen die bekend zijn in het

5 vakgebied. Daarnaast worden deze eiwitten gelabeld ofwel met een radio-isotoop zoals radioactief jodium ofwel met een enzym zoals beta-galactosidase of horseradish peroxidase, of met een fluorescerende kleurstof zoals fluoresceïne of rhodamine waarbij gebruik wordt gemaakt van werkwijzen die

10 bekend zijn in het vakgebied. Daarnaast kan ofwel één of beide van de TBA en BBA worden geïmmobiliseerd op een vast oppervlak zoals het oppervlak van een microtiterplaat of het oppervlak van een korrel zoals een gekleurde korrel met een diameter ergens tussen 0,01 tot 10 μm . De labels op de TBAs

15 en BBAs kunnen hetzelfde zijn of verschillend.

In dit voorbeeld wordt de TBA die het dimere p50 DNA-bindende domein bevat gelabeld met rhodamine terwijl de BBA, cro, gelabeld is met fluoresceïne. In overeenstemming hiermee, na hybridisatie van de PNAs, TNAs, BNAs, en HNAs

20 zoals beschreven in deze octrooibeschrijving en de eerdere en volgende voorbeelden, worden nucleïnezuur hybriden, indien deze worden gevormd, in contact gebracht met een overmaat aan gelabeld TBA en cro. De fluorescentie van deze labels wordt gemeten door gebruik te maken van werkwijzen die bekend zijn

25 en de detectie van beide signalen is indicatief voor de aanwezigheid van $\frac{1}{2}$ TBR sequenties in de TNA. Het onderscheidende signaal dat wordt geproduceerd door middel van de fluorescentie van de NF-kB en cro is een meting van de mate waarin de polymerisatie van BNAs op de PNA-TBA hybride

30 heeft geresulteerd in de amplificatie van het signaal.

Amplificatie van één tot meer dan een duizend maal wordt overwogen volgens de werkwijze van deze uitvinding.

Voorbeeld 5 - Hybridisatie van twee PNAs met een TNA en een

35 onderscheid tussen een TNA en een CNA

De PNAs, PNA1, SEQ ID NO. 40 en PNA2, SEQ ID NO. 45, worden gebruikt in een ongeveer 10-voudige molaire overmaat ten opzichte van de concentratie TNAs in een testvoorbeeld. Voor dit voorbeeld wordt een geïsoleerde duplex HIV LTR, 5 waarin één streng waarvan de sequentie SEQ ID NO. 37 is, zoals getoond in Figuur 7, en de andere streng daarvan is complementair aan de sequentie die getoond wordt in Figuur 7, wordt gebruikt als de TNA. Een duplex geïsoleerd CNA wordt ook gebruikt in dit voorbeeld en één streng daarvan is 10 hetzelfde als SEQ ID NO. 37, behalve dat in de eerste NF-kB bindingsplaats die getoond wordt in Figuur 7, bij het centrum van de bindingsplaats, positie 1 in Figuur 7, in plaats van een "T" er een "A" is waardoor de complementaire streng daarom mispaart met de SEQ ID NO. 40 PNA op deze positie.

15 SEQ ID NO. 40 en SEQ ID NO. 45 zijn beide aangepast aan gescheiden reacties waarbij de eerste de hierboven beschreven TNA bevat en de tweede bevat de hierboven beschreven CNA. De monsters worden in oplossing gebracht in een geschikte hybridisatiebuffer zoals 10 mM Tris (pH 7,5), 1 20 mM EDTA. De monsters worden verwarmd tot ongeveer 90°C gedurende ongeveer vijf minuten voor het streng scheiden van de duplex TNAs en CNAs in de monsters, en hierna laat men de monsters afkoelen om te verschaffen dat de strengen van PNAs, TNAs en CNAs annealen.

25 Op het moment dat de hybridisatie voltooid is, wat kan worden bepaald door gebruik te maken van bekende werkwijzen zoals door het berekenen van de $t_{1/2}$ gebaseerd op de base samenstellingen en de annealingstemperatuur waarbij gebruik wordt gemaakt van bekende werkwijzen, is de SEQ ID 30 NO. 40 PNA gepolymeriseerd door toevoeging van de BNAs zoals in Voorbeeld 2, en de SEQ ID NO. 45 PNA2 probe is gepolymeriseerd met BNAs die beginnen bij de Sph1 herkenningsplaatsoverhang. Volgens de toevoeging van de BNAs en een korte hybridisatieperiode, worden de gescheiden 35 monsters toegevoegd aan korrels bekleed met covalent

geïmmobiliseerd NF-kB, en men laat de NF-kB binden aan elk van de TBRs gevormd in de TNA en CNA monsters. Na ongeveer 15 minuten binding worden de monsters twee maal gewassen met ongeveer drie volumina van een geschikte wasbuffer zoals 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, of een andere buffer waarvan vooraf bepaald is dat deze niet interfereert met NF-kB, of bacteriofaag lambda CI repressor eiwit bindingsactiviteit. Na elke was, laat men de korrels neerslaan door middel van zwaartekracht of door middel van een korte centrifugatie, .

10 Dit verwijdt alle nucleinezuren die niet een perfecte NF-kB bindingsplaats hebben gevormd door hybridisatie van de PNAI en TNA sequenties.

Na de uiteindelijke was wordt bacteriofaag lambda CI repressor eiwit gelabeld met een radioactieve isotoop zoals met radioactief jodium of gelabeld met een enzym zoals horseradish peroxidase met gekleurde korrels, of met een fluorescent label toegevoegd aan elk monster. De monsters worden hierna verscheidene malen (ongeveer 3) gewassen met verscheidene volumina (ongeveer 2) van een geschikte wasbuffer zoals 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, of een andere buffer waarvan vooraf bepaald is dat deze niet interfereert met NF-kB, of bacteriofaag lambda CI repressor eiwit bindingsactiviteit. Na elke wasstap laat men de korrels neerslaan door middel van zwaartekracht of door middel van een korte centrifugatie. Volgend op de laatste neerslag of centrifugatie wordt het gebonden label gekwantificeerd door middel van de detectie van de gebonden radioactiviteit, de vrijgemaakte kleur in enzymatische assay, de kleur van de gebonden korrels of door middel van fluorescentie detectie.

30 Als alternatief kan een anti-CI antilichaam worden toegevoegd en een standaard sandwich enzym gelinkt immuno assay of radioimmuun assay kan worden uitgevoerd voor het detecteren van de gebonden repressor. Daarnaast, als een negatieve controle (achtergrond) worden alle hiervoor genoemde

35 manipulaties gelijktijdig uitgevoerd met een monster waarin

korrels worden gebruikt waarop zich geen geïmmobiliseerd NF-kB bevindt.

Als een resultaat van het hiervoor beschreven assay bezitten de controle- en CNA-bevattende monsters 5 vergelijkbare lage signalen terwijl de TNA-bevattende monsters een signaal bezitten dat goed ligt boven de achtergrond.

Voorbeeld 6 - Een Test Kit voor de Detectie van of HIV

10

A. Kit Inhoud:

1. Microtiter plaat.
2. 1 mg/mL oplossing van recombinant geproduceerd NF-kB in
15 tris-gebufferde zoutoplossing.
3. Buis die enkel-strengs HIV PNAs bevat (een mengsel van vooraf gemengde oligonucleotiden die coderen voor NF-kB ½ bindingsplaatsen, dat wil zeggen, een mengsel van SEQ. ID. Nos.7 en 8).
- 20 4. Buis welke enkel-strengs humaan genomische PNA bevat, SEQ ID NO. 1.
5. Buis met nuclease (*PstI*).
6. Buis met protease.
7. Buis welke pre-gepolymeriseerde BNA's bevat, 100
25 herhalende eenheden van bacteriofaag lambda O_R, voorzien van een cap met een HNA maar met vrije 1/2 BBRs beschikbaar voor binding aan de PNA-TNA hybrididen.
8. Buis met horseradish peroxidase (hrp) geconjugeerd cro.
9. Buis met hrp gekleurd substraat.
- 30 10. Tris-gebufferde zoutoplossing, 100 mL.
11. Lancet.

12. Reactiebuizen A, B, C, elk bevattende 250 μ L gedestilleerd water.

13. Medicijn drupper.

5 B. Assay Method:

- (a) De microtiter plaat (item 1) wordt bekleed met de oplossing van recombinant geproduceerde NF-kB (item 2) met een concentratie van 1 mg/mL in Tris gebufferde zoutoplossing overnacht bij 4°C terwijl men schudt.
- 10
- (b) Drie druppels bloed van de testafnemer worden verkregen door middel van het prikken in de vinger door middel van een lancet (reagens 11), en een druppel bloed wordt gedispenseerd in elk van de reactiebuizen A, B, en C (reagens 12).
- 15
- (c) In elke buis wordt één druppel protease oplossing gedispenseerd (reagens 6) met de medicinale drupper (item 12) en de buis wordt geschud en men laat deze staan gedurende 5 minuten.
- 20
- (d) Een druppel nuclease (item 5) wordt toegevoegd aan elk van de buizen A-C waarbij gebruik wordt gemaakt van de medicinale drupper en de buizen worden geschud en men laat deze staan gedurende 10 minuten.
- 25
- (e) Een druppel van item 3 wordt toegevoegd aan buis A (test monster); één druppel van item 4 wordt toegevoegd aan buis B (positieve controle); en één druppel zoutoplossing (item 12) wordt toegevoegd aan buis C als een negatieve controle. De buizen worden verwarmd tot 50°C in heet water en men laat deze afkoelen tot kamertemperatuur gedurende 1 uur.
- 30
- (f) Terwijl men de hybridisatie laat voortgaan zoals beschreven wordt in stap (d) wordt de overmaat aan

eiwit afgenomen van het oppervlak en de microtiterplaat afkomstig uit stap (a) en de plaat wordt gewassen met een Tris gebufferde zoutoplossing (buis 10).

- 5 (g) De inhoud van buizen A-C uit step (e) wordt overgebracht naar drie wells van de microtiter plaat en men laat deze staan gedurende 1 uur terwijl men schudt.
- 10 (h) De microtiter wells welke de inhoud van de buizen A-C bevatten, worden gespoeld met een Tris gebufferde zoutoplossing en leeg gemaakt.
- (i) Een druppel van item 7 wordt toegevoegd aan elk well en men laat deze hybridiseren met elke 1/2 BBR plaatsen die gebonden zijn aan de plaat gedurende 1 uur wat gevolgd wordt door drie spoelingen met een Tris gebufferde zoutoplossing.
- 15 (j) Een druppel van item 8 wordt toegevoegd aan elke well en men laat cro binden aan elke gebonden BNA's gedurende 10 minuten, gevolgd door vijf, één mL was tappen met een Tris gebufferde zoutoplossing.
- 20 (k) Een druppel van het hrp substraat wordt toegevoegd aan elke well en men laat de kleur ontwikkelen.

C. Resultaten:

25

Indien de wells A en B beide een kleurontwikkeling vertonen en well C doet dit niet, dan is de test valide en het individu is geïnfecteerd met HIV. Indien slechts well A een kleurontwikkeling toont, of indien well C een

30 kleurontwikkeling toont, dan is de test niet correct uitgevoerd en deze is niet geldig. Indien wells A en C geen kleurontwikkeling vertonen, maar well B wel, dan is de test valide en het individu is niet geïnfecteerd met HIV.

Voorbeeld 7 - Productie van Verschillende Nieuwe TBAs

Nieuwe TBAs voor gebruik in de onderhavige uitvinding worden als volgt bereid:

5

(a) NFkB/NF-kB (HIV-Detectie I). Een nucleïnezuur dat codeert voor één van de SEQ ID NOS. 63-71 of een dergelijk NF-kB DNA bindingseiwit wordt in frame gefuseerd aan een nucleotide sequentie welke codeert voor een structuur sequentie zoals
 10 *cro*, zodanig dat de NF-kB DNA herkenningsequentie is gecodeerd aan de amino of carboxy terminus van de *cro* sequentie. Optioneel wordt een verbindingssequentie verschaft tussen de NF-kB sequentie en de *cro* sequentie. Aan de andere terminus van *cro* wordt optioneel een nucleair
 15 lokalisatiesignaal sequentie zoals SEQ ID NO. 72 verschaft. Daarnaast worden asymmetrische sequenties optioneel verschaft aan de *cro* terminus die niet wordt gebruikt door de NF-kB herkenningsequentie. Voorbeelden van complete TBAs worden hieronder getoond.

20 (b) NF-kB/SP1 (HIV-Detectie II). Op een vergelijkbare wijze zoals datgene wat hierboven wordt beschreven onder (a) wordt een coderende sequentie die codeert voor het NF-kB herkenning domein bereid. In een gescheiden construct, in plaats van SEQ ID NOS. 63-72, wordt de coderende sequentie
 25 voor het DNA herkenning gedeelte van SP1 opgenomen. Dergelijke sequenties moeten coderen voor een geheel of een functioneel gedeelte van SEQ ID NO. 73, wat het gedeelte is van de SP1 transcriptie factor welke DNA binding verschaft (zie Kadonaga et al. [1987] Cell 51:1079-1090). De NF-kB-
 30 coderende vector en de SP1-coderende vector worden hierna co-getransfecteerd in een geschikt expressiesysteem zoals goed bekend is in het vakgebied. Een monomere NF-kB herkenningseenheid wordt toegevoegd voor het complementeren van het NF-kB herkenning dimeer na de constructie van de SP1
 35 en NF-kB herkenningseenheden door de chaperonne. De

asymmetrische sequenties voorkomen de vorming van NF-kB of SP1 dimeren en richten in plaats hiervan, de vorming van NFkB-SP1 heterodimeren (dat wil zeggen, HIV-Detectie II), welke hierna worden geïsoleerd uit het expressiesysteem
 5 (zoogdier of bacteriële cellen) door gebruik te maken van bekende werkwijzen.

(c) SP1/SP1 TBAs (HIV-Detectie III). Zoals hierboven wordt beschreven in (b) wordt een SP1-coderend TBA construct
 10 gebruikt. Alleen dit construct wordt echter getransfecteerd in het expressiesysteem en de asymmetrische sequenties die de vorming verschaffen van SP1-SP1 dimeren worden opgenomen.

(d) SP1-TATA (HIV-Detectie IV). Zoals hierboven wordt
 15 beschreven onder (b) wordt een SP1-coderende TBA recombinant geproduceerd. Daarnaast, wordt een recombinant die codeert voor een TBA met de bindingssequentie SEQ ID NO. 74, of hierop gelijkende sequentie die codeert voor een TATA herkenningseenheid bereid met asymmetrische sequenties
 20 complementair aan diegenen die zijn opgenomen in het SP1 TBA-coderende construct. Deze constructen worden co-getransfecteerd en de heterodimeren worden geïsoleerd door gebruik te maken van standaard werkwijzen waaronder affiniteitszuivering op een DNA kolom met de geschikte SP1-
 25 TATA bindingsgebieden.

(e) SP1-E2 (HPV-Detectie I). Een SP1-coderend construct wordt bereid zoals hierboven onder (b). Een E2 TBA-coderend construct wordt bereid door gebruik te maken van een
 30 sequentie die gecodeerd wordt volgens één van de SEQ ID NOS. 75-84 en 94-98 welke de papillomavirus E2 DNA herkenningseenheden zijn (zie Hegde et al. [1992] Nature 359:505-512) of hierop gelijkende herkenningseenheden en deze worden bereid en co-getransformeerd of co-getransfecteerd met

het SP1 TBA-coderende construct. Monomere E2 herkenningseenheden worden toegevoegd aan de complete E2 herkenningsdimeer na de samenstelling van de E2-SP1 herkenningseenheid met behulp van de chaperonne. De
 5 heterodimeer HPV-Detectie I wordt geïsoleerd door gebruik te maken van bekende werkwijzen.

(f) E2-E2 (HPV-Detectie II). Zoals hierboven wordt beschreven onder (e) wordt een E2 TBA-coderend construct bereid behalve
 10 dat asymmetrische sequenties worden opgenomen welke de vorming verschaffen van E2 dimeren. De tot expressie gebrachte dimeren worden hierna geïsoleerd door gebruik te maken van bekende werkwijzen waaronder affiniteit voor een dimere E2 bindingsplaats op een DNA affiniteitskolom.

15

(g) E2-TATA (HPV-Detectie III). Zoals hierboven beschreven in (e) en (d), worden E2 en TATA bindings TBAs bereid (respectievelijk), behalve dat asymmetrische sequenties
 20 worden opgenomen welke de vorming versterken van heterodimeren in plaats van homodimeren. Deze constructen worden hierna tot co-expressie gebracht en de heterodimeren worden geïsoleerd.

(h) TATA-TATA (HPV-Detectie IV). Zoals hierboven wordt
 25 beschreven onder (a) en (d), wordt een TATA bindende TBA-coderend construct bereid door gebruik te maken van asymmetrische sequenties die de homodimeervorming bevorderen en de homodimeer wordt geïsoleerd.

(i) Andere TBAs. Zoals hierboven is beschreven voor de HIV en
 30 HPV TBAs, kunnen TBAs voor elk bepaald pathogeen of ziekte-aandoening worden geproduceerd door middel van het identificeren van twee specifieke DNA bindingseiwitten en het vormen van het expressie construct door gebruik te maken van

een geschikte linker, constructie en asymmetrische sequenties.

Voorbeeld 8

5

Op een vergelijkbare wijze als het assay dat wordt beschreven in Voorbeeld 5, wordt een stringenter assay geproduceerd door gebruik te maken van het duplex NF-kB-SP1 bindend eiwit bereid volgens Voorbeeld 6. In overeenstemming
10 hiermee kunnen de probes die worden getoond in Figuur 7 en die worden gebruikt in Voorbeeld 5, worden verlengd voor het reduceren van de interprobe afstand en daarmee het reduceren van de flexibiliteit van het DNA in de TNA.

15 Voorbeeld 9 - Productie van "Hoge-Orde" TBAs

Door een geschikt gebruik van asymmetrische sequenties worden TBAs geproduceerd die dimeren, trimeren, tetrameren, pentameren, of hexameren zijn van specifieke DNA
20 herkenningseenheden. Op deze wijze wordt een hexamere TBA geproduceerd door het maken van een eerste NF-kB p50 dimeer TBA waarbij gebruik wordt gemaakt van asymmetrische sequenties welke dimeerformatie verschaffen. Daarnaast verschaffen de asymmetrische sequenties de tetramerisatie van
25 de p50 dimeer met een SP1-SP1 dimeer. Tenslotte richten de additionele asymmetrische sequenties de hexamerisatie met een dimeer welke nucleaire lokalisatiesequenties bezit. Dit wordt verschaft door het incorporeren, bijvoorbeeld, van de asymmetrische sequenties van insuline welke van nature
30 hexameren vormen. Deze hexameervorming wordt gericht door de sequenties SEQ ID NOS. 85(A) en 86(B), 87(A) en 88(B), 89(A) en 90(B), en 91(A) en 92(B) (zie Figuren 13 en 14).

Vanwege de extreem hoge affiniteit voor de HIV-LTR die kan worden gegenereerd door gebruik te maken van multimere TBAs worden de verbindingen met deze structuur en welke kunnen worden gebruikt voor dit doeleinde, aangeduid
 5 als "HIV-Lock".

Een optimale HIV-Lock wordt gedefinieerd door middel van footprinting (volgens werkwijzen die goed bekend zijn in het vakgebied) TBAs die gebonden zijn aan TBRs in de HIV LTR met als doel het bevestigen dat de bindingsaffiniteit van elk
 10 DNA-bindend eiwit dat bijdraagt aan de vorming van het multimere TBA complex naar beneden wordt geschaald ten opzichte van een affiniteit van elke van een natuurlijke target sequentie (dat wil zeggen CNAs) waarvan de DNA bindingsherkenningseenheid van de TBA is verkregen. Elk
 15 hiermee samengaan verlies aan bindingsaffiniteit voor de HIV TBRs wordt meer dan gecompenseerd door de vorming van de multimeren die hieronder worden beschreven.

Er kan een competitie bestaan tussen de binding van elke component TBA voor zijn TBR en constructie door middel
 20 van asymmetrische sequenties met betrekking tot het vormen van de multimeren. Dit wordt omzeild door het aanpassen van de linkers tussen de chaperonne en de asymmetrische sequenties in elke TBA component zodat deze wedijverende gebeurtenissen worden ontkoppeld. De resulterende
 25 vermindering van de dimensionaliteit van de diffusie (effectieve concentratieverhoging) met betrekking tot de TBA asymmetrie en structuurcomponenten resulteert in een efficiënte vorming van het multimere complex.

Op basis van de footprinting, wordt de lengte en de
 30 samenstelling van de linkers aangepast voor het verschaffen van een optimaal onderscheid tussen target HIV sequenties en natuurlijk voorkomende sequenties. Op deze wijze, hoewel elke component TBA een lage affiniteit zal bezitten voor de CNA en TBR sequenties, zal het multimere complex een extreem hoge
 35 affiniteit bezitten voor de nu uitgebreide TBR die wordt

herkend door het multimere complex (de vierkant van de
affiniteit voor elke TBR herkend door elke component TBA van
de multimere TBA), terwijl er nog steeds een lage affiniteit
bestaat voor de CNAs. Op deze wijze, worden andere multimere
5 TBA complexen naast de HIV-Lock bereid.

TBAs die op deze wijze kunnen zijn gevormd, omvatten
de volgende sequenties welke worden samengesteld door middel
van een verbinding van ofwel de eiwit sub-eenheden ofwel de
nucleïnezuur sequenties die coderen voor deze sub-eenheden op
10 de volgende wijze:

	Reeks	Verbindingssequenties van Groepen
	A	I + II + III
	B	IV + V + III
15	C	IV + III

waarbij de groepen I-V bestaan uit sequenties geselecteerd
uit:

20

Groep Gekozen uit de Sequenties:

	I	Elk van SEQ ID NOS. 85-92
	II	Met Ser, verbonden met elk van SEQ ID NOS 104-106, waarvan elk verbonden is aan SEQ ID NO. 99.
25	III	SEQ ID NO. 100 verbonden met elk van SEQ ID NOS. 75-84 of 94-98; SEQ ID NO. 101 verbonden met ofwel SEQ ID NO. 74 of SEQ ID NO. 93; of SEQ ID NO. 102 verbonden met SEQ ID NO.74 of SEQ ID NO. 93; of elk van SEQ ID NO. 72, 103, 73, of 63-71.
30	IV	Elk van SEQ ID NOS. 104-106.
	V	SEQ ID NO.99.

Specifieke voorbeelden van dergelijke TBAs zijn SEQ ID NOS. 109-116, die als volgt zijn samengesteld:

	Reeks	SEQ ID NO.	Verbonden SEQ IDS
5			
	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
10	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

15

Op deze wijze, door te kiezen tussen geschikte asymmetrische sequenties, constructiesequenties, en DNA herkenningseenheden kunnen vele verschillende TBAs worden gevormd. Daarnaast zullen reeksen van deze, zoals SEQ ID NOS. 114 en 115, met elkaar associëren maar dimeren van SEQ ID NO. 114 of 115 zullen niet gevormd worden vanwege lading-afstoting in de gemuteerde constructiesequenties (SEQ ID NO. 104 is *cro*; SEQ ID NO. 105 is een nieuwe gemuteerde, negatief geladen *cro*, en SEQ ID NO. 106 is een nieuwe gemuteerde positief geladen *cro*).

Natuurlijk kan de gemiddeld geschoolde vakman gebaseerd op de aminozuursequenties van deze TBAs recombinant nucleïnezuur maken die coderen en dergelijke recombinant klonen kunnen natuurlijk een integraal onderdeel vormen van deze uitvinding.

Voorbeeld 10 - HIV Test Gebruikmakend van "HIV-Lock"

Op een zeer vergelijkbare wijze als de werkwijze die wordt gebruikt in Voorbeeld 6, wordt de "HIV-Lock" geproduceerd volgens Voorbeeld 9 gebruikt als een TBA, reagens 2, met vergelijkbare resultaten.

Voorbeeld 11 - HIV Test Gebruikmakend van "HIV-LOCK" indien bloed wordt getest voor donatie

10

Indien de hoeveelheid bloed die moet worden getest niet limiterend is, zoals het geval is indien bloedmonsters voor donaties worden getest op HIV-besmetting, worden testen die vergelijkbaar zijn met Voorbeeld 6 uitgevoerd, maar voor elk van de buizen A-C, wordt 5 mL bloed gepelletiseerd in een tabelcentrifuge. Andere reagentia worden opgeschaald voor zover noodzakelijk voor het bewerken van de grotere hoeveelheid TNA aanwezig in het monster.

20 Voorbeeld 12 - "HIV-LOCK" als een Anti-HIV Therapeutische Stof

"HIV-LOCK" geproduceerd volgens Voorbeeld 9 wordt geformuleerd als een 1 mg/mL oplossing in liposomen en intraveneus geïnjecteerd in een individu die is getest en waarvan bevestigd is dat deze geïnfecteerd is met HIV. Een dosering van ongeveer 0.1 mg tot 100 mg "HIV-LOCK"/kilogram lichaamsmassa wordt geïnfuseerd gedurende een tijdsperiode van vier-en-twintig uur en de concentratie van HIV p24 in het serum van de patiënt wordt gemeten. De behandeling wordt zo vaak herhaald als noodzakelijk is, zoals, indien verhogingen in het serum p24 optreden.

Voorbeeld 13 - Gebruik van een HIV-TBA Construct als een
Therapeuticum

Een recombinant retrovirale of hierop gelijkende
5 vector wordt gebruikt voor het toedienen van een construct
dat codeert voor een HIV-LTR bindende TBA aan een
geïnfecteere patiënt. De vector codeert een chaperonne, zoals
cro, en sequenties DNA voor de bindende gedeelten van p50.
Dezelfde vector codeert ook voor een chaperonne waarop een
10 SP1 TBA vouwt. Asymmetrische sequenties worden zodanig
verschafft dat na co-expressie van de p50-TBA en de SP1-TBA in
een enkele HIV-geïnfecteerde cel *in vivo*, een onmiddellijke
associatie optreedt tussen deze TBAs, terwijl tegelijkertijd
elke associatie wordt voorkomen tussen het DNA bindend
15 gedeelte van p50 en endogene p50 of p65 monomeren. NLS
sequenties worden ook verschafft in de TBAs zodat, nadat
dimeervorming de TBA zich onmiddellijk verplaatst naar de
nucleus van de cel en deze bindt specifiek aan geïntegreerde
HIV sequenties, waarmee dus elke transcriptie wordt voorkomen
20 van die positie.

Voor dit doel is het wenselijk om sequenties te
selecteren die coderen voor DNA bindende domeinen, zodanig
dat tot expressie gebrachte monomeren worden samengesteld tot
een TBA welke niet bind aan natuurlijke humane sequenties.
25 Het is dus slechts na binding van de TBA componenten aan hun
target sequenties dat alle associatie tussen alle componenten
van de TBA optreedt zodat een complex wordt gevormd welke
strak en specifiek bindt aan de HIV-LTR.

30 Voorbeeld 14 - Diagnostische Test Kit voor Humaan
Papillomavirus

Deze diagnostiek voor humaan papillomavirus maakt
gebruik van het bekende verschil tussen goedaardige en

carcinogene HPV voor het verschaffen van een test welke de ontvankelijkheid aanduidt voor een kwaadaardigheid in een patiënt. De papillomavirussen zijn een groep van kleine DNA virussen die samengaan met goedaardige squamous epitheliale

5 celtumoren in hogere vertebraten. Ten minste 27 aparte humane typen papillomavirussen (HPVs) zijn gevonden; vele van deze gaan samen met specifieke klinische lesies. Vier van deze, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, en HPV-33 gaan samen met humane buislesies. In het algemeen is gevonden dat HPV-6 en

10 HPV-11 DNAs samengaan met goedaardige lesies van de genitale buis. Van HPV-16, HPV-18, en HPV-33 is ook gevonden dat deze samengaan met pre-maligne en maligne lesies en deze worden getranscribeerd in de meeste cellijnen die zijn verkregen uit cervicale carcinoma's. HPV-16, HPV-18, en HPV-33 zijn

15 waarschijnlijk de enige twee leden van een grote reeks van HPV DNAs die samengaan met maligne humane cervicale carcinoma's.

Dierlijke modellen hebben aangetoond dat benigne papillomavirus lesies zich kunnen ontwikkelen tot maligne

20 lesies in de aanwezigheid van een co-carcinogeen. HPV DNA is gevonden in metastasen van cervicale carcinomas. In maligne cervicale lesies, is HPV DNA meestal geïntegreerd in het humane genoom maar ook extrachromosomaal HPV DNA is aanwezig. Integratie van HPV voor het vormen van het provirus

25 resulteert meestal in een onderbreking van het virale E2 open reading frame (ORF). Ondanks de verstoring van het E2 ORF, en onderzoek op cellijnen afkomstig uit verschillende cervicale carcinomas, hebben aangetoond dat transcriptioneel actief en geïntegreerd HPV-16 en HPV-18 aangetoond. Indien HPV-16

30 genomen welke aanwezig zijn in de humane cervicale carcinoma cellijnen SiHa en CaSki, zijn onderzocht worden er verschillen gevonden in de integratie of HPV-16. In de SiHa lijn, treedt een enkele HPV-16 genoom integratie op bij basen 3132 en 3384, waarmee de E1 en E2 ORFs worden onderbroken met

35 een deletie van 0,3 kb. Een additioneel 50-basepaar deletie van HPV-16 DNA resulteerde er in dat de E2 en E4 OFRs werden

gefuseerd. Het 5' gedeelte van het HPV-16 DNA, bestaande uit het onderbroken E2 ORF, wordt geligeerd aan de continue humane rechter flankerende sequenties. Daarnaast wordt een enkele additionele guanine gedetecteerd op nucleotide 1138 in
 5 het midden van het E1 ORF. Deze basepaar toevoeging resulteert in de fusie van de E1a en E1b ORFs tot een enkele E1 ORF.

Het complete genoom van HPV-16 is beschikbaar onder GenBank onder toegangsnummer K02718; het complete genoom van
 10 HPV-33 is beschikbaar onder GenBank toegangsnummer M12732; het complete genoom van HPV-18 is beschikbaar onder GenBank toegangsnummer X05015.

Als een eerste test kan het feit of een HPV infectie aanwezig is in een bepaald cervicaal biopsiemonster, door
 15 middel van een eenvoudige "ja/nee" type analyse worden uitgevoerd door bijvoorbeeld gebruik te maken van één of alle van de PNAs volgens SEQ ID NOS. 46-53 en een E2 TBA zoals hierboven wordt beschreven (dat wil zeggen, fragment DNA, binding van de PNA, immobiliseren met de TBA, en detecteren
 20 van een signaal met BNAs en BBAs).

Op het moment dat van een biopsiemonster is gevonden dat deze positief is voor HPV, wordt additionele informatie verkregen met betrekking tot maligne potentieel van de HPV door het analyseren van de integratiestatus van het virus in
 25 het humane genoom.

1. Fragmenteer het DNA in het cervicale biopsiemonster en hybridiseer dit aan een blokkerende probe met de sequentie, SEQ ID NO.
 30 60. Deze probe zal aan alle fragmenten in het DNA binden waarvan niet het 0,3 kb fragment is uitgesplitst.

2. Stel het DNA in het biopsiemonster bloot aan een PNA met de sequentie, SEQ ID NO. 61. Deze probe zal slechts binden aan fragmenten welke een 0,3 kb fragment bezitten (de blokkerende probe zal het uitsluiten voorkomen van grotere deletiefragmenten, indien aanwezig).
3. Een PNA met SEQ ID NO. 62 wordt gehybridiseerd met SEQ ID NO. 41 zodat gevormd wordt een BBR welke zal binden aan cro of λ CI repressor als een BBA, wat een enkel-strengs gedeelte achterlaat dat in staat is tot hybridisatie met de TATA positie op SEQ ID NO. 61. Dit wordt toegevoegd voor het vormen van een TBR aan het 5' uiteinde van de grote deletie.
4. De TBR wordt geïmmobiliseerd door een TBA met een TATA bindingseiwit DNA herkenningseenheid.
5. De gebonden fragmenten worden gedetecteerd door het toevoegen van de BNAs en BBAs zoals hierboven wordt beschreven.

20

Detectie van een signaal in deze test duidt aan dat het grote fragment is gedeleteerd in HPV aanwezig in de TNA. Omdat deze deletie samengaat met kwaadaardigheid, verschaft dit assay een inzicht in het kwaadaardig potentieel van de HPV sectie. Deze conclusie kan worden bevestigd door het uitvoeren van een analoog assay gebaseerd op de deletie van het 52-basepaar fragment dat ook correleert het HPV-geïnduceerde kwaadaardigheid.

De TBP herkenningseenheid die wordt gebruikt in de TBA volgens die assay kan bijvoorbeeld worden gekozen uit een sequentie zoals SEQ ID NO: 70 of SEQ ID NO. 93.

Voorbeeld 15 - Recombinant HIV-LOCK™ Productie

Fase Een - Bereiding van het DNA voor het produceren van de HIV-Lock™. *In vitro* mutagenese van de coderende gebieden van de natuurlijk voorkomende gekloneerde componenten van de HIV-Lock™ welke gemodificeerd moeten worden, worden uitgevoerd met een MutaGene Phagemid kit. Het gemodificeerde protocol omvat het gebruik van een Blue-script plasmide dat elk van de bindende componenten van de HIV-Lock™ (TM) bevat. Deze worden getransformeerd in competente cellen en uracil-bevattende faagmiden worden opgegroeid. Enkel-strengs DNA wordt geëxtraheerd en gebruikt als een template voor de mutagene streng. Oligonucleotiden die de gewenste mutaties bevatten, waaronder de incorporatie van een nieuwe restrictieplaats worden gesynthetiseerd en behandeld met polynucleotide kinase en ATP. De kinase-behandelde oligonucleotiden worden geanneald op een enkel-strengs template en een mutagene streng wordt gesynthetiseerd en geligeerd in overeenstemming met MutaGene protocol, met de uitzondering dat Sequenase 2.0 de polymerase verschaft. Bibliotheken worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van zowel g^{32P} eindig-gelabelde nucleotiden die sequenties bevatten die complementair zijn aan de geïntroduceerde mutaties en door middel van het isoleren van het plasmide DNA en identificeren van de mutanten door de aanwezigheid van geïntroduceerde restrictieplaats. De mutaties worden ook bevestigd door sequentie volgordebepaling met een Sequenase kit. Het HIV-Lock™ DNA wordt gekloneerd in het baculovirus expressie systeem met een polyhedron promotor.

Fase Twee - Productie van HIV-Lock™ Eiwitten door Gebruikmaking van Baculovirus.

Sf-9 cellen worden opgegroeid tot een voorafbepaalde dichtheid (ongeveer 1×10^6 cellen/ml, log fase), geïnfecteerd met het baculovirus dat de HIV-Lock™ instructies bevat en geoogst voor het winnen van de recombinant eiwitten

omvattende de HIV-Lock™. In het opschalingsproces worden cultures opgegroeid uit flessen tot spinners en hier opvolgend in bioreactoren. Volgend op de infectie worden de cellen geoogst op 12, 24, 36 en 48 uur voor het eiwit. De
 5 maatstaven voor levensvatbaarheid worden getest gedurende het gehele proces.

Fase Drie - Zuivering van de HIV-Lock™ Eiwitten.

10 De geoogste eiwitten worden eerst gescheiden van de deeltjes door middel van doorstroom-ultracentrifugatie door het vereenvoudigen van de hierop volgende zuivering. Het gecentrifugeerde product wordt hierna steriel gefilterd. Extracten worden hierna gecentrifugeerd bij 40.000 rpm bij 4°
 15 gedurende 30 minuten en hoeveelheden worden immunologisch geprecipiteerd met een polyklonaal konijnen antilichaam tegen één van de HIV-Lock™ componenten. Men laat de immuno-geprecipiteerde eiwitten lopen op een SDS-10% PAGE gel.

20 Fase Vier - Test van HIV-Lock™ Eiwitten Tegen HIV DNA

Bewegelijkheid verschuivingsassays worden uitgevoerd door gebruik te maken van een oligonucleotide probe omvattende elementen van de HIV lange terminale herhaling en
 25 fragmenten die NFκB bindings DNA bevatten geassocieerd met kappa lichte keten en microglobuline regulatie. De oligonucleotide wordt geanneald aan zijn complementaire streng en eind-gelabeld met g^{32P} ATP.

Footprinting wordt uitgevoerd door het combineren van
 30 kleine (10^{-15} M) radio-gelabelde HIV LTR DNA met een licht kleinere hoeveelheid van HIV-Lock™ in een buffer bij kamertemperatuur gedurende 10 minuten. Dithiothreitol wordt toegevoegd voor de toevoeging van het eiwit. IJzer(II), EDTA, waterstofperoxide en natriumascorbaat worden toegevoegd en

het reactiemengsel wordt geïncubeerd. Een quenching stof wordt toegevoegd en de producten worden geanalyseerd door gebruik te maken van denaturerende gelelektroforese. Dit wordt uitgevoerd voor verschillende concentraties van het eiwit. De resulterende gel wordt ontwikkeld door gebruik te maken van een fosfoimager scanner en de resulterende beeldfile met een hoge resolutie wordt geanalyseerd voor het aftrekken van de bindingsaffiniteit van HIV-Lock™ voor het HIV DNA ten opzichte van het cellulaire DNA.

Meerder ontwerpen en testherhalingen kunnen worden gebruikt voor het opnieuw vinden van de binding van HIV-Lock™ en andere TBAs voor HIV en andere organismen. Dit proces maakt het mogelijk om bindingsstructuren te ontwerpen zodanig, dat de bindingsstructuren niet competitief zijn met de wild-type eiwitten voor enkele bindingsplaatsen in genomische monsters. De ontwikkeling van TBAs voor andere organismen en TNAs voor sequenties in deze organismen kan worden uitgevoerd door gebruik te maken van de hiervoor vermelde werkwijze. Deze werkwijze is valide indien deze bindingsstructuren produceert voor alle nucleïnezuur TBRs waaronder DNA-DNA, DNA-RNA, en RNA-RNA hybriden en combinaties van deze hybriden.

Voorbeeld 16 - Werkwijze voor het Identificeren van Nucleïne Zuur Bindende Moleculen voor de Productie van TBAs en BBAs volgens de Uitvinding:

In de werkwijze volgens deze uitvinding worden target binding structuren en booster binding structuren geassembleerd door middel van het identificeren van nucleïnezuur-bindende moleculen en het verbinden van de nucleïnezuur-bindende gedeelten van de moleculen op een zodanige wijze dat TBAs worden verschaft die onderscheid maken tussen specifieke target sequenties en zelfs sterk gerelateerde sequenties. Een werkwijze voor het identificeren

van de nucleïnezuur-bindende moleculen betreft de volgende stappen:

- 5 1. Het verschaffen van een biologisch monster dat
 het target nucleïnezuur bevat. Dit kan
 bijvoorbeeld een organisme zijn of een
 weefselextract geïnfecteerd met een pathogeen.
- 10 2. Het fragmenteren van het monster met als doel het
 blootstellen van de nucleïnezuren en het
 reduceren van de grote complexiteit van nucleïne
 zuren die aanwezig zijn in het monster.
- 15 3. Het in contact brengen van een eerste hoeveelheid
 van de gefragmenteerde nucleïnezuren met een
 controle buffermedium en het in contact brengen
 van een tweede hoeveelheid van de gefragmenteerde
 nucleïnezuren met het controlemedium buffer dat
 een bekend profiel van nucleïnezuur-bindende
 moleculen bevat.
- 20 4. Het analyseren van de twee hoeveelheden voor het
 identificeren van fragmenten welke een veranderd
 gedrag vertonen van de hoeveelheid die in contact
 is gebracht met de target bindingsmoleculen ten
 opzichte van de controlehoeveelheid. Dit wordt
 verschaft door een enkele dimensie gel-
25 elektroforese, een twee-dimensionale gel-
 elektroforese, hoge prestatie
 vloeistofchromatografie, papierchromatografie of
 elk ander middel wat een verschillend gedrag
 onthult van de nucleïnezuur fragmenten indien
30 deze gebonden zijn aan het nucleïnezuur-bindend
 molecuul in vergelijking indien het nucleïnezuur
 fragment niet gebonden is.
- 35 5. Het identificeren en isoleren van fragmenten
 welke een veranderd gedrag vertonen indien deze
 in contact worden gebracht met het nucleïnezuur-

bindend molecuul en ofwel het bepalen van de
sequentie van het nucleïnezuur fragment voor de
bepaling of bekende nucleïnezuur-bindende
molecuul motieven aanwezig zijn of het direct
5 identificeren van het nucleïnezuur-bindend
molecuul gebonden aan het nucleïnezuur. Het
laatste kan bijvoorbeeld worden verschaft door
middel van het in contact brengen van het twee-
dimensionale patroon van de geelektroforeerde
10 nucleïnezuren met differentieel gelabelde
antilichamen welke binden aan de verschillende
nucleïnezuur-bindende moleculen.

Volgens deze werkwijze worden bij voorkeur
15 nucleïnezuur motieven gebruikt voor ofwel diagnostische ofwel
therapeutische doeleinden waarbij het target nucleïnezuur
meer dan een enkel bruikbaar nucleïnezuur bindend molecuul
target bezit. Op deze wijze kan een complexe target-bindende
structuur worden gegenereerd welke gebruikmaakt van de
20 nabijheid van verschillende nucleïnezuur bindende moleculaire
motieven voor het versterken van de specificiteit van de TBA
constructie ten opzichte van de geïdentificeerde individuele
nucleïnezuur-bindende componenten. De verschillende
nucleïnezuur-bindende gedeelten van de nucleïnezuur-bindende
25 moleculen worden hierna geassembleerd tot de complete TBAs
zoals hierboven beschreven, zoals bijvoorbeeld met betrekking
tot HIV-LOCK™.

Voorbeeld 17 - Werkwijze voor het Identificeren van
30 specifieke RNA sequenties in een Monster

In overeenstemming met de werkwijzen en composities
die worden geleerd in deze uitvinding, kan elke nucleïnezuur
sequentie specifiek worden geïdentificeerd voor het
35 identificeren van target HIV RNA in een monster en dit wordt

verschaft door het verschaffen van een monster van het bloed
 van een patiënt of ander biologisch monster of extract welke
 het HIV RNA kan bevatten en het testen op de aanwezigheid van
 TAR bindingsplaatsen. Tat is een positieve regulator van de
 5 HIV replicatie welke bindt aan het target gebied van het HIV
 RNA. De kleinste natuurlijk voorkomende volledig actieve vorm
 van HIV-Tat bezit een lengte van 72 aminozuren en wordt
 hierin aangeduid als SEQ ID NO: 118. TAT bevat ten minste
 twee functionele domeinen en transactiveert genexpressie
 10 vanaf de HIV lange terminale herhaling (HIV LTR). Tat bindt
 aan een RNA stem loop structuur die wordt gevormd door zelf-
 hybridisatie van de sequenties TAR, welke zich bevinden vlak
 voor het 5' uiteinde ten opzichte van de HIV LTR. HIV TAR RNA
 vormt een dinucleotide uitstulping en twee stem-loop
 15 structuren (Rhim et al. 1994 Virology:202, 202-211). De Tat
 (SEQ. ID No: 118) bind aan deze structuur met een lagere
 aviditeit dan de Tat varianten waarin Ala58 een threonine is
 of waar His65 een een Asp residu is. (Derse et al., 1993
 Virology:194,530-536). Door gebruik te maken van deze feiten
 20 wordt de onderhavige werkwijze verschaft door:

1. Fragmenteren van een biologisch monster met als doel het
 blootstellen van de nucleïnezuren en het reduceren van de
 grootte complexiteit van de nucleïnezuren.
- 25 2. Het in contact brengen van een TBA met het monster welke
 een hybride TAR bindend eiwit sequentieert en een
 proximale flankerende sequentie in het HIV genoom. De TBA
 die wordt gebruikt voor dit doeleinde wordt geassembleerd
 op cro als de chaperonne waarbij gebruik wordt gemaakt
 30 van Tat als het HIV RNA specifieke bindingsmolecuul. Voor
 het verschaffen van een zodanige specificiteit dat kruis-
 communicatie optreedt tussen de HIV TAR plaats en zeer
 gerelateerde TAR plaatsen die aanwezig kunnen zijn
 vanwege andere pathogenen zoals die als het
 35 cytomegalovirus, bezit de TBA ook een antilichaam

component welke het DNA-RNA hybride target bindingsgebied herkent dat gevormd wordt op het moment dat een probe nucleïnezuur bindt aan het HIV LTR RNA.

3. Elimineren van enige "kruis-communicatie" die wordt geproduceerd door het binden van Tat aan het TAR gebied van het HIV RNA als gevolg van dergelijke besmettingen (neven RNAs) als de CMV TAR sequentie door het in contact brengen van de reactie met een overmaat aan de Tat variant (ofwel de Ala58 naar Thr of de His65 naar Asp varianten) welke binden met een hogere aviditeit. Op deze wijze wordt een competitie aangegaan met enkele bindingsgebeurtenissen omdat TBA binding aan de neven RNAs ten opzichte van de Tat variant in het nucleïnezuur monster. Aan de andere kant, door het geschikte selecteren van de affiniteit van de dubbele binding die wordt verschaft als het resultaat van het antilichaam en de Tat, wordt de TBA niet verdrongen van de ware targets. Dit proces wordt geïllustreerd in Figuur 16. Volgens een ander aspect van dezelfde werkwijze kan de TBA er één zijn waarin, in plaats van het gebruik van een variant van Tat, een antilichaam wordt gebruikt welke dit nucleïnezuur segment herkent en de TBA die wordt gebruikt, is een dubbel antilichaam TBA.

In een alternatieve versie van deze werkwijze kan een probe nucleïnezuur worden gebruikt welke hybridiseert met het HIV LTR RNA. In overeenstemming hiermee kan een duplex segment van de LTR sp1 plaatsen worden gecreëerd als onderdeel van het target bindingsgebied. Dit gebied van het HIV RNA flankiert het TAR gebied welke 5' is ten opzichte van de LTR maar welke zich dicht in de nabijheid hiervan bevindt. Een TBA die Tat en twee Sp1 bindingseenheden bevat wordt gechaparonneerd voor het verschaffen van Tat binding aan TAR en Sp1 binding aan de Sp1 bindingsplaatsen. Amplificatie en detectie wordt hierna uitgevoerd door het toevoegen van

geschikte BNAs, BBAs en ITNAs. In nog een ander alternatief, kunnen de PNAs met SEQ ID NOS. 38 en SEQ ID.39 (zie Figuur 7) worden gebruikt. Een TBA wordt gebruikt welke bevat één of meer Sp1 bindingseenheden en een antilichaam eenheid welke bindt aan de geproduceerde DNA-RNA hybride uit het monster RNA en SEQ ID NO: 38 PNA. Geschikte BNAs, BBAs en ITNAs worden hierna toegevoegd voor het amplificeren van het signaal.

Natuurlijk zal de gemiddeld geschoolde vakman herkennen dat andere TBA en TNA combinaties kunnen worden gebruikt voor het optimaliseren van de werkwijzen die hierin als voorbeeld worden verschaft.

Er zal worden begrepen dat de sequenties die hierin worden verschaft slechts voorbeeld-verschaffend zijn en dat andere, hierop gelijkende sequenties gesuggereerd worden door deze en deze kunnen worden gebruikt in een werkwijze volgens deze uitvinding. Er zal ook worden begrepen dat hoewel elke sequentie die hierin wordt verschaft aangeduid kan worden als lineair, deze kan worden gebruikt in een circulaire vorm of in een anderszins veranderde vorm en hoewel aangeduid als niet-zijnde antisense kan deze worden gebruikt in de coderende of niet-coderende vorm of binden aan de coderende of niet-coderende complementaire sequenties.

25

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

5

(i) APPLICANT:

Applicant Name(s): THE GENE POOL, INC.
Street address: 300 Queen Anne Ave. N., Suite 392
City : Seattle
State/Province: Washington
Country: US
Postal code/Zip: 98109-4599
Phone number: (206) 526-8617 Fax number:

10

(ii) TITLE OF INVENTION: METHOD OF DETECTION OF NUCLEIC ACIDS WITH A SPECIFIC SEQUENCE COMPOSITION

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 118

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

15

(A) ADDRESSEE: Saliwanchik & Saliwanchik
(B) STREET: 2421 N.W. 41st St., Suite A-1
(C) CITY: Gainesville
(D) STATE: Florida
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 32606

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

20

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

25

(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

5 (A) NAME: Bencen, Gerard H
(B) REGISTRATION NUMBER: 35,746
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: GP-100.C1

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (904) 375-8100
(B) TELEFAX: (904) 372-5800

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10 (A) LENGTH: 13 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:
TGGGGATTCC CCA 13

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 13 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

20 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:
AAGGGACTTT CCC 13

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25 (A) LENGTH: 13 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

AGGGGACTTT CCG 13

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 15 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:
GCTGGGGACT TTCCA 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 15 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:
ACAAGGGACT TTCCG 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 20 (A) LENGTH: 13 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:
CCGGGTTTTTCCC 13

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 25 (A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:
 AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA 27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 27 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:
 AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG 27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:
 GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:
 GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:
 GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGGC 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:
 GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG 26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:
 GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG 26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:
 GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGCGTG 26

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 26 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: both

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC 26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: both

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

TTCCAGGGA GGCGTGGCCT GGGCGGGACT GGG 33

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: both

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC 33

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 45 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

5 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT 45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 46 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:
CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15 (A) LENGTH: 46 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:
CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 46 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

25 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:
CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 45 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCAT

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 44 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGCGTG GCCT

44

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 44 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGGCGC GGCT

44

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 45 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGAGAGGCGT GGACT

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 46 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGCG TGGACT 46

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

- (A) LENGTH: 46 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGGGAG 46

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 43 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCTG CCT 43

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG 48

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 45 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

TTTCAGGGA GCGGTGGCCT GGGCGGGACT GGGGAGTGGC GTCCC

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 59 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

CTACAAGGGA CTTTCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGG

59

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 59 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:33:

TTTCGCTGG GGACTTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG TGGCGTCCC

59

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 70 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:34:

25

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA 60
CTGGCGTCCC 70

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 61 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:35:

TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTATCAC CGCAGATGGT 60
T 61

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

15

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 64 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:36:

20

TATCACCGCA AGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT 60
GATA 64

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

- (A) LENGTH: 70 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:37:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60
GTGGCGTCCC 70

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 37 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:
 CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGG 37

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15

(A) LENGTH: 22 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:
 CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC 22

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 103 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG 60
TCAACACCGC CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA 103

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

5

- (A) LENGTH: 62 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MÅ

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:41;

10

GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA 60

TA 62

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15

- (A) LENGTH: 71 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:42:

20

GATCCAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCG 60

GTGATACTGC A 71

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

- (A) LENGTH: 63 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:43:

GATCACC GC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG 60
TTG 63

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:
 GATCCGGGGG GATACCCCC G 21

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 91 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGGATAA ATATCTAACA CCGTGCGTGT 60
TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G 91

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 53 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:
 CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTTGAACCG AAACCGGTTA GTATAAAAGC AGA 53

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 54 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:47:

AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCGGGACC GAAACGGTG TATATAAAG ATGT 54

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10

- (A) LENGTH: 54 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:48:

AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTTCAACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA 54

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:49:

GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:50:

TGTGCAACCG ATTCGGTTG CCTT 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:51:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

5

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:51:
TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

10

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:
TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTTG 24

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

20

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:
GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 52 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

25

- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC 52

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 53 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:55:

GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AAACAGCTAC AGCACACCCC CTC 53

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:56:

15

GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG 60

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 20 (A) LENGTH: 68 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:57:

CATACCAAAG CCGTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTG TTGCACAGAG 60

ACTCAGTG 68

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 77 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

5

TAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTATTCC AGCACCGTGT 60
CCGTGGGCAC CGCAAAG 77

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 80 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

15

ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAAC ACCCGCCTT GGACAATAGA 60
ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

(A) LENGTH: 266 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: both
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

25

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 95 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

10 AGGATGTATA AAAAAACATG GATATACAGT GGAAGTGCAG TTTGATGGAG ACATATGCTA 60
 TTAGGCAGCA CTTGGCCAAC CACCCGCCG CGACC 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 81 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: both
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

20 CATGTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT 60
 AATTTATCAC CGCAGATGGT T 81

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 322 amino acids
 (B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:63:

```

Met Ala Asp Asp Asp Pro Tyr Gly Thr Gly Gln Met Phe His Leu Asn
1           5           10           15

Thr Ala Leu Thr His Ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr Ser Pro Glu
          20           25           30

Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu Glu Gln Pro
          35           40           45

Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly Pro Ser His
          50           55           60

Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys Ser Tyr Pro
65           70           75           80

Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val Ile Val Gln
          85           90           95

Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His Ser Leu Val
          100          105          110

```

Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala Gly Pro Lys
 115 120 125
 Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val Thr Lys
 130 135 140
 5 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
 10 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
 15 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
 20 Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Val Asn
 305 310 315 320
 Ile Thr

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 325 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

5 Asp Ile Asn Ile Thr
325

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 268 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

Met Glu Pro Ala Asp Leu Leu Pro Leu Tyr Leu Gln Pro Glu Trp Gly
1 5 10 15

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

20

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

25

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
 5 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
 10 Lys Gly Ser Phe Ala Ala Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val
 245 250 255
 Phe Arg Thr Pro Pro Phe Arg Glu Arg Ser Leu Arg
 260 265

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 15 (A) LENGTH: 263 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear
 (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

20 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
 25 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

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 263 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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
 5 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
 10 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
 15 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
 20 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

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 299 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:

5	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
10	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
15	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
20	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
25	Leu Val Ile Cys Arg Leu Cys Ser Cys Ser Ala Thr Val Phe Gly Asn	225 230 235 240
	Thr Gln Ile Ile Leu Leu Cys Glu Lys Val Ala Lys Glu Asp Ile Ser	245 250 255

Val Arg Phe Phe Glu Glu Lys Asn Gly Gln Ser Val Trp Glu Ala Phe
260 265 270

Gly Asp Phe Gln His Thr Asp Val His Lys Gln Thr Ala Ile Thr Phe
275 280 285

Lys Thr Pro Arg Tyr His Thr Leu Asp Ile Thr
290 295

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 261 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 262 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

Phe Leu Gly Asp Ile Thr
260

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

Ser Gln Gly Val Ile Gly Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys Ala His Asp
 20 25 30
 Leu Ala Val Gly Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn
 35 40 45
 Glu Tyr Pro Gln Leu Ser Phe Arg Tyr Arg Asp Ser Ile Lys Lys Thr
 50 55 60
 Glu Ile Asn Glu Ala Leu Lys Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Phe Val Ser Asn Ser Ser Ile Lys Pro Asp Gly Gly Ile Val Glu
 85 90 95
 Val Lys Asp Asp Tyr Gly Glu Trp Arg Val Val Leu Val Ala Glu Ala
 100 105 110
 Lys His Gln Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu Leu Val
 115 120 125
 Gly Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Gly Asn Ala Ile Glu
 130 135 140
 Arg Ser His Asn Ile Ser Glu Ile Ala Asn Phe Met Leu Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly Ser Asn Phe Leu Thr Glu
 165 170 175
 Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg Val Val Asn Leu Glu Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Gly Ser Glu Ser His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly
 195 200 205
 Ser Asn Phe Leu Thr Glu Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg
 210 215 220
 Val Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Ala Ala Asn Tyr Gly Met Pro Ile Asn Ser Asn Leu Cys Ile
 245 250 255
 Asn Lys Phe Val Asn His Lys Asp Lys Ser Ile Met Leu Gln Ala Ala
 260 265 270
 Ser Ile Tyr Thr Gln Gly Asp Gly Arg Glu Trp Asp Ser Lys Ile Met
 275 280 285
 Phe Glu Ile Met Phe Asp Ile Ser Thr Thr Ser Leu Arg Val Leu Gly
 290 295 300
 Arg Asp Leu Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys
 305 310

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

5 (A) LENGTH: 17 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15 (A) LENGTH: 168 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

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

Ser Asp His Leu Ser Lys His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly
 85 90 95
 Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly
 100 105 110
 Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr
 115 120 125
 Thr Asn Met Val Ala Met Glu Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly Phe
 165

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 181 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:74:

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

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

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 85 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:75:

15

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

20

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

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 87 amino acids
- (B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:76:

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

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

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

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

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

Val Thr Met Thr Val Asp Phe
 85

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 84 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:77:

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

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10 (A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:

15 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
 20 Asp Glu Thr Val Lys Tyr Pro Lys Gly Val Asp Thr Ser Tyr Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Asp Ser Leu

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25 (A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:79:

5 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
 10 Phe Asn Gly Ser

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

20 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
 25 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 80 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 80 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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
20 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 81 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

- (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

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

Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Asn Glu Leu Tyr Ser Ser Met Ser Ser
 20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys Asn Gly Ile Val
 35 40 45

Thr Val Thr Phe Val Thr Gly Gln Gln Gln Gln Met Phe Leu Gly Thr
 50 55 60

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

Val

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 15 (A) LENGTH: 21 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

20 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
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 25 (A) LENGTH: 30 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:87:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 30 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:89:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 amino acids
 (B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:89:

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

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:90:

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

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

Leu

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:91:

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

5 Thr Glu Asp Phe Arg Met Val Cys
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 40 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

10

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

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

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

Asn Phe Gly Asn Tyr Pro Ile Met
 35 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 182 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

25

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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 83 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

5 (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96:

10 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
 15 Met Thr Met

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 84 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

20 (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:97:

25

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

5

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

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID No:98:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 89 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

20

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

25

Ser Gly Phe Thr Ala Ser Leu Asp Phe
85

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 7 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: C-terminal
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

5

Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID No:100:

10

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 4 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:100:

15

Asn Ser Asn Thr
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:101:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

20

- (A) LENGTH: 4 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:101:

25

Ser Gly Asn Thr
1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:102:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 6 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:102:

Ser Ser Gly Ser Ser Gly
 1 5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:103:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 15 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:103:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:104:

20

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: protein
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

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

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

Thr Ala
65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID WO:105:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

15

(x) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:105:

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

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

20

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

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

Thr Ala
65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:106:

25

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 66 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:106:

5 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
 10 Thr Ala
 65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:107:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15 (A) LENGTH: 96 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:107:

20 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
 25 Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser
 85 90 95

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:108:

(I) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 96 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:108:

10 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

15 Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
 65 70 75 80

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:109:

- 20 (I) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 180 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- 25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:110:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 113 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:110:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:111:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 292 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

20

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:111:

25

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

Arg Lys Thr Thr
290

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:112:

5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 273 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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
15 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
20 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
25 Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys
165          170          175
Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His
180          185          190

```

Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser
 195 200 205
 Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn
 245 250 255
 Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 260 265 270

Phe

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:113:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 421 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (v) FRAGMENT TYPE: N-terminal
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr
 385 390 395 400

Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Ile Thr
420

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:114:

5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 391 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:114:

10

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

15

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

20

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

25

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

Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val
180 185 190

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:115:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 391 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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
 5 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
 10 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:116:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 241 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:116:

20 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
 25 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
 5 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
 10 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
 15 Phe

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:117:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 10 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: both
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL : NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:117:

GGGAMTNYCC 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:118:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 72 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: N-terminal

25

CONCLUSIES

1. Probe nucleïnezuur (PNA) omvattende twee verschillende sequenties welke zijn:

- 5 (a) een enkel-strengs sequentie (1/2 TBR) welke in staat is tot het vormen, onder hybridisatie-omstandigheden, van een hybride (TBR) met een target nucleïnezuur (TNA); en
- (b) een enkel-strengs sequentie (1/2 BBR) welke in staat is tot het vormen, onder hybridisatie-omstandigheden, van een hybride (BBR) met een enkel-streng sequentie aanwezig
- 10 in een booster nucleïnezuur (BNA);
- waarbij genoemde TBR in staat is tot binding met een hoge affiniteit aan een substantie (TBA) die in staat is onderscheid te maken tussen een gepaarde hybride (TBR) en een hybride met niet-gepaarde nucleotiden; en
- 15 waarbij genoemde BBR in staat is tot binding met een hoge affiniteit aan een substantie (BBA) die in staat is tot het maken van een onderscheid tussen een gepaarde hybride (BBR) en een hybride met niet-gepaarde nucleotiden.

20 2. PNA volgens conclusie 1, waarbij de TBR is samengesteld uit één of meer herkenningsplaatsen voor een nucleïnezuur-bindend eiwit, een DNA-bindend eiwit, een DNA-RNA hybride-bindend eiwit of een RNA bindend eiwit.

25 3. PNA volgens conclusie 2, waarbij de TBR een nucleïnezuur-bindend eiwit herkenningsplaats aanwezig in het

genoom van het pathogeen is of een bindingsplaats die
 samengaat met een pathogene aandoening in een vertebraat
 genoom of deze is een nucleïnezuur-bindend eiwit
 herkenningsplaats aanwezig in het genoom van een organisme
 5 welke een fermentatieproces besmet.

4. PNA volgens conclusie 2, waarbij de TBR de HIV-LTR
 is, of een gedeelte daarvan.

10 5. Werkwijze voor het detecteren of lokaliseren van
 een specifieke TNA sequentie, omvattende de stappen van:

(a) het hybridiseren van genoemde TNA met de PNA
 volgens conclusie 1;

15 (b) het hybridiseren van genoemde PNA met een BNA
 bevattende een 1/2 BBR wiens sequentie complementair is aan
 een 1/2 BBR sequentie in de PNA;

(c) het toevoegen van de producten van de stappen (a)
 en (b) bevattende een TBR en een BBR, aan een oppervlak, een
 20 vloeistof of een ander medium dat een TBA bevat;

(d) het toevoegen van BBAs aan het mengsel van stap ©
 waarbij genoemde BBA omvat:

(i) een molecuul of een gedeelte van een molecuul
 welke in staat is tot het selectief binden aan een BBR;

25 (ii) een detecteerbare indicator; en

(e) het detecteren van een signaal dat geproduceerd
 wordt door de indicator bevestigd aan de BBA.

6. Werkwijze volgens conclusie 5, waarbij genoemde
 30 indicator een eiwit is, waaronder enzymen die in staat zijn
 tot katalyserende reacties die leiden tot productie van

gekleurde reactieproducten; een radionucleotide; gekleurde korrels.

7. *In vitro* werkwijze voor het amplificeren van het
 5 signaal dat wordt verkregen door binding van de PNA volgens
 conclusie 1 aan een TNA, welke omvat het binden van BNAs aan
 de PNA-TNA hybride, en het binden van gelabelde BBAs aan de
 BNAs.

10 8. Werkwijze voor het detecteren of lokaliseren van
 specifieke nucleïnezuursequenties met een hoge mate van
 gevoeligheid en specificiteit welke omvat:

(a) het toevoegen van PNAS zoals gedefinieerd wordt
 in conclusie 1, bevattende een 1/2 BBR en een 1/2 TBR, aan
 15 een monster dat bevat of waarvan gedacht werd dat deze TNAs
 bevat die 1/2 TBR sequenties bevatten met als doel het vormen
 van een complex met target bindingsgebieden, TBRs, gevormd
 door de hybridisatie van complementaire 1/2 TBRs aanwezig in
 respectievelijk de PNAS en TNAs;

20 (b) het binden van de TBRs gevormd in stap (a) aan
 een geïmmobiliseerde TBA met als doel het vormen van een
 TBA-TNA-PNA complex;

(c) het toevoegen van Booster Nucleïne Zuren, BNAs,
 die booster bindingsgebieden bevatten, 1/2 BBRs, aan het
 25 complex gevormd in stap (b) zodanig dat de 1/2 BBRs in de
 BNAs hybridiseren met de 1/2 BBR sequenties aanwezig in de
 PNAS of aan de 1/2 BBRs aanwezig in de BNAs die reeds
 gebonden zijn aan de PNA, met als doel het vormen van de BBRs
 zodat TBA-TNA-NA-(BNA)_n complexen worden gevormd;

30 (d) het toevoegen van Hairpin Nucleïne Zuren, HNAs,
 die 1/2 BBR sequenties bevatten, aan het complex dat gevormd
 wordt in stap (c) zodanig dat de 1/2 BBRs in de HNAs
 hybridiseren met elke beschikbare 1/2 BBR sequenties aanwezig
 in de BNAs van het complex van stap (c), waarmee een cap

wordt gevormd op de extensie van de BNAs op de TBA-TNA-NA-(BNA)_n complexen van stap (c) zodat gevormd wordt TBA-TNA-NA-(BNA)_n-HNA complexen;

(e) het toevoegen van Booster Binding Constructies, BBAs, verbonden met indicator groepen, aan de TBA-TNA-PNA(BNA)_n-HNA complexen die gevormd worden in stap (d) voor het vormen van TBA-TNA-NA-(BNA-BBA)_n-HNA complexen; en

(f) het detecteren van de signalen die worden geproduceerd door de indicator groepen die gebonden zijn aan de TBAs, PNAs, BNAs, BBAs of HNAs in de TBA-TNA-PNA(BNA-BBA)_n-HNA complexen volgens stap (e);

waarin de TNA bevat:

(i) één of meer specifieke 1/2 TBR nucleïnezuur sequenties, waarvan de aanwezigheid of afwezigheid in een specifiek monster moet worden bevestigd;

de BNA omvat:

(i) een 1/2 BBR, zoals getoond wordt in Figuur 1 (IIb) welke een sequentie bezit die complementair is aan een 1/2 BBR sequentie in een NA en welke in staat is tot het vormen, onder hybridisatie-omstandigheden, van een hybride, BBR, met de NA;

(ii) een OSA, dat niet bevestigd is aan een ondersteuning of indicator of bevestigd aan een ondersteuning of andere middelen van lokalisatie, waaronder, maar hieraan niet gelimiteerd, de bevestiging aan korrels, polymeren, en oppervlakken, en/of indicators;

(iii) additionele hybridisatieplaatsen, 1/2 BBRs, of andere BNAs; en

(iv) sequenties, 1/2 BBRs, welke in staat zijn tot hybridisatie aan de BNAs die reeds zijn gehybridiseerd aan de NA;

de BBA omvat:

(i) een molecuul of een gedeelte van een molecuul welke in staat is tot selectieve binding aan een BBR; en

(ii) een OSA, welke niet bevestigd is aan een ondersteuning en/of indicator, of een bevestigde

5 ondersteuning of andere middelen van lokalisatie, waaronder, maar niet limiterend, de bevestiging aan korrels, polymeren, en oppervlakken en/of indicators;

en de TBA omvat:

10 (i) een molecuul of een gedeelte van een molecuul dat in staat is tot het selectief binden aan een TBR; en

(ii) geen bevestigd ondersteuning en/of indicator, of een bevestigde ondersteuning of andere middelen van lokalisatie, waaronder, maar niet limiterend, de bevestiging aan korrels, polymeren en oppervlakken en/of indicators.

15

9. Vaste-fase hybridisatiemethode voor het detecteren van de aanwezigheid van een target polynucleotide door gebruik te maken van een NA zoals gedefinieerd wordt in conclusie 1, betreffende: het immobiliseren van een target
20 polynucleotide, indien aanwezig in een testmonster, direct of door middel van een tussen vangstructuur, op een vaste fase op een vangplaats; voor, gedurende of na de genoemde immobilisatie, het bevestigen van een detecteerbaar label aan de genoemde target polynucleotide, indien aanwezig; en het
25 detecteren van het genoemde label indien aanwezig, bij de genoemde vangplaats, waarin de immobilisatie omvat het gebruik van een target bindingsstructuur (TBA) die slechts bindt aan een unieke hybride van het target nucleïnezuur en het probe nucleïnezuur (PNA) omvattende een 1/2 BBR die in
30 staat is tot binding aan een booster nucleïnezuur (BNA) bevattende een enkel-strengs complementaire 1/2 BBR, welke, na hybridisatie met de 1/2 BBR in de NA, een BBR vormt die in staat is tot binding aan gelabelde booster bindingsstructuren (BBAs), waarbij de uitdrukkingen TBA, BNA, BBR en BNA zijn,
35 zoals gedefinieerd in conclusie 1.

10. Diagnostische of forensische testkit voor de detectie van een target nucleïnezuur sequentie in een monster van nucleïnezuur, welke omvat eerste en tweede nucleïnezuur probes en eerste en tweede nucleïnezuur-bindende eiwitten, waarbij de eerste probe een sequentie bezit die complementair is aan de target sequentie en een additionele sequentie;

het eerste bindend eiwit is specifiek voor de eerste probe-target duplex;

de tweede probe is complementair aan de additionele sequentie van de eerste probe; en

het tweede bindende eiwit bindt specifiek aan de eerste probe-tweede probe duplex, en is gelabeld met een detecteerbaar label.

11. Kit volgens conclusie 10, waarbij de eerste probe complementair is aan de HIV LTR, en, na hybridisatie van de eerste probe met HIV LTR, wordt een bindingsplaats gevormd voor NF-kB of een subeenheid daarvan, SP1, TATA-bindingseiwit, HIV-Detectie I, II, III of IV, of HIV-Lock.

12. Kit volgens conclusie 11, waarbij het eerste bindingseiwit NF-kB is of een subeenheid daarvan, SP1, TATA-bindingseiwit, HIV-Detectie I, II, III of IV, of HIV-Lock.

13. Kit volgens één der conclusies 10 tot 12, waarbij de eerste probe, naast zijn complementair aan de HIV LTR, een sequentie omvat die codeert voor de bacteriofaag lambda linker of rechter operator, en de tweede probe omvat sequentie complementair aan de genoemde bacteriofaag lambda linker of rechter operator sequentie, zodanig dat, bij hybridisatie van de eerste en de tweede probes, een bindingsplaats wordt gevormd voor het bacteriofaag lambda CI repressor eiwit, het bacteriofaag lambda cro eiwit of een derivaat of homoloog daarvan.

14. Kit volgens conclusie 13, waarbij het tweede eiwit het bacteriofaag lambda CI repressor eiwit is, het bacteriofaag lambda cro eiwit of een derivaat of homoloog daarvan.

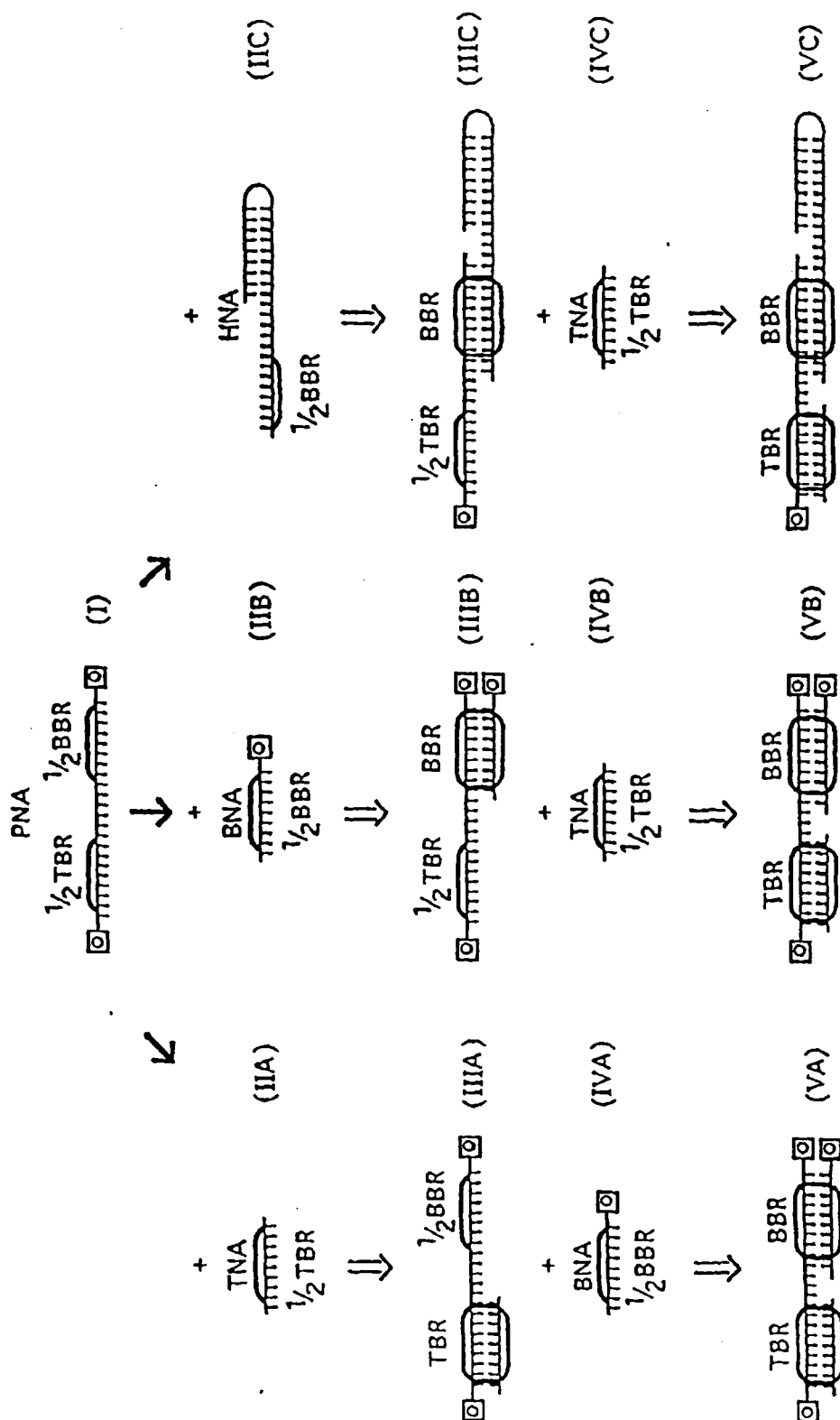
5

10

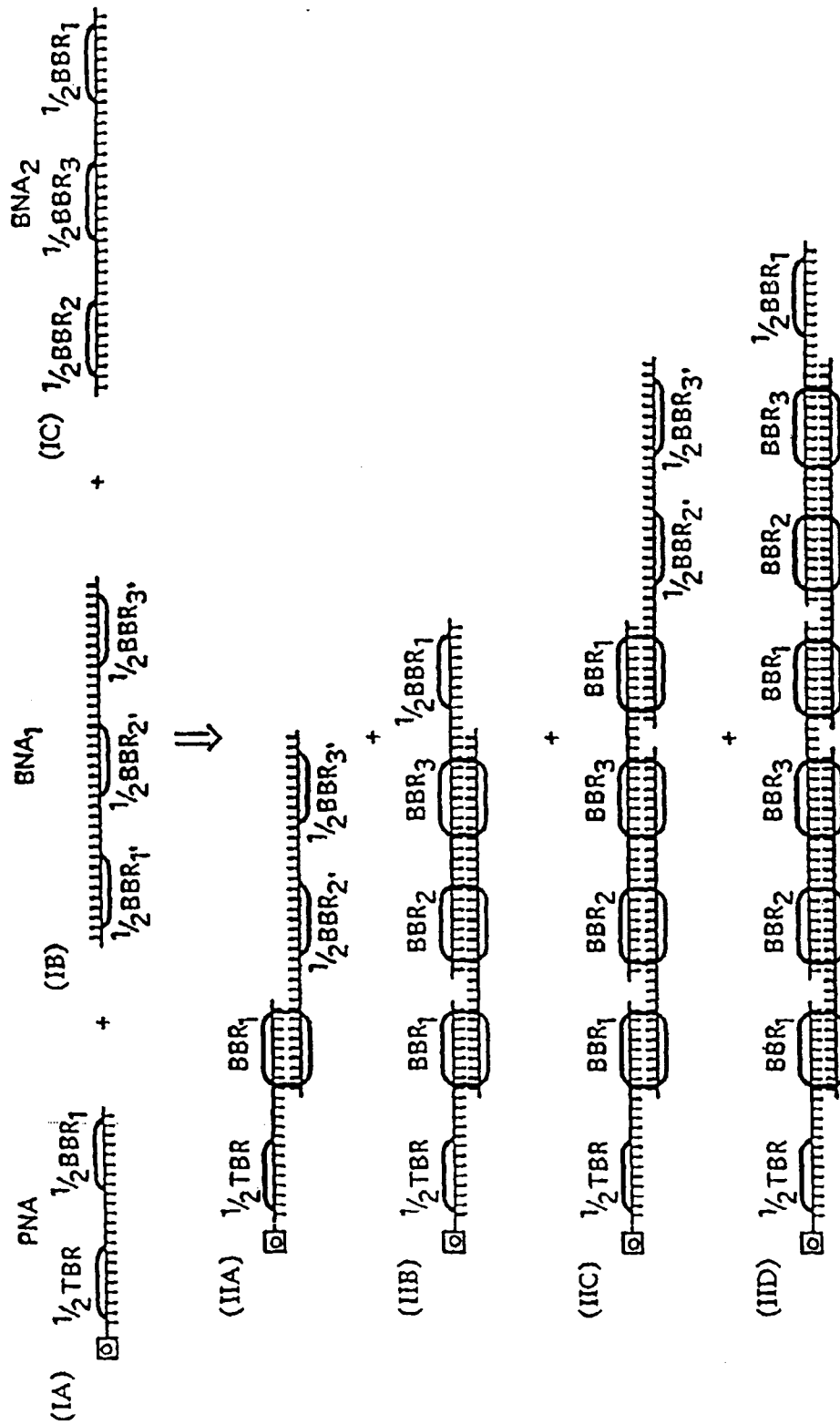
15

20

25



FIGUUR 1



FIGUR 2 A

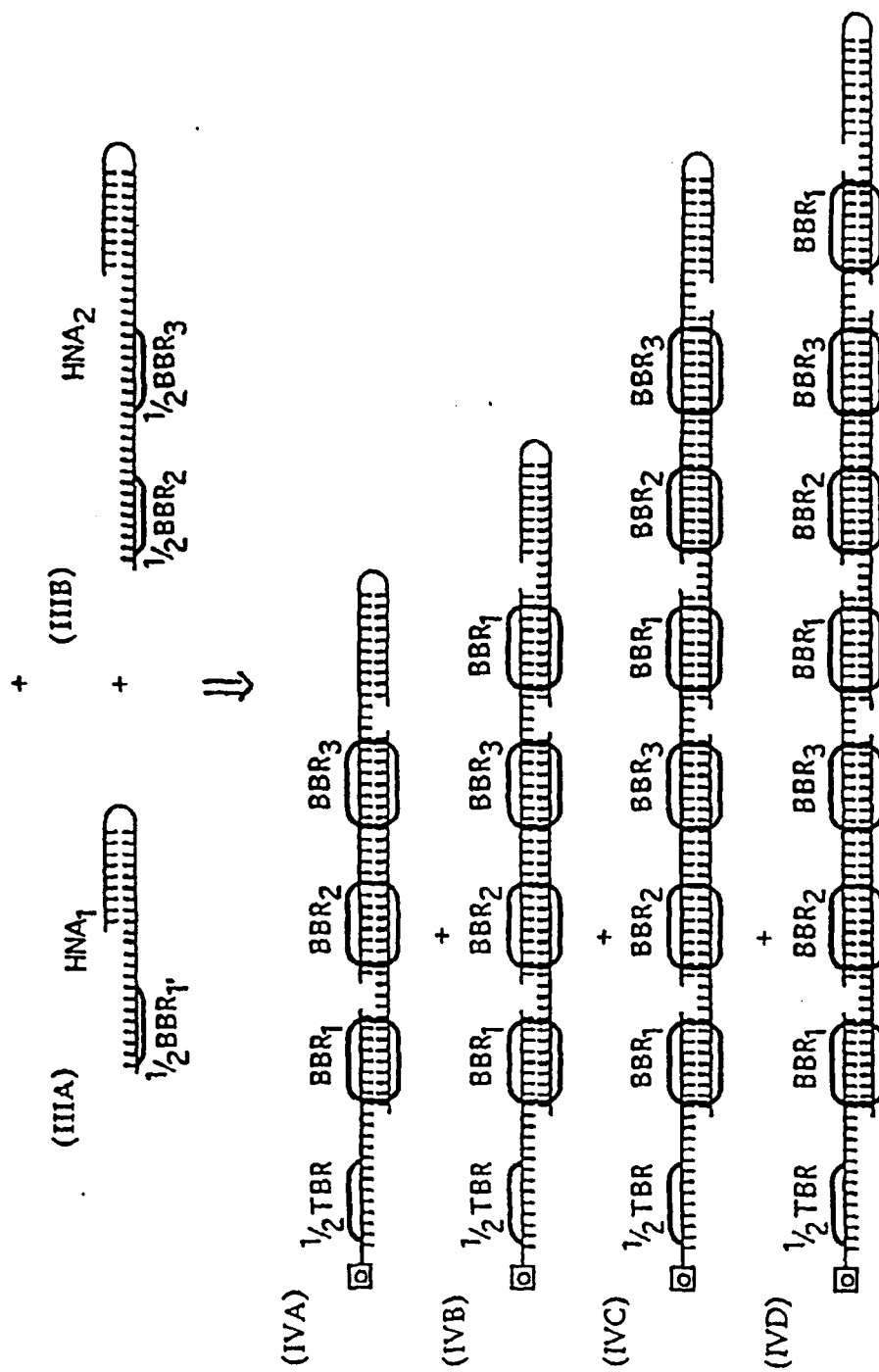
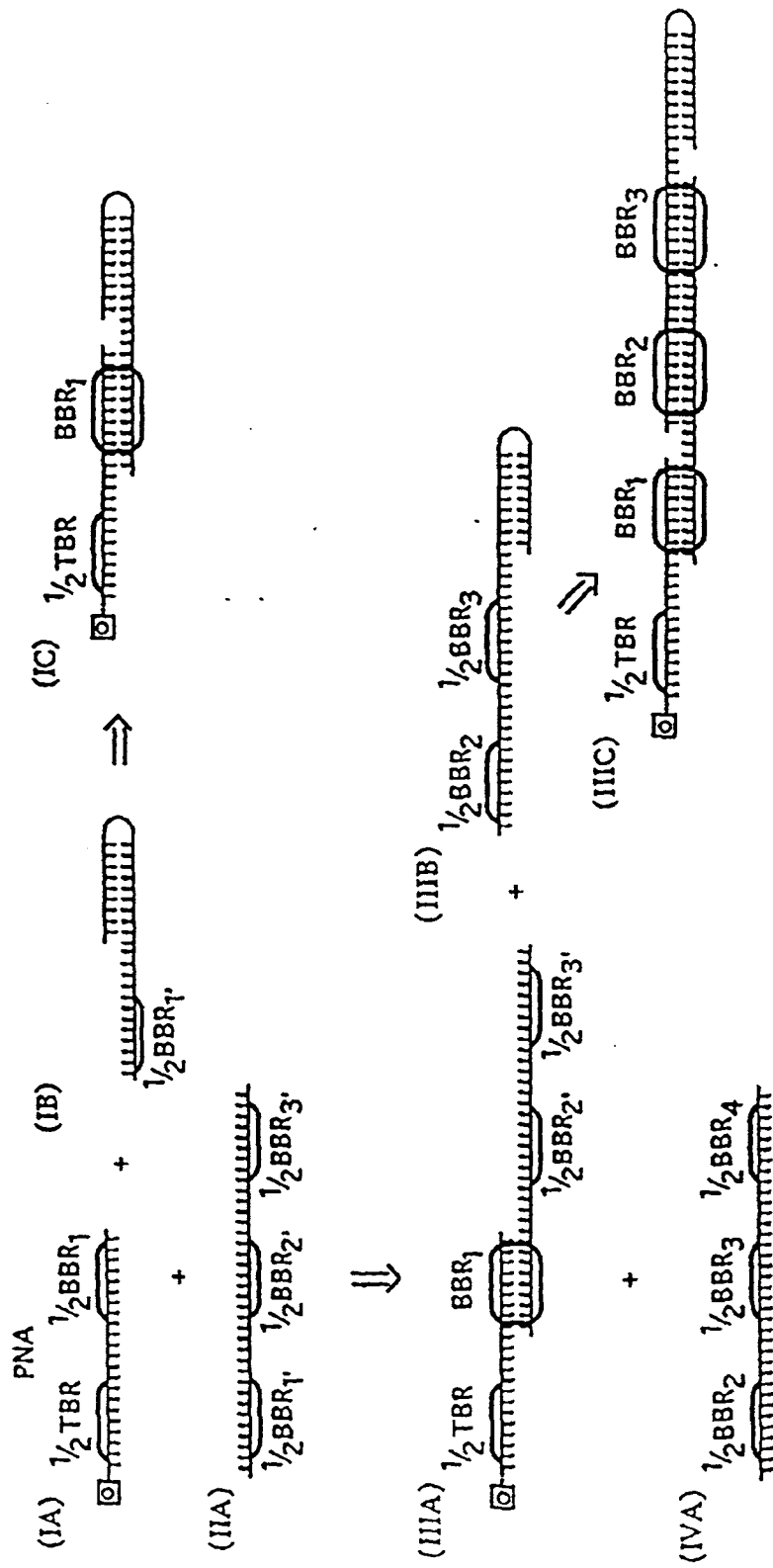


FIGURE 2 B



FIGUUR 2 C

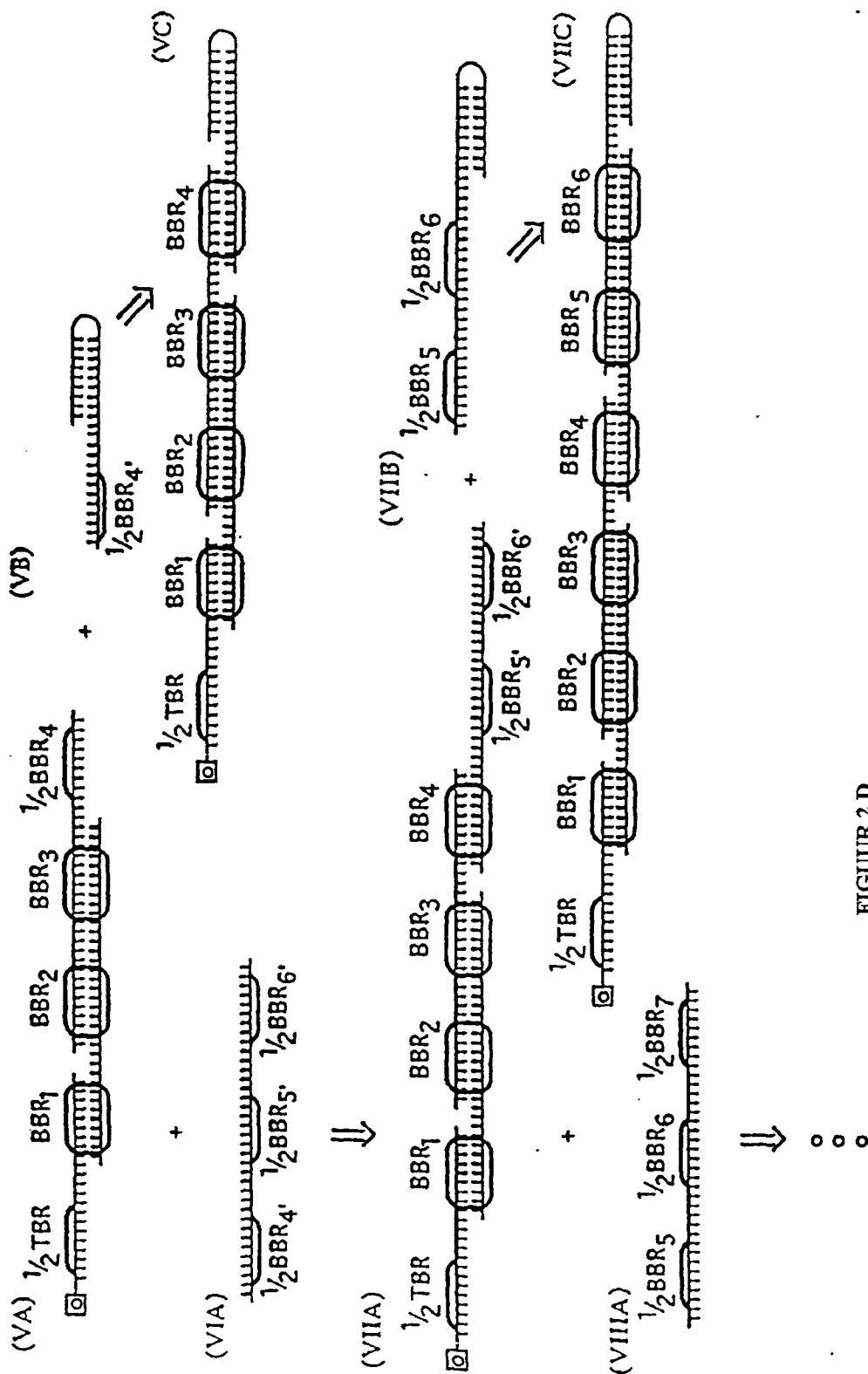


FIGURE 2 D

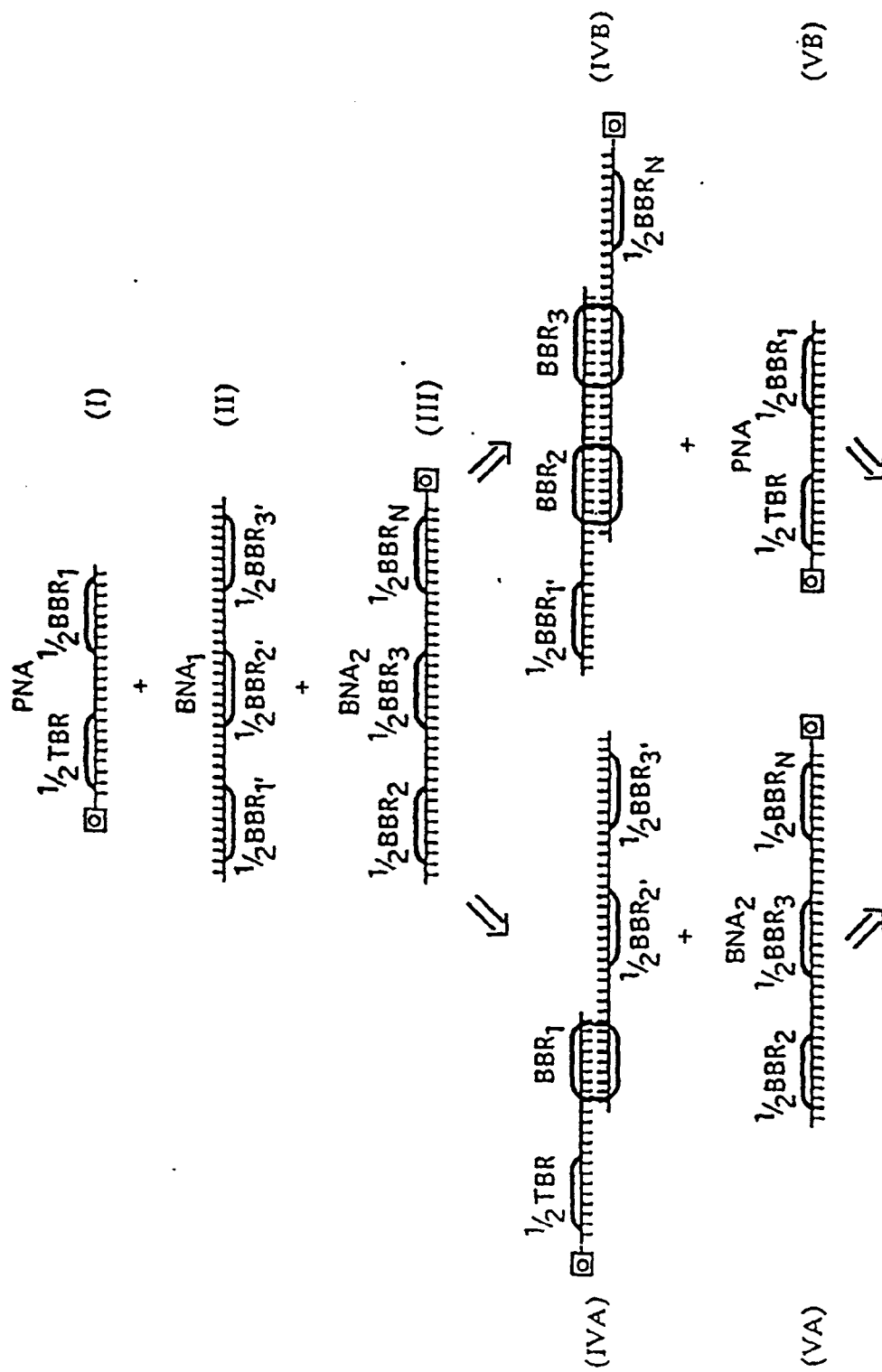
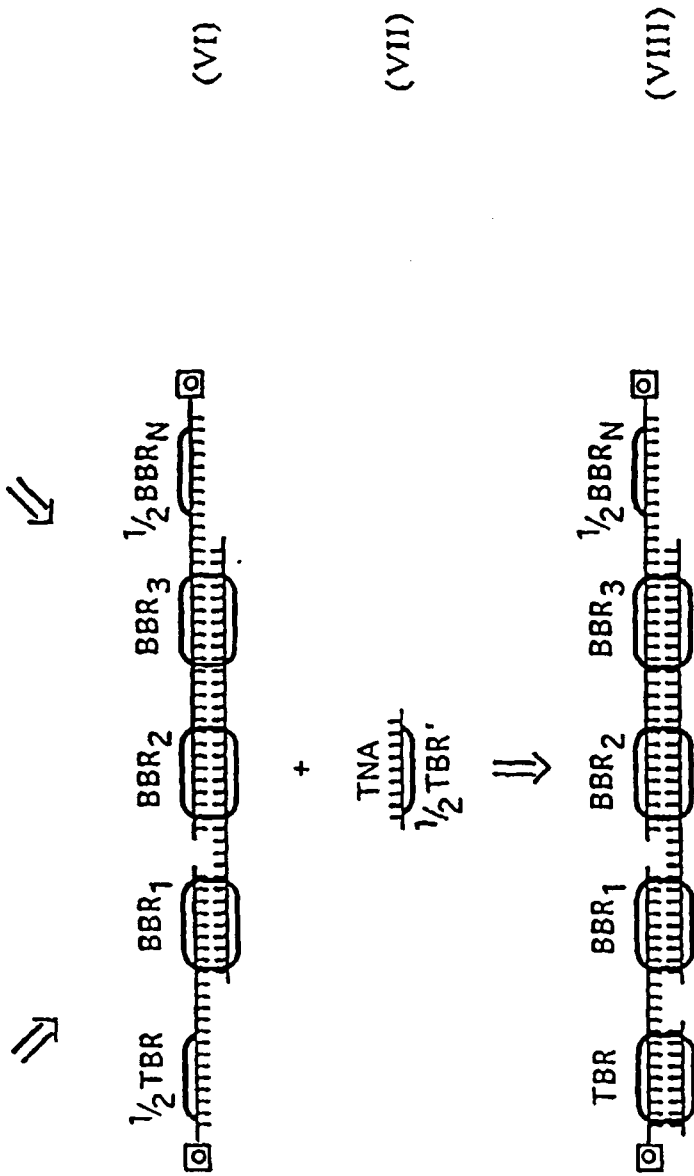
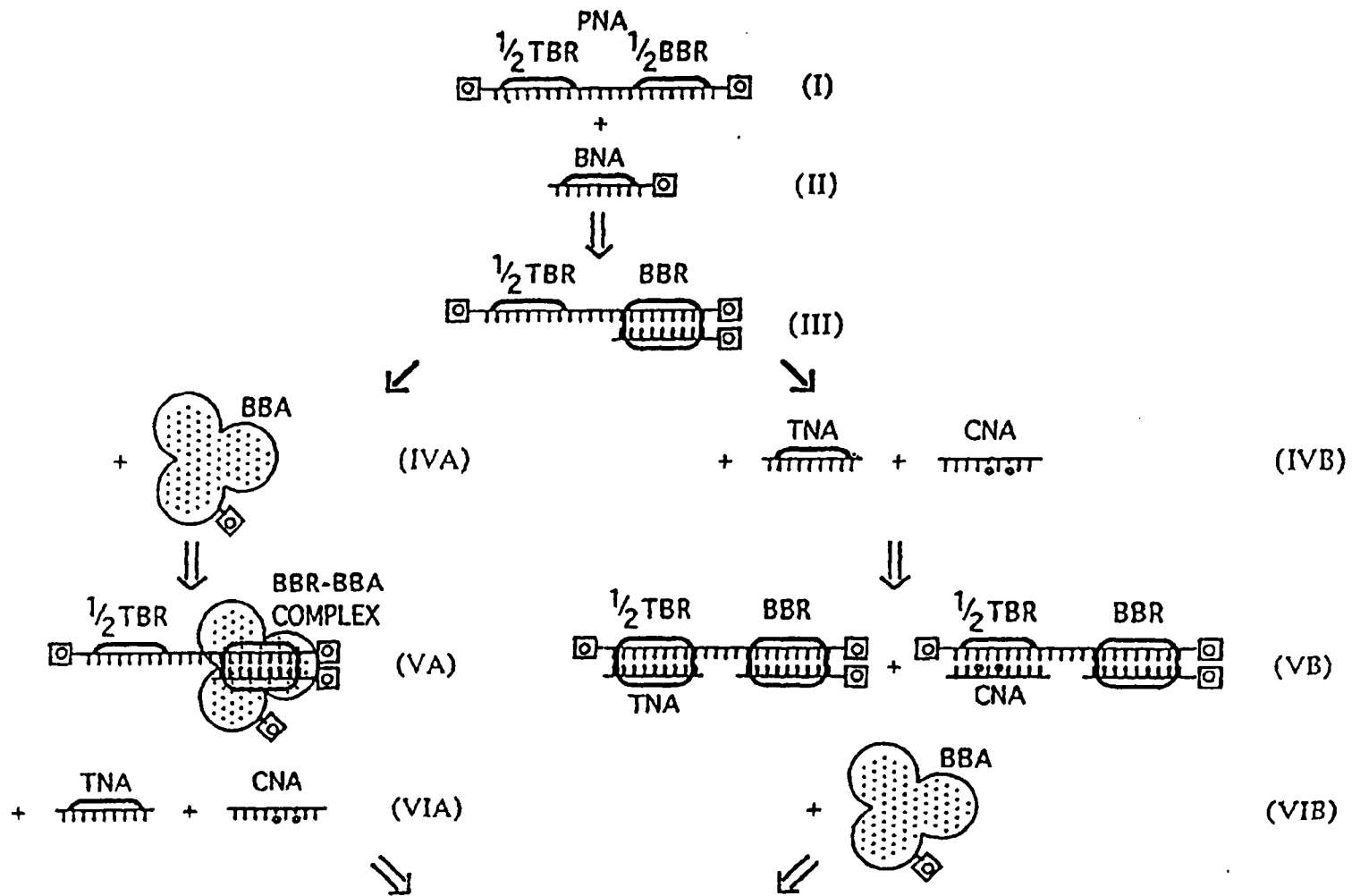


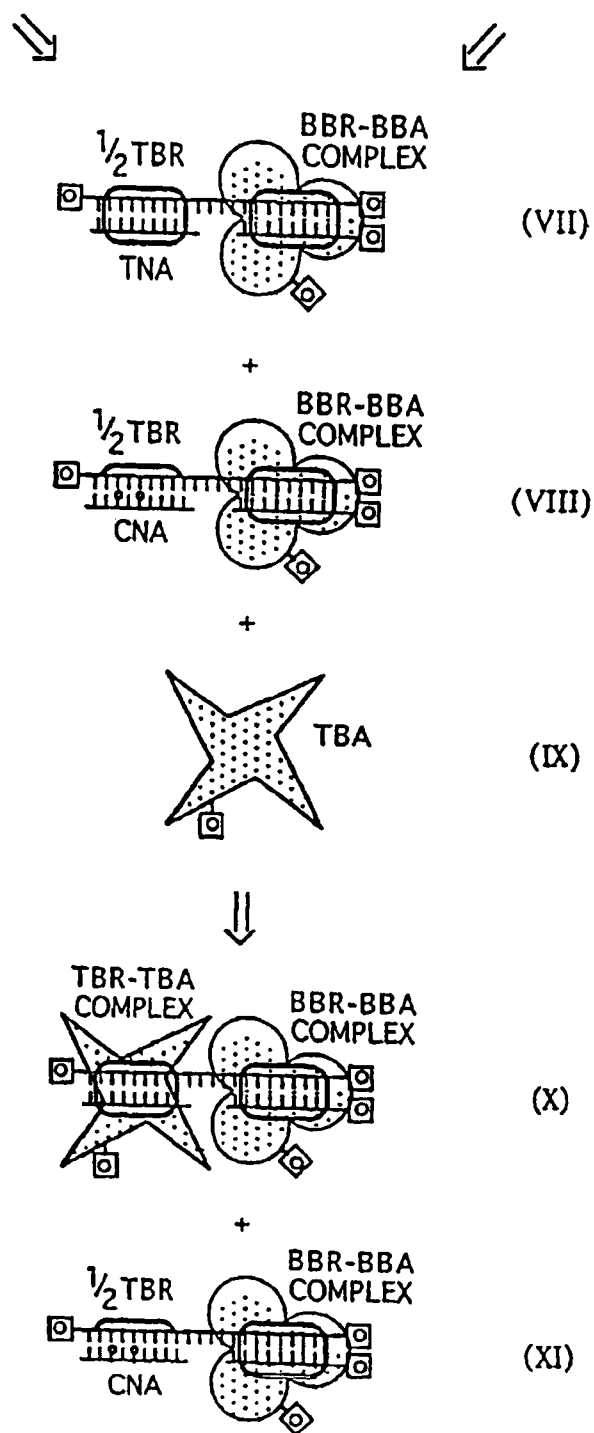
FIGURE 3 A



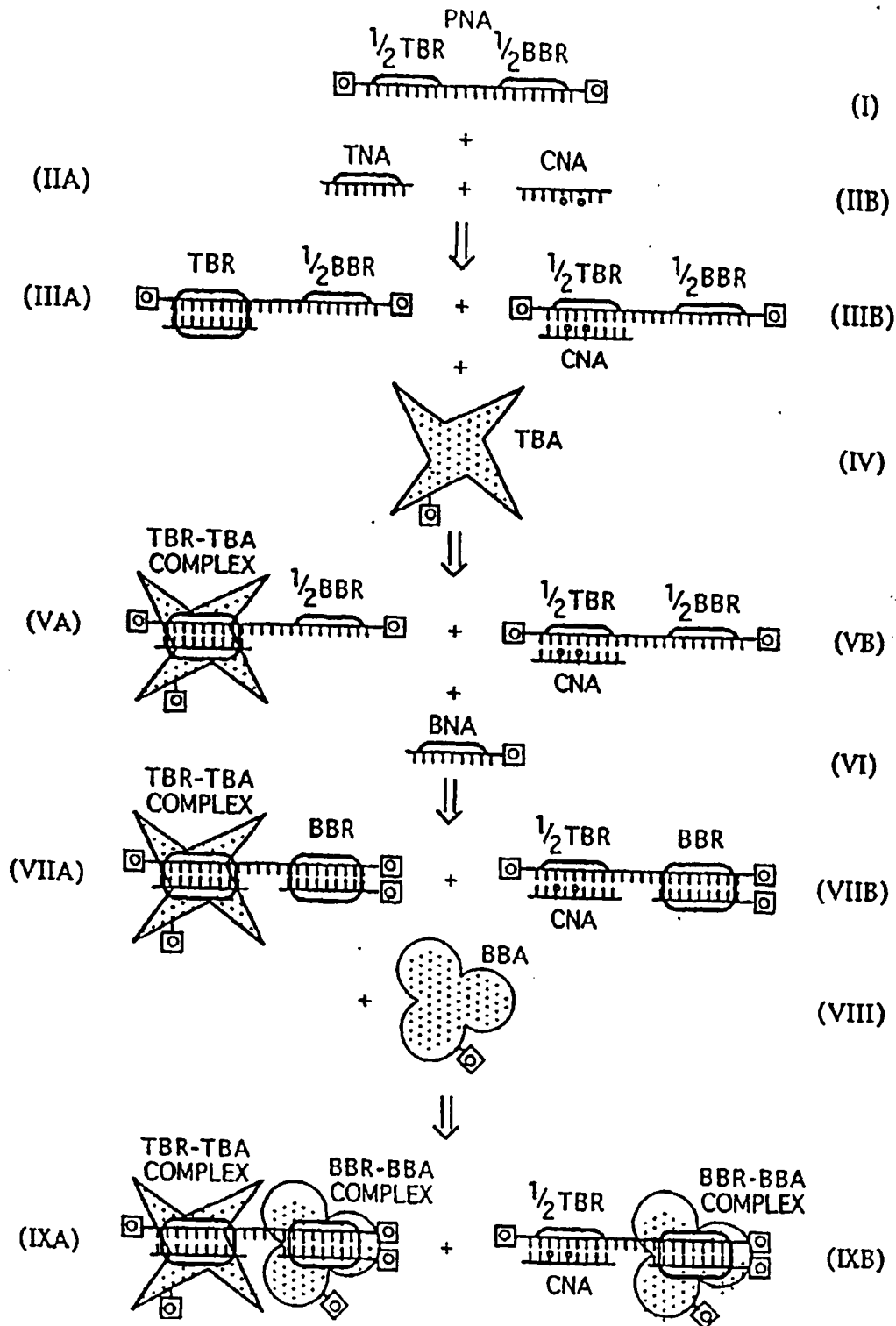
FIGUUR 3 B



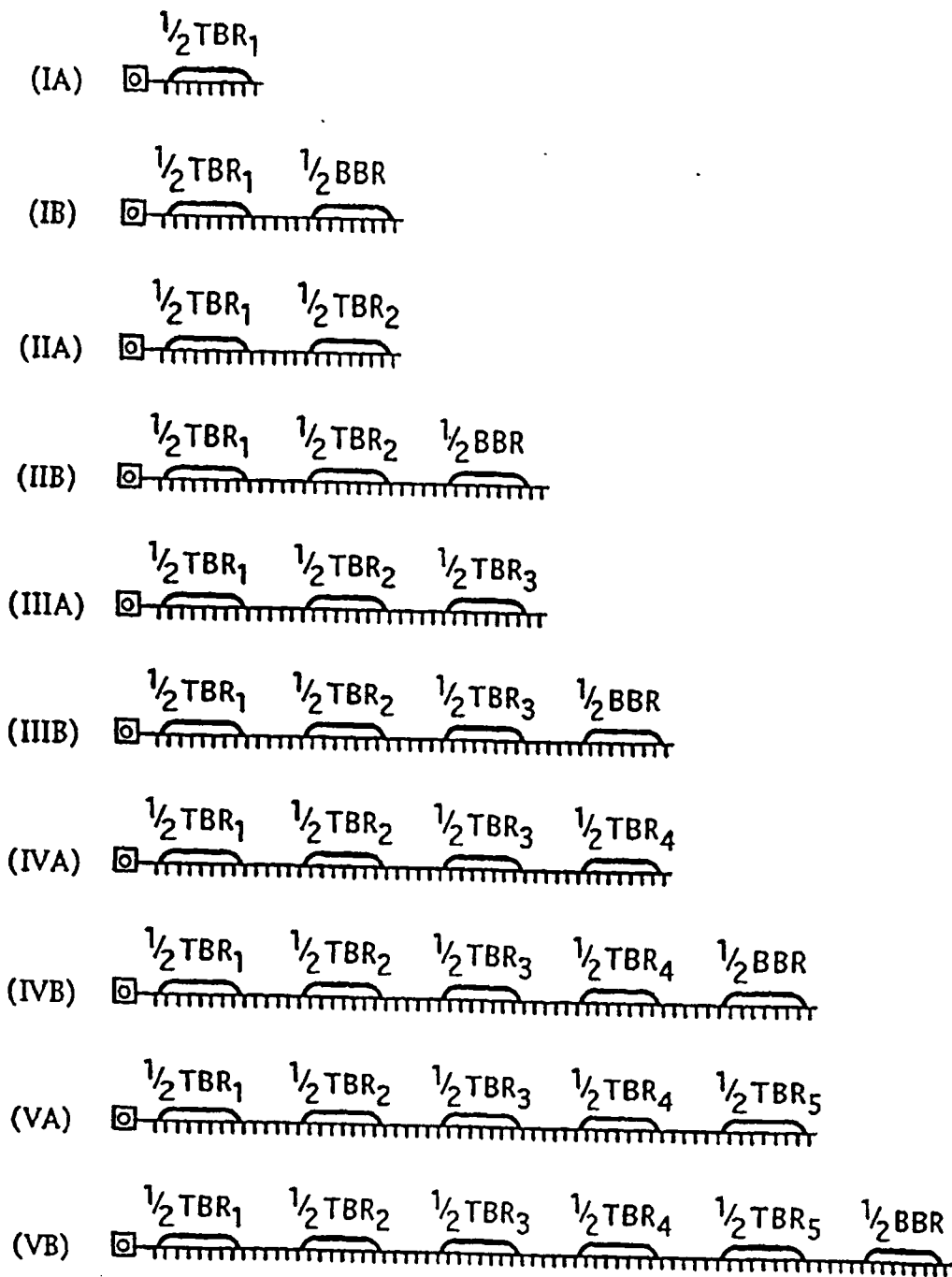
FIGUUR 4 A



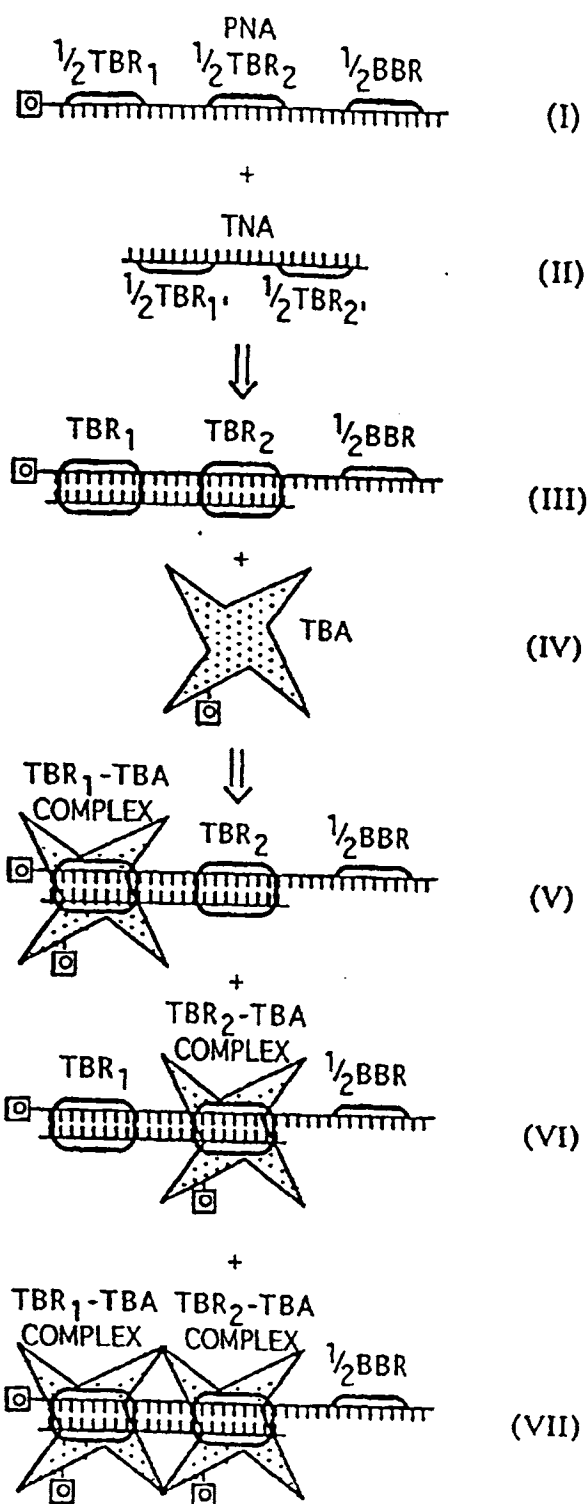
FIGUUR 4 B



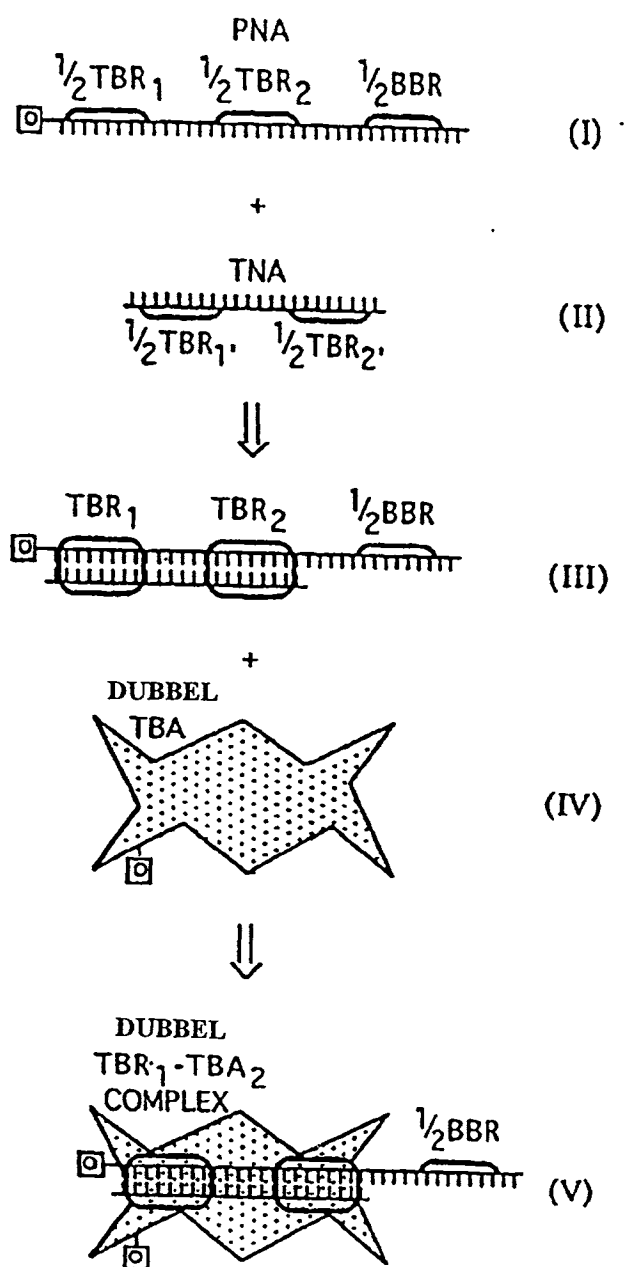
FIGUUR 4 C



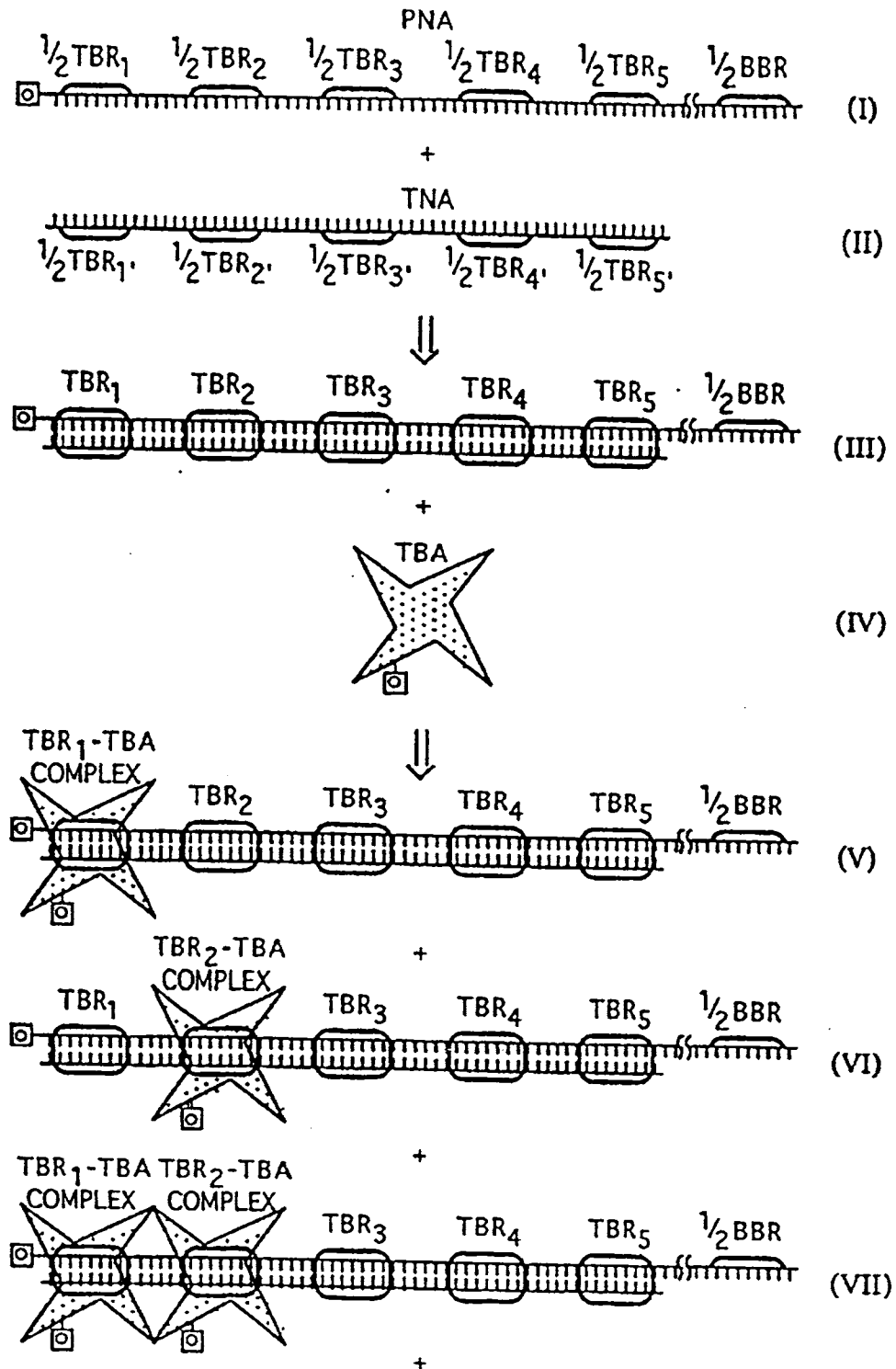
FIGUUR 5



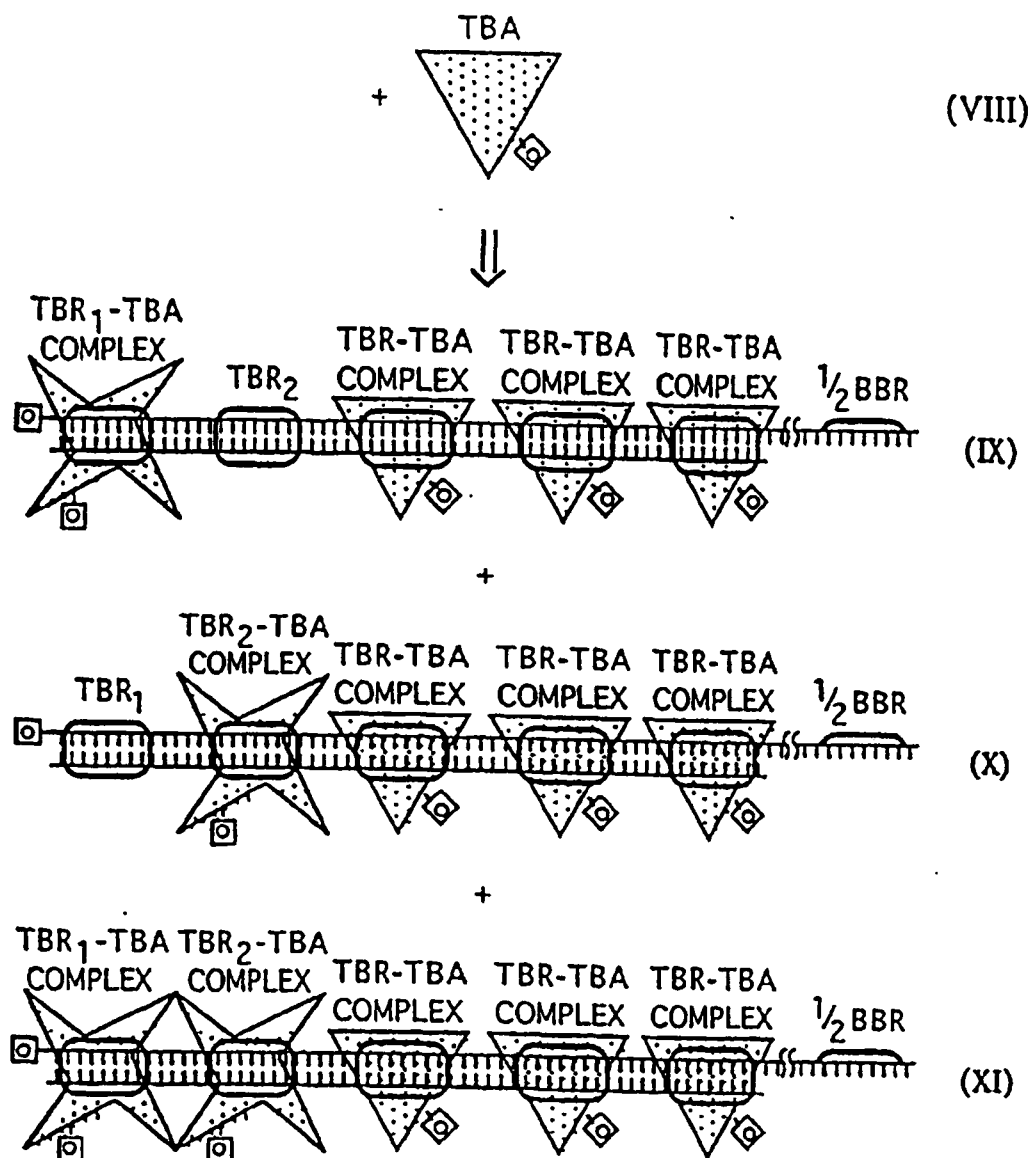
FIGUUR 6 A



FIGUUR 6 B



FIGUUR 6 C



FIGUUR 6 D

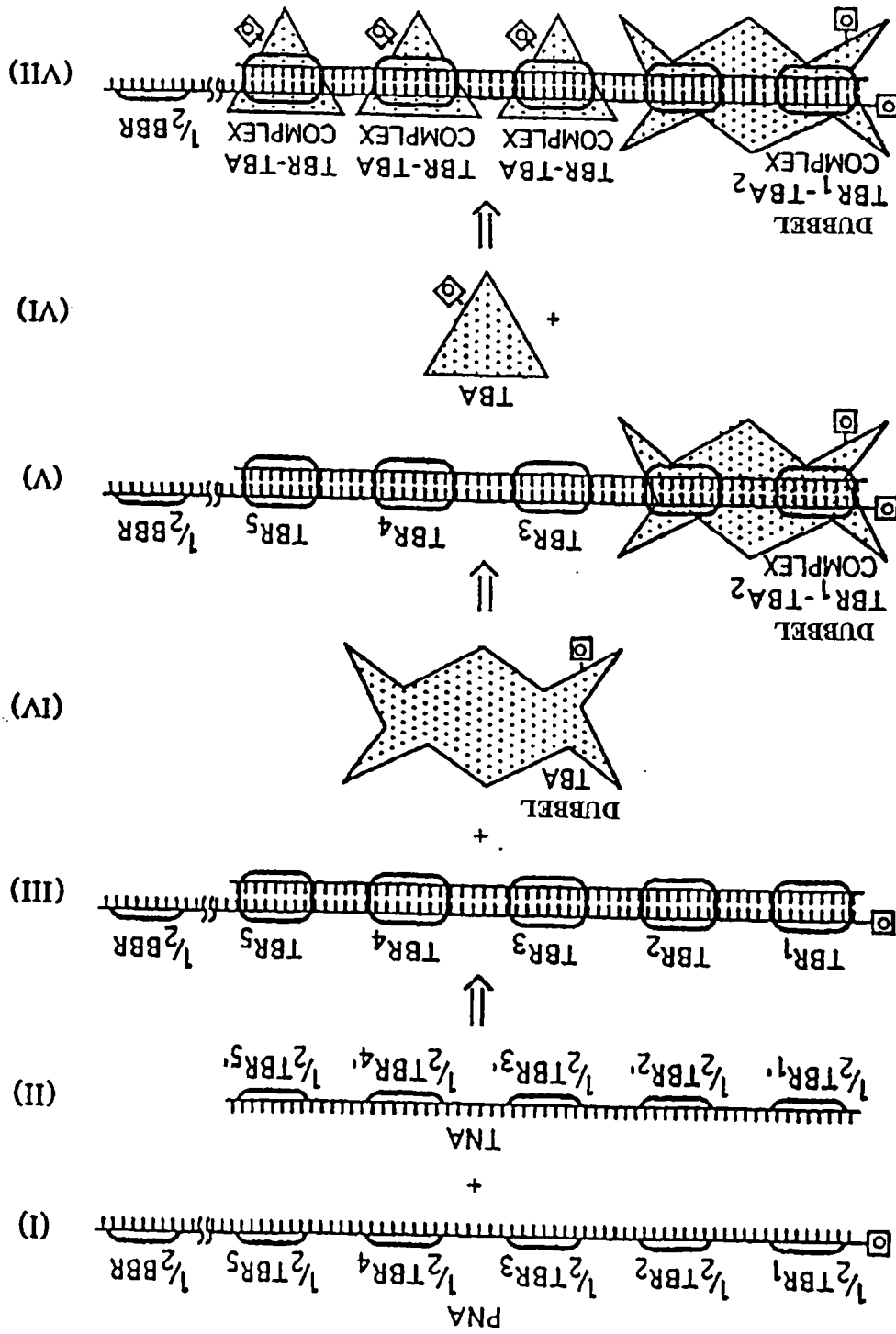


FIGURE 6 E

SEQ. ID: 37:

12345678901234567890123456789012345678901234567890
CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
+++++
NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1

HIV Test Kit PNA1 (+++ zoals hierboven) , SEQ. ID: 39:

CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGG

HIV Test Kit PNA1 (=== zoals hierboven) , SEQ. ID: 39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

De plakkerige eindsequentie in PAN2 is complementair ten opzichte van één van de uiteinden van de operator DNA gevormd uit:

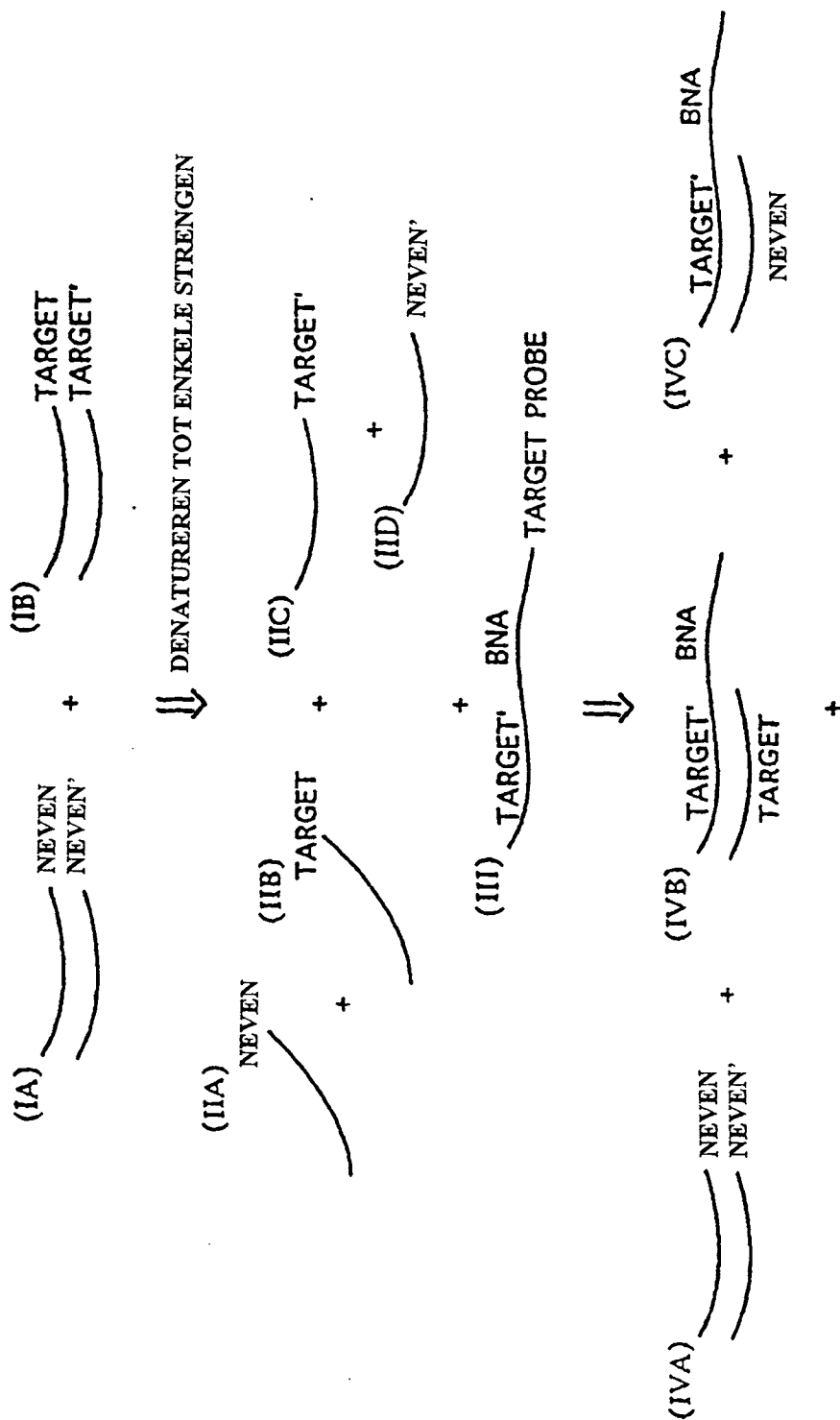
###OL1-OL2-OL3
OL1'-OL2'-OL3'***

of

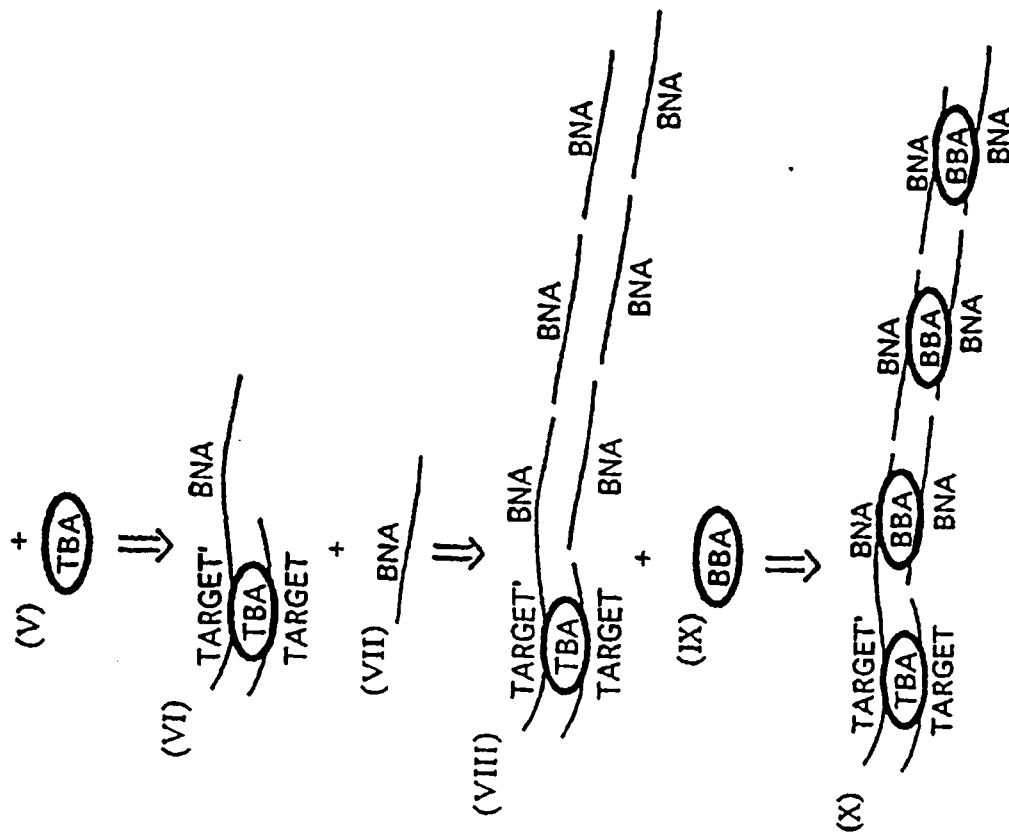
###OR3-OR2-OR1
OR3'-OR2'-OR1'***

FIGUUR 7

GEFRAGMENTEERD DUBBEL-STRENGS
NUCLEÏNEZUUR MONSTER

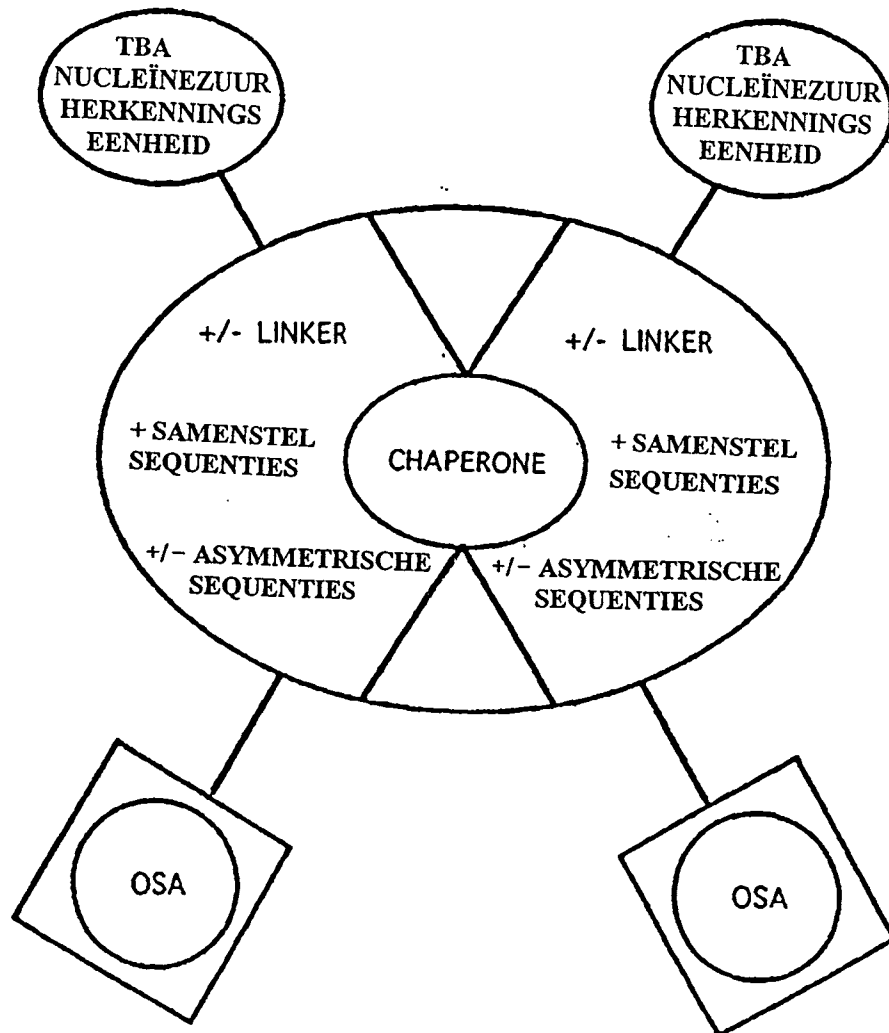


FIGUUR 8 A

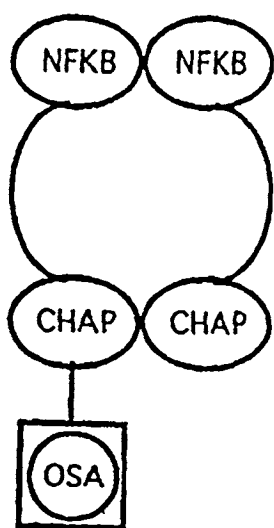


FIGUUR 8 B

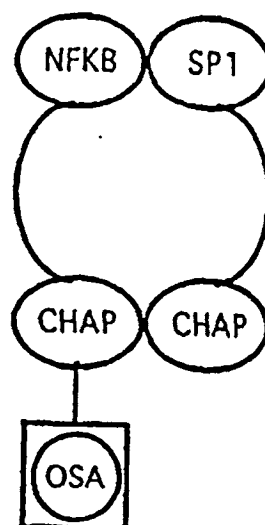
TBA: TARGET BINDING ASSEMBLY



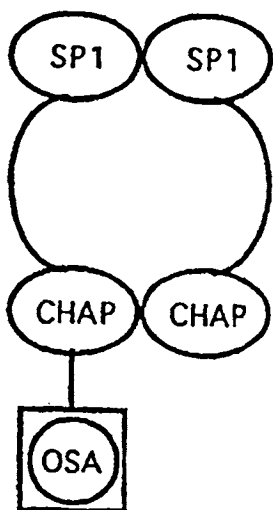
FIGUUR 9



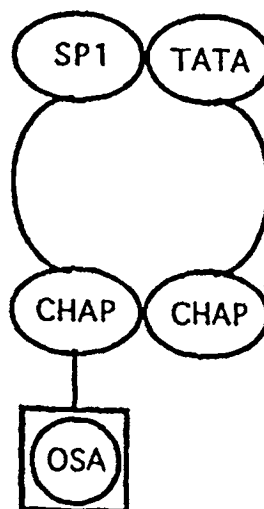
HIV-DETECT I



HIV-DETECT II

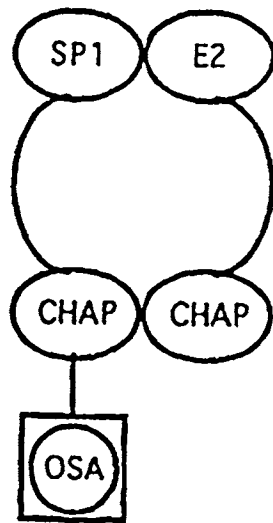


HIV-DETECT III

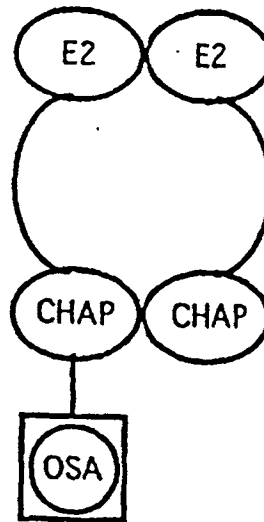


HIV-DETECT IV

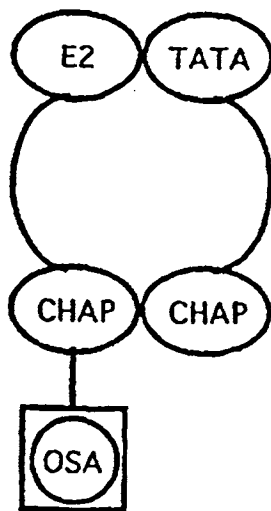
FIGUUR 10



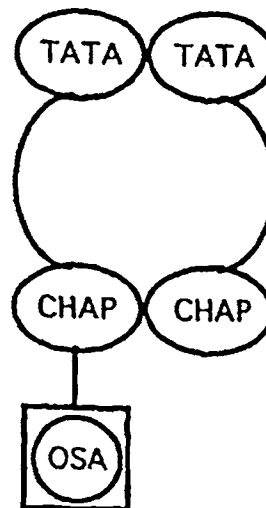
HPV-DETECT I



HPV-DETECT II

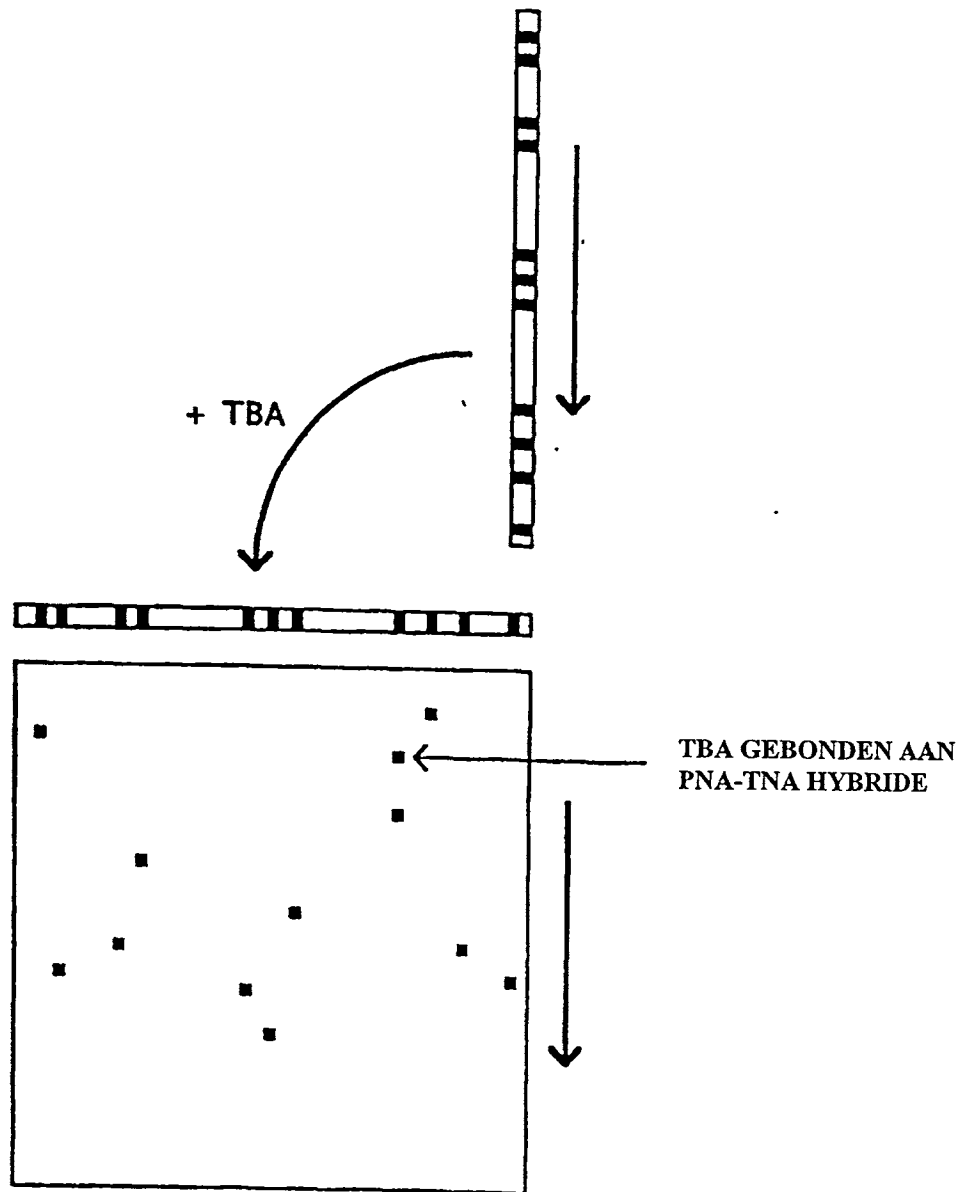


HPV-DETECT III

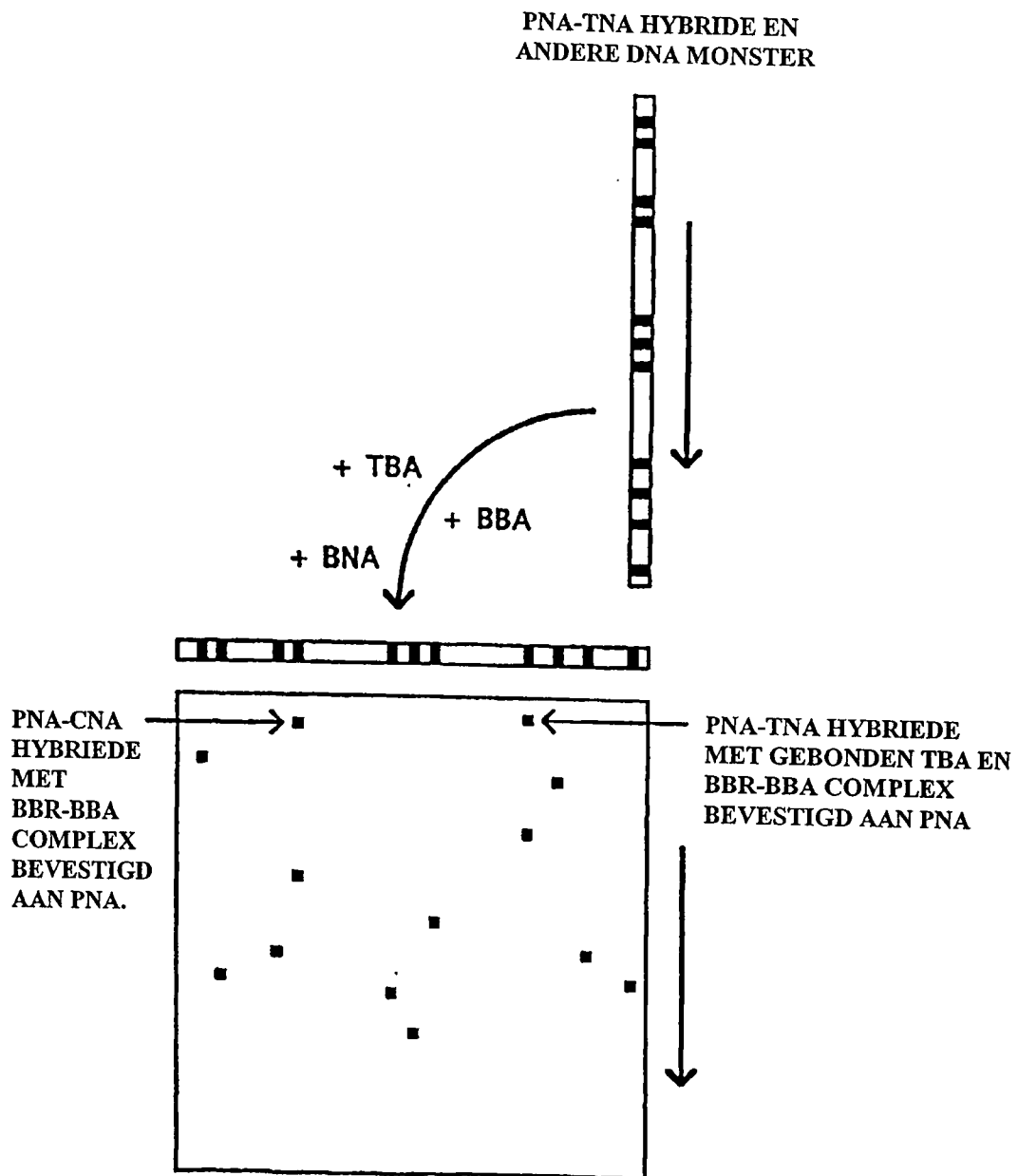


HPV-DETECT IV

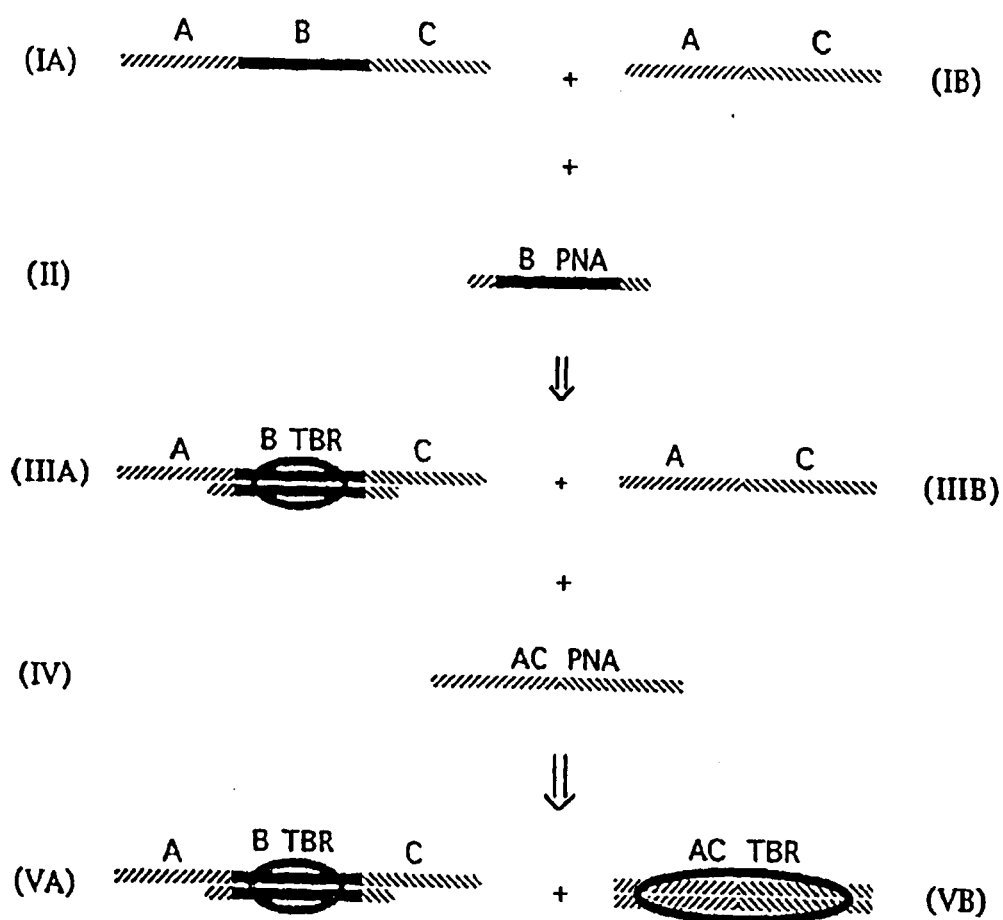
FIGUUR 11



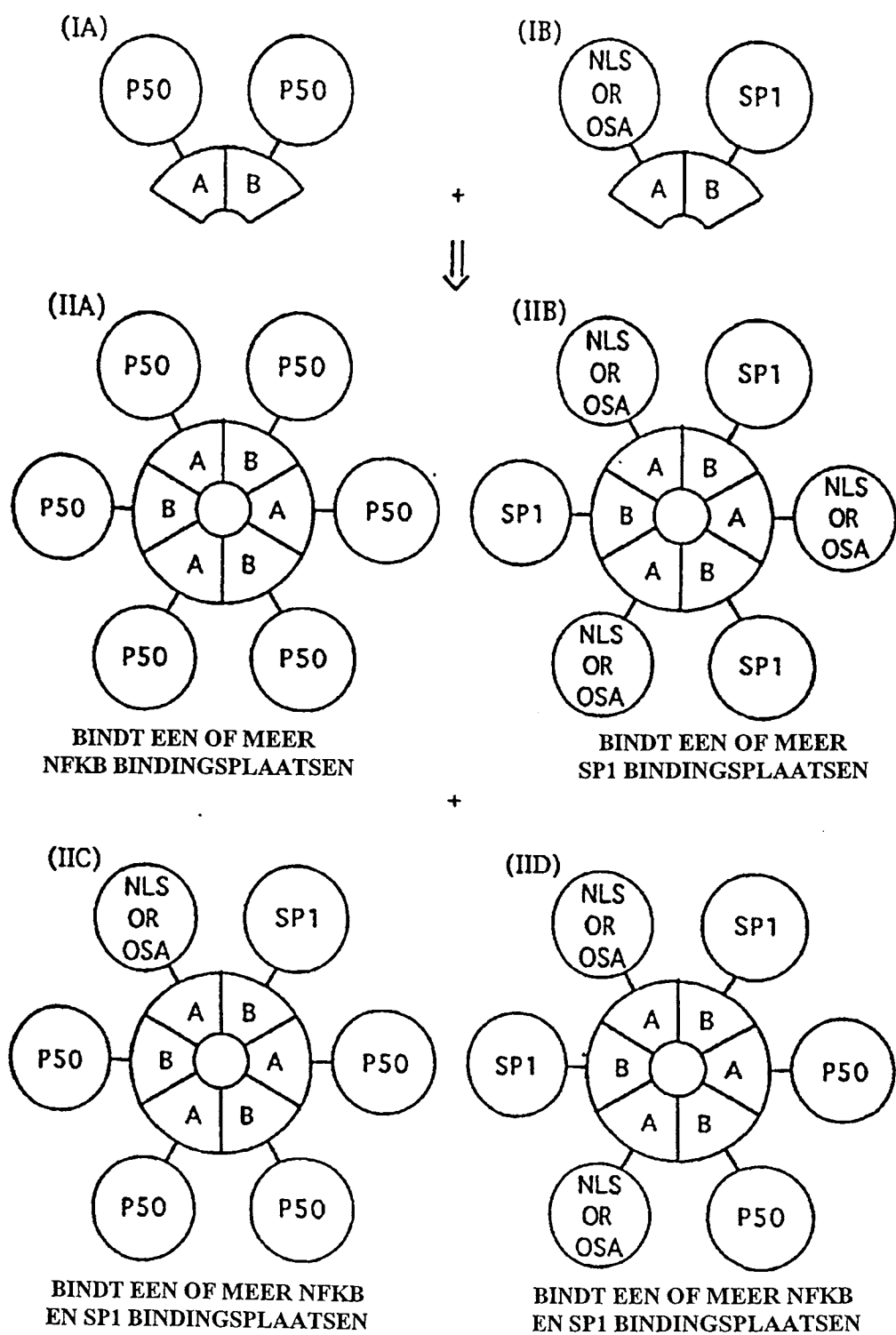
FIGUUR 12 A



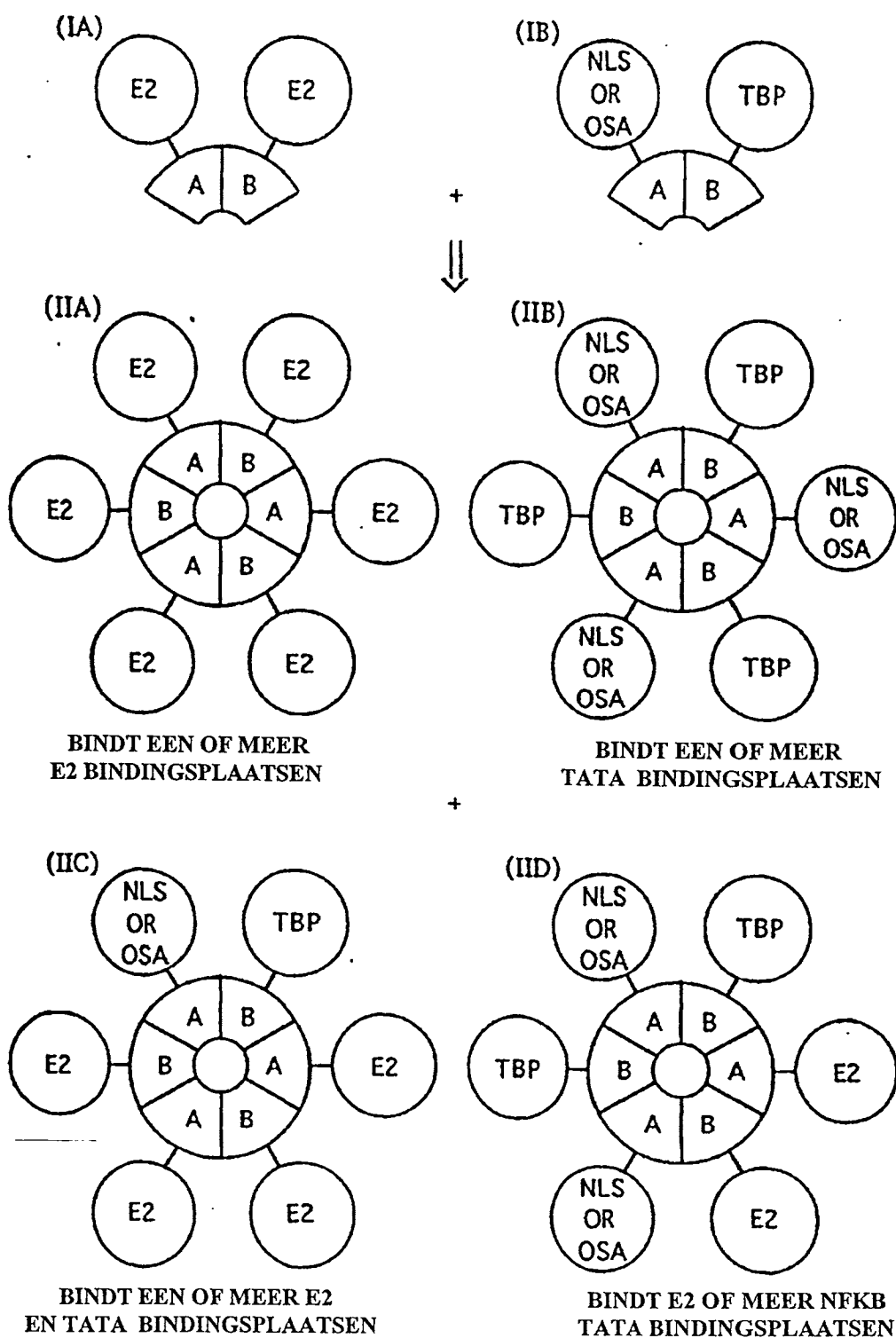
FIGUUR 12 B



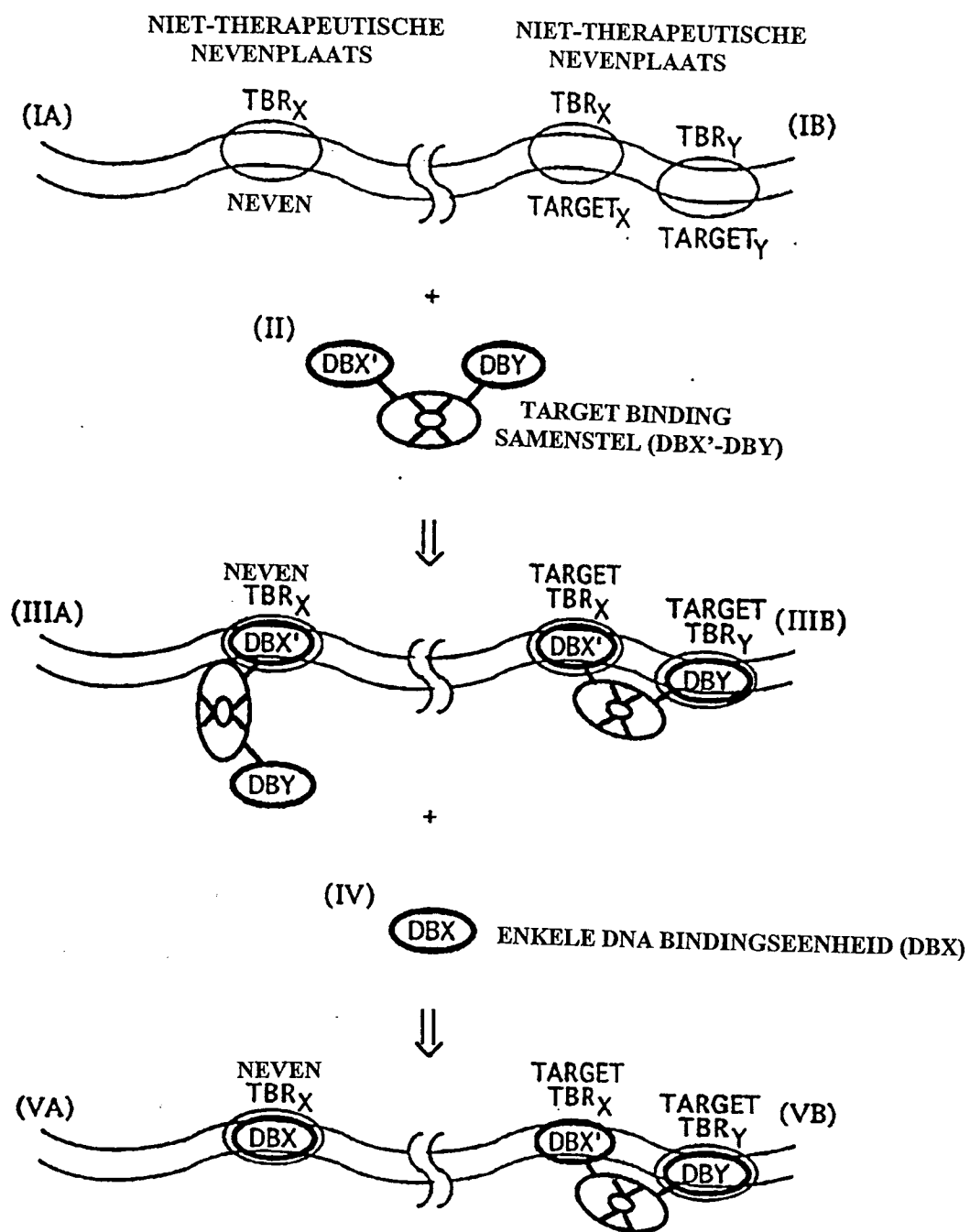
FIGUUR 13



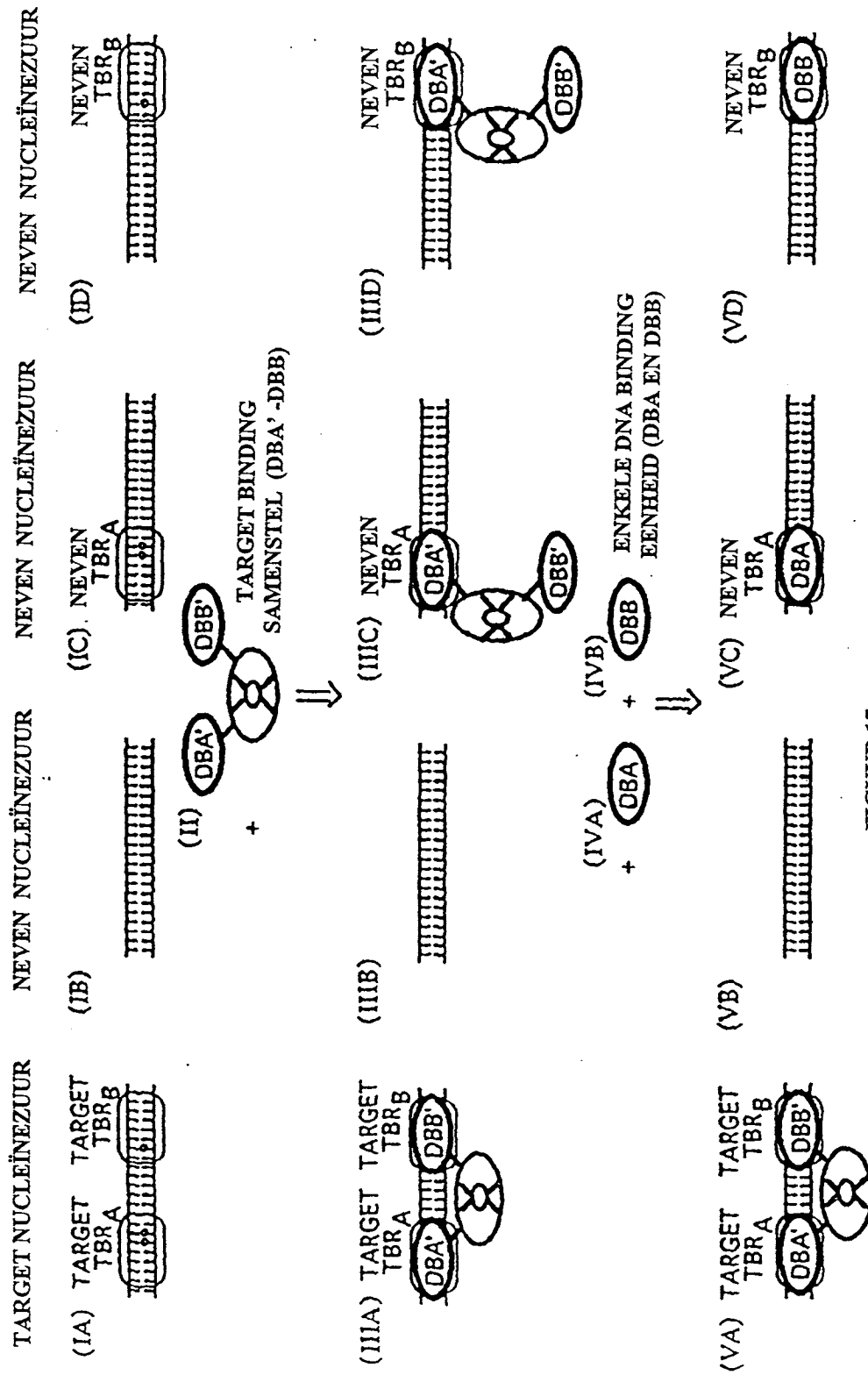
FIGUUR 14



FIGUUR 15



FIGUUR 16



FIGUR 17