(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 951488 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 951488

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 16/10
C07K 16/42
C12N 15/13
C12N 1/21
G01N 33/577
G01N 33/569
A61K 39/42
A61K 39/44

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.09.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **29.03.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.05.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **30.09.1993 PCT/US1993/009328**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

30.09.1992 US 954148

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **The Scripps Research Institute,** 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Burton, Dennis R.,** La Jolla, CA 92037, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Barbas, Carlos F.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Lerner, Richard A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Ihmisen immuunikatoviruksen vastaiset ihmisen neutraloivat monoklonaal iset vasta-aineet
Humana neutraliserande monoklonala antikroppar mot human immunbristsvi rus

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

69078 ATCC 69079 ATCC 69080 ATCC

Ihmisen immuunikatoviruksen vastaiset ihmisen neutraloivat monoklonaaliset vasta-aineet - Humana neutraliserande monoklonala antikroppar till humant immunbristvirus

Tekniikan ala

Keksintö koskee yleisesti immunologian alaa ja erityisesti ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, jotka sitovat ja neutraloivat ihmisen immuunikatovirusta (HIV).

Tausta

1. HIV-immunoterapia

HIV on intensiivisten tutkimusten kohteena, koska se on immuunikadon (AIDS) aiheuttava aine. Immunoterapeuttiset menetelmät ovat yksi useista lähestymistavoista HIV-infektion ja HIV:n aiheuttamien sairauksien estämiseksi, hoitamiseksi tai parantamiseksi. Erityisesti neutraloivien vasta-aineiden käyttö passiivisissa immunoterapioissa on keksinnölle keskeisen tärkeää.

On kuvattu HIV-1-infektoitujen ihmisten passiivinen immunisointi käyttämällä ihmisseerumeja, jotka sisältävät polyklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat HIV:n kanssa immunoreaktiivisia. Katso esimerkiksi Jackson et al., Lancet, syyskuu 17:647-652, (1988); Karpas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:7613-7616 (1990).

Lukuisat ryhmät ovat kuvanneet ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden valmistuksen, jotka neutraloivat HIV-isolaatteja in vitro. Kuvatuilla vasta-aineilla on tyypillisesti immunospesifisyyksiä HIV-glykoproteiini gp120:llä tai sen sukuisella ulkoisella pintakuoriglykoproteiini gp120:lla tai transmembraaniglykoproteiini gp41:llä oleville epitoopeille. Katso esimerkiksi Levy, Micro. Rev., 57:183-289 (1993); Karwowska et al., Aids Research and Human Retroviruses, 8:1099-1106 (1992); Takeda et al., J. Clin. Invest., 89:1952-1957 (1992); Tilley et al., Aids Research and Human

Retroviruses, 8:461-467 (1992); Laman et al., J. Virol., 66:1823-1831 (1992); Thali et al., J. Virol., 65:6188-6193 (1991); Ho et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8949-8952 (1991); D'Souza et al., AIDS, 5:1061-1070 (1991); Tilley et al., Res. Virol., 142:247-259 (1991); Broliden et al., Immunol., 73:371-376 (1991); Matour et al., J. Immunol., 146:4325-4332 (1991); ja Gorny et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:3238-3242 (1991).

Tähän mennessä minkään kuvatuista ihmisen monoklonaalisista vasta-aineista ei ole osoitettu olevan tehokasta passiivisissa immunisointiterapioissa. Lisäksi, monoklonaalisina vasta-aineina niistä kukin reagoi HIV-kuoriglykoproteiinilla, gp120 tai gp160 olevan yksittäisen epitoopin kanssa. Epitooppia, jota vastaan tehokas neutraloiva vasta-aine immunoreagoi, ei ole tunnistettu.

On edelleen tarvetta kehittää ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen valmisteita, joilla on merkittävää HIV-neutralointiaktiivisuutta. Lisäksi on tarvetta monoklonaalisille vasta-aineille, jotka ovat immunoreaktiivisia muille ja monenlaisille neutraloiville epitoopeille HIV-gp120:llä ja -gp41:llä, hiljattain tehtyjen tutkimusten valossa, jotka viittaavat siihen, että gp120 ja gp41 liittyvät sekä HIV-viruksen soluun sitoutumiseen että jälkisitoutumistapahtumiin, joita ovat mm. kuoren erkaneminen ja irtoaminen. Katso katsausta varten Levy, Micro. Rev., 57:183-289 (1993). Lisää (uusia) epitooppispesifisyyksiä vaaditaan, koska passiivisesti immunisoitaessa annon kohteena oleva potilas voi tuottaa immuunivastetta annettua vasta-ainetta vastaan, inaktivoiden siten erityisen terapeuttisen vasta-aineen.

2. Kombinaatiofagemidikirjastoista tuotetut ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet

Filamenttifagi-"display"-vektorien, joita kutsutaan fagemideiksi, on toistuvasti osoitettu sallivan valmistaa tehokkaasti erilaiset ja uudet immunospesifisyydet omaavien mono-

klonaalisten vasta-aineiden suuria kirjastoja. Teknologiassa käytetään filamenttifaagivaippaproteiinimembraaniankkuridomeenia keinona geenituotteen ja geenin liittämiseksi filamenttifaagin replikaation kokoonpanovaiheen aikana, ja sitä on käytetty vasta-aineiden kloonaukseen ja ekspressioon kombinaatiokirjastoista. Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991). Vasta-aineiden kombinaatiokirjastoja on tuotettu käyttämällä sekä cpVIII-membraaniankkuria (Kang et al., yllä) että cpIII-membraaniankkuria. Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991).

Filamenttifaagipohjaisen kombinaatiovasta-ainekirjaston vaihtelevaisuutta voidaan lisätä sekoittamalla raskaan ja keveän ketjun geenit (Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991)), muuttamalla kirjaston kloonattujen raskaan ketjun geenien CDR3-alueita (Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992)), ja lisäämällä kirjastoon sattumanvaraisia mutaatioita virheisiin taipuvaisilla polymeraasiketjureaktioilla (PCR) [Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992)].

"Filamentous phage display" -vektoreita on myös käytetty tuottamaan ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat immunoreaktiivisia hepatiitti B -virus(HBV)- tai HIV-antigeenien kanssa. Katso esimerkiksi Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992); ja Burton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:10134-10137 (1991), vastaavasti. Minkään aikaisemmin kuvatun ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden, jotka on tuotettu fagemidivektoreilla ja jotka ovat HIV:n kanssa immunoreaktiivisia, ei ole osoitettu neutraloivan HIV:tä.

Keksinnön lyhyt kuvaus

Nyt on keksitty menetelmiä, joissa käytetään fagemidivektoreita HIV:tä neutraloivien ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden tunnistamiseksi ja eristämiseksi kombinaatiokirjas-

toista, ja sallimaan täysin ihmisestä johdettujen neutraloivien vasta-aineiden suurten lukumäärien nopean valmistuksen. Tunnistetut neutraloivat vasta-aineet määrittävät uusia epitooppeja HIV-gp120- ja -gp41-glykoproteiineissa, lisäten siten uusien immunoterapeuttisten ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden saatavuutta.

Keksintö aikaansaa ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, jotka neutraloivat HIV:tä, ja aikaansaa myös solulinjoja, joita käytetään näiden monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseen.

Aikaansaadaan myös aminohapposekvenssejä, jotka antavat monoklonaalisen vasta-aineen antigeeninsitomisdomeenille neutralointifunktion, ja joita voidaan käyttää immunogeenisesti tunnistamaan muita vasta-aineita, jotka sitovat spesifisesti HIV:tä ja neutraloivat sitä. Keksinnön mukaisilla monoklonaalisilla vasta-aineilla on erityistä käyttökelpoisuutta reagensseina HIV:n aiheuttaman sairauden diagnoosissa ja immunoterapiassa.

Keksinnön mukaisten monoklonaalisten vasta-aineiden eräs tärkeä etu johtuu siitä tosiseikasta, että niitä koodittaa ihmisen polynukleotidisekvenssi. Siten keksinnön mukaisten monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö in vivo HIV:n aiheuttaman sairauden diagnoosiin ja immunoterapiaan vähentää passiivisesti annettujen vasta-aineiden vastaisen merkittävän isäntäimmuunivasteen ongelmia huomattavasti, joka on ongelma, johon tavallisesti törmätään ksenogeenis- tai kimeeriperäisiä monoklonaalisia vasta-aineita käytettäessä.

Yhdessä suoritusmuodossa keksintö ottaa lukuun ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp120:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä. Eräällä edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää

immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 78 tai 79. Eräällä toisella edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 110, 115, 118, 121, 122, 124 tai 132.

Edelleen eräässä suoritusmuodossa keksintö ottaa lukuun ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini qp41:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä. Eräällä edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 142, 143, 144, 145 tai 146. Eräällä toisella edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 147, 148, 114, 150 tai 151.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa keksinnössä kuvataan polynukleotidisekvenssi, joka koodittaa keksinnön mukaisen ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen immunoglobuliinin raskaan tai keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssiosaa. Otetaan lukuun myös DNA-ekspressiovektorit, jotka sisältävät polynukleotidin, ja isäntäsolut, jotka sisältävät keksinnön mukaisia vektoreita ja polynukleotideja.

Keksintö ottaa lukuun myös menetelmän ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) osoittamiseksi, jossa menetelmässä näyte, jonka epäillään sisältävän HIV:tä, saatetaan kontaktiin diagnosti-

sesti tehokkaan määrän kanssa keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta, ja määritetään, immunoreagoiko monoklonaalinen vasta-aine näytteen kanssa. Menetelmä voidaan toteuttaa in vitro tai in vivo, ja se voi sisältää erilaisia menetelmiä immunoreaktiotuotteen läsnäolon määrittämiseksi.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa keksinnössä kuvataan menetelmä passiivisen immunoterapian aikaansaamiseksi ihmisen immuunikatovirus (HIV) -sairaudelle ihmisellä, jossa menetelmässä ihmiselle annetaan immunoterapeuttisesti tehokas määrä keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta. Anto voidaan aikaansaada profylaktisesti, ja parenteraalisella annolla. Farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät yhtä tai useaa erilaisista ihmisen monoklonaalisista vasta-aineista, kuvataan keksinnön mukaisissa terapeuttisissa menetelmissä käyttöä varten.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Piirroksissa, jotka muodostavat tämän kuvauksen osan:

Kuviossa 1 kuvataan kaksijuosteinen synteettinen DNA-sekvenssi, joka on insertoitu Lambda Zap:iin Lambda Hc2-ekspressiovektorin tuottamiseksi. Kaksijuosteisen synteettisen DNA-insertion valmistus kuvataan esimerkissä 1a2). Eri ominaispiirteitä, joita vaaditaan jotta tämä vektori ekspressoisi V_H-koodittavia DNA-homologeja, ovat mm. Shine-Dalgarno ribosomin sitoutumiskohta, johtosekvenssi ohjaamaan ekspressoidun proteiinin solulimaan, kuten kuvataan julkaisussa: Mouva et al.; J. Biol. Chem., 255:27, 1980, ja erilaisia restriktioentsyymikohtia, joita käytetään liittämään V_H-homologit toimintakykyisesti ekspressiovektoriin. V_H-ekspressiovektorisekvenssi sisältää myös lyhyen nukleiinihapposekvenssin, joka koodittaa aminohappoja, joita esiintyy tyypillisesti raskaan ketjun vaihtelevilla alueilla (V_H-rungossa). Tämä V_H-runko sijaitsee juuri ylävirtaan ja oikeassa lukusuunnassa V_H-DNA-homologeina, jotka ovat liittyneet toimintakykyisesti XhoI- ja SpeI -kloonauskohtiin. Kaksijuosteisen

synteettinen DNA-insertion huippu- ja pohjajuosteen sekvenssit luetellaan vastaavasti SEKV. ID.NROssa 1 ja SEKV. ID. NROssa 2. Kymmenen aminohapon sekvenssi, joka käsittää dekapeptidipäätteen, luetellaan SEKV. ID.NROssa 5. Synteettinen DNA-insertio on liitetty suunnatusti Lambda Zap II:een, joka on sulatettu restriktioentsyymeillä Not 1 ja Xho I Lambda Hc2-ekspressiovektorin muodostamiseksi.

Kuviossa 2 kuvataan bakteriaalisen ekspressiovektori Lambda Hc2:n (V_H-ekspressiovektorin) tärkeimmät ominaispiirteet. Insertion suuntaus Lambda Zap II:ssa esitetään. V_H-DNA-homologit on insertoitu Xho I- ja Spe I-kloonauskohtiin. Läpilukutranskriptio tuottaa dekapeptidiepitoopin (tag), joka sijaitsee kloonauskohdasta juuri 3'-suuntaan. Dekapeptidipäätteen ja Pel B-johtosekvenssin/välikkeen aminohappotähdesekvenssi luetellaan vastaavasti SEKV. ID.NROssa 5 ja 6.

Kuviossa 3 kuvataan Lambda Zap:iin Lambda Lc2-ekspressiovektorin tuottamiseksi insertoidun kaksijuosteisen synteettisen DNA:n sekvenssi. Kuviossa 1 kuvataan eri ominaispiirteet, jotka tältä vektorilta vaaditaan V_L:ää koodittavien DNA-homologien ekspressoimiseksi. V_L:ää koodittavat DNA-homologit on liitetty toimintakykyisesti Lc2-sekvenssiin Sac I- ja Xho I-restriktiokohdat. Kaksijuosteisen synteettisen DNA-insertion huippu- ja pohjajuosteen sekvenssit luetellaan vastaavasti SEKV. ID.NROssa 3 ja SEKV. ID.NROssa 4. Synteettinen DNA-insertio on liitetty suunnatusti Lambda Zap II:een, joka on sulatettu restriktioentsyymeillä Sac I ja Not I Lambda Lc2-ekspressiovektorin muodostamiseksi.

Kuviossa 4 kuvataan bakteriaalisen ekspressiovektorin Lc2 (V_L-ekspressiovektorin) tärkeimmät ominaispiirteet. Synteettinen DNA-sekvenssi kuviosta 3 esitetään huipulla yhdessä LacZ-promoottorin kanssa Lambda Zap II:sta. Esitetään insertion suuntaus Lambda Zap II:ssa. V_L-DNA-homologit on insertoitu Sac I- ja Xho I-kloonauskohtiin. Pel B-johtosekvenssi/välikkeen aminohappotähdesekvenssi luetellaan SEKV. ID.

NROssa 7.

Kuviossa 5 kuvataan kaksikistroninen ekspressiovektori, pComb, fagemidiekspressiovektorin muodossa.

Kuviossa 6 kuvataan HIV-1:n neutralointi yhdistelmä-DNA-Fab'eilla. Samoja supernaattivalmisteita käytettiin p24- ja solulimamäärityksissä. Kuviot ilmaisevat neutralointitiitterit. Katso esimerkkiä 3 koskien määritysmenettelytapojen yksityiskohtia ja tulosten pohdintaa. ELISA-tiitterit ja Fab-konsentraatiot määritettiin esimerkissä 2b kuvatulla tavalla.

Kuviossa 7 kuvataan Fab-fragmenttien suhteelliset affiniteetit gp120 (IIIB):tä kohtaan kuvattuna inhibitio-ELISA:lla, joka suoritettiin esimerkissä 2b6) kuvatulla tavalla. Fabs 27, 6, 29, 2 ja 3 ovat kaikki esimerkissä 4 käsiteltyjen ryhmien prototyyppijäseniä. Silmukka 2 on Fab-fragmentti, joka on valittu samasta kirjastosta kuin muut Fab'it, mutta joka tunnistaa V3-silmukan. Tiedot esitetään Y-akselilla maksimisitoutumis-%-asteena X-akselilla esitettyjen liukoisen gp120:n kasvavien konsentraatioiden (10^{-11} M - 10^{-7} M) funktiona.

Kuviossa 8 kuvataan liukoisen CD4:n kilpailu Fab-fragmenttien kanssa gp120 (IIIB):stä. P4D10- ja silmukka 2 ovat kontrolleja. P4D10 ion hiiri-monoklonaalista vasta-ainetta, joka reagoi gp120 (IIIB):n V3-silmukan kanssa. Tiedot, joita käsitellään esimerkissä 2b6), esitetään kaavioina kuviossa 7 kuvatulla tavalla.

Kuviossa 9 kuvataan HIV:n neutralointi puhdistetuilla Fab'-eilla, jotka on valmistettu esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Esitetyt tulokset on johdettu solulimamäärityksestä, jossa käytetään MN-kantaa. Tiedot esitetään Y-akselilla sitomisen esto-%:na X-akselilla esitettyjen kasvavien Fab-konsentraatioiden [0,1 - 10 μg/ml] funktiona.

Kuviossa 10 kuvataan gp120:een sitoutuvien Fab'ien vaihtelevien raskaiden (V_H) domeenien aminohappotähdesekvenssit. Sekvenssihomologian perusteella on tunnistettu seitsemän erillistä ryhmää esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Ensimmäisen sekvenssin identiteetti ryhmässä ilmaistaan pisteillä. Fab-klooninimet ilmoitetaan vasemmanpuoleisessa sarakkeessa. Vastaavat SEKV. ID.NROt ilmoitetaan oikeanpuoleisessa sarakkeessa. Sekvensöidyt alueet oikealta vasemmalle ovat kehysalue 1 (FR1), komplementaarisuuden määrittävä alue (complementary determining region) 1 (CDR1), kehysalue 2 (FR2), komplementaarisuuden määrittävä alue 2 (CDR2), kehysalue 3 (FR3), komplementaarisuuden määrittävä alue 3 (CDR3) ja kehysalue 4 (FR4). Viiden aminoterminaalisen tähteen sekvenssi, joka alkaa LEQ:lla, syntyy VH1a:sta kun taas viiden aminoterminaalisen tähteen sekvenssi, joka alkaa LEE:llä, syntyy VH3a-alukkeista. b11- ja b29-sekvenssit ovat hyvin samanlaisia kuin b3-ryhmä, ja niiden voitaisiin väittää olevan intraklonaalisia variantteja tuon ryhmän sisällä; ne sijoitetaan omaan ryhmäänsä V-D- ja D-J-rajapinnan välisistä eroista johtuen.

Kuviossa 11 kuvataan gp120:een kiinnittyvien Fab'ien vaihtelevien keveiden (V_L) domeenien aminohappotähdesekvenssit. Katso kuviota 10 kuvion kuvausta varten ja esimerkkiä 4 sekvenssien analyysiä varten.

Kuviossa 12 kuvataan gp120:een sitoutuvien Fab'ien V_L-domeenien aminohappotähdesekvenssit ja jotka on luotu sekoittamalla kloonin b12 raskaan ketjun keveiden ketjujen kirjastoa (H12-LCn-Fab't) vastaan esimerkissä 5 kuvatulla tavalla. Huomaa, että uudet V_L-sekvenssit ovat saaneet klooninumerot, jotka eivät liity alkuperäisestä kirjastosta oleviin numeroihin. Ainutlaatuiset sekvenssit luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NRO 114:sta 122:een. Uusia V_L-domeenisekvenssejä verrataan alkuperäisen klooni b12:n V_L-sekvenssiin.

Kuviossa 13 kuvataan gp120:een sitoutuvista Fab'eista olevi-

en V_H-domeenien aminohappotähdesekvenssit ja jotka on luotu sekoittamalla kloonista b12 olevan keveän ketjun raskaiden ketjujen kirjastoa (L12-HCn-Fab'eja) vastaan esimerkissä 5 kuvatulla tavalla. Huomaa, että uudet V_H-sekvenssit ovat saaneet klooninumerot, jotka eivät liity alkuperäisestä kirjastosta oleviin numeroihin. Ainutlaatuiset sekvenssit luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NRO 123:sta 132:een. Uusia V_H-domeenisekvenssejä verrataan alkuperäisen klooni b12:n V_H-sekvenssiin.

Kuviossa 14 kuvataan, kahdessa kuviossa, kuvio 14A ja 14B, raskaan (pTACO1H) ja keveän ketjun (pTCO1) replikoni-yhteensopivien ketjunsekoitusvektorien plasmidikartat, vastaavasti. Molemmat plasmidit ovat hyvin samanlaisia osassa, joka sisältää promoottori- ja kloonauskohdan. Lyhenteet: tacPO, tac-promoottori/operoni; 5 histidiiniaminohappotähdeloppuosa (histidiini)5-häntä; f1IG, f1-fagin intergeeninen alue; stu, "stuffer"-fragmentti, joka on valmis korvattavaksi lukuvaiheistukseen keveällä ja raskaalla ketjulla, vastaavasti; cat, klooriamfenikolitransferaasigeeni; bla, b-laktamaasigeeni; ori, replikaation aloitus. Kartta on piirretty suurin piirtein mittakaavassa.

Kuviossa 15 kuvataan binaaristen sekoitusvektorien nukleotidisekvenssit kahdessa kuviossa, 15A ja 15B. Vektorien konstruointi ja käyttö kuvataan esimerkissä 6. Kuviossa 15A esitetään keveän ketjun vektorin, pTCO1:n multippelin kloonauskohdan kaksijuosteinen nukleotidisekvenssi. Huippu- ja pohjanukleotidiemäsjuosteiden sekvenssit luetellaan vastaavasti SEKV. ID.NROssa 8 ja SEKV. ID.NROssa 9. Aminohappotähdesekvenssi, joka käsittää pelB-johdon, joka päättyy Sac I-restriktiokohtaan, luetellaan SEKV. ID.NROssa 10. Kuviossa 15B esitetään multippelin kloonauskohdan nukleotidisekvenssi raskaan ketjun vektorissa, pTACO1H. Huippu- ja pohjanukleotidiemäsjuosteiden sekvenssit luetellaan vastaavasti SEKV. ID.NROssa 11 ja SEKV. ID.NROssa 12. Aminohappotähdesekvenssi, joka käsittää pelB-johdon, joka päättyy Xho I-restrik-

tiokohtaan, luetellaan SEKV. ID.NROssa 13. Aminohappotähdesekvenssi, joka käsittää histidiinihännän, luetellaan SEKV. ID.NROssa 14. Relevantit restriktiokohdat on alleviivattu. tac-promoottori ja ribosomin sitoutumiskohta (rbs) ilmoitetaan laatikoilla.

Kuviossa 16 kuvataan kaikkien alkuperäisestä kirjastosta gp160 (IIIB):tä (b1 - b27), gp120 (IIIB):tä (B8 - B35), gp120 (SF2):ta (s4 - s8), ja silmukkapeptidiä (p35) "pannauksella" eristettyjen Fab-fragmenttien raskaiden ja keveiden ketjujen välisten ohjattujen risteymien täydellinen sarja määritettynä ELISA'lla IIIB gp120:ta vastaan esimerkissä 6 kuvatulla tavalla. Raskaat ketjut luetellaan vaakasuorasti ja keveät ketjut luetellaan pystysuorasti. Kloonit lajiteltiin esimerkissä 4 vakiintuneen ryhmittelyn mukaan. Eri ryhmät erotetaan vaakasuorilla ja pystysuorilla viivoilla. "-" erityisessä raskaan ketjun ja keveän ketjun leikkauspisteessä merkitsee selvää negatiivista (signaali, joka on taustaan verrattuna kolminkertainen tai pienempi) tuolle erityiselle risteymälle, "+" osoittaa selvän positiivisen, joka on verrattavissa alkuperäiseen raskaan ja keveän ketjun yhdistelmään, ja "w" merkitsee keskinkertaista arvoa ELISA'ssa. "●": HCp35/LCp35-yhdistelmä on negatiivinen gp120 (IIIB):tä käytettäessä, mutta positiivinen gp120 (IIIB):tä käytettäessä. Identtisissä ketjuissa on sama tunnistin (joko *, ¶, § tai ¥).

Kuviossa 17 kuvataan vasta-aine/antigeeni-vuorovaikutuksen affiniteetti b12-raskas ketju-risteymille keveiden ketjujen kanssa kaikista sekoituksista, jotka analysoitiin kompetitiivisella ELISA'lla käyttämällä liukoista IIIB gp120:tä kilpailevana antigeeninä esimerkissä 6 kuvatulla tavalla. Tiedot esitetään Y-akselilla maksimisitoutumis-%-osuutena X-akselilla esitettyjen liukoisen gp120 (IIIB):n kasvavien konsentraatioiden (10^{-12} M - 10^{-7} M) funktiona.

Kuviossa 18 kuvataan gp41:een sitoutuvien Fab'ien vaihtele-

vien raskaiden (V_H) domeenien aminohappotähdesekvenssit. Fab-klooninimet ilmoitetaan vasemmanpuoleisessa sarakkeessa. Raskaan ketjun sekvenssit viidelle Fab'ille, joita merkitään yksittäin DL 41 19, DO 41 11, GL 41 1, MT 41 12 ja SS 41 8, on annettu vastaavat SEKV. ID.NROt 142, 143, 144, 145 ja 146. Sekvensöidyt alueet oikealta vasemmalle ovat kehysalue 1 (FR1), komplementaarisuuden määrittävä alue 1 (CDR1), kehysalue 2 (FR2), komplementaarisuuden määrittävä alue 2 (CDR2), kehysalue 3 (FR3), komplementaarisuuden määrittävä alue 3 (CDR3) ja kehysalue 4 (FR4).

Kuviossa 19 kuvataan gp41:een sitoutuvien Fab'ien vaihtelevien keveiden (V_L) domeenien aminohappotähdesekvenssit. Katso kuviota 18 kuvion kuvausta varten. Keveän ketjun sekvenssit viidelle Fab'ille, joita merkitään yksittäin DL 41 19, DO 41 11, GL 41 1, MT 41 12 ja SS 41 8, on annettu vastaavat SEKV. ID.NROt 147, 148, 149, 150 ja 151.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

A. Määritelmiä

Aminohappotähde: Aminohappo, joka muodostuu polypeptidin kemiallisen sulatuksen (hydrolyysin) yhteydessä peptidisidoksistaan. Tässä kuvatut aminohappotähteet ovat edullisesti "L"-isomeerimuodossa. "D"-isomeerimuodossa olevat tähteet voivat kuitenkin korvata minkä hyvänsä L-aminohappotähteen sikäli kuin polypeptidissä säilyy haluttu funktionaalinen ominaisuus. NH_2 viittaa vapaaseen aminoryhmään, joka on läsnä polypeptidin aminoterminaalisessa päässä. COOH viittaa polypeptidin karboksiterminaalisessa päässä olevaan vapaaseen karboksiryhmään. Pitäytyen standardipolypeptidinomenklatuuriin (kuvattu julkaisussa J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) ja otettu käyttöön 37 CFR §1.822(b)(2):ssa), aminohappotähteiden lyhenteet esitetään seuraavassa vastaavuustaulukossa:

Vastaavuustaulukko

Symboli		Aminohappo
1-kirjaiminen	3-kirjaiminen	
Y	Tyr	tyrosiini
G	Gly	glysiini
F	Phe	fenyylialaniini
M	Met	metioniini
A	Ala	alaniini
S	Ser	seriini
I	Ile	isoleusiini
L	Leu	leusiini
T	Thr	treoniini
V	Val	valiini
P	Pro	proliini
K	Lys	lysiini
H	His	histidiini
Q	Gln	glutamiini
E	Glu	glutamiinihappo
Z	Glx	Glu ja/tai Gln
W	Trp	tryptofaani
R	Arg	arginiini
D	Asp	asparagiinihappo
N	Asn	asparagiini
B	Asx	Asn ja/tai Asp
C	Cys	kysteiini
X	Xaa	tuntematon tai muu

Olisi huomattava, että kaikilla tässä kaavoilla esitetyillä aminohappotähdesekvensseillä on vasemmalta oikealle -orientaatio tavanomaisessa suunnassa aminoterminaalisesta päästä karboksiterminaaliseen päähän. Lisäksi fraasi "aminohappotähde" määritellään laajalti sisältämään vastaavuustaulukossa luetellut aminohapot ja modifioidut ja epätavalliset aminohapot, kuten ne, jotka on lueteltu 37 CFR 1.822(b)(4):ssä, joka liitetään tähän viitteeksi. Lisäksi olisi huomattava, että pilkku aminohappotähdesekvenssin alussa tai lopussa ilmaisee peptidisidoksen yhden tai usean

aminohappotähteen muuhun sekvenssiin tai kovalenttisen sidoksen aminoterminaaliseen ryhmään kuten NH_2 tai asetyyli tai karboksiterminaaliseen ryhmään kuten COOH.

Yhdistelmä-DNA(rDNA)-molekyyli: DNA-molekyyli, joka on tuotettu liittämällä kaksi DNA-segmenttiä toimintakykyisesti. Siten yhdistelmä-DNA-molekyyli on hybridi-DNA-molekyyli, joka käsittää ainakin kaksi nukleotidisekvenssiä, joita ei normaalisti esiinny luonnossa yhdessä. rDNA'iden, joilla ei ole yhteistä biologista alkuperää, ts., jotka ovat kehitysopillisesti erilaisia, sanotaan olevan "heterologisia".

Vektori: rDNA-molekyyli, joka pystyy autonomiseen replikaatioon solussa ja johon DNA-segmentti, esimerkiksi geeni tai polynukleotidi, voi liittyä toimintakykyisesti aikaansaaden kiinnittyneen segmentin replikaation. Yhtä tai useaa polypeptidiä koodittavien geenien ekspressiota ohjaamaan pystyviä vektoreita kutsutaan tässä "ekspressiovektoreiksi". Erityisen tärkeät vektorit sallivat cDNA:n (komplementaarisen DNA:n) kloonauksen käänteistranskriptaasia käyttäen tuotetuista mRNA'ista.

Reseptori: Reseptori on molekyyli, kuten proteiini, glykoproteiini tai vastaava, joka voi sitoutua spesifisesti (eisattumanvaraisesti) toiseen molekyyliin.

Vasta-aine: Käsitettä vasta-aine erilaisissa kieliopillisissa muodoissaan käytetään tässä viittaamassa immunoglobuliinimolekyyleihin ja immunoglobuliinimolekyylien immunologisesti aktiivisiin osiin, ts., molekyyleihin, jotka sisältävät vasta-aineen tarttumiskohdan tai -paratoopin. Esimerkinomaisia vasta-ainemolekyylejä ovat ehjät immunoglobuliinimolekyylit, oleellisen ehjät immunoglobuliinimolekyylit ja immunoglobuliinimolekyyli osat, mukaan lukien osat, jotka tunnetaan alla nimillä Fab, Fab', $F(ab')_2$ ja F(v).

Vasta-aineen tarttumiskohta: Vasta-aineen tarttumiskohta on vasta-ainemolekyylin se rakenneosa, joka koostuu raskaan ja keveän ketjun vaihtelevista ja hypervaihtelevista alueista, jotka sitoutuvat (immunoreagoivat) spesifisesti antigeenin kanssa. Käsite immunoreagoida erilaisissa muodoissaan tarkoittaa antigeenisen determinantin sisältävän molekyylin ja vasta-aineen tarttumiskohdan sisältävän molekyylin kuten kokonaiseen vasta-ainemolekyylin tai sen osan välistä spesifistä sitoutumista.

Monoklonaalinen vasta-aine: Monoklonaalinen vasta-aine erilaisissa kieliopillisissa muodoissaan viittaa vasta-ainemolekyylien populaatioon, joka sisältää vain yhtä vasta-aineen tarttumiskohdan lajia, jola pystyy immunoreagoimaan erityisen epitoopin kanssa. Siten monoklonaalinen vasta-aine heijastaa tyypillisesti yhtä ainoaa sitoutumisaffiniteettia mitä hyvänsä epitooppia kohtaan, jonka kanssa se immunoreagoi. Monoklonaalinen vasta-aine voi sen vuoksi sisältää vasta-ainemolekyylin, jossa on lukuisia vasta-aineen tarttumiskohtia, jotka ovat kukin immunospesifisiä eri epitoopille, esimerkiksi kaksoisspesifiselle monoklonaaliselle vasta-aineelle. Vaikka monoklonaalista vasta-ainetta tuotettiin historiallisesti tekemällä klonaalisesti puhdasta immunoglobuliinia erittävää solulinjaa kuolemattomaksi, vasta-ainemolekyylien monoklonaalisesti puhdasta populaatiota voidaan valmistaa myös keksinnön mukaisilla menetelmillä.

Fuusiopolypeptidi: Polypeptidi, joka koostuu ainakin kahdesta polypeptidistä ja liitossekvenssistä kahden polypeptidin liittämiseksi toimintakykyisesti yhdeksi jatkuvaksi polypeptidiksi. Fuusiopolypeptidiksi liitetyt kaksi polypeptidiä on tyypillisesti johdettu kahdesta toisistaan riippumattomasta lähteestä, ja sen vuoksi fuusiopolypeptidi käsittää kaksi liitettyä polypeptidiä, jotka eivät normaalisti esiinny liitettyinä luonnossa.

Ylävirtaan: Suuntaan, joka on DNA-transkription suunnalle vastakkainen,, ja kulkee sen vuoksi 5′:sta 3′:uun ei-koodittavalla juosteella, tai 3′:sta 5′:uun mRNA:ssa.

Alavirtaan: Edelleen pitkin DNA-sekvenssiä suuntaan, joka on sekvenssin transkriptio- tai lukusuunnassa, joka kulkee 3′ - - 5′-suunnassa pitkin DNA:n ei-koodittavaa juostetta tai 5′ - 3′ -suunnassa pitkin RNA-transkriptiä.

Kistroni: DNA-molekyylissä oleva nukleotidisekvenssi, joka koodittaa aminohappotähdesekvenssiä ja sisältää ylävirran ja alavirran DNA-ekspressionkontrollielementit.

Johtopolypeptidi: Polypeptidin aminoterminaalisessa päässä oleva aminohapposekvenssin lyhyt pituus, joka kuljettaa tai ohjaa polypeptidin sisämembraanin läpi ja varmistaa siten sen lopulta tapahtuvan erittymisen solulimatilaan ja ehkä kauemmas. Johtosekvenssipeptidi poistetaan tavallisesti ennen kuin polypeptidi muuttuu aktiiviseksi.

Lukualue: Translaatiossa käytettyjen jatkuvien nukleotiditriplettien (kodonien) erityinen sekvenssi. Lukualue riippuu translaation aloituskodonin sijainnista.

B. Ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet

Keksintö koskee ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, jotka ovat ihmisen immuunikatovirukselle (HIV) spesifisiä, ja neutraloivat sitä. Keksinnön eräässä edullisessa suoritusmuodossa kuvataan ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, jotka voivat sitomaan HIV:n glykoproteiini gp120:ssa olevia epitoppipolypeptidisekvenssejä. Edelleen eräs edullinen suoritusmuoto ovat ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, jotka pystyvät sitomaan HIV:n glykoproteiini gp41:ssä olevia epitooppisia polypeptidisekvenssejä. Kuvataan myös vasta-aine, jolla on määritelty aminohapposekvenssi, joka sekvenssi antaa kyvyn sitoa spesifistä epitooppia ja neutraloida HIV:tä kun nämä vasta-aineet sitovat virusta. Ihmisen mono-

klonaalinen vasta-aine, jolla on vaadittu spesifisyys, ja vastaavat ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, joilla on vastaava spesifisyys, ovat käyttökelpoisia HIV:n aiheuttaman sairauden diagnosoinnissa ja immunoterapiassa.

Käsite "HIV:n aiheuttama sairaus" tarkoittaa mitä hyvänsä sairautta, jonka HIV aiheuttaa, suoraan tai epäsuorasti. Eräs esimerkki HIV:n aiheuttama sairaus immuunikato (AIDS), ja mikä hyvänsä lukuisista tiloista, jotka yleensä liittyvät AIDS'iin ja joita HIV-infektio aiheuttaa.

Siten keksintö kohdistuu yhdessä näkökannassa ihmisen monoklonaalisiin vasta-aineisiin, jotka ovat reaktiivisia HIV-neutralointikohdan kanssa, ja solulinjoja, jotka tuottavat sellaisia vasta-aineita. Keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita tuottavien solulinjojen eristys kuvataan hyvin yksityiskohtaisesti edempänä tässä, ja voidaan toteuttaa tässä kuvattuja fagemidivektorikirjastomenetelmiä käyttämällä, ja käyttämällä rutiininomaisia seulontatekniikkoja, jotka sallivat kiinnostuksen kohteena olevan monoklonaalisen vasta-aineen perusimmunoreaktio- ja neutralointimuodon määrityksen. Siten, jos testattava ihmisen monoklonaalinen vasta-aine sitoutuu HIV:hen ja neutraloi sitä samalla tavalla kuin keksinnön solulinjoilla tuotettu ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, niin testattua vasta-ainetta pidetään keksinnön mukaisen vasta-aineen kanssa ekvivalenttina.

On myös mahdollista määrittää ilman kohtuutonta kokeisen suorittamista, onko ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella sama (ts., ekvivalentti) spesifisyys kuin keksinnön mukaisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella ottamalla selville, estääkö ensiksi mainittu viimeksi mainittua sitoutumasta HIV:hen. Jos testattava ihmisen monoklonaalinen vasta-aine kilpailee keksinnön mukaisen ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa osoitettuna keksinnön mukaisen ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen sitoutumisen vähenemisenä kompetiivisessa vakiomäärityksessä sitoutumisesta kiinteällä

faasilla olevaan antigeeniin, esimerkiksi gp120:een, niin on todennäköistä, että nämä kaksi monoklonaalista vasta-ainetta sitoutuvat samaan tai lähisukuiseen epitooppiin.

Edelleen eräs muu tapa määrittää onko ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella keksinnön mukaisen ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen spesifisyys on esi-inkuboida keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta HIV:n kanssa, jonka kanssa se on normaalisti reaktiivista, ja lisätä sitten testattavaa ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta sen määrittämiseksi, estyykö testattavan ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen kyky sitoutoa HIV:tä. Jos testattava ihmisen monoklonaalinen vasta-aine estyy, niin kaikella todennäköisyydellä sillä on sama, tai funktionaalisesti ekvivalentti, epitooppispesifisyys kuin keksinnön mukaisella monoklonaalisella vasta-aineella. Keksinnön mukaisten ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden seulonta voidaan suorittaa myös käyttämällä HIV-neutralointimäärityksiä ja määrittämällä, neutraloiko monoklonaalinen vasta-aine HIV:tä.

Kyky neutraloida HIV:tä virusinfektion yhdessä tai useassa vaiheessa on keksinnön mukaisen ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen eräs haluttava laatu. Viruksen neutralointia voidaan mitata erilaisilla in vitro- ja in vivo-menetelmätavoilla. Esimerkinomaisia tässä neutralointikapasiteetin määritykseen kuvattuja menetelmiä ovat in vitro-määritykset, jotka mittaavat HIV:n aiheuttaman monitumaisten jättisolujen muodostuksen estoa, täplämääritykset ja määritykset, jotka mittaavat ydin-p24-antigeenin HIV:llä infektoituneessa solussa muodostumisen estoa.

Kuten tässä osoitetaan, keksinnön mukaisen, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen immunospesifisyyttä voidaan ohjata epitooppeihin, jotka ovat yhteisiä kautta HIV-serotyyppien ja/tai -kantojen, tai se voi olla spesifistä yhdelle ainoalle HIV-kannalle, epitoopista riippuen. Siten edullinen ihmisen monoklonaalinen vasta-aine voi immunoreagoida an HIV-1:n

ja/tai HIV-2:n kanssa, ja voi immunoreagoida yhden tai usean kanssa HIV-1-kannoista IIIB, MN, RF, SF-2, Z2, Z6, CDC4, ELI ja vastaavista kannoista.

Vasta-aineen immunospesifisyyden, sen HIV-neutralointikapasiteetilla, ja liittyvä affiniteetti, joka vasta-aineella on epitooppia kohtaan, määritellään epitoopilla, jonka kanssa vasta-aine immunoreagoi. Epitooppispesifisyyden määrää ainakin osaksi immunoglobuliinivasta-aineen raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssi, ja osaksi keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssi. Edulliset ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet immunoreagoivat glykoproteiini gp120:n CD4-sitoutumiskohdan kanssa.

Keksinnön eräällä edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin vaihtelevan alueen raskaan ketjun aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 78 tai 97, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

Keksinnön eräällä toisella edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, jolla monoklonaalisella vasta-aineella on immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssi, joka on SEKV. ID.NRO 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 110, 115, 118, 121, 122, 124 tai 132, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

Edelleen edulliset ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet immunoreagoivat glykoproteiini gp41:n CD4-sitomiskohdan kanssa. Keksinnön eräällä edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 142, 143, 144, 145 tai 146, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

Keksinnön eräällä toisella edullisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen gp41-sitomisspesifisyys, jolla monoklonaalisella vasta-aineella on immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssi, joka on SEQ ID NO 147, 148, 149, 150 tai 151, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

Kuten keksinnön opetuksilla ja kombinaatiokirjastonsekoitus- ja seulontamenetelmillä osoitetaan, voidaan tunnistaa uusia raskaan ja keveän ketjun pareja (H:L), jotka toimivat HIV:tä neutraloivana monoklonaalisena vasta-aineena. Erityisesti voidaan sekoittaa tunnettua raskasta ketjua, joka on johdettu HIV:tä neutraloivasta ihmisen monoklonaalisesta vasta-aineesta, keveiden ketjujen kirjaston kanssa uusien H:L-parien tunnistamiseksi, jotka muodostavat keksinnön mukaista funktionaalista vasta-ainetta. Samalla lailla voidaan sekoittaa tunnettua keveää ketjua, joka on johdettu HIV:tä neutraloivasta ihmisen monoklonaalisesta vasta-aineesta, raskaiden ketjujen kirjaston kanssa uusien H:L-parien tunnistamiseksi, jotka muodostavat keksinnön mukaista funktionaalista vasta-ainetta.

Erityisen edullisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita ovat ne, joilla on monoklonaalisen vasta-aineen gp120-immunoreaktio(sitoutumis)spesifisyys, jolla monoklonaalisella vasta-aineella on pareittain (H:L) immunoglobuliinin raskaan ja keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssit, jotka ovat SEKV. ID.NRO 66:95, 67:96, 72:102, 66:97, 73:107, 74:103, 70:101, 68:98, 75:104, 72:105, 78:110, 66:118, 66:122, 66:121, 66:115, 79:124, 79:132 tai 66:98, tai näiden konservatiivisia substituutioita. Kahden SEKV. ID.NRO'n merkintä kaksoispisteen kanssa, esimerkiksi, 66:95, merkitsee H:L-paria, jonka muodostavat raskas ja keveä ketju, SEKV. ID.NRO 66 ja SEKV. ID.NRO 95, vastaavasti.

Edelleen edullisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita ovat ne, joilla on monoklonaalisen vasta-aineen gp41-immu-

noreaktio(sitoutumis)spesifisyys, jonka monoklonaalisen vasta-aineen immunoglobuliinin raskaan ja keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssit ovat pareittain (H:L) SEKV. ID.NRO 142:147, 143:148, 144:149, 145:150 tai 146:151, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

Erityisen edullisia ovat ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, joilla on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, jota monoklonaalista vasta-ainetta tuottavat E. coli-mikro-organismit, jotka on talletettu kansainväliseen ATCC-talletuslaitokseen, ja jotka kuvataan tässä myöhemmin.

Erityisen edullisia ovat ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, joilla on monoklonaalisten vasta-aineiden sitomisspesifisyys, joita monoklonaalisia vasta-aineita tuottavat E. coli-mikro-organismit nineltään ATCC 69078, 69079 ja 69080. "Sitomisspesifisyyden omaamisella" tarkoitetaan ekvivalentteja monoklonaalisia vasta-aineita, joilla on samat tai samanlaiset immunoreaktio- ja neutralointiominaisuudet, ja jotka kilpaisevat sitoutumisesta HIV-antigeeniin. Edullisia ovat ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, joita tuottavat ATCC 69078, 69079 ja 69080.

Käsite "konservatiivinen variaatio" tässä käytettäessä tarkoittaa aminohappotähteen korvaamista toisella, biologisesti samanlaisella tähteellä. Esimerkkejä konservatiivisista variaatioista ovat mm. yhden hydrofobisen tähteen kuten isoleusiinin, valiinin, leusiinin tai metioniinin korvaaminen toisella, tai yhden polaarisen tähteen korvaaminen toisella, kuten lysiinin korvaaminen arginiinilla, asparagiinihapon korvaaminen glutamiinihapolla, ja vastaavat. Käsitteeseen "konservatiivinen variaatio" luetaan mukaan myös substituoidun aminohapon käyttö substituoimattoman emäaminohapon sijasta edellyttäen, että vasta-aineet, jossa on korvattu polypeptidi, neutraloivat myös HIV:tä. Analogisesti, keksinnön eräs toinen edullinen suoritusmuoto koskee polynukleotideja, jotka koodittavat edellä mainittuja raskaan ja/tai

keveän ketjun polypeptidejä, ja polynukleotidisekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia näille polynukleotidisekvenseille. Komplementaarisiin polynukleotidisekvensseihin luetaan ne sekvenssit, jotka hybridisoituvat keksinnön mukaisiin polynukleotidisekvensseihin ankarissa hybridisointiolosuhteissa.

Käyttämällä keksinnön mukaisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita on nyt mahdollista tuottaa anti-idiotyyppisiä vasta-aineita, joita voidaan käyttää seulomaan ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita tunnistamaan, onko vasta-aineella sama sitomisspesifisyys kuin keksinnön mukaisella ihmisen monoklonaalisella vasta-aineella, ja voita voidaan myös käyttää aktiiviseen immunisointiin (Herlyn et al., Science, 232:100 (1986)). Sellaisia anti-idiotyyppisiä vasta-aineita voidaan tuottaa hyvin tunnettuja hybridoomatekniikkoja käyttämällä (Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)). Anti-idiotyyppinen vasta-aine on vasta-aine, joka tunnistaa ainutlaatuiset determinantit, joita on läsnä ihmisen monoklonaalisessa vasta-aineessa, joka on tuotettu kiinnostuksen kohteena olevalla solulinjalla. Nämä determinantit sijaitsevat vasta-aineen hypervaihtelevalla alueella. Juuri tämä alue sitoutuu määrättyyn epitooppiin, ja on siten vastuussa vasta-aineen spesifisyydestä. Anti-idiotyyppistä vasta-ainetta voidaan valmistaa immunisoimalla eläintä kiinnostuksen kohteena olevalla monoklonaalisella vasta-aineella. Immunisoitu eläin tunnistaa immunisoivan vasta-aineen idiotyyppiset determinantit ja vastaa niihin, ja tuottaa näiden idiotyyppisten determinanttien vastaista vasta-ainetta. Käyttämällä immunisoidun eläimen anti-idiotyyppisiä vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä keksinnön mukaiselle ihmisen monoklonaaliselle vasta-aineelle, jota tuotettiin solulinjalla, jota käytettiin toisen eläimen immunisoimiseen, on nyt mahdollista tunnistaa muita klooneja, joilla on sama idiotyyppi kuin immunisointiin käytetyn hybridooman vasta-aineella. Kahden solulinjan ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden välinen idiotyyppinen identiteetti osoittaa, että nämä kaksi mono-

klonaalista vasta-ainetta ovat samat suhteessa saman epitooppideterminantin tunnistukseensa. Siten anti-idiotyyppisiä vasta-aineita käyttämällä on mahdollista tunnistaa muita hybridoomia, jotka ekspressoivat monoklonaalisia vasta-aineita, joilla on sama epitooppispesifisyys.

On myös mahdollista käyttää anti-idiotyyppiteknologiaa tuottamaan monoklonaalisia vasta-aineita, jotka matkivat epitooppia. Esimerkiksi anti-idiotyyppisellä monoklonaalisella vasta-aineella, joka on tehty ensimmäiseen monoklonaaliseen vasta-aineeseen, on hypervaihtelevalla alueella sitomisdomeeni, joka on ensimmäisen monoklonaalisen vasta-aineen sitoman epitoopin "kuva". Siten anti-idiotyyppistä monoklonaalista vasta-ainetta voidaan käyttää immunisointiin, koska anti-idiotyyppisen monoklonaalisen vasta-aineen sitomisdomeeni toimii tehokkaasti antigeeninä.

Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa keksintö ottaa lukuun katkaistun immunoglobuliinimolekyylin, joka käsittää Fab-fragmentin, joka on johdettu keksinnön mukaisesta ihmisen monoklonaalisesta vasta-aineesta. Fab-fragmentti, josta puuttuu Fc-reseptori, on liukoista, ja antaa terapeuttisia etuja seerumin puoliintumisajassa, ja diagnostisia etuja liukoisen Fab-fragmentin käyttötavoissa. Liukoisen Fab-fragmentin valmistus on yleensä tunnettua immunologian alalla, ja voidaan suorittaa erilaisilla menetelmillä. Tässä kuvataan eräs edullinen menetelmä liukoisen Fab-fragmentin tuottamiseksi.

C. Immunoterapeuttiset menetelmät ja koostumukset

Ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita voidaan myös käyttää immunoterapeuttisesti HIV-sairauteen. Käsite "immunoterapeuttisesti" tai "immunoterapia" tässä keksinnön mukaisten monoklonaalisten vasta-aineiden yhteydessä käytettäessä merkitsee sekä ennaltaesto- että terapeuttista antoa. Siten monoklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää riskialttiilla potilailla HIV:n aiheuttaman sairauden todennäköisyyden

ja/tai vakavuuden pienentämiseksi, annettuna potilaille, joilla jo on todisteita aktiivisesta HIV-infektiosta, tai annettuna potilaille, jotka ovat HIV-infektiovaarassa.

1. Terapeuttiset koostumukset

Sen vuoksi keksintö ottaa lukuun terapeuttiset koostumukset, jotka ovat käyttökelpoisia tässä kuvattujen terapeuttisten menetelmien toteuttamiseen. Keksinnön mukaiset terapeuttiset koostumukset sisältävät fysiologisesti siedettävää väliainetta yhdessä tässä kuvatun, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen ainakin yhden lajin kanssa, liuotettuna tai dispergoituna siihen aktiivisena valmistusaineena. Eräässä edullisessa suoritusmuodossa terapeuttinen koostumus ei ole immunogeenistä annettaessa ihmispotilaalle terapeuttisiin tarkoituksiin, ellei tuo tarkoitus ole immuunivasteen aiheuttaminen, kuten tässä kuvataan muualla.

Tässä käytettäessä, käsitteitä "farmaseuttisesti hyväksyttävä", "fysiologisesti siedettävä" ja näiden kieliopillisia variaatioita, niiden viitatessa koostumuksiin, väliaineisiin, laimennusaineisiin ja reagensseihin, käytetään keskenään vaihdettavasti, ja ne edustavat sitä, että materiaaleja voidaan antaa ihmiselle tuottamatta ei-toivottavia fysiologisia vaikutuksia kuten pahoinvointia, huimausta, mahahäiriötä ja vastaavia.

Liuotettuja tai dispergoituja aktiivisia valmistusaineita sisältävän farmakologisen koostumuksen valmistus on alalla hyvin ymmärrettyä. Tyypillisesti sellaiset koostumukset valmistetaan steriileiksi injisoitaviksi valmisteiksi joko nesteliuoksiksi tai -suspensioiksi, vesipohjaisiksi tai vedettömiksi, voidaan kuitenkin valmistaa myös kiinteitä muotoja, jotka soveltuvat liuotettavaksi tai suspendoitavaksi nesteeseen ennen käyttöä. Valmiste voidaan myös emulgoida.

Aktiivinen valmistusaine voidaan sekoittaa täyteaineiden kanssa, jotka ovat farmaseuttisesti hyväksyttäviä ja yhteensopivia aktiivisen valmistusaineen kanssa ja määrinä, jotka soveltuvat tässä kuvatuissa terapeuttisissa menetelmissä käyttöön. Sopivia täyteaineita ovat esimerkiksi vesi, suolaliuos, dekstroosi, glyseroli, etanoli ja/tai vastaavat. Lisäksi koostumus voi haluttaessa sisältää vähäisemmät määrät apuaineita kuten kostutus- tai emulgoimisaineet, puskuroimisaineita ja vastaavia, jotka lisäävät aktiivisen valmistusaineen tehokkuutta.

Keksinnön mukainen terapeuttinen koostumus voi sisältää tässä mainittujen komponenttien farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja. Farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja ovat mm. happoadditiosuolat (jotka on muodostettu polypeptidin vapaiden aminoryhmien kanssa), jotka muodostetaan epäorgaanisten happojen kuten esimerkiksi suola- tai fosforihapon kanssa, tai sellaisten orgaanisten happojen kuten etikka-, viini-, manteli- ja vastaavat hapot. Vapaiden karboksyyliryhmien kanssa muodostettuja suoloja voidaan johtaa myös epäorgaanisista emäksistä, kuten esimerkiksi natrium-, kalium-, ammonium-, kalsium- tai rauta(III)hydroksidi, ja sellaisista orgaanisista emäksistä kuten isopropyyliamiini, trimetyyliamiini, 2-etyyliaminoetanoli, histidiini, prokaiini ja vastaavat.

Fysiologisesti siedettävät väliaineet ovat tekniikan alalla hyvin tunnettuja. Esimerkinomaisia nestemäisiä väliaineita ovat steriilit vesiliuokset, jotka eivät sisällä aktiivisten valmistusaineiden ja veden lisäksi materiaaleja, tai sisältävät puskuria kuten natriumfosfaatti fysiologisessa pH-arvossa ja/tai fysiologista suolaliuosta, kuten fosfaattipuskuroitua suolaliuos. Yhä edelleen vesipohjaiset väliaineet voivat sisältää useampaa kuin yhtä puskurisuolaa, samoin kuin suoloja kuten natrium- ja kaliumkloridi, dekstroosi, propyleeniglykoli, polyetyleeniglykoli ja muut liuenneet aineet.

Nestemäiset koostumukset voivat myös sisältää nestefaaseja veden lisäksi tai pois jättämiseksi. Esimerkinomaisia sellaisia lisänestefaaseja ovat glyseroli, kasvisöljyt kuten puuvillansiemenöljy, orgaaniset esterit kuten etyylioleaatti, ja vesi/öljy-emulsiot.

Terapeuttinen koostumus sisältää keksinnön mukaista, HIV:tä neutraloivaa ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta, tyypillisesti määrän ainakin 0,1 paino-% vasta-ainetta koko terapeuttisen koostumuksen painosta. Paino-% on vasta-aineen painosuhde koko koostumukseen verrattuna. Siten esimerkiksi, 0,1 paino-% on 0,1 g vasta-ainetta/100 g koko koostumusta.

2. Terapeuttiset menetelmät

Keksinnön mukaisten ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden osoitetun HIV-neutralointikyvyn valossa tämä kuvaus aikaansaa menetelmän HIV:n neutraloimiseksi in vitro tai in vivo. Menetelmässä näyte, jonka uskotaan sisältävän HIV:tä, saatetaan kontaktiin koostumuksen kanssa, joka sisältää terapeuttisesti tehokkaan määrän keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta.

In vivo-modaliteettejä varten menetelmässä annetaan potilaalle terapeuttisesti tehokas määrä fysiologisesti siedettävää koostumusta, joka sisältää keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta. Siten keksinnössä kuvataan yhdessä suoritusmuodossa menetelmä passiivisen immunoterapian aikaansaamiseksi HIV-sairaudelle ihmisellä, jossa menetelmässä ihmiselle annetaan immunoterapeuttisesti tehokas määrä keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta.

Eräs edustava potilas keksinnön mukaisten passiivisten immunoterapeuttisten menetelmien harjoittamiseksi on kuka hyvänsä ihminen, jolla on HIV:n aiheuttaman sairauden oireita, mukaan lukien AIDS:in tai siihen liittyvien tilojen, joita HIV-infektion uskotaan aiheuttavan, ja ihmiset, jotka ovat HIV-infektiovaarassa. HIV-infektiovaarassa olevia potilaita

ovat mm. HIV-infektion omaavien raskaana olevien äitien vauvat, HIV:tä sisältävät tiedettyjen verensiirtojen saajat, HIV:n kontaminoimien neulojen käyttäjät, yksilöt, jotka ovat osallistuneet suuririskisiin seksuaalisiin aktiviteetteihin tunnetusti HIV-infektion omaavien yksilöiden kanssa, ja vastaavat riskitilanteet.

Yhdessä suoritusmuodossa passiivisessa immunisointimenetelmässä annetaan koostumusta, joka sisältää useampaa kuin yhtä keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen lajia, joka on edullisesti suunnattu ei-kilpailevia epitooppeja vastaan tai on suunnattu erillisiä HIV-serotyyppejä tai -kantoja vastaan passiivisen immunoterapian lisääntyneen tehokkuuden aikaansaamiseksi.

Ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen terapeuttisesti (immunoterapeuttisesti) tehokas määrä on ennaltamäärätty määrä, jonka lasketaan saavuttaan halutun vaikutuksen, ts., neutraloivan näytteessä tai potilaassa läsnä olevan HIV:n, ja täten vähentävän havaittavissa olevan HIV:n määrää näytteessä tai potilaassa. In vivo-terapioiden tapauksessa tehokas määrä voidaan mitata potilaalla esiintyvään HIV:n aiheuttamaan sairauteen liittyvien yhden tai usean oireen paranemisella, tai HIV-antigeenien serologisilla vähenemisinä.

Siten annostelualueet keksinnön mukaisten monoklonaalisten vasta-aineiden antoon ovat sellaisia, jotka ovat riittävän suuria tuottamaan halutun vaikutuksen, jossa HIV-sairauden oireet paranevat tai infektion todennäköisyys pienenee. Annos ei saisi olla niin suuri, että se aiheuttaa haitallisia sivuvaikutuksia, kuten hyperviskositeettioireita, keuhkopöhöä, verentungosta aiheuttavaa sydämen vajaatoimintaa ja vastaavia. Yleensä annostelu vaihtelee iän, tilan, sukupuolen ja sairauden potilaassa etenemisen mukaan ja ammattimies osaa sen määrittää.

Yksittäinen lääkäri voi säätää annostelua minkä hyvänsä komplikaation sattuessa.

Keksinnön mukaisen vasta-aineen terapeuttisesti tehokas määrä on tyypillisesti sellainen vasta-ainemäärä, että se fysiologisesti siedettävässä koostumuksessa annettaessa on riittävä plasmakonsentraation noin 0,1 - 100 µg/ml, edullisesti noin 1 - 5 µg/ml, ja tavallisesti noin 5 µg/ml saavuttamiseksi. Ts. annostelu voi vaihdella tasolla noin 0,1 - 300 mg/kg, edullisesti noin 0,2 - 200 mg/kg, edullisimmin noin 0,5 - 20 mg/kg, yhdessä tai useassa annoksessa annettuna päivittäin, yhden tai useiden päivien ajan.

Keksinnön mukaisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita voidaan antaa parenteraalisesti injektiolla tai vähitellen tapahtuvana infuusiona ajan mittaan. Vaikka HIV-infektio on tyypillisesti systeemistä ja on sen vuoksi useimmiten käsiteltävä terapeuttisten koostumusten laskimonsisäisellä annolla, otetaan lukuun muut kudokset ja vapautustavat, kun on todennäköisyyttä, että kohteena oleva kudos sisältää infektoivaa HIV:tä. Siten keksinnön mukaisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita voidaan antaa laskimonsisäisesti, vatsaontelonsisäisesti, lihaksensisäisesti, ihonalaisesti, ontelonsisäisesti, transdermaalisesti, ja voidaan vapauttaa peristalttisesti.

Terapeuttinen koostumukset, jotka sisältävät keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta, annetaan tavanomaisesti laskimonsisäisesti, kuten esimerkiksi annosyksikön annolla. Käsite "annosyksikkö" keksinnön mukaisen terapeuttisen koostumuksen yhteydessä käytettäessä viittaa fysikaalisesti erillisiin yksikköihin, jotka soveltuvat yksikköannosteluun kohteelle, kunkin yksikön sisältäessä ennaltamäärätyn määtän aktiivista materiaalia, jonka on laskettu tuottavan halutun terapeuttisen vaikutuksen vaaditun laimennusaineen; ts. väliaineen tai vehikkelin yhteydessä.

Koostumukset annetaan tavalla, joka on annosformulaation kanssa yhteensopiva, ja terapeuttisesti tehokkaan määrän. Annettava määrä riippuu hoidettavasta kohteesta, kohteen järjestelmän kapasiteetista hyödyntää aktiivista valmistusainetta, ja halutun terapeuttisen vaikutuksen tasosta. Aktiivisen valmistusaineen täsmälliset määrät, joita vaaditaan annettavaksi, riippuvat hoitavan lääkärin harkinnasta ja ovat kullekin yksilölle ominaiset. Tässä kuvataan kuitenkin systeemiseen antoon sopivia annostelualueita, ja ne riippuvat antoreitistä. Sopivat anto-ohjeet ovat myös vaihtelevia, mutta tyypillistä on alkuanto, jota seuraavat toistuvat annokset yhden tai usean tunnin välein seuraavalla injektiolla tai muulla annolla. Vaihtoehtoisesti otetaan lukuun jatkuva laskimonsisäinen infuusio, joka on riittävä konsentraatioiden ylläpitämiseksi veressä tasoilla, jotka on määritelty in vivo-terapioille.

Monoklonaalisen vasta-aineen tehokkaiden määrien annon avuksi diagnostinen menetelmä monoklonaalisen vasta-aineen havaitsemiseksi kohteen veressä on käyttökelpoinen annetun terapeuttisen koostumuksen kohtalon karakterisoimiseksi.

Keksintö koskee myös tapaa valmistaa lääkettä tai farmaseuttista koostumusta, joka sisältää keksinnön mukaisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita, jota lääkettä käytetään HIV-sairauden immunoterapiaan.

D. Diagnostiset määritysmenetelmät

Keksintö ottaa lukuun erilaisia määritysmenetelmiä HIV:n läsnäolon ja edullisesti määrän määrittämiseksi näytteestä kuten biologisesta neste- tai kudosnäytteestä käyttämällä keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta immunokemiallisena reagenssina muodostamaan immunoreaktiotuotetta, jonka määrä on suhteessa, joko suoraan tai epäsuorasti, näytteessä olevaan HIV-määrään.

Ammattimiehet ymmärtävät, että on lukuisia hyvin tunnettuja kliinisiä diagnostisen kemian menettelytapoja, joissa keksinnön mukaista immunokemiallista reagenssia voidaan käyttää muodostamaan immunoreaktiotuotetta, jonka määrä on suhteessa kehonäytteessä läsnä olevan HIV:n määrään. Siten, vaikka tässä kuvataan esimerkinomaisia määritysmenetelmiä, keksintö ei ole niin rajoittunut.

Keksinnön mukaisen määritysmenetelmän suorituksessa voidaan käyttää erilaisia heterogeenisiä ja homogeenisiä protokolleja, joko kompetitiivisia tai ei-kompetitiivisia. Esimerkkejä immunomäärityksen tyypeistä, joissa voidaan käyttää keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita, ovat kompetitiiviset ja ei-kompetitiiviset immunomääritykset joko suorassa tai epäsuorassa muodossa. Esimerkkejä sellaisista immunomäärityksistä ovat radioimmunomääritys (RIA) ja kerrostus(sandwich)määritys (immunometrinen). Antigeenien osoittaminen keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita käyttämällä voidaan suorittaa käyttämällä immunomäärityksiä, jotka ajetaan joko eteenpäin, taaksepäin tai samanaikaisesti tapahtuvalla tavalla, mukaan lukien immunohistokemiallisia määrityksiä fysiologisilla näytteillä. Ammattimiehet tuntevat, tai voivat helposti huomata, muita immunomääritysmuotoja ilman kohtuutonta kokeidensuoritusta.

Keksinnön mukaisia monoklonaalisia vasta-aineita voidaan sitoa useille erilaisille kantajille ja käyttää HIV:n läsnäolon osoittamiseen. Esimerkkejä hyvin tunnetuista kantajista ovat mm. lasi, polystyreeni, polypropyleeni, polyetyleeni, dekstraani, nylon, amylaasit, luonnon- ja modifioidut selluloosat, polyakryyliamidit, agaroosit ja magnetiitti. Kantaja voi olla keksinnön tarkoituksiin luonteeltaan joko liukoista tai liukenematonta. Ammattimiehet tuntevat muita sopivia kantajia monoklonaalisten vasta-aineiden sitomiseen, tai voivat huomata sellaisia rutiininomaista kokeidensuoritusta käyttäen.

On olemassa useita erilaisia ammattimiesten tuntemia leimoja ja leimausmenetelmiä. Esimerkkejä leimojen tyypeistä, joita keksinnössä voidaan käyttää, ovat mm. entsyymit, radioisotoopit, fluoresoivat yhdisteet, kolloidiset metallit, kemiluminenssiyhdisteet ja bioluminenssiyhdisteet. Ammattimiehet tuntevat muita sopivia keksinnön mukaisiin monoklonaalisiin vasta-aineisiin sidottavia leimoja, tai voivat huomata sellaisia rutiininomaista kokeidensuoritusta käyttäen. Lisäksi näidenleimojen sitominen keksinnön mukaisiin monoklonaalisiin vasta-aineisiin voidaan suorittaa ammattimiehille tutuilla standarditekniikoilla.

Keksinnön tarkoituksiin HIV voidaan osoittaa keksinnön mukaisilla monoklonaalisilla vasta-aineilla, kun niitä on läsnä biologisten nesteiden ja kudosten näytteissä. Voidaan käyttää mitä hyvänsä näytettä, joka sisältää osoitettavissa olevan määrän HIV:tä. Näyte voi olla nestettä, kuten virtsa, sylki, aivo-selkäydinnestettä, verta, seerumia ja vastaavia, tai kiinteää tai puolikiinteää, kuten kudoksia, ulosteita ja vastaavia, tai vaihtoehtoisesti kiinteää kudosta, kuten niitä, joita usein käytetään kudosopilliseen diagnoosiin.

Eräs toinen leimaustekniikka, joka voi antaa tulokseksi suuremman herkkyyden, koostuu vasta-aineiden liittämisestä pienimolekyylimassaisiin hapteeneihin. Nämä hapteenit voidaan sitten osoittaa spesifisesti toisen reaktion avulla. Esimerkiksi, on tavallista käyttää hapteeneja kuten biotiini, joka reagoi avidiinin kanssa, tai dinitrofenolia, pyridoksaalia tai fluoreseiinia, jotka voivat reagoida spesifisten anti-hapteeni-vasta-aineiden kanssa.

Keksinnön mukaiset monoklonaaliset vasta-aineet soveltuvat käyttöön in vitro, esimerkiksi immunomäärityksissä, joissa niitä voidaan käyttää nestefaasissa tai sidottuna kiinteää faasia olevaan kantajaan HIV:n osoittamiseksi näytteistä, kuten edellä kuvataan. Monoklonaaliset vasta-aineet voidaan leimata näissä immunomäärityksissä osoitetavasti erilaisilla

tavoilla in vitro -käyttöä varten.

Keksinnön mukaisten ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden käytössä antigeenin osoitukseen in vivo, osoitettavasti leimattua ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta annetaan annos, joka on diagnostisesti tehokas. Käsite "diagnostisesti tehokas" tarkoittaa, että osoitettavasti leimatun, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen määrää annetaan riittävä määrä mahdollistamaan kohdan paljastuksen, jossa on HIV-antigeeni, jolle monoklonaaliset vasta-aineet ovat spesifisiä.

Annetun, osoitettavasti leimatun, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen konsentraation pitäisi olla riittävä niin, että HIV:n sitoutuminen on osoitettavissa verrattuna taustaan. Lisäksi on toivottavaa, että osoitettavasti leimattu monoklonaalinen vasta-aine poistuu nopeasti verenkierrosta, jotta saataisiin paras kohde/tausta -signaalisuhde.

Sääntönä osoitettavasti leimatun, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen annostelu in vivo -diagnoosiin vaihtelee riippuen sellaisista tekijöistä kuten yksilön ikä, sukupuoli ja sairauden laajuus. Ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen annostelu voi vaihdella välillä noin 0,01 - 500 mg/m^2, edullisesti 0,1 - noin 200 mg/m^2, edullisimmin noin 0,1 - 10 mg/m^2. Sellaiset annostelut voivat vaihdella riippuen esimerkiksi siitä, annetaanko useita injektioita, kudoksesta, ja muista ammattimiesten tuntemista tekijöistä.

In vivo -diagnostiseen kuvaukseen, käytettävissä olevan osoituslaitteen tyyppi on eräs tärkeä tekijä määrätyn radioisotoopin valinnassa. Valitulla radioisotoopilla on oltava vaimentumistyyppi, joka on osoitettavissa määrätyn tyyppisellä instrumentilla. Edelleen toinen tärkeä tekijä radioisotoopin valinnassa in vivo-diagnoosiin on, että radioisotoopin puoliintumisaika on riittävän pitkä niin, että se on edelleen osoitettavissa maksimisisäänoton ajanhetkellä

kohteessa, mutta riittävän lyhyt niin, että minimoidaan haitallinen säteilyt isännälle. Ihanteellisesti in vivo -kuvaukseen käytetyltä radioisotoopilta puuttuu partikkeliemissio, mutta tuottaa alueella 140 - 250-keV suuren lukumäärän fotoneja, jotka voidaan helposti osoittaa tavanomaisilla gammasädekameroilla.

In vivo -diagnoosiin, radioisotoopit voidaan sitoa immunoglobuliiniin joko suoraan tai epäsuorasti välissä olevaa funktionaalista ryhmää käyttämällä. Funktionaalisia väliryhmiä, joita usein käytetään metalli-ioneina esiintyvien radioisotooppien sitomiseen immunoglobuliineihin, ovat bifunktionaalisewt kelatointiaineet, kuten dietyleenitriamiinipentaetikkahappo (DTPA) ja etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA) ja vastaavat molekyylit. Tyypillisiä esimerkkejä metalli-ioneista, joita voidaan sitoa keksinnön mukaisiin monoklonaalisiin vasta-aineisiin, ovat ^{111}In, ^{97}Ru, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{89}Zr ja ^{201}Tl.

Keksinnön mukaiset monoklonaaliset vasta-aineet voidaan myös leimata paramagneettisella isotoopilla in vivo -diagnoositarkoituksiin, kuten magneettiresonanssikuvaus (MRI) tai elektronispinresonanssiin (ESR). Visualisoivaan diagnostiseen kuvaukseen voidaan yleensä käyttää mitä hyvänsä tavanomaista menetelmää. Tavallisesti gammasäteitä ja positronia emittoivia radioisotooppeja käytetään kamerakuvaukseen, ja paramagneettisia isotooppeja MRI:hin. Alkuaineita, jotka ovat erityisen käyttökelpoisia sellaisissa tekniikoissa, ovat mm. ^{157}Gd, ^{55}Mn, ^{162}Dy, ^{52}Cr ja ^{56}Fe.

Keksinnön mukaisia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää in vitro ja in vivo seuraamaan HIV-sairausterapian edistystä. Siten esimerkiksi mittaamalla HIV:llä infektoitujen solujen lukumäärän kasvun tai pienenemisen tai kehossa tai erilaisissa kehonesteissä läsnä olevan HIV:n konsentraation muutoksia olisi nahdollista määrittää, onko erityinen HIV-sairauden parantamiseen tarkoitettu terapeut-

tinen hoito-ohje tehokas.

E. Diagnostiset järjestelmät

Keksinnössä kuvataan myös diagnostinen järjestelmä, edullisesti reagenssipakkausmuodossa oleva, HIV:n läsnäolon määrittämiseksi näytteessä tässä kuvattujen diagnostisten menetelmien mukaan. Eräs diagnostinen järjestelmä sisältää, riittävänä määränä ainakin yhden määrityksen suorittamiseksi, kohteena olevaa ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta, erikseen pakattuna reagenssina.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa, otetaan lukuun diagnostinen järjestelmä anti-HIV-monoklonaalisen vasta-aineen läsnäolon määrittämiseksi kehonestenäytteessä, kuten terapeuttisesti annetun vasta-aineen kohtalon tarkkailemiseksi. Järjestelmä sisältää, riittävänä määränä ainakin yhteen määritykseen, kohteena olevaa vasta-ainetta kontrollireagenssina, ja edullisesti ennalta valitun määrän HIV-antigeeniä, kumpaakin erikseen pakattuina immunokemiallisina reagensseina.

Tyypillisesti sisältyvät myös ohjeet pakatun reagenssin käyttämiseksi.

"Ohjeet käyttöä varten" sisältää tyypillisesti konkreettisen ilmauksen, jossa kuvataan reagenssikonsentraatio tai ainakin yksi määritysmenetelmän parametri, kuten sekoitettavat reagenssin ja näytteen sekoitettavat määrät, ylläpitoajanjaksot reagenssi/näyte -seoksia varten, lämpötila-, puskuriolosuhteet ja vastaavat.

Suoritusmuodoissa HIV:n osoittamiseksi kehonesteessä keksinnön mukainen diagnostinen järjestelmä voi sisältää leimaa tai osoitusvälinettä, joka voi antaa merkin keksinnön mukaista, ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta sisältävän immunokompleksin muodostumisesta.

Sana "kompleksi" tässä käytettäessä viittaa spesifisen si-

toutumisreaktion kuten vasta-aine/antigeeni-reaktion tuotteeseen. Esimerkinomaisia komplekseja ovat immunoreaktiotuotteet.

Tässä käytettäessä käsitteet "leima" ja "osoitusväline" eri kieliopillisissa muodoissaan viittaavat yksittäisiin atomeihin ja molekyyleihin, jotka osallistuvat joko suoraan tai epäsuorasti osoitettavissa olevan signaalin tuottamiseen kompleksin läsnäolon osoittamiseksi. Mikä hyvänsä leima tai osoitusväline voidaan liittää tai sisällyttää ekspressoituun proteiiniin, polypeptidiin tai vasta-ainemolekyyliin, joka on osa keksinnön mukaista vasta-aine- tai monoklonaalisen vasta-aineen koostumusta, tai käyttää erikseen, ja noita atomeja tai molekyylejä voidaan käyttää yksinään tai yhdistelmänä muiden reagenssien kanssa. Sellaiset leimat ovat itse hyvin tunnettuja kliinisessä diagnostisessa kemiassa ja käsittävät keksinnön osan vain mikäli niitä käytetään muuten uusien proteiinien, menetelmien ja/tai järjestelmien kanssa.

Leimausväline voi olla fluoresoiva leimausaine, joka sitoutuu vasta-aineisiin tai antigeeneihin kemiallisesti denaturoimatta niitä fluorokromin (värin) muodostamiseksi, joka on käyttökelpoista immunofluoresoivaa merkkiainetta. Sopivia fluoresoivia leimausaineita ovat fluorokromit kuten fluoreseiini-isosyanaatti (FIC), fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC), 5-dimetyyliamiini-1-naftaleenisulfonyylikloridi (DANSC), tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti (TRITC), lissamiini, rodamiini 8200-sulfonyylikloridi (RB 200 SC) ja vastaavat. Kuvaus immunofluoresenssianalyysitekniikoista esitetään kappaleessa DeLuca, "Immunofluorescence Analysis", teoksessa Antibody As a Tool, Marchalonis et al., toimittaja, John Wiley & Sons, Ltd., s. 189-231 (1982), joka liitetään tähän viitteeksi.

Edullisissa suoritusmuodoissa ilmaiseva ryhmä on entsyymi, kuten piparjuuriperoksidaasi (HRP), glukoosioksidaasi tai vastaava. Sellaisissa tapauksissa, joissa pääasiallinen

osoitusryhmä on entsyymi kuten HRP tai glukoosioksidaasi, vaaditaan muita reagensseja visualisoimaan sen tosiseikan, että on muodostunut reseptori/ligandi-kompleksi (immunoreaktantti). Sellaisia lisäreagensseja HRP:tä varten ovat mm. vetyperoksidi ja hapetusväriprekursori kuten diaminobentsidiini. Eräs muu reagenssi, joka on käyttökelpoinen glukoosioksidaasin kanssa, on 2,2'-amino-di-[3-etyylibentstiatsoliini-G-sulfonihappo) (ABTS).

Radioaktiiviset alkuaineet ovat myös käyttökelpoisia leimausaineita, ja niitä käytetään tässä valaisevasti. Eräs esimerkinomainen radioleimausaine on radioaktiivista alkuainetta, joka tuottaa gammasäde-emissioita. Alkuaineet, jotka itse emittoivat gammasäteitä, kuten ^{124}I, ^{125}I, ^{128}I, ^{132}I ja ^{51}Cr, edustavat yhtä gammasäde-emissiota tuottavan radioaktiivisen alkuaineen ilmaiseviewn ryhmien luokkaa. Erityisen edullista on ^{125}I. Eräs toinen käyttökelpoisten leimausvälineiden ryhmä ovat ne alkuaineet, kuten ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O ja ^{13}N, jotka itse emittoivat positroneja. Näin emittoidut positronit tuottavat gammasäteitä kohdatessaan eläimen kehossa läsnä olevia elektroneja. Myös käyttökelpoista on β-säteilijä, kuten ^{3}H:n ^{111} indiumia.

Leimojen liittäminen, ts., polypeptidien ja proteiinien leimaus on tekniikan alalla hyvin tunnettua. Esimerkiksi vasta-ainemolekyylit, joita tuottaa hybridooma, voidaan leimata sisällyttämällä metabolisesti radioisotooppia sisältäviä aminohappoja, jotka järjestetään kasvatusväliaineen komponenttina. Katso esimerkiksi, Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981). Proteiinikonjugointi- tai -liitostekniikat aktivoituja funktionaalisia ryhmiä käyttäen ovat erityisen käyttökelpoisia. Katso esimerkiksi Aurameas et al., Scand. J. Immunol., vol. 8 suppl. 7:7-23 (1978); Rodwell et al., Biotech., 3:889-894 (1984), ja US-patenttijulkaisua 4,493,795.

Diagnostiset järjestelmät voivat sisältää myös, edullisesti erillisenä pakkauksena, spesifistä sitomisainetta. "Spesifinen sitomisaine" on molekyylikokonaisuutta, joka pystyy selektiivisesti sitomaan keksinnön mukaista reagenssilajia tai kompleksia, joka sisältää sellaista lajia, mutta se ei itse ole keksinnön mukaista polypeptidi- tai vasta-ainemolekyylikoostumusta. Esimerkinomaisia sitomisaineita ovat toiset vasta-ainemolekyylit, komplementtiproteiinit tai niiden fragmentit, S. aureus-proteiini A, ja vastaavat. Edullisesti spesifinen sitomisaine sitoo reagenssilajin kun tuota lajia on läsnä kompleksin osana.

Edullisissa suoritusmuodoissa spesifinen sitomisaine on leimattua. Kuitenkin kun diagnostinen järjestelmä sisältää spesifistä sitomisainetta, joka ei ole leimattua, ainetta käytetään tyypillisesti vahvistusvälineenä tai -reagenssina. Leimattu spesifinen sitomisaine pystyy näissä suoritusmuodoissa sitomaan vahvistusvälineen spesifisesti kun vahvistusväline on sitoutunut reagenssilajia sisältävään kompleksiin.

Keksinnön mukaisia diagnostisia reagenssipakkauksia voidaan käyttää "ELISA"-muodossa havaitsemaan keksinnön mukaisen APC-inhiitbitorin määrän verisuoninestemäytteessä kuten veri, seerumi tai plasma. "ELISA" viittaa entsyymiliitettyyn immunosorbenttimääritykseen, jossa käytetään vasta-ainetta tai antigeeniä, joka on sidottu kiinteään faasiin, ja entsyymi/antigeeni- tai entsyymi/vasta-aine-konjugaattia näytteessä läsnä olevan antigeenin havaitsemiseksi ja kvantisoimiseksi. Eräs kuvaus ELISA-tekniikoista esitetään luvussa 22 teoksessa 4th Edition of Basic and Clinical Immunology, kirjoittaja D.P. Sites et al., julkaisija Lange Medical Publications of Los Altos, CA vuodelta 1982, ja US-patenttijulkaisuissa 3,654,090; 3,850,752; ja 4,016,043, jotka kaikki liitetään tähän viitteeksi.

Siten joissakin suoritusmuodoissa keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta voidaan kiinnittää kiinteään matriisiin muodostamaan kiinteää kantajaa, joka käsittää pakkauksen kohteena oleviussa diagnostisissa järjestelmissä.

Reagenssi kiinnitetään kiinteään matriisiin tyypillisesti adsorptiolla vesipohjaisesta väliaineesta, vaikka voidaan käyttää muita ammattimiesten hyvin tuntemia kiinnitystapoja, jotka ovat sovellettavissa proteiineille ja polypeptideille.

Myös käyttökelpoiset kiinteät matriisit ovat hyvin tunnettuja tekniikan alalla. Sellaiset materiaalit ovat veteenliukenemattomia, ja mukaan luetaan mm. verkkoutettu dekstraani, jota on saatavissa tavaramerkillä SEPHADEX yhtiöstä Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ); agaroosi; polystyreenihelmet, joiden halkaisija on noin 1 μm - 5 mm, ja joita on saatavissa yhtiöstä Abbott Laboratories of North Chicago, IL; polyvinyylikloridi, polystyreeni, verkkoutettu polyakryyliamidi, nitroselluloosa- tai nylonpohjaiset kudokset kuten arkit, suikaleet tai sekoituslavat; tai putket, levyt tai mikrotiitterilevyn kuten polystyreenistä tai polyvinyylikloridista tehtyjen mikrotiitterilevyjen kaivot.

Mikä hyvänsä tässä kuvatun diagnostisen järjestelmän reagenssilaji, leimattu spesifinen sitomisaine tai vahvistusreagenssi voidaan toimittaa liuoksena, nestedispersiona tai oleellisen kuivana jauheena, esimerkiksi lyofilisoidussa muodossa. Kun osoitusväline on entsyymi, entsyymin substraatti voidaan myös toimittaa järjestelmän erillisessä pakkauksessa. Tähän diagnostiseen määritysjärjestelmään voidaan sisällyttää myös kiinteä kantaja, kuten edellä kuvattu mikrotiitterilevy, ja yhtä tai useaa puskuria erillisesti pakattuina elementteinä.

Tässä diagnostisiin järjestelmiin liittyen käsitellyt pakkausmateriaalit ovat diagnostisissa järjestelmissä tavanomaisesti käytettyjä.

Käsite "pakkaus" viittaa kiinteään matriisiin tai materiaaliin kuten lasi, muovi (esimerkiksi polyetyleeni, polypropyleeni ja polykarbonaatti), paperi, folio ja vastaavat, jotka pystyvät pitämään diagnostista reagenssia kuten keksinnön mukaista monoklonaalista vasta-ainetta kiinteiden rajojen sisällä. Siten pakkaus voi olla esimerkiksi pullo, lääkepullo, muovikuori ja muovikalvolla laminoitu kuori tai vastaava astia, jota käytetään sisältämään lukuun otettua diagnostista reagenssia, tai se voi olla mikrotiitterilevyn kaivo, johon on kiinnitetty μg-määrät lukuun otettua diagnostista reagenssia toimintakykyisesti, ts. liitetty siten, että osoitettava vasta-aine tai polypeptidi voi kiinnittyä siihen immunologisesti.

Ihanteellisesti keksinnön mukaisessa määrityksessä käyttöön tarkoitetut materiaalit soveltuvat reagenssipakkauksen valmistukseen. Sellainen reagenssipakkaus voi käsittää kantajavälineen, joka on jaettu osastoihin ottamaan vastaan tiiviisti rajoitettuun tilaan yhtä tai useaa säiliövälinettä, kuten lääkepulloja, putkia ja vastaavia, kunkin säiliövälineistä sisältäessä yhtä menetelmässä käytetyistä erillisistä elementeistä. Esimerkiksi yksi säiliövälineistä voi sisältää keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta, joka on, tai voi olla, osoitettavasti leimattua. Reagenssipakkauksessa voi myös olla säiliöitä, jotka sisältävät mitä hyvänsä muista edellä mainituista immunokemiallisista reagensseista, joita käytetään diagnostisten menetelmien suoritukseen.

F. Menetelmät HIV:tä neutraloivan, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen tuottamiseksi

Keksinnössä kuvataan menetelmiä uusien HIV:tä neutraloivien ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseksi. Menetelmät perustuvat yleensä vasta-ainemolekyylien kombinaatiokirjastojen käyttöön, joita voidaan tuottaa erilaisista lähteistä, ja mukaan luetaan mm. naiivit kirjastot, modifioidut kirjastot, ja kirjastot, jotka on tuotettu suoraan ihmislah-

joittajilta, joilla on HIV-spesifinen immuunivaste.

Kombinaatiokirjaston tuottaminen ja manipulointimenetelmät on kuvattu perusteellisesti kirjallisuudessa, eikä niistä esitetä tässä yksityiskohtaista katsausta, paitsi niiden ominaispiirteiden suhteen, joita vaaditaan keksinnön ainutlaatuisten suoritusmuotojen tekemiseen ja käyttöön. Yleensä menetelmiin liittyy kuitenkin filamenttifagi(fagemidi)pinta-ekspressiovektorijärjestelmän käyttö kirjaston vasta-ainelajien kloonaukseen ja ekspressioon. Muut ovat kuvanneet erilaisia fagemidikloonausjärjestelmiä kombinaatiokirjastojen tuottamiseksi. Katso esimerkiksi fagemideihin perustuvien kombinaatiovasta-ainekirjastojen tuottamista tavalla, joka on kuvattu julkaisuissa Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:4363-4366 (1991); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:7978-7982 (1991); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992); Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:11120-11123 (1991); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:4457-4461 (1992); ja Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992), jotka viitteet liitetään tähän viitteeksi.

Yhdessä suoritusmuodossa menetelmään liittyy ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden fagemidikirjaston valmistus käyttämällä luovuttajaimmuunisolu-lähetti-RNA:ta HIV-infektoiduista luovuttajista. Luovuttajilla voi olla AIDS'in oireita, mutta edullisissa suoritusmuodoissa luovuttaja on oireeton, koska tulokseksi saatu kirjasto sisältää oleellisesti suuremmat määrät HIV:tä neutraloivia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa kuovuttaja on naiivi suhteessa HIV:n vastaiseen immuunivasteeseen, ts. luovuttajalla ei ole HIV-infektiota. Vaihtoehtoisesti kirjasto voi olla synteettinen, tai se voi olla peräisin luovuttajasta, jolla on immuunivastetta muita antigeenejä kohtaan.

Menetelmään ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen tuottamiseksi liittyy yleensä vaiheet, joissa (1) valmistetaan erillisten H- ja L-ketjua koodittavien geenien kirjastot kloonausvektoreissa käyttämällä kirjastojen lähteinä ihmisen immunoglobuliinigeenejä, (2) yhdistetään H- ja L-ketjua koodittavat geenikirjastot yhteen ainoaan dikistroniseen ekspressiovektoriin, joka pystyy ekspressoimaan ja kokoamaan heterodimeerisen vasta-ainemolekyylin, (3) ekspressoidaan kokoonpantu heterodimeerinen vasta-ainemolekyyli filamenttifagipartikkelin pinnalla, (4) eristetään pinnalla ekspressoitu fagipartikkeli käyttämällä immunoaffiniteettitekniikkoja, kuten fagipartikkelien "pannaus" (panning) ennalta valitun antigeenin kanssa, eristäen täten yhden tai useita fagemidilajeja, jotka sisältävät erityistä H- ja L-ketjua koodittavia geenejä ja vasta-ainemolekyylejä, jotka immunoreagoivat ennalta valitun antigeenin kanssa.

Kuten tässä kuvataan esimerkeissä, tulokseksi saatua fagemidikirjastoa voidaan manipuloida kirjaston monoklonaalisten vasta-aineiden immunospesifisyyksien lisäämiseksi ja/tai muuttamiseksi tuottamaan ja seuraavaksi tunnistamaan keksinnön mukaisia muita haluttuja, ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita.

Esimerkiksi raskaan (H) ketjun ja keveän (L) ketjun immunoglobuliinimolekyyliä koodittavia geenejä voidaan sekoittaa sattumanvaraisesti (shuffled) luomaan kokoonpannussa immunoglobuliinimolekyylissä uusia HL-pareja. Lisäksi toinen tai molemmat H- ja L-ketjua koodittavista geeneistä voidaan mutagenisoida immunoglobuliinipolypeptidin vaihtelevan alueen komplementaarisuuden määrittävällä alueella (CDR), ja seuloa seuraavksi haluttujen immunoreaktio- ja neutralointikykyjen suhteen. Yhdessä suoritusmuodossa H- ja L-geenit voidaan kloonata erillisiin, yksikistronisiin ekspressiovektoreihin, joita kuvataan "binaariseksi" järjestelmäksi, jota kuvataan tässä pitemmällä. Tässä menetelmässä edellä oleva vaihe (2) poikkeaa siinä, että H- ja L-ketjua koodittavien geenien

yhdistäminen tapahtuu lisäämällä kahta binaarista plasmidia yhteen ainoaan isäntäsoluun ekspressoimaan ja kokoamaan yhteen fagemidia, jossa on heterodimeerinen vasta-ainemolekyyli, jonka pintaan voidaan päästä käsiksi.

Yhdessä sekoitussuoritusmuodossa sekoittaminen voidaan toteuttaa binaarisilla ekspressiovektoreilla, jotka pystyvät kukin ekspressoimaan yhtä ainoaa raskasta tai keveää ketjua koodittavaa geeniä, kuten esimerkissä 6 kuvataan.

Keksinnön mukaisissa menetelmissä vasta-ainemolekyylit ovat monoklonaalisia, koska kloonausmenetelmät sallivat vasta-ainetta tuottavien solulinjojen klonaalisesti puhtaiden lajien valmistuksen. Lisäksi monoklonaaliset vasta-aineet ovat ihmisestä, koska H- ja L-ketjua koodittavat geenit ovat peräisin ihmisen immunoglobuliinia tuottavista immuunisoluista, kuten perna-, kateenkorva-, luuydin- ja vastaavista soluista.

Menetelmä HIV:tä neutraloivan, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen tuottamiseksi vaatii myös, että tulokseksi saatava vasta-ainekirjasto, joka on immunoreaktiivista ennalta valitun HIV-antigeenin kanssa, seulotaan vasta-ainelajien läsnäolon suhteen, joilla on kapasiteetti neutraloida HIV:tä yhdessä tai useissa tässä kuvatuista määrityksistä neutralointikapasiteetin määrittämiseksi. Siten tuotetaan ensin edullista vasta-ainemolekyylien kirjastoa, joka sitoutuu HIV-antigeeniin, edullisesti gp160:een, gp120:een, gp41:een, gp160:n V3-silmukka-alueelle, tai gp120:n ja gp41:n CD4-sitoutumiskohtaan, ja seulotaan sitten HIV:tä neutraloivien vasta-aineiden läsnäolon suhteen tässä kuvatulla tavalla.

Muita kirjastoja voidaan seuloa sekoitetuista kirjastoista muita HIV-immunoreaktiivisia ja HIV:tä neutraloivia ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita varten.

Keksinnön edelleen eräänä karakterisointina määritetään vasta-ainemolekyylin H- tai L-ketjua koodittavan geenin nukleotidi- ja vastaava aminohappotähdesekvenssi nukleiinihapposekvensöinnillä. Primaarinen aminohappotähdesekvenssi-informaatio antaa oleellista informaatiota vasta-ainemolekyylin epitooppireaktiivisuudesta.

Tunnistettujen HIV-immunoreaktiivisten monoklonaalisten vasta-aineiden vaihtelevan ketjualueen sekvenssien sekvenssivertailut esitetään tässä kuvioissa 10 - 13. Sekvenssit on asetettu rinnan sekvenssihomologiaan perustuen, ja täten tunnistetaan sukulaisvasta-ainemolekyylien ryhmiä, joissa raskaan ketjun tai keveän ketjun geeneillä on oleellista sekvenssihomologiaa.

Esimerkeissä kuvataan ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen esimerkinomainen valmistus. Kiinnostuksen kohteena olevaa vasta-ainetta ekspressoimaan pystyvän erityisen vektorin eristykseen liittyy kaksikistronisen ekspressiovektorin lisääminen isäntäsoluun, joka sallii filamenttifagigeenien ekspression ja fagipartikkelien kokoonpanon. Binaarista vektorijärjestelmää käytettäessä molemmat vektorit lisätään isäntäsoluun. Tyypillisesti, isäntä on E. coli. Tämän jälkeen auttajafagigenomi isäntäsoluun, joka sisältää immunoglobuliiniekspressiovektori(n/t) aikaansaamaan geneettisen komplementaation, joka on välttämätön fagipartikkelien kokoonpanon sallimiseksi. Tulokseksi saatua isäntäsolua kasvatetaan lisättyjen fagigeenien ja immunoglobuliinigeenien ekspression sallimiseksi, ja fagipartikkelien kokoonpanemiseksi ja isäntäsolusta leviämiseksi. Sitten levinneet fagipartikkelit korjataan talteen (kerätään) isäntäsolukasvatusväliaineesta ja seulotaan haluttujen immunoreaktio- ja neutralointiominaisuuksien suhteen. Tyypillisesti talteen korjatut partikkelit "pannattiin" ("panned") immunoreaktion suihteen ennalta valitun antigeenin kanssa. Sitten voimakkaasti immunoreaktiiviset partikkelit kerätään, ja yksittäiset partikkelien lajit eristetään kloonauksellisesti (clonally) ja

seulotaan edelleen HIV-neutraloinnin suhteen. Fagit, jotka tuottavat neutraloivia vasta-aineita, valitaan ja käytetään keksinnön mukaisen, HIV:tä neutraloivan, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen lähteenä.

Keksinnön mukaisia, ihmisen monoklonaalisia vasta-aineita voidaan tuottaa myös muuttamalla keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen raskasta tai keveää ketjua koodittavan polynukleotidisekvenssin nukleotidisekvenssiä. Ekspressiovektorin nukleotidisekvenssiä voidaan muuttaa esimerkiksi kohtasuunnatulla mutageneesillä ja täten lisätä muutoksia tulokseksi saatuun ekspressoituun aminohappotähdesekvenssiin. Siten voidaan ottaa esimerkiksi SEKV. ID.NROn 66 polynukleotidi, ja muuttaa se SEKV. ID.NROn 67 polynukleotidiksi. Samalla lailla voidaan ottaa tunnettu polynukleotidi ja muuttaa sitä satunnaisesti sattumanvaraisella mutageneesillä, lisätä muutettu polynukleotidi uudelleen ekspressiojärjestelmään ja seuloa seuraavaksi tuote-H:L-pari HIV:tä neutraloivan aktiivisuuden suhteen.

Kohtasuunnatun ja sattumanvaraisen mutageneesin menetelmät ovat polynukleotidialoilla hyvin tunnettuja, eikä niitä ole pidettävä yhtä rajoittavina kuin menetelmät kohteena olevan polynukleotidin nukleotidisekvenssin muuttamiseksi.

Johtuen fagipartikkelin läsnäolosta immunoaffiniteettieristetyssä vasta-aineessa, yhteen suoritusmuotoon liittyy tulokseksi saatujen kloonattujen geenien manipulointi immunoglobuliinia koodittavan geenin katkaisemiseksi niin, että liukoinen Fab-fragmentti erittyy isäntä-E. coli-solusta, joka sisältää fagemidivektorin. Siten tulokseksi saadut manipuloidut kloonatut immunoglobuliinigeenit tuottavat liukoista Fab'tä, joka voidaan helposti karakterisoida ELISA-määrityksissä epitoopinsitomistukimuksia varten, kompetitiomäärityksissä tunnetuilla anti-HIV-vasta-ainemolekyyleillä, ja HIV-neutralointimäärityksissä. Liukoiseksi tehty Fab aikaansaa toistettavissa olevan ja verrattavan vasta-aine-

tuotannon vertailevia - ja karakterisointitutkimuksia varten.

Liukoisen Fab'in valmistus kuvataan yleisesti immunologian alalla, ja voidaan suorittaa tavalla, joka on kuvattu tässä esimerkissä 2b6), tai tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Burton et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:10134-10137 (1991).

G. Ekspressiovektorit ja polynukleotidit monoklonaalisten anti-HIV-vasta-aineiden ekspressoimiseksi

Keksinnön mukaisten ihmisen monoklonaalisten vasta-aineiden valmistus riippuu, yhdessä suoritusmuodossa, kloonaus- ja ekspressiovektoreista, joita käytetään tässä kuvattujen kombinaatiovasta-ainekirjastojen valmistamiseen. Kloonatut immunoglobuliinin raskaan ja keveän ketjun geenit voidaan sukkuloida (shuttled) lamdavektorien, fagemidivektorien ja plasmidivektorien välillä tässä kuvattujen menetelmien eri vaiheissa.

Fagemidivektorit tuottavat fuusioproteiineja, jotka ekspressoituvat kokoonpannun filamenttifagipartikkelin pinnalla.

Eräs keksinnön mukainen edullinen fagemidivektori on yhdistelmä-DNA (rDNA)-molekyyli, joka sisältää nukleotidisekvenssin, joka koodittaa ja pystyy ekspressoimaan fuusiopolypeptidiä, joka sisältää, aminoterminaalisesta päästä karboksiterminaalisen pään suuntaan, (1) prokaryoottisen erityssignaalidomeenin, (2) heterologisen polypeptidin, joka määrittää immunoglobuliinin raskaan tai keveän ketjun vaihtelevan alueen, ja (3) filamenttifagin membraaniankkuridomeenin. Vektori sisältää DNA-ekspression kontrollisekvenssit fuusiopolypeptidin ekspressoimiseksi, edullisesti prokaryoottiset kontrollisekvenssit.

Filamenttifagin membraaniankkuri on edullisesti cpIII- tai cpVIII-kuoriproteiinin domeeni, joka pystyy assosioitumaan

filamenttifagipartikkelin matriisin kanssa, sisällyttäen siten fuusiopolypeptidin fagin pinnalle.

Erityssignaali on proteiinin johtopeptididomeeni, joka kohdistaa proteiinin gram-negatiivisten bakteerien periplasmiseen membraaniin. Eräs edullinen erityssignaali on pelB-erityssignaali. Erityssignaalidomeenin ennustetut aminohappotähdesekvenssit kahdesta pelB-geenituotevariantista Erwinia carotova'sta kuvataan julkaisussa: Lei et al.; Nature 331:543-546 (1988).

pelB-proteiinin johtosekvenssiä on käytetty aikaisemmin fuusioproteiinien erityssignaalina (Better et al., Science, 240:1041-1043 (1988); Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:5728-5732 (1989); ja Mullinax et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:8095-8099 (1990)). Aminohappotähdesekvenssit muita E. coli'sta olevia erityssignaalipolypeptididomeeneja varten, jotka ovat keksinnön mukaisesti käyttökelpoisia, kuvataan teoksessa Oliver, Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Neidhard, F.C. (toimittaja), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1:56-69 (1987).

Edullisia membraaniankkureita vektoria varten on saatavissa filamenttifagi M13:sta, f1:stä, fd:stä, ja samanarvoisesta filamenttifagista. Edullisia membraaniankkuridomeenja esiintyy geeni III:n ja geeni VIII:n koodittamissa kuoriproteiineissa. Filamenttifagin kuoriproteiinin membraaniankkuridomeeni on osa kuoriproteiinin karboksiterminaalisesta alueesta, ja sisältää hydrofobisten aminohappotähteiden alueen lipidikaksoiskerroksen läpi yltämiseksi, ja varautuneiden aminohappotähteiden alueen, joka normaalisti esiintyy membraanin solulimapinnalla ja ulottuu membraanista pois.

Fagi f1:ssä, geeni VIII-kuoriproteiinin membraanin yli ulottuva alue käsittää tähteen Trp-26 - Lys-40, ja solulima-alue käsittää karboksiterminaaliset 11 tähdettä 41:stä 52:een

(Ohkawa et al., J. Biol. Chem., 256:9951-9958 (1981)). Eräs esimerkinomainen membraaniankkuri koostuisi cpVIII:n tähteistä 26 - 40. Siten erään edullisen membraaniankkurialueen aminohappotähdesekvenssi on johdettu M13 filamenttifagigeeni VIII-kuoriproteiinista (merkitään myös cpVIII tai CP 8). Geeni VIII-kuoriproteiinia on läsnä kypsän filamenttifagin päällä pääosasta fagipartikkelia, tyypillisesti noin 2500 - 3000 kopiota kuoriproteiinia.

Lisäksi, erään toisen edullisen membraaniankkuridomeenin aminohappotähdesekvenssi on johdettu M13-filamenttifagigeeni III-kuoriproteiinista (kutsutaan myös nimellä cpIII). Geeni III-kuoriproteiinia on läsnä kypsässä filamenttifagissa fagipartikkelin toisessa päässä, tyypillisesti noin 4 - 6 kopiota kuoriproteiinia.

Filamenttifagipartikkelien rakenteen, niiden kuoriproteiinien ja partikkelikokoonpanon yksityiskohtaisia kuvauksia varten katso katsauksia, jotka ovat kirjoittaneet Rached et al., Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986); ja Model et al., teoksessa "The Bacteriophages: vol. 2", R. Calendar, toimittaja. Plenum Publishing Co., s. 375-456 (1988).

DNA-ekspression kontrollisekvenssit käsittävät sarjan DNA-ekspressiosignaaleja rakennegeenituotteen ekspressoimiseksi ja sekä 5′- että 3′-elementit, kuten on hyvin tunnettua, toimintakykyisesti kistroniin liitettynä siten, että kistroni voi ekspressoida rakennegeenituotetta. 5′-kontrollisekvenssit määrittävät promoottorin transkription aloitusta varten, ja ribosomin sitoutumiskohdan liitettynä toimintakykyisesti ylävirtaan käännettävän DNA-sekvenssin 5′-terminaalisessa päässä.

Geenieksпression korkeiden tasojen saavuttamiseksi E. colissa ei ainoastaan ole välttämätöntä käyttää voimakkaita promoottoreita mRNA:n suurten määrien luomiseksi, vaan myös ribosomin sitoutumiskohtia varmistamaan, että mRNA käänne-

tään tehokkaasti. E. colissa ribosomin sitoutumiskohta sisältää aloituskodonin (AUG) ja sekvenssin, jonka pituus on 3 - 9 nukleotidia, ja joka sijaitsee 3 - 11 nukleotidia ylävirtaan aloituskodonista (Shine et al., Nature, 254:34 (1975). Sekvenssi, AGGAGGU, jota kutsutaan Shine-Dalgarno(SD) -sekvenssiksi, on komplementaarinen E. colin 16S-rRNA:n 3'-päälle. Ribosomin sitoutumista mRNA:han ja mRNA:n 3'-päässä olevaan sekvenssiin voivat tehostaa useat tekijät:

(i) SD-sekvenssin ja 16S rRNA:n 3'-pään välisen komplementaarisuuden aste.

(ii) Etäisyys ja mahdollisesti DNA-sekvenssi, joka sijaitsee SD-sekvenssin ja AUG:n välillä. Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:760, (1979a); Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5596 (1979b); Guarente et al., Science, 209:1428 (1980); ja Guarente et al., Cell, 20:543 (1980). Optimisointi saavutetaan mittaamalla geenien ekspressiotason plasmideissa, jossa tätä etäisyyttä muutetaan systemaattisesti. Eri mRNA'iden vertailu osoittaa, että asemissa -20 - +13 (jossa AUG:n A on asema 0) on tilastollisesti edullisia sekvenssejä. Gold et al., Annu. Rev. Microbiol., 35:365 (1981). Johtosekvenssien on osoitettu vaikuttavan translaatioon dramaattisesti. Roberts et al., 1979 a, b, yllä.

(iii) AUG:n jälkeen seuraava nukleotidisekvenssi, joka vaikuttaa ribosomin sitoutumiseen. Taniguchi et al., J. Mol. Biol., 118:533 (1978).

3'-kontrollisekvenssit määrittävät ainakin yhden lopetus (stop) -kodonin samassa lukuvaiheistuksessa ja toimintakykyisesti liittyneenä heterologiseen fuusiopolypeptidiin.

Edullisissa suoritusmuodoissa käytetty vektori sisältää prokaryoottisen replikaation alun tai replikonin, ts. DNA-sekvenssin, jolla on kyky ohjata yhdistelmä-DNA-molekyylin autonomista replikoitumista ja ylläpitoa ekstrakromosomaali-

sesti prokaryoottisessa isäntäsolussa, kuten bakteeri-isäntäsolussa, joka on transformoitu sillä. Sellaiset replikaation aloituskohdat ovat alalla hyvin tunnettuja. Edullisia replikaation aloituskohtia ovat ne, jotka ovat tehokkaita isäntäorganismissa. Eräs edullinen isäntäsolu on E. coli. Vektorin käyttöä varten E. colissa eräs edullinen replikaation aloituskohta on ColE1, joka esiintyy pBR322:ssa ja erilaisissa muissa tavallisissa plasmideissa. Myös edullinen on p15A-replikaation aloituskohta, joka esiintyy pACYC:ssä ja sen johdannaisissa. ColE1- ja p15A-replikonia on käytetty laajalti molekyylibiologiassa, ovat saatavissa erilaisissa plasmideissa, ja ne kuvaa ainakin Sambrook et al., käsikirjassa "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

ColE1- ja p15A-replikonit ovat erityisen edullisia käytettäväksi keksinnön yhdessä suoritusmuodossa, jossa käytetään kahta "binaarista" plasmidia, koska niillä on kummallakin kyky ohjata plasmidin replikaatiota E. coli'ssa, kun taas toinen replikoni on läsnä toisessa plasmidissa samassa E. coli-solussa. Ts. ColE1 ja p15A ovat toisiaan häiritsemättömiä replikoneja, jotka sallivat kahden plasmidin ylläpidon samassa isännässä (katso esimerkiksi Sambrook et al., yllä, sivuilla 1.3-1.4). Tämä ominaispiirre on erityisen tärkeä keksinnön binaaristen vektorien suoritusmuodossa, koska yhden ainoan isäntäsolun, joka sallii fagireplikaation, on ylläpidettävä kahden erillisen vektorin toisistaan riippumatonta ja samanaikaista replikaatiota, ts. ensimmäisen vektorin raskaan ketjun polypeptidin ekspressoimiseksi, ja toisen vektorin keveän ketjun polypeptidin ekspressoimiseksi.

Lisäksi ne suoritusmuodot, jotka sisältävät prokaryoottisen replikonin, voivat myös sisältää geenin, jonka ekspressio antaa sillä transformoidulle bakteeri-isännälle selektiivisen edun, kuten lääkeresistenssin. Tyypillisiä bakteriaalisia lääkeresistenssigeenejä ovat ne, jotka antavat resistenssin ampisilliinille, tetrasykliinille, neomysiini/kana-

mysiinille tai kloorіamfenikolille. Tyypillisesti vektorit sisältävät myös mukavat restriktiokohdat käännettävien DNA-sekvenssien insertiota varten. Esimerkinomaisia vektoreita ovat plasmidit pUC8, pUC9, pBR322, ja pBR329, jotka ovat saatavissa yhtiöstä BioRad Laboratories, (Richmond, CA) ja pPL ja pKK223, jotka ovat saatavissa yhtiöstä Pharmacia, (Piscataway, NJ).

Eräs vektori keksinnön mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen ekspressioon filamenttifagipartikkelin pinnalla on yhdistelmä-DNA(rDNA) -molekyyli, joka on sovitettu vastaanottamaan ja ekspressoimaan käännettävien ensimmäisen ja toisen DNA-sekvenssien vastaanottoon ja ekspressoimiseen ensimmäisen ja toisen polypeptidin muodossa, jolloin toinen polypeptideistä on fuusioitunut filamenttifagin kuoriproteiinimembraaniankkuriin. Ts. ainakin toinen polypeptideistä on fuusiopolypeptidiä, joka sisältää filamenttifagimembraaniankkuridomeenin, prokaryoottisen erityssignaalidomeenin, ja immunoglobuliinin raskaan tai keveän ketjun vaihtelevan domeenin.

Eräs DNA-ekspressiovektori heterodimeerisen vasta-ainemolekyylin ekspressoimiseksi aikaansaa järjestelmän kahden käännettävän DNA-sekvenssin riippumattoman kloonauksen (insertoinnin) vektorissa läsnä oleviin kahteen erilliseen kasettiin, kahden erillisen kistronin muodostamiseksi vasta-ainemolekyylin ensimmäisen ja toisen polypeptidin ekspressoimiseksi, tai vasta-ainemolekyylin käsittävien polypeptidien ligandinkiinnitysosat (ts. immunoglobuliinimolekyylin H- ja L-vaihtelevat alueet). DNA-ekspressiovektoria kahden kistronin ekspressoimiseksi kutsutaan kaksikistroniseksi ekspressiovektoriksi.

Vektori käsittää ensimmäisen kassetin, joka sisältää ylävirran ja alavirran käännettävät DNA-sekvenssit liitettynä toimintakykyisesti nukleotidisekvenssin kautta, joka on soveltuu suunnattuun insertti-DNA:han liittämiseen. Ylävirran käännettävä sekvenssi koodittaa tässä määriteltyä erityssig-

naalia. Alavirran käännettävä sekvenssi koodittaa tässä määriteltyä filamenttifagimembraaniankkuria. Edullisesti kasetti sisältää DNA-ekspressionkontrollisekvenssit reseptoripolypeptidin ekspressoimiseksi, joka muodostuu, kun käännettävä insertti-DNA-sekvenssi (insertti-DNA) on insertoitu suunnatusti kasettiin mukleotidisekvenssin kautta, joka soveltuu suunnattuun liittämiseen. Filamenttifagimembraaniankkuri on edullisesti cpIII- tai cpVIII-kuoriproteiinin domeeni, joka pystyy sitomaan filamenttifagipartikkelin matriisin, lisäten siten fuusiopolypeptidin fagin pinnalle.

Reseptoria ekspressoiva vektori sisältää myös toisen kasetin toisen reseptoripolypeptidin ekspressoimiseksi. Toinen kasetti sisältää toisen käännettävän DNA-sekvenssin, joka koodittaa tässä määriteltyä erityssignaalia, toimintakykyisesti kiitettynä 3'-päästään nukleotidisekvenssin kautta, joka soveltuu suunnattuun liittämiseen vektorin alavirran DNA-sekvenssiin, joka määrittää tyypillisesti ainakin yhden lopetuskodonin kasetin lukualueella. Toinen käännettävä DNA-sekvenssi on toimintakykyisesti liitetty 5'-päästään DNA-ekspressiokontrollisekvensseihin, jotka muodostavat 5'-pään elementit. Toinen kasetti pystyy, käännettävän DNA-sekvenssin (insertti-DNA) insertion jälkeen ekspressoimaan toista fuusiopolypeptidiä, joka käsittää erityssignaalin reseptorin, insertti-DNA:n koodittaessa polypeptidiä.

Ylävirran käännettävä DNA-sekvenssi koodittaa aikaisemmin kuvattua prokaryoottista erityssignaalia. Ylävirran käännettävä DNA-sekvenssi, joka koodittaa pelB-erityssignaalia, on edullinen DNA-sekvenssi reseptorin ekspressiovektoriin sisällytettäväksi. Alavirran käännettävä DNA-sekvenssi koodittaa aikaisemmin kuvattua filamenttifagimembraaniankkuria. Siten eräs alavirran käännettävä DNA-sekvenssi koodittaa aminohappotähdesekvenssiä, joka vastaa, ja on edullisesti identtinen tämän kanssa, joko filamenttifagigeeni III- tai geeni VIII-kuoripolypeptidin membraaniankkuridomeenia.

Kasetti keksinnön mukaisessa DNA-ekspressiovektorissa on vektorin alue, joka muodostaa käännettävän DNA-sekvenssin (insertti-DNA) insertoitaessa nukleotidisekvenssin, joka pystyy ekspressoimaan sopivassa isännässä fuusiopolypeptidiä. Ekspressiokompetenttia nukleotidisekvenssiä kutsutaan kistroniksi. Siten kasetti käsittää DNA-ekspressionkontrollielementit liitettyinä toimintakykyisesti ylävirran ja alavirran käännettäviin DNA-sekvensseihin. Kistroni muodostuu, kun käännettävä DNA-sekvenssi on insertoitu suunnatusti (liitetty suunnatusti) ylävirran ja alavirran sekvenssien välille tähän tarkoitukseen sopivien nukleotidisekvenssin kautta. Tulokseksi saadut kolme käännettävää DNA-sekvenssiä, ts. ylävirran, insertoitu ja alavirran sekvenssi, ovat kaikki toimintakykyisesti liittyneet samaan lukualueeseen.

Siten DNA-ekspressiovektori vasta-ainemolekyylin ekspressoimiseksi aikaansaa järjestelmän käännettävien DNA-sekvenssien kloonaamiseksi vektorin kasettiosiin tuottaen kistroneita, jotka pystyvät ekspressoimaan ensimmäisiä ja toisia polypeptidejä, ts., monoklonaalisen vasta-aineen raskaita ja keveitä ketjuja.

Tässä käytettäessä käsite "vektori" viittaa nukleiinihappomolekyyliin, joka pystyy kuljettamaan eri geneettisten ympäristöjen välillä toista nukleiinihappoa, johon se on liitetty toimintakykyisesti. Edullisia vektoreita ovat ne, jotka pystyvät replikoitumaan autonomisesti ja ekspressoimaan rakennegeenituotteita, jotka ovat läsnä DNA-segmenteissä, joihin ne on liitetty toimintakykyisesti. Sen vuoksi vektorit sisältävät edullisesti edellä kuvatut replikonit ja valittavat merkit.

Tässä käytettäessä DNA-sekvenssien tai -segmenttien yhteydessä ilmaisu "toimintakykyisesti liitetty" tarkoittaa, että sekvenssit tai segmentit on liitetty kovalenttisesti, edullisesti tavanomaisilla fosfodiesterisidoksilla, DNA:n toiseen juosteeseen, olipa tämä sitten yksi- tai kaksijuosteis-

ta muotoa. Vektorin valinta, johon keksinnön mukainen transkriptioyksikkö tai kasetti liitetään toimintakykyisesti, riippuu suoraan, kuten alalla on hyvin tunnettua, halutuista funktionaalisista ominaisuuksistad, esimerkiksi vektorin replikaatiosta ja proteiinieksressiosta, ja transformoitavasta isäntäsolusta, näiden ollessa yhdistelmä-DNA-molekyylienkonstruointialan luontaisia rajoituksia.

Suunnattuun liittämiseen soveltuva nukleotidisekvenssi, ts., polylinkkeri, on DNA-ekspressiovektorin alue, joka (1) liittää toimintakykyisesti replikaatiota ja kuljetusta varten ylävirran ja alavirran käännettävät DNA-sekvenssit ja (2) aikaansaa kohdan tai välineen DNA-sekvenssin suunnattuun liittämiseen vektoriin. Tyypillisesti suunnattu polylinkkeri on nukleotidisekvenssi, joka määrittää kaksi tai useampia restriktioendonukleaasintunnistussekvenssejä, eli restriktiokohtia. Restriktiokatkaisussa nämä kaksi kohtaa antavat tulokseksi kohesiiviset päät, joihin käännettävä DNA-sekvenssi voidaan liittää DNA-ekspressiovektoriksi. Edullisesti nämä kaksi restriktiokohtaa aikaansaavat restriktiokatkaisussa, kohesiiviset päät, jotka ovat ei-komplementaariset ja sallivat täten käännettävän DNA-sekvenssin suunnatun insertoinnin kasettiin. Yhdessä suoritusmuodossa suunnattyu liittämisväline aikaansaadaan nukleotideilla, jotka ovat läsnä ylävirran käännettävässä DNA-sekvenssissä ja/tai alavirran käännettävässä DNA-sekvenssissä. Eräässä toisessa suoritusmuodossa suunnattuun liittämiseen sopiva nukleotidisekvenssi käsittää nukleotidisekvenssin, joka määrittää useita suuntaavia kloonausvälineitä. Kun suunnattuun liittämiseen soveltuva nukleotidisekvenssi määrittää lukuisia restriktiokohtia, sitä kutsutaan multippeliksi kloonauskohdaksi.

Eräässä edullisessa suoritusmuodossa DNA-ekspressiovektori suunnitellaan mukavaan manipulointiin filamenttifagipartikkelin muodossa, joka kapseloi keksinnön opetusten mukaisen genomin. Tässä suoritusmuodossa DNA-ekspressiovektori sisältää edelleen nukleotidisekvenssin, joka määrittää filament-

tifagin replikaation alun siten, että vektori sopivan geneettisen täydennyksen esittelyn jälkeen voi replikoitua filamenttifagina yksijuosteisessa replikatiivisessa muodossa ja pakkautua filamenttifagipartikkeleiksi. Tämä ominaispiirre aikaansaa DNA-ekspressiovektorin kyvyn pakkautua fagipartikkeleiksi partikkelin ja sen sisältämän vektorin seuraavaa eritystä varten, kauas muista partikkeleista, jotka käsittävät fagipartikkelien populaation.

Filamenttifagin replikaation alku on fagigenomin alue, kuten hyvin tiedetään, joka määrittää kohdat replikaation aloitusta varten, replikaation lopetusta varten ja replikaatiolla tuotetun replikoituvan muodon pakkausta varten (katso esimerkiksi Rasched et al., Microbiol. Rev., 50:401-427 (1986); ja Horiuchi, J. Mol. Biol., 188:215-223 (1986)).

Eräs edullinen filamenttifagin replikaation alku keksinnössä käyttöä varten on M13-, f1- tai fd-fagin replikaation alku (Short et al., Nucl. Acids Res. 16:7583-7600 (1988)). Edullisia DNA-ekspressiovektoreita keksinnön mukaisen, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen kloonaukseen ja ekspressioon ovat tässä kuvatut kaksikistroniset ekspressiovektorit pComb8, pComb2-8, pComb3, pComb2-3 ja pComb2-3'.

Eräs erityisen edullinen keksinnön mukainen vektori sisältää polynukleotidisekvenssin, joka koodittaa keksinnön mukaisen, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen raskaan tai keveän ketjun vaihtelevaa aluetta. Erityisen edullisia ovat vektorit, jotka sisältävät nukleotidisekvenssin, joka koodittaa kuvioissa 10 - 13 esitettyä raskaan tai keveän ketjun aminohappotähdesekvenssiä, joka koodittaa raskasta tai keveää ketjua, jolla on kuviossa 10 - 13 esitettyjen sekvenssien sitomisspesifisyys, tai joka koodittaa raskasta tai keveää ketjua, jossa on konservatiivisia substituutioita suhteessa kuviossa 10 - 13 esitettyyn sekvenssiin, ja näille komplementaariset polynukleotidisekvenssit.

Mikäli polynukleotidit ovat ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen raskaan tai keveän ketjun immunoglobuliinin vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin DNA-ekspressiovektorin komponenttiosia, keksintö ottaa lukuun myös eristetyt polynukleotidit, jotka koodittavat sellaisia raskaan tai keveän ketjun sekvenssejä.

On ymmärrettävä, että geneettisestä koodista ja sen oheisilmiöredundansseista johtuen voidaan suunnitella lukuisia polynukleotidisekvenssejä, jotka koodittavat lukuun otettua immunoglobuliinin raskaan tai keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssiä. Siten keksintö ottaa lukuun sellaiset vaihtoehtoiset polynukleotidisekvenssit, jotka sisältävät geneettisen koodin redundanssin ominaispiirteet.

Sikäli kuin ekspressiovektori keksinnön mukaisen, ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen tuottamiseksi suoritetaan isäntäsolussa, joka on yhteensopiva vasta-aineen ekspression kanssa, keksintö ottaa lukuun isäntäsolun, joka sisältää keksinnön mukaisen vektorin tai polynukleotidin. Eräs edullinen isäntäsolu on tässä kuvattu E. coli.

E. coli -viljelmät, jotka sisältävät edullisia ekspressiovektoreita, jotka tuottavat keksinnön mukaista ihmisen monoklonaalista vasta-ainetta, talletettiin kansainvälisen Budapestin sopimuksen mukaan kansainväliseen talletuslaitokseen the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, tässä kuvatulla tavalla.

Esimerkit

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu keksinnön suoja-alan kuvaamiseen, mutta rajoittamatta.

1. Kaksikistronisen ekspressiovektorin konstruointi heterodimeerisen reseptorin tuottamiseksi fagipartikkeleille

Vektorijärjestelmän saamiseksi antamaan suuren lukumäärän

Fab-vasta-ainefragmentteja, jotka voidaan seuloa suoraan, on aikaisemmin konstruoitu ekspressiokirjastot bakteriofagi Lambdassa tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Huse et al.; Science, 246:1275-1281 (1989). Nämä järjesdtelmät eivät sisällä suunnitteluominaispiirteitä, jotka huolehtivat ekspressoidun Fab:n kohdistamisesta filamenttifagipartikkelin pinnalle.

Vektorijärjestelmän valinnassa käytetty tärkein kriteeri oli välttämättömyys luoda suurin mahdollinen lukumäärä Fab-fragmentteja, jotka voitaisiin seuloa suoraan. Bakteriofagi Lambda valittiin kolmesta syystä lähtöpisteeksi ekspressiovektorin kehitykseen. Ensiksi, fagi-DNA:n pakkaaminen in vitro oli tehokkain menetelmä DNA:n johtamiseksi takaisin isäntäsoluihin. Toiseksi proteiinieksPressio oli mahdollista paljasta yksittäisten fagitäplien tasolla. Lopuksi, fagikirjastojen seulontaan liittyi tyypillisesti vähemmän epäspesifisen sitoutumisen vaikeutta. Vaihtoehto, plasmidikloonausvektorit, ovat edullisia vain kloonien analyysissä sen jälkeen, kun ne on tunnistettu. Tätä etua ei menetetä keksinnön mukaisessa järjestelmässä kaksikistronisen ekspressiovektorin kuten pCombVIII:n käyutöstä johtuen, sallien täten raskaan ketjun, keveän ketjun tai Fab'tä ekspressoivien inserttien sisältävän plasmidin katkaisemisen.

a. Kaksikistronisen ekspressiovektori pCOMB:n konstruointi

1) Lambda Zap ™II:n valmistus

Lambda Zap™ II on alkuperäisen Lambda Zap'n (ATCC-tulonumero 40,298) johdannainen, jossa ovat säilyneet kaikki alkuperäisen Lambda Zap'in ominaispiirteet, mukaan lukien 6 ainutlaatuista kloonauskohtaa, fuusioproteiinin ekspressio, ja kyky leikata insertti nopeasti fagemidin (Bluescript SK-) muodossa, mutta josta puuttuu SAM 100 mutaatio, sallien useiden Non-Sup F -kantojen kasvun, mukaan lukien XL1-Blue'n. Lambda Zap™ II konstruoitiin tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Short et al.; Nuc. Acids Res., 16:7583-7600, 1988, korvaamalla Lambda S -geenin, joka sisältyi 4254 emäsparin

(bp) DNA-fragmenttiin, joka tuotettiin sulattamalla Lambda Zap'in Nco I-restriktioentsyymillä. Tämä 4254 emäsparin DNA-fragmentti korvattiin 4254 emäsparin DNA-fragmentilla, joka sisälsi Lambda S-geenin, joka oli eristetty Lambda gt10:stä (ATCC # 40,179) sen jälkeen kun vektori oli sulatettu Nco I -restriktioentsyymillä. Lambda gt10'stä eristetty 4254 emäsparin DNA-fragmentti liitettiin alkuperäiseen Lambda Zap -vektoriin käyttämällä T4 DNA -ligaasia ja standardityöohjeita, kuten niitä, jotka kuvataan teoksessa Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., toimittaja, John Wiley ja Sons, NY, 1987, Lambda Zap™ II:n muodostamiseksi.

2) Lambda Hc2:n valmistus

V_H:ta koodittavien DNA-homologien suuren joukon ekspressoimiseksi E. coli -isäntäsolussa konstruoitiin vektori, joka sai nimen Lambda Hc2. Vektori aikaansai seuraavat seikat: kapasiteetti sijoittaa V_H:ta koodittavat DNA-homologit oikeaan lukukehykseen; ribosomin sitoutumiskohdan, joka kuvataan julkaisussa: Shine et al., Nature, 254:34 (1975); johtosekvenssin, joka ohjaa ekspressoidun proteiinin solulimatilaan, ja jota kutsutaan nimellä pelB-erityssignaali; polynukleotidisekvenssin, joka kooditti tunnettua epitooppia (epitoopin loppuosaa (tag)); ja myös polynukleotidin, joka kooditti välikeproteiinia V_H:ta koodittavan DNA-homologin ja epitoopin loppuosaa koodittavan polynukleotidin välissä. Lambda Hc2 on kuvattu aikaisemmin julkaisussa: Huse et al.; Science, 246:1275-1281 (1989).

Lambda Hc2:n valmistamiseksi konstruoitiin synteettinen DNA-sekvenssi, joka sisälsi kaikki edellä mainitut ominaispiirteet, suunnittelemalla yksijuosteiset polynukleotidisegmentit, joissa oli 20 - 40 emästä, ja jotka hybridisoituisivat toisiinsa ja muodostaisivat kuviossa 1 esitetyn kaksijuosteisen synteettisen DNA-sekvenssin. Yksittäiset yksijuosteiset polynukleotidisegmentit esitetään taulukossa 1.

Polynukleotidit N2, N3, N9-4, N11, N10-5, N6, N7 ja N8 (taulukko 1) kinasoitiin lisäämällä 1 µl kutakin polynukleotidia 0,1 µg/µl ja 20 yksikköä T4 polynukleotidikinaasia liuokseen, joka sisälsi 70 mM Tris-HCl:ää (tris[hydroksimetyyli]aminometaanihydrokloridi) pH-arvossa 7,6, 10 mM $MgCl_2$:ta, 5 mM ditiotreitolia (DTT), 10 mM ß-merkaptoetanolia, 500 µg/ml naudan seerumialbumiinia (BSA). Liuosta pidettiin 30 min ajan 37 °C:ssa, ja reaktio pysäytettiin pitämällä liuosta 10 min ajan 65 °C:ssa. Edellä olevaan kinasointireaktioliuokseen lisättiin kahta päätypolynukleotidia, 20 ng polynukleotideja N1 ja polynukleotideja N12, yhdessä 1/10 -tilavuuden kanssa liuosta, joka sisälsi 20 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 7,4, 2,0 mM $MgCl_2$:ta ja 50 mM NaCl:ää. Tätä liuosta kuumennettiin 70 °C:seen 5 min ajan ja annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, noin 25 °C, 1,5 tunnin aikana 500-ml vesiastiassa. Tämän ajanjakson aikana kaikki 10 polynukleotidia emäspariutuivat muodostaen kuviossa 1 esitetyn kaksijuosteisen synteettisen DNA-insertion. Yksittäiset polynukleotidit liitettiin toisiinsa kovalenttisesti synteettisen DNA-insertion stabiloimiseksi lisäämällä 40 µl edellä olevaa reaktiota liuokseen, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 7,5, 7 mM $MgCl_2$:ta, 1 mM DTT:tä, 1 mM adenosiinitrifosfaattia (ATP) ja 10 yksikköä T4 DNA-ligaasia. Tätä liuosta pidettiin 30 min ajan 37 °C:ssa, ja sitten T4 DNA-ligaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 10 min ajan 65 °C:ssa. Päätypolynukleotidit kinasoitiin sekoittamalla 52 µl edellä olevaa reaktiota, 4 µl liuosta, joka sisälsi 10 mM ATP:tä ja 5 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Tätä liuosta pidettiin 30 min ajan 37 °C:ssa, ja sitten T4-polynukleotidikinaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 10 min ajan 65 °C:ssa.

Taulukko 1

SEKV. ID.NRO		
(15)	N1)	5' GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCAT 3'
(16)	N2)	5' AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3'
(17)	N3)	5' GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCC 3'
(18)	N6)	5' CAGTTTCACCTGGGCCATGGCTGGTTGGG 3'

(19)	N7)	5' CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3'
(20)	N8)	5' GTATTTCATTATGACTGTCTCCTTGAAATAGAATTTGC 3'
(21)	N9-4)	5' AGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGTTACCCGTAC 3'
(22)	N10-5)	5' CGGAACGTCGTACGGGTAACTAGTCTAGAAATCTCGAG 3'
(23)	N11)	5' GACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTCG 3'
(24)	N12)	5' TCGACGAATTCTATTAAGAACCGTAGTC 3'

Täydellinen synteettinen DNA-insertio liitettiin suoraan Lambda Zap™ II -vektoriin, joka kuvataan esimerkissä 1a1), ja joka oli aikaisemmin sulatettu restriktioentsyymeillä, Not I ja Xho I. Liitosseos pakattiin valmistajan ohjeiden mukaan käyttämällä Gigapack II Gold -pakkausuutetta, joka on saatavissa yhtiöstä Stratagene, La Jolla, Kalifornia. Pakattu liitosseos levitettiin XL1-Blue -soluille (Stratagene). Yksittäiset lambda-täplät kairattiin, ja insertit leikattiin valmistajan (Stratagene) Lambda Zap™ II:ta varten toimittaman in vivo-leikkaustyöohjeen mukaisesti. Tämä in vivo -leikkaustyöohje siirsi kloonatun insertin Lambda Hc2 -vektorista fagemidivektoriin helpon manipuloinnin ja sekvensöinnin sallimiseksi. Edellä olevien kloonausvaiheiden tarkkuus varmistettiin sekvensöimällä insertin käyttämällä Sanger -dideoksimenetelmää, joka on kuvattu julkaisussa: Sanger et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74:5463-5467 (1977) ja käyttämällä valmistajan ohjeita AMV Reverse Transcriptase ^{35}S-ATP -sekvensöintireagenssipakkauksessa (Stratagene). Tulokseksi saadun kaksijuosteisen synteettisen DNA-insertion sekvenssi V_H-ekspressiovektorissa (Lambda Hc2) esitetään kuviossa 1. Lambda Hc2:n kummankin juosteen (huippu ja pohja) sekvenssi luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NROna 1 ja SEKV. ID.NROna 2, vastaavasti. Tulokseksi saatu Lambda Hc2 -ekspressiovektori esitetään kuviossa 2.

3) Lambda Lc2:n valmistus

Lukuisten V_L:ää koodittavien DNA-homologien ekspressoimiseksi E. coli -isäntäsolussa konstruoitiin vektori nimeltään Lambda Lc2, jolla on kapasiteetti sijoittaa V_L:ää koodittavat DNA-homologit oikeaan lukuvaiheistukseen, aikaansaatiin ribosomin sitoutumiskohta tavalla, joka kuvataan julkaisus-

sa: Shine et al.; Nature, 254:34 (1975), aikaansaatiin pelB -geenijohtosekvenssin erityssignaali, jota on aikaisemmin käytetty menestyksekkäästi erittämään Fab-fragmentteja E. coli:ssa tavalla, joka on kuvattu julkaisuissa: Lei et al., J. Bac., 169:4379 (1987); ja Better et al., Science, 240: 1041 (1988), ja aikaansaatiin myös polynukleotidi, joka sisälsi restriktioendonukleaasikohdan kloonausta varten. Lambda Lc2 on kuvattu aikaisemmin julkaisussa: Huse et al.; Science, 246:1275-1281 (1989).

Konstruoitiin synteettinen DNA-sekvenssi, joka sisälsi kaikki edellä mainitut ominaispiirteet, suunnittelemalla yksijuosteiset polynukleotidisegmentit, joissa on 20 - 60 emästä, ja jotka hybridisoituisivat toisiinsa ja muodostaisivat kaksijuosteisen synteettisen DNA-sekvenssin, joka esitetään kuviossa 3. Kummankin yklsittäisen yksijuosteisen polynukleotidisegmentin sekvenssi (01-08) kaksijuosteisen synteettisen DNA-sekvenssin sisällä esitetään taulukossa 2.

Polynukleotidit 02, 03, 04, 05, 06 ja 07 (taulukko 2) kinasoitiin lisäämällä 1 μl (0,1 μg/μl) kutakin polynukleotidia ja 20 yksikköä T_4-polynukleotidikinaasia liuokseen, joka sisälsi 70 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 7,6, 10 mM $MgCl_2$:ta, 5 mM DTT:tä, 10 mM ß-merkaptoetanolia, 500 μg/ml BSA:ta. Liuosta pidettiin 30 min ajan 37 °C:ssa, ja reaktio pysäytettiin pitämällä liuosta 10 min ajan 65 °C:ssa. 20 ng kumpaakin kahdesta päätypolynukleotidista, 01 ja 08, lisättiin edellä olevaan kinasointireaktioliuokseen yhdessä 1/10 -tilavuuden kanssa liuosta, joka sisälsi 20,0 mM Tris-HCl:ää pH-arvoassa 7,4, 2,0 mM $MgCl_2$:ta ja 15,0 mM natriumkloridia (NaCl). Tätä liuosta kuumennettiin 5 min ajan 70 °C:seen ja annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, noin 25 °C, 1,5 tunnin aikana 500-ml vesiastiassa. Tämän ajanjakson aikana kaikki 8 polynukleotidia emäspariutuivat muodostaen kaksijuosteisen synteettisen DNA-insertion, joka esitetään kuviossa 3. Yksittäiset polynukleotidit liitettiin toisiinsa kovalenttisesti synteettisen DNA-insertion stabiloimiseksi lisäämällä

40 µl edellä olevaa reaktiota liuokseen, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 7,5, 7 mM $MgCl_2$:ta, 1 mM DTT:tä, 1 mM ATP:tä ja 10 yksikköä T4 DNA-ligaasia. Tätä liuosta pidettiin 30 min ajan 37 °C:ssa, ja sitten T4 DNA-ligaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 10 min ajan 65 °C:ssa. Päätypolynukleotidit kinasoitiin sekoittamalla 52 µl edellä olevaa reaktiota, 4 µl liuosta, joka sisälsi 10 mM ATP:tä ja 5 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia. Tätä liuosta pidettiin 30 min ajan 37 °C:ssa, ja sitten T4-polynukleotidikinaasi inaktivoitiin pitämällä liuosta 10 min ajan 65 °C:ssa.

Taulukko 2

SEKV. ID.NRO		
(25)	01)	5′ TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCAT 3′
(26)	02)	5′ AATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATT 3′
(27)	03)	5′ GTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCC 3′
(28)	04)	5′ GAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG 3′
(29)	05)	5′ GTATTTCATTATGACTGTCTCCTTGGCGACTAGTTTAGAA-TTCAAGCT 3′
(30)	06)	5′ CAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAG 3′
(31)	07)	5′ TGACGAGCTCGGCCATGGCTGGTTGGG 3′
(32)	08)	5′ TCGACGGCCGCTTAACTCTAGAAC 3′

Täydellinen synteettinen DNA-insertio liitettiin suoraan Lambda Zap™ II -vektoriin, joka kuvataan esimerkissä 1a1), ja joka oli aikaisemmin sulatettu restriktioentsyymeillä Sac I ja Xho I. Liitosseos pakattiin valmistajan ohjeiden mukaan käyttämällä Gigapack II Gold -pakkausuutetta (Stratagene). Pakattu liitsoseos levitettiin XL1-Blue -soluille (Stratagene). Yksittäiset lambdatäplät kairattiin, ja insertit leikattiin valmistajan (Stratagene) Lambda Zap™ II:tqa varten toimittaman in vivo -leikkaustyöohjeen mukaan. Tämä in vivo -leikkaustyöohje siirsi kloonatun insertin Lambda Lc2 -vektorista plasmidifagemidivektoriin, joka sallii helpon manipuloinnin ja sekvensöinnin. Edellä olevien kloonausvaiheiden tarkkuus varmistettiin sekvensöimällä insertin käyttämällä valmistajan ohjeita AMV Reverse Transcriptase ^{35}S-dATP -sekvensöintireagenssipakkausta (Stratagene). Tulokseksi saadun

Lc2-ekspressiovektorin (Lambda Lc2) sekvenssi esitetään kuviossa 3. Kumpikin juoste luetellaan erikseen sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NROna 3 ja SEKV. ID.NROna 4. Tulokseksi saatu Lc2 -vektori esitetään kaaviomaisesti kuviossa 4.

Eräs edullinen vektori keksinnön mukaiseen käyttöön, ja jota kutsutaan nimellä Lambda Lc3, on edellä valmistetun Lambda Lc2 johdannainen. Lambda Lc2 sisältää Spe I -restriktiokohdan, joka sijaitsee 3'-suuntaan EcoR I -restriktiokohdasta ja 5'-päähän Shine-Dalgarno -ribosomin sitoutumiskohdasta, kuten esitetään sekvenssissä kuviossa 3 ja SEKV. ID.NROssa 3. Lambda Hc2:ssa on läsnä myös Spe I -restriktiokohta kuten kuvioissa 1 ja 2 ja SEKV. ID.NROssa 1 esitetään. Konstruoitiin kombinaatiovektori, jota kutsutaan nimellä pComb, yhdistämällä Lambda Hc2:n ja Lc2:n osia yhteen tavalla, joka kuvataan esimerkissä 1a4) alla. Tulokseksi saatu kombinaatio-pComb-vektori sisälsi kaksi Spe I-restriktiokohtaa, joista toinen oli aikaansaatu Lambda Hc2:lla ja toinen oli aikaansaatu Lambda Lc2:lla, jolloin näiden välissä oli EcoR I -kohta. Kahden Spe I -restriktiokohdan läsnäolosta huolimatta, DNA -homologit, joissa oli kohesiiviset Spe I- ja EcoR I-päät, liitettiin menestyksekkäästi suunnatusti pComb -ekspressiovektoriin, joka oli aikaisemmin sulatettu Spe I:llä ja EcoR I:llä alla esimerkissä 1b kuvatulla tavalla. EcoR I -restriktiokohdan läheisyys 3'-pään Spe I-kohtaan nähden, joka oli aikaansaatu Lc2 -vektorilla, esti 3'-pään Spe I -kohdan täydellisen sulamisen. Siten pComb:n sulatus Spe I:llä ja EcoR I:llä ei antanut tulokseksi kahden Spe I-kohdan välisen Eco I:n poistamista.

Toisen Spe I -restriktiokohdan läsnäolo voi olla ei-toivottavaa liitoksille pComb -vektoriin, joka on sulatettu vain Spe I:llä, koska näiden kahden kohdan välinen alue poistuisi. Sen vuoksi Lambda Lc2:n johdannainen, josta puuttuu toinen eli 3'-pään Spe I-kohta, ja jota kutsutaan nimellä Lambda Lc3, tuotettiin sulattamalla Lambda Lc2:n ensin Spe I:llä linearisoidun vektorin muodostamiseksi. Päät täytet-

tiin tylppien päiden muodostamiseksi, jotka liitetään yhteen, jolloin tulokseksi saadaan Lambda Lc3, josta puuttuu Spe I -kohta. Lambda Lc3 on kombinaatiovektorin konstruoinnissa käyttöön edullinen vektori, kuten alla kuvataan.

4) pComb:n valmistus

Fagemidit leikattiin ekspressiovektoreista Lambda Hc2 tai Lambda Lc2 käyttämällä edellä kuvattua in vivo-leikkaustyöohjetta käyttämällä. Kaksijuosteinen DNA valmistettiin fagemidia sisältävistä soluista menetelmillä, jotka kuvataan julkaisussa: Holmes et al.; Anal. Biochem., 114:193 (1981). In vivo -leikkauksesta tulokseksi saadut fagemidit sisälsivät samat nukleotidisekvenssit vasta-ainefragmentin kloonausta ja ekspressiota varten, kuin emävektorit, ja niitä kutsutaan nimillä fagemidi Hc2 ja Lc2, vastaten Lambda Hc2:ta ja Lc2:ta, vastaavasti.

Kombinaatiofagemidivektorin pComb konstruoimiseksi, joka tuotettiin fagemidin Hc2 ja fagemidin Lc2 osia yhdistämällä, fagemidi Hc2 sulatettiin ensin Sac I:llä 5'-suuntaan LacZ-promoottista sijaitsevan restriktiokohdan poistamiseksi. Sitten linearisoitu fagemidi tehtiin tylppäpäiseksi T4-polymeraasilla ja liitettiin antamaan tulokseksi Hc2-fagemidin, josta puuttuu Sac I-kohta. Sitten modifioitu Hc2-fagemidi ja Lc2-fagemidi restriktiosulatettiin erikseen Sca I:llä ja EcoR I:llä, jolloin saatiin tulokseksi Hc2-fragmentti, jossa oli 5':sta 3':uun Sca I-, Not I-, Xho I-, Spe I- ja EcoR I -restriktiokohdat, ja Lc2-fragmentti, jossa oli 5':sta 3':uun EcoR I-, Sac I-, Xba I- ja Sac I -restriktiokohdat. Sitten linearisoidut fagemidit liitettiin yhteen vastaavissa kohesiivisissa päissään muodostamaan pComb'in, rengasmaisen fagemidin, jossa oli lineaarinen restriktiokohtien järjestys Not I, Xho I, Spe I, EcoR I, Sac I, Xba I, Not I, Apa I ja Sca I. Sitten liitetty fagemidivektori insertoitiin sopivaan bakteeri-isäntään, ja transformantit valittiin ampisilliini-antibiootilla.

Valitut ampisilliiniresistentit transformantit seulottiin kahden Not I -kohdan läsnäolon suhteen. Tulokseksi saatu ampisilliiniresistentti kombinaatiofagemidivektori sai nimen pComb, sen kaaviomainne järjestäytyminen esitetään kuviossa 5. Tulokseksi saatu kombinaatiovektori, pComb, koostui DNA-molekyylistä, jossa oli kaksi kasettia ekspressoimaan kahta fuusioproteiinia ja jossa oli nukleotidijäännössekvenssit seuraavia toimintakykyisesti liitettyjä elementtejä varten lueteltuna 5′ → 3′ -suunnassa: ensimmäinen kasetti, joka koostuu indusoitavasta LacZ -promoottorista ylävirtaan LacZ -geenistä; Not I -restriktiokohta; ribosomin sitoutumiskohta; pelB -johto; välike; kloonausalue, jonka rajoina olivat 5′-päässä Xho- ja 3′-päässä Spe I -restriktiokohta; dekapeptidiloppupää, jonka jälkeen seurasi ekspressiokontrollin lopetussekvenssit; EcoR I -restriktiokohta, joka sijaitsi 5′-suunnassa suhteessa toiseen kasettiin, joka koostui ekspressiokontrolliribosominsitoutumiskohdasta; pelB -johto; välikealue; kloonausalue, jonka rajoina oli 5′-päässä Sac I- ja 3′-päässä Xba I -restriktiokohta, minkä jälkeen seurasi ekspressiokontrolin lopetussekvenssit ja toinen Not I -restriktiokohta.

Eräs edullinen keksinnössä käytettävä kombinaatiovektori, joka sai nimen pComb2, konstruoidaan yhdistämällä osia fagemidista Hc2 ja fagemidista Lc3 edellä pComb:n valmistukselle kuvatulla tavalla. Tulokseksi saatu kombinaatiovektori, pComb2, koostui DNA-molekyylistä, jossa oli kaksi kasettia, jotka olivat pComb:n kanssa identtiset ekspressoimaan kahta fuusioproteiinia pComb:n kanssa identtisesti paitsi, että toinen Spe I -restriktiokohta toisesta kasetista on poistettu.

b. pCombIII-vektorin konstruointi fuusioproteiinien ekspressoimiseksi, joissa on bakteriofagin kuoriproteiinimembraaniankkuri

Edellä valmistettu pComb-fagemidiekspressiovektori on multippeleista endonukleaasirestriktiokloonauskohdista johtuen

modifiointiin käyttökelpoinen kloonausvehikkeli keksinnön mukaisesti käytettävän ekspressiovektorin valmistuksessa. Tätä varten pComb sulatettiin EcoR I:llä ja Spe I:llä, minkä jälkeen seurasi fosfataasikäsittely linearisoidun pComb'in tuottamiseksi.

1) pCombIII:n valmistus
Konstruoitiin erillinen fagemidiekspressiovektori käyttämällä sekvenssejä, jotka koodittavat bakteriofagi cpIII:n membraaniankkuridomeenia. PCR-tuote, joka määrittää DNA-sekvenssin, joka koodittaa filamenttifagin kuoriproteiinia, cpIII, membraaniankkuria, joka sisältää LacZ-promoottori-aluesekvenssin 3'-suuntaan membraaniankkurista keveän ketjun ekspressiota varten, ja Spe I- ja EcoR I-kohesiiviset päät valmistettiin M13mp18:sta, kaupallisesti saatavasta bakteriofagivektorista (Pharmacia, Piscataway, New Jersey).

Modifioidun cpIII:n valmistamiseksi eristettiin ensin replikoituvaa DNA-muotoa M13mp18:sta. Lyhyesti, 2 ml:aan LB:tä (Luria-Bertani -väliaine) sekoitettiin 50 µl viljelmää bakteerikannasta, joka sisältää F'-episomin (JM107, JM109 tai TG1), jolloin 1/10 bakteriofagipartikkelien suspensiosta oli peräisin yhdestä ainoasta täplästä. Seosta inkuboitiin 4 - 5 tunnin ajan 37 °C:ssa vakiosekoituksella. Sitten seosta sentrifugoitiin 12 000 x g:llä 5 min ajan infektoitujen bakteerien pelletöimiseksi. Kun supernatantti oli poistettu, pelletti suspendoitiin uudelleen voimakkaasti pyörteellä sekoittaen 100 µl:aan jääkylmää liuosta I. Liuos I valmistettiin sekoittamalla 50 mM glukoosia, 10 mM EDTA (dinatriumetyleenidiamiinitetraetikkahappo) ja 25 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 8,0, ja autoklavoimalla 15 min ajan.

Bakteerisuspensioon sekoitettiin 200 µl juuri valmistettua liuosta II, ja putki käännettiin nopeasti viidesti ylösalaisin. Liuos II valmistettiin sekoittamalla 0,2 N NaOH:ta ja 1 % SDS:ää. Bakteerisuspensioon sekoitettiin 150 µl jääkylmää liuosta III, ja putkea sekoitettiin varovasti pyörteillä

ylösalaisessa asemassa 10 s ajan liuoksen III dispergoimiseksi viskoosilla bakteerilysaatilla. Liuos III valmistettiin sekoittamalla 60 ml 5 M kaliumasetaattia, 11,5 ml jääetikkaa ja 28,5 ml vettä. Tulokseksi saatua bakteerialysaattia säilytettiin jäässä 5 min akan, minkä jälkeen sentrifugoiriin 12 000 x g:llä 5 min ajan 4 °C:ssa mikrofuugissa. Tulokseksi saatu supernatantti otettiin talteen ja siirrettiin uuteen putkeen. Supernatanttiin lisättiin yhtä suuri tilavuus fenoli/kloroformia, ja seosta sekoitettiin pyörteillä. Sitten seosta sentrifugoitiin 12 000 x g:llä 2 min ajan mikrofuugissa. Tulokseksi saatu supernatantti siirrettiin uuteen putkeen, ja kaksijuosteinen bakteriofagi-DNA saostettiin 2 tilavuudella etanolia huoneenlämpötilassa. Kun seos oli saanut seistä huoneenlämpötilassa 2 min ajan, seos sentrifugoitiin DNA:n pelletöimiseksi. Supernatantti poistettiin, ja pelletöity reploituva DNA-muoto suspendoitiin uudelleen 25 µl:aan Tris-HCl:ää pH-arvossa 7,6, ja 10 mM EDTA:han (TE).

Sitten käytettiin kaksijuosteista M13mp18:n replikoituvaa DNA-muotoa templaattina geenin eristykseen, joka koodittaa membraaniankkuridomeenia cpIII:ssa, jonka sekvenssi luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NROna 33. Membraaniankkuridomeeni-cpIII:n aminohappotähdesekvenssi luetellaan SEKV. ID.NROssa 34. M13mp18:n replikoituva DNA-muoto valmistettiin edellä kuvatulla tavalla, ja käytettiin templaattina kahteen PCR-amplifiointiin DNA-fragmentin konstruoimiseksi, joka koostuu kypsästä geenistä cpIII-membraaniankkuridomeenia varten, joka sijaitsee 5'-suuntaan sekvenssistä, joka koodittaa LacZ-promoottoria, operaattoria ja cap-sitomiskohtaa keveän ketjun ekspression kontrolloimiseksi. Restriktiokohdat, Spe I ja EcoR I, luotiin amplifiointireaktioissa, ja ne paikannettiin fragmentin 5'- ja 3'-päihin, vastaavasti. Alla kuvataan menetelytapa tämän fragmentin luomiseksi yhdistämällä kahden erillisen PCR-amplifioinnin tuotteet.

Alukeparia, G-3(F) (SEKV. ID.NRO 35) ja G-3(B) (SEKV. ID.NRO 36), joka luetellaan taulukossa 3, käytettiin ensimmäisessä PCR-reaktiossa edellä suoritetulla tavalla amplifioimaan cpIII-membraaniankkurigeenin ja sisällyttämään Spe I- ja Nhe I-restriktiokohdat fragmenttiin. PCR-reaktiota varten 2 µl, joka sisälsi 1 ng M13mp18:n replikoituvaa DNA-muotoa, sekoitettiin 0,5-ml mikrofuugiputkessa 10 µl:n kanssa 10X PCR -puskuria, joka ostettiin kaupallisesti (Promega Biotech, Madison, Wisconsin). DNA-seokseen sekoitettiin 8 µl 2,5 mM dNTP'iden liuosta (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), jolloin tulokseksi saatiin lopullinen konsentraatio 200 µM. DNA-liuokseen sekoitettiin 3 µl (vastaten 60 pmol G-3(F) -aluketta ja 3 µl (60 pM) 3'-pään taaksepäin suunnattua G-3(B) -aluketta. Seokseen lisättiin 73 µl steriiliä vettä ja 1 µl/5 yksikköä polymeraasia (Promega Biotech). Seoksen päälle lisättiin 2 tippaa mineraaliöljyä, ja suoritettiin 40 kierrosta PCR-amplifiointia lämpösyklilaitteessa. Amplifiointisykli koostui 52 °C:sta 2 min ajan, 72 °C:sta 1,5 min ajan ja 91 °C:sta 2 min ajan. Sitten tulokseksi saatua, M13mp18:sta olevaa PCR-modifioitua cpIII-membraaniankkuridomeeni-DNA-fragmenttia sisältävät näytteet puhdistettiin Gene Clean'illa (BIO101, La Jolla, Kalifornia), uutettiin kahdesti fenoli/kloroformilla, kerran kloroformilla, sen jälkeen saostettiin etanolilla, ja varastoitiin -70 °C:ssa 10 mM Tris-HCl:ssä pH-arvossa 7,5, ja 1 mM EDTA:ssa.

Tulokseksi saatu PCR-modifioitu cpIII-DNA-fragmentti, jossa oli Spe I- ja Nhe I-kohdat fragmentin 5'- ja 3'-päässä, vastaavasti, varmistettiin elektroforeesilla 1-%:sessa agaroosigeelissä. Agaroosissa oleva alue, joka sisälsi modifioidun cpIII-DNA-fragmentin, eristettiin agaroosista. PCR-modifioidun cpIII-membraaniankkuridomeeni-DNA-fragmentin sekvenssi luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NROna 40. Tulokseksi saatu amplifioitu PCR-fragmentti sisälsi myös nukleotidisekvenssit viiden aminohapon narua varten, joka koostui neljästä glysiinitähteestä ja yhdestä seriinistä asetettuina rinnan raskasta ketjua ja cpIII:a koodittavien

domeenien väliin. Kerran ekspressoiduttuaan viiden aminohappotähteen sekvenssi, josta puuttui täsmällinen sekundaarinen rakenne, toimi Fab- ja cpIII-domeenien välisen vuorovaikutuksen minimoiden.

Toinen PCR-amplifiointi käyttämällä alukepareja, Lac-F (SEKV. ID.NRO 37) ja Lac-B (SEKV. ID.NRO 38), jotka luetellaan taulukossa 3, suoritettiin erillisellä erällä M13mp18 replikoituvan muodon templaatti-DNA:lla LacZ-promoottorin, operaattorin ja Cap-sitoutumiskohdan, jossa on 5'-päässä Nhe I-kohta ja 3'-päässä EcoR I-kohta. Tässä amplifioinnissa käytetyt alukkeet suunniteltiin sisällyttämään amplifioidun fragmentin 5'-päähän Nhe I-kohdan olemaan limittäin cpIII-geenifragmentin 3'-pään osan ja Nhe I-kohdan osan kanssa 3'-suuntaan amplifioitavasta cpIII-fragmentista. Reaktio ja PCR-tuotteen puhdistus suoritettiin edellä kuvatulla tavalla. Tulokseksi saadun, 5'-pään Nhe I- ja 3'-pään EcoR I-restriktiokohdan sisältävän, PCR-modifioidun cpIII-DNA-fragmentin sekvenssi luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID. NROna 41.

Eräs vaihtoehtoinen Lac-B -aluke cpIII-membraaniankkuri- ja LacZ-promoottorialueen konstruoinnissa käyttöön oli Lac-B', joka esitetään taulukossa 3. Amplifiointireaktiot suoritettiin amplifioinnille kuvatulla tavalla, Lac-B:n sijasta käytettiin Lac-B':a, jossa oli Lac-F. Tuote amplifiointireaktiosta luetellaan sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NROna 41 nukleotidiasemasta 1 nukleotidiasemaan 172. Lac-B':n käyttö antoi tulokseksi LacZ-alueen, josta puuttui 29 nukleotidia 3'-päästä, mutta se oli funktionaalisesti ekvivalentti pitemmän, Lac-F- ja Lac-B -alukkeilla tuotetun fragmentin kanssa.

Sitten tuotteen ensimmäisestä ja toisesta PCR-amplifioinnista, joissa käytettiin alukepareja G-3(F) ja G-3(B) ja Lac-F ja Lac-B, yhdistettiin nukleotideissa, jotka vastaavat cpIII-membraaniankkurin limittäistä osaa ja Nhe I-restriktiokoh-

taa, ja alistettiin toiselle PCR-kierrokselle käyttäen G-3(F)- (SEKV. ID.NRO 35) ja Lac-B (SEKV. ID.NRO 38) -alukeparia muodostamaan rekombinaatio-PCR-DNA-fragmenttituotteen, joka koostui seuraavista: 5'-pään Spe I-restriktiokohta; cpIII-DNA-membraaniankkuridomeeni alkaen nukleotiditähdesekvenssistä, joka vastaa koko kypsän cpIII-proteiinin aminohappotähdettä 198; endogeenisen lopetuskohdan, jonka toimittaa membraaniankkuri aminohappotähteessä numero 112; Nhe I -restriktiokohta, LacZ -promoottori, operaattori ja Cap-sitoutumiskohtasekvenssi; ja 3'-pään EcoR I -restriktiokohta.

Fagemidivektorin konstruoimiseksi koordinoimaan esimerkissä 2 kuvatulla tavalla valmistetun raskas ketju-cpIII-fuusioproteiinin ekspressiota kappa-keveän ketjun kanssa, rekombinaatio-PCR-modifioitu cpIII-membraaniankkuridomeeni-DNA-fragmentti restriktiosulatettiin sitten Spe I:llä ja EcoR I:llä tuottamaan DNA-fragmentin suunnattua liittämistä varten samalla lailla sulatettuun pComb2-fagemidiekspressiovektoriin, jossa oli vain yksi esimerkissä 1a4) valmistettu Spe I-kohta, pComb2-III (kutsutaan myös nimellä pComb2-III) -fagemidiekspressiovektorin muodostamiseksi. Siten tuloksesi saatu ampisilliiniresistenssin antava pComb2-3-vektori, jossa oli vain yksi Spe I -restriktiokohta, sisälsi erilliset LacZ-promoottori/operaattori-sekvenssit raskas ketju-(Fd)-cpIII-fuusiotuotteen ja keveä ketju-proteiinin erillisen ekspression ohjaamiseksi. pelB-johtosekvenssit ohjasivat ekspressoidut proteiinit solulimatilaan funktionaalista kokoonpanoa varten membraanilla. Fagi F1-intergeenisen alueen sisällyttäminen vektoriin salli yksijuosteisen fagemidin pakkauksen auttajafagin avulla. Auttajafagisuperinfektion käyttö johti kahden cpIII-muodon ekspressioon. Siten normaalia fagimorfogeneesiä häiritsi auttajafagin Fab-cpIII-fuusio- ja natiivi-cpIII:n kilpailu virioniin pääsystä Fab-cpVIII-fuusioihin. Lisäksi keksinnön mukaiseen käyttöön otetaan lukuun myös vektorit, jotka antavat klooriamfenikoliresistenssin, ja vastaavat.

Eräs edullisempi keksinnössä käyttöön tarkoitettu fagemidiekspressiovektori, jossa on lisärestriktioentsyymikloonauskohdat, ja jota kutsutaan nimellä pComb-III' tai pComb2-3', valmistettiin tavalla, joka kuvataan edellä pComb2-3:lle, lisäten 51 emäsparin fragmentin pBluescript'-ista, joka kuvataan julkaisussa: Short et al.; Nuc. Acids Res., 16:7583-7600 (1988), ja kaupallisesti saatavissa yhtiöstä Stratagene. pComb2-3':n valmistamiseksi pComb2-3 sulatettiin ensin Xho I- ja Spe I-restriktioentsyymeillä linearisoidun pComb2-3:n muodostamiseksi. Vektori pBluescript sulatettiin samoilla entsyymeillä, jolloin vapautui 51 emäsparin fragmentti, joka sisälsi restriktioentsyymikohdat Sal I, Acc I, Hinc II, Cla I, Hind III, EcoR V, Pst I, Sma I ja BamH I. 51 emäsparin fragmentti liitettiin pComb2-3 -vektoriin kohesiivisilla Xho I- ja Spe I-päätteillä pComb2-3':n muodostamiseksi.

Taulukko 3

SEKV. ID.NRO	Aluke	
(35)[1]	G-3 (F)	5' GAGACGACTAGTGGTGGCGGTGGCTCTCCATTC GTTTGTGAATATCAA 3'
(36)[2]	G-3 (B)	5' TTACTAGCTAGCATAATAACGGAATACCCAAAA GAACTGG 3'
(37)[3]	LAC-F	5' TATGCTAGCTAGTAACACGACAGGTTTCCCGAC TGG 3'
(38)[4]	LAC-B	5' ACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGGTC 3'
(39)[5]	LAC-B'	5' AGCTGTTGAATTCGTGAAATTGTTATCCGCT 3'

F Eteenpäin-aluke

B Taaksepäin-aluke

1 5':sta 3':iin: Spe I-restriktiokohtasekvenssi on yksinkertaisesti alleviivattu; osittain päällekkäinen sekvenssi cpIII:n 5'-pään kanssa on kaksoisalleviivattu

2 5':sta 3':uun: Nhe I-restriktiokohtasekvenssi yksinkertaisesti alleviivattu; osittain päällekkäinen sekvenssi cpIII:n 3'-pään kanssa on kaksoisalleviivattu.

3 5′:sta 3′:uun: osittain limittäinen sekvenssi cpIII:n 3′-pään kanssa on kaksoisalleviivattu; Nhe I-restriktiosekvenssi alkaa nukleotiditähteellä "G" asemassa 4, ja yltää vielä 5 tähteen verran = GCTAGC.

4 EcoR I-restriktiokohdan sekvenssi on yksinkertaisesti alleviivattu.

5 Vaihtoehtoinen taaksepäin suuntautuva aluke LacZ:n amplifioimiseksi; EcoR I-restriktiokohdan sekvenssi on yksinkertaisesti alleviivattu.

2. Kaksikistronisesta ekspressiovektorista pComb2-3 tuotettujen HIV-1-spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden eristys

Keksinnön toteutuksessa vasta-aineiden raskaat (Fd, joka koostuu V_H:sta ja C_H1:stä) ja keveät (kappa) ketjut (V_L, C_L) kohdistetaan ensin E. coli'n solulimaan heterodimeeristen Fab-molekyylien kokoonpanoa varten. Vasta-aine-Fab-kirjastojen ekspression saamiseksi fagipinnalla joko Fd- tai keveää ketjua koodittavien nukleotiditähdesekvenssien on oltava liitetty toimintakykyisesti nukleotiditähdesekvenssiin, joka koodittaa filamenttibakteriofagikuoriproteiinimembraaniankkuria. Eräs kuoriproteiini käytettäväksi tässä keksinnössä membraaniankkurin aikaansaamisessa on III (cpIII tai cp3). Tässä kuvatuissa esimerkeissä menetelmät kuvataan Fd-ketjua koodittavan nukleotiditähdesekvenssin liittäminen toimintakykyisesti cpIII-membraaniankkuriin keksinnön mukaisessa fuusioproteiinissa.

Fagemidivektorissa ensimmäinen ja toinen kistroni, jotka koostuvat käännettävistä DNA-sekvensseistä, liitetään toimintakykyisesti kaksikistronisen DNA-molekyylin muodostamiseksi. Kumpikin kistroni kaksikistronisessa DNA-molekyylissä on liittynyt DNA-ekspressionkontrollisekvensseihin fuusioproteiinin, Fd-cpIII, ja kappa-keveän ketjun koordinoitua ekspressiota varten.

Ensimmäinen kistroni koodittaa solulimaanerityssignaalia (pelB-johto) liitettynä toimintakykyisesti fuusioproteiiniin, Fd-cpIII. Toinen kistroni koodittaa toista pelB-johtoa liitettynä toimintakykyisesti kappa-keveään ketjuun. pelB-johdon läsnäolo helpottaa sekä fuusioproteiinin että keveän ketjun koordinoitua mutta erillistä erittymistä bakteerin solulimasta solulimatilaan.

Tässä menetelmässä fagemidiekspressiovektori kantaa Fd-cpIII-fuusion ja kappa-ketjun lisäksi ampisilliinilla valittavissa olevan resistenssimerkkigeenin (ß-laktamaasi eli bla). f1-fagi-replikaation alku helpottaa yksijuosteisen fagemidin luomista. Fd-cpIII-fuusiota (V_H, C_{H1}, cpIII) ja keveää ketjua (V_L, C_L) koodittavan kaksikistronisen lähetin isopropyyli-tiogalaktopyranosidi(IPTG) -indusoitu ekspressio johtaa raskaiden ja keveiden ketjujen muodostumiseen. Kunkin ketjun vapauttaa solulimatilaan pelB-johtosekvenssi, joka seuraavaksi katkaistaan. Raskas ketju ankkuroidaan membraaniin cpIII-membraaniankkuridomeenilla kun taas keveä ketju erittyy solulimaan. Raskas ketju kokoontuu keveän ketjun läsnäollessa Fab-molekyylejä muodostaen. Tämä sama tulos voidaan saavuttaa jos, vaihtoehdossa, keveä ketju ankkuroidaan membraaniin keveän ketjun fuusioproteiimin kautta, jossa on membraaniankkuri, ja raskas ketju erittyy pelB-johdon kautta solulimaan.

E. colin seuraavassa infektiossa auttajafagilla, filamenttibakteriofagin kokoonpanon edistyessä kuoriproteiini III sisällytetään bakteriofagin häntään.

a. Imusolu-RNA:n valmistus

5 ml luuydintä poistettiin imemällä oireettomilta HIV-1-seropositiivisilta yksilöiltä. Kokosolu-RNA valmistettiin luuydinimusoluista edellä kuvatulla tavalla käyttämällä RNA-valmistusmenetelmiä, jotka on kuvattu julkaisussa: Chomczynski et al.; Anal Biochem., 162:156-159 (1987), ja käyttämällä RNA-eristysreagenssipakkausta (Stratagene) valmistajan

ohjeiden mukaan. Lyhyesti, eristetyssä luuytimessä olevien solujen välitöntä homogenisointia varten eristettyyn luuytimeen sekoitettiin 10 ml denaturointiliuos, joka sisälsi 3,0 M guanidiniumisotiosyanaattia sisältäen 71 µl ß-merkaptoetanolia. Sitten homogenisoitujen solujen kanssa sekoitettiin 1 ml natriumasetaattia konsentraatiossa 2 M pH-arvossa 4,0. Yksi ml fenolia, joka oli aikaisemmin kyllästetty H_2O:lla, sekoitettiin myös denaturointiliuokseen, joka sisälsi homogenisoidun pernan. Tähän homogenaattiin lisättiin kaksi ml kloroformi:isoamyylialkoholi (24:1 tilavuus/tilavuus) -seosta. Homogenaattia sekoitettiin voimakkaasti 10 s ajan ja pidettiin jäässä 15 min ajan. Sitten homogenaatti siirrettiin paksuseinäiseen 50-ml polypropyleenisentrifugiputkeen (Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA). Liuosta sentrifugoitiin 10 000 x g:llä 20 min ajan 4 °C:ssa. Ylempi, RNA:ta sisältävä vesikerros siirrettiin tuoreeseen 50-ml:n polypropyleenisentrifugiputkeen, ja sekoitettiin yhtä suuren tilavuuden kanssa isopropanolia. Tätä liuosta pidettiin -20 °C:ssa ainakin yhden tunnin ajan RNA:n saostamiseksi. Liuosta, joka sisälsi saostettua RNA:ta, sentrifugoitiin 10 000 x g:llä 20 min ajan 4 °C:ssa. Pelletöity kokosolu-RNA kerättiin ja liuotettiin 3 ml:aan edellä kuvattua denaturointiliuosta. Uudelleen suspendoituun kokosolu-RNA:han lisättiin 3 ml isopropanolia, ja sekoitettiin voimakkaasti. Tätä liuosta pidettiin -20 °C:ssa ainakin yhden tunnin ajan RNA:n saostamiseksi. Saostettua RNA:ta sisältävää liuosta sentrifugoitiin 10 000 x g:llä 10 min ajan 4 °C:ssa. Pelletöity RNA pestiin kerran liuoksella, joka sisälsi 75 % etanolia. Pelletöityä RNA:ta kuivattiin tyhjössä 15 min ajan, ja suspendoitiin sitten uudelleen dimetyylipyrokarbonaattikäsiteltyyn (DEPC-H_2O) H_2O:hon.

Lähetti-RNA:ta (mRNA), jota oli rikastettu sekvenssien suhteen, jotka sisälsivät pitkiä poly A-alueita, valmistettiin kokosolu-RNA:sta käyttämällä menetelmiä, jotka kuvataan käsikirjassa: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis et al., toimittaja, Cold Spring Harbor, NY, (1982).

Lyhyesti, puolet kokonais-RNA:sta, joka eristettiin yhdeltä luovuttajalta, ja valmistettiin edellä kuvatulla tavalla, suspendoitiin yhteen ml:aan DEPC-H_2O:ta ja pidettiin 5 min ajan 65 °C:ssa. Uudelleen suspendoituun RNA:han sekoitettiin yksi ml 2X suuren suolamäärän sisältävää puskuria, joka koostui 100 mM Tris-HCl:stä, 1 M NaCl:stä, 2,0 mM EDTA:sta pH-arvossa 7,5, ja 0,2 %:sta SDS, ja seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan.

Sitten puhdistettua kokonais-mRNA:ta käytettiin PCR-amplifiointireaktioissa esimerkissä 2c kuvatulla tavalla. Vaihtoehtoisesti mRNA:ta puhdistettiin edelleen poly A+ RNA:ksi seuraavalla menettelytavalla. Kokonais-MRNA lisättiin oligo-dT:hen (Collaborative Research tyyppi 2 tai tyyppi 3) -kolonniin, joka oli valmistettu aikaisemmin pesemällä oligo-dT:tä liuoksella, joka sisälsi 0,1 M natriumhydroksidia ja 5 mM EDTA:ta ja sitten kolonni tasapainotettiin DEPC-H_2O:lla. Eluaatti kerättiin steriiliin polypropyleeniputkeen, ja lisättiin uudelleen samaan kolonniin sen jälkeen kun eluaattia oli kuumennettu 5 min ajan 65 °C:ssa. Sitten oligo-dT-kolonni pestiin 2 ml:lla suuren suolamäärän sisältävää puskuria, jossa oli 50 mM Tris-HCl;ää pH-arvossa 7,5, 500 mM natriumkloridia, 1 mM EDTA:ta pH-arvossa 7,5 ja 0,1 % SDS:ää. Sitten oligo-dT-kolonni pestiin 2 ml:lla 1X keskinkertaisen suolamäärän sisältävää puskuria, jossa oli 50 mM Tris-HCl:ää, pH 7,5, 100 mM, 1 mM EDTA:ta ja 0,1 % SDS:ää. Lähetti-RNA eluoitiin oligo-dT -kolonnista 1 ml:lla puskuria, joka koostui 10 mM Tris-HCl:stä pH-arvossa 7,5, 1 mM EDTA:sta pH-arvossa 7,5, ja 0,05-%:sta SDS:ää. Lähetti-RNA puhdistettiin uuttamalla tätä liuosta fenoli/kloroformilla, minkä jälkeen seurasi yksi ainoa uutto 100-%:isella kloroformilla. Lähetti-RNA konsentroitiin etanolisaostuksella ja suspendoitiin uudelleen DEPC-H_2O:hon.

Tulokseksi saatu puhdistettu mRNA sisälsi suuren joukon anti-HIV:tä koodittavia V_H- ja V_L-sekvenssejä anti-HIV-1-Fab-DNA-kirjaston valmistamiseksi.

b. Kombinaatio-HIV-1-vasta-ainekirjaston konstruointi

1) Oligonukleotidialukkeiden valinta

Immunoglobuliiniproteiini-CDR'iä koodittavat nukleotidisekvenssit ovat hyvin vaihtelevia. On kuitenkin olemassa useita säilyneiden sekvenssien alueita, jotka reunustavat joko keveän tai raskaan ketjun V-alueen domeeneja, esimerkiksi, ja jotka sisältävät oleellisen säilyneitä nukleotidisekvenssejä, ts. sekvenssejä, jotka hybridisoituvat samaan alukesekvenssiin. Sen vuoksi konstruoitiin polynukleotidisynteesi(amplifiointi) -alukkeita, jotka hybridisoituvat säilyneisiin sekvensseihin ja sisällyttävät tuotettuun DNA-homologiin restriktiokohdat, jotka soveltuvat syntetisoitujen DNA-fragmenttien liittämisen toimintakykyisesti vektoriin. Erityisemmin alukkeet suunniteltiin niin, että tulokseksi saadut tuotetut DNA-homologit voidaan insertoida keksinnön mukaiseen ekspressiovektoriin lukuvaiheistukseen ylävirran käännettävän DNA-sekvenssin kanssa vektorin alueella, joka sisältää suunnatusti liittävän välineen.

V_H-domeenien amplifiointia varten suunniteltiin alukkeet lisäämään kohesiiviset päät, jotka ovat yhteensopivat pComb2-3-ekspressiovektorin ainutlaatuisiin Xho I- ja Spe I-kohtiin suunnatusti liittämisen kanssa. Kaikissa tapauksissa, suunniteltiin 5'-pään alukkeet VH1a (5' CAGGTGCAGCTCGAGCAGTCTGGG 3' SEKV. ID.NRO 42) ja VH3a (5' GAGGTGCAGCTCGAGGAGTCTGGG 3' SEKV. ID.NRO 43) maksimoimaan homologian V_H1- ja V_H3-alaryhmäperheiden kanssa, vastaavasti, vaikka odotettiin muiden alaryhmien merkittävää ristialustusta. Xho I-restriktiokohta pComb2-3-vektoriin kloomaamista varten on alleviivattu. 3'-aluketta CG1z, jolla on nukleotidisekvenssi 5' GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGGG 3' (SEKV. ID.NRO 44), jota käytettiin 5'-alukkeiden yhteydessä, on aluke raskasta ketjua varten, joka vastaa sarana-alueen osaa. Spe I-kohta pComb2-3-vektoriin kloonaamista varten on alleviivattu.

V_L-domeenia koodittavat nukleotidisekvenssit ovat hyvin

vaihtelevia. Kuitenkin on useita säilyneiden sekvenssien alueita, jotka reunustavat V_L-domeeneja, mukaan lukien J_L, V_L-kehysalueet ja V_L-johto/promoottori. Sen vuoksi konstruoitiin amplifiointialukkeet, jotka hybridisoituvat säilyneisiin sekvensseihin ja sisällyttävät restriktiokohdat, jotka sallivat amplifioitujen fragmenttien kloonaamisen pComb2-3-ekspressiovektoriin, joka on leikattu Sac I:llä ja Xba I:llä.

Edellä luetelluille raskaan ketjun alukkeille analogisten kappa-V_L-domeenien amplifiointia varten käytettiin 5'-alukkeita VK1a (5' GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCA 3' SEKV. ID.NRO 45) ja VK3a (5' GAAATTGAGCTCACGCAGTCTCCA 3' SEKV. ID.NRO 46). Nämä alukkeet lisäsivät myös Sac I-restriktioendonukleaasikohdan, joka ilmaistaan alleviivatuilla nukleotideilla, sallimaan V_L-DNA-homologin kloonaamisen pComb2-3-ekspressiovektoriin. Keveän ketjun amplifioimiseen käytettiin 3'-V_L-amplifiointialuketta, CK1a, jolla on nukleotidisekvenssi 5'

GCGCCGTCTAGAACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCAAG 3' (SEKV. ID.NRO 47), joka vastaa keveän ketjun 3'-päätä, samalla kun sisällytettiin alleviivattu Xba I-restriktioendonukleaasikohta, joka vaaditaan insertoimaan V_L-DNA-homologin pComb2-3-ekspressiovektoriin lisäämiseen.

Kaikki tässä kuvatut alukkeet ja synteettiset polynukleotidit joko ostettiin yhtiöstä Research Genetics in Huntsville, Alabama, tai syntetisoitiin Applied Biosystems DNA -syntetisaattorilla, malli 381A, valmistajan ohjeiden mukaan.

2) V_H- ja V_L-DNA-homologien PCR-amplifiointi

PCR-amplifiointin valmistuksessa edellä valmistettua mRNA:ta käytettiin templaattina cDNA-synteesiin alukkeenjatkoreaktiolla. Ensin 20 - 50 μg kokonais-mRNA:ta vedessä hybridisoitiin (emäspariutettiin) ensin 70 °C:ssa 10 min ajan 600 ng:n (60,0 pmol) kanssa edellä lueteltuja joko raskaan tai keveän ketjun 3'-alukkeita. Seuraavaksi hybridisoitua seosta

käytettiin tyypillisessä 50-µl käänteistranskriptioreaktiossa, joka sisälsi 200 µM kutakin dATP:stä, dCTP:stä, dGTP:stä ja dTTP:stä, 40 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 8,0, 8 mM $MgCl_2$:ta, 50 mM NaCl:ää, 2 mM spermidiiniä ja 600 yksikköä käänteistranskriptaasia (SuperScript, BRL). Sitten reaktioseosta pidettiin 1 tunnin ajan 37 °C:ssa RNA-cDNA-seoksen muodostamiseksi.

Sitten 3 µl tulokseksi saadusta RNA-cDNA-seoksesta käytettiin PCR-amplifioinnissa reaktiotilavuudessa 100 µl, joka sisälsi kaikkien neljän dNTP'n seosta konsentraatiossa 60 µM, 50 mM KCl:ää, 10 mM Tris-HCl:ää pH-arvossa 8,3, 15 mM $MgCl_2$:ta, 0,1 % gelatiinia ja 5 yksikköä Thermus aquaticus(Taq) -DNA-polymeraasia (Perkin-Elmer-Cetus, Emeryville, Kalifornia), ja 60 pmol edellä lueteltuja sopivia 5'- ja 3'-alukkeita. Erilliset reaktioseokset päällystettiin mineraaliöljyllä ja alistettiin 35 amplifiointisyklille. Kukin amplifiointisykli sisälsi denaturoinnin 91 °C:ssa 1 min ajan, emäspariuttamisen 52 °C:ssa 2 min ajan, ja polynukleotidisynteesin alukkeenjatkolla (epidennyksellä) 72 °C:ssa 1,5 min ajan, minkä jälkeen seurasi lopullinen ylläpitoajanjakso 10 min ajan 72 °C:ssa. Sitten reaktioseosten erä ajettiin erikseen elektroforeesilla 2-%:isella agaroosigeelillä. Geelielektroforeettisella vaelluksella määritetyn menestyksekkään amplifioinnin jälkeen amplifioitiin RNA-cDNA:n loppuosa, minkä jälkeen yhteisen 3'-alukkeen PCR-tuotteet yhdistettiin erillisiksi V_H:ta ja V_L:ta koodittavaa DNA-homologia sisältäviksi näytteiksi, ja uutettiin sitten kahdesti fenoli/kloroformilla, kerran kloroformilla, saostettiin etanolilla ja varastoitiin -70 °C:ssa 10 mM Tris-HCl:ssä pH-arvossa 7,5 ja 1 mM EDTA:ssa.

3) V_H:ta ja V_L:ää koodittavien DNA-homologien insertointi pComb2-3 ekspressiovektoriin

Edellä valmistetut V_H:ta koodittavat DNA-homologit (raskas ketju) sulatettiin sitten ylimäärällä Xho I:tä ja Spe I:tä seuraavaa liittämistä varten samalla lailla sulatettuun ja

linearisoituun pComb2-3:een kokonaistilavuudessa 150 µl 10 yksiköllä ligaasia 16 °C:ssa yön yli. Kirjaston konstruointi suoritettiin tavalla, joka on kuvattu julkaisussa: Burton et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:10134-10137 (1991). Lyhyesti, liittämisen jälkeen pComb2-3-vektori, joka sisälsi raskaan ketjun DNA:n, transformoitiin sitten elektroporaatiolla 300 µl:aan XL1-Blue -soluja. Transformoinnin ja kasvatuksen jälkeen kirjaston koko määritettiin siirtämällä viljelmän eriä levyille. Tyypillisesti kirjastossa oli noin 10^7 jäsentä. Sitten valmistettiin yön yli viljelmä, josta valmistettiin raskaan ketjun kirjaston sisältävä fagemidi-DNA.

$_{v}$L:ää koodittavien DNA-homologien (keveä ketju) kloonaamiseksi 10 µg raskaan ketjun kirjaston sisältävää fagemidi-DNA:ta sulatettiin sitten Sac I:llä ja SbaI:llä. Tulokseksi saatu linearisoitu vektori käsiteltiin fosfataasilla ja puhdistettiin agaroosigeelielektroforeesilla. Haluttu fragmentti, jonka pituus oli 4,7 kb, leikattiin geelistä. Tämän vektorin liittäminen valmistetun keveän ketjun PCR-DNA:n kanssa eteni raskaalla ketjulla edellä kuvatulla tavalla. Täten oli tuotettu kirjasto, jossa oli noin 10^7 jäsentä, joissa oli raskaan ketjun fragmentit liitettyinä toimintakykyisesti cpIII-ankkurisekvenssiin (Fd-cpIII) ja keveän ketjun fragmentteihin.

4) Fagia ekspressoivien Fab-heterodimeerien valmistus

Kun tulokseksi saatu, edellä valmistettu kirjasto oli transformoitu XL1-Blue-soluihin, valmistettiin fagi HIV-1-spesifisten Fab'ien eristyksen sallimiseksi pannaamalla kohdeantigeeneillä. Fagin eristämiseksi, jossa oli indusoitu heterodimeerin ekspressio, sekoitettiin 3 ml SOC-väliainetta (SOC valmistettiin sekoittamalla 20 g baktotryptonia, 5 g hiivauutetta ja 0,5 g NaCl:ää 1 litraan vettä, säätämällä pH-arvoon 7,5 ja sekoittamalla 20 ml glukoosia juuri ennen käyttöä Fd-cpIII- ja keveän ketjun heterodimeerin ekspression indusoimiseksi), ja viljelmää ravisteltiin nopeudella 220

r/min yhden tunnin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen 10 ml SB:ää (SB valmistettiin sekoittamalla 30 g tryptonia, 20 g hiivauutetta ja 10 g Mops-puskuria/l säätäen pH-arvoon 7), joka sisälsi 20 µg/ml karbenisilliinia ja 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja seosta ravisteltiin vielä tunnin ajan nopeudella 300 r/min. Tämä tulokseksi saatu seos sekoitettiin 100 ml:aan SB:tä, joka sisälsi 50 µg/ml karbenisilliinia ja 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja ravisteltiin yhden tunnin ajan, minkä jälkeen sekoitettiin auttajafaagia VCSM13 (10^{12} pfu), ja seosta ravisteltiin vielä 2 tunnin ajan. Tämän ajan jälkeen sekoitettiin 70 µg/ml kanamysiiniä, ja pidettiin 30 °C:ssa yön yli. Alhaisempi lämpötila antoi tulokseksi heterodimeerin paremman sisällyttämisen fagin pinnalle. Supernatantti kirkastettiin sentrifugoimalla (4000 r/min 15 min ajan JA10-roottorissa 4 °C:ssa). Fagi saostettiin sekoittamalla 4 % (paino/tilavuus) polyetyleeniglykoli 8000:tta ja 3 % (paino/tilavuus) NaCl:ää ja pidettiin 30 min ajan jäässä, minkä jälkeen sentrifugoitiin (9000 r/min 20 min ajan JA10 -roottorissa 4 °C:ssa). Fagipelletit suspendoitiin uudelleen 2 ml:aan PBS:ää, ja mikrosentrifugoitiin 3 min ajan solujäänteen pelletöimiseksi, siirrettiin tuoreisiin putkiin ja varastoitiin -20 °C:ssa seuraavaa alla kuvatulla tavalla seulontaa varten.

Titraavien kolonianmuodostusyksiköiden (cfu) määrittämiseksi fagit (pakatut fagemidit) laimennettiin SB:hen, ja käytettiin 1 µl infektoimaan 50 µl tuoreita (OD600 = 1) XL1-Blue-soluja, joita kasvatettiin SB:ssä, joka sisälsi 10 µg/ml tetrasykliiniä. Fageja ja soluja pidettiin 15 min ajan huoneenlämpötilassa, ja lisättiin sitten suoraan LB/karbenisilliini-levyille.

5) Anti-HIV-1-heterodimeerien valinta fagipinnoilla

(a) Fagikirjaston moninkertaiset pannaukset

Esimerkissä 2b4) tuotettu faagikirjasto pannattiin tässä kuvattua HIV-1-kanta IIIb:n yhdistelmä-DNA-gp120:tä vastaan päällystetyllä mikrotiitterilevyllä anti-gp120-heterodimee-

rien valitsemiseksi. Eräs toinen fagikirjasto pannattiin alempana kuvattua yhdistelmä-DNA-gp41:tä (American Biotechnologies, Boston, MA) vastaan anti-gp41-heterodimeerien suhteen valikoimiseksi.

Käytetty pannausmenettelytapa oli modifikaatio siitä, joka Parmley ja Smith alunperin kuvasivat (Parmley et al., Gene, 73:305-318 (1988). Suoritettiin 4 pannauskierrosta spesifisten antigeeniä sitovien kloonien rikastamiseksi. Tätä menettelytapaa varten neljä mikrotiitterilevyn (Costar 3690) kaivoa päällystettiin yön yli 4 °C:ssa 25 µl:lla 40 µg/ml edellä valmistettua gp120:tä tai gp41:tä (American Biotechnologies) 0,1 M bikarbonaatissa, pH 8,6. Solut pestiin kahdesti vedellä ja salvattiin täyttämällä kaivon täysin 3-%:isella (paino/tilavuus) BSA:lla PBS:ssä, ja pitämällä levyä 37 °C:ssa yhden tunnin ajan. Kun salpausliuos oli ravisteltu ulos, 50 µl edellä valmistettua fagikirjastoa (tyypillisesti 10^{11} cfu) sekoitettiin kuhunkin kaivoon, ja levyä pidettiin kahden tunnin ajan 37 °C:ssa.

Fagit poistettiin, ja levy pestiin kerran vedellä. Sitten kukin kaivo pestiin kymmenesti TBS/Tween'illä (50 mM Tris-HCl pH-arvossa 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween 20) 1 tunnin aikana huoneenlämpötilassa, jolloin pesu koostui ylös ja alas pipetoimisesta kaivon pesemiseksi, antaen kaivon pysyä pesujen välillä täysin täytettynä TBS/Tween'illä. Levy pestiin vielä kerran tislatulla vedellä, ja tarttuneet fagit eluoitiin lisäämällä jokaiseen kaivoon 50 µl eluointipuskuria (0,1 M HCl, säädetty pH-arvoon 2,2 kiinteällä glysiinillä, joka sisälsi 1 mg/ml BSA'ta), minkä jälkeen pidettiin huoneenlämpötilassa 10 min ajan. Eluointipuskuria pipetoitiin useita kertoja ylös ja alas, poistettiin, ja säädettiin neutraaliin arvoon 3 µl:lla 2 M Tris-emästä/50 µl käytettyä eluointipuskuria.

Eluoitua fagia käytettiin infektoimaan 2 ml tuoreita (OD_{600} = 1) E. coli XL1-Blue-soluja 15 min ajan huoneenlämpötilassa,

minkä jälkeen sekoitettiin 10 ml SB:tä, joka sisälsi 20 µg/ml karbenisilliinia ja 10 µg/ml tetrasykliiniä. Viljelmästä poistettiin 20-, 10- ja 1/10-µl erät levyille levitystä varten fagien (pakattujen fagemidien) lukumäärän lukumäärän määrittämiseksi. Viljelmää ravisteltiin yhden tunnin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen se lisättiin 100 ml:aan SB:tä, joka sisälsi 50 µg/ml karbenisilliinia ja 10 µg/ml tetrasykliiniä, ja ravisteltiin yhden tunnin ajan. Sitten lisättiin auttajafagia VCSM13 (10^{12} pfu), ja viljelmää ravisteltiin vielä 2 tunnin ajan. Tämän ajan kuluttua lisättiin 70 µg/ml kanamysiiniä, ja viljelmää inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa. Fagin valmistus ja edelleen pannaus toistettiin edellä kuvatulla tavalla.

Kunkin pannauskierroksen jälkeen määritettiin fagin saanto-%, jossa saanto-% = (eluoitunut fagilukumäärä/nlisätty fagilukumäärä) X 100. Alkufagilisäysmääräksi määritettiin titraamalla selektiivisillä levyillä noin 10^{11} cfu kussakin pannauskierroksessa. Lopullinen fagin ulostulosuhde määritettiin infektoimalla 2 ml logaritmisessa faasissa olevia XL1-Blue -soluja edellä kuvatulla tavalla ja lisäämällä erät selektiivisille levyille. Ensimmäisessä pannauksessa gp120-reaktiivisen fagin suhteen lisättiin 4,6 X 10^{11} fagia neljään kaivoon, ja eluoitiin 7,7 X 10^5 fagia. Neljännen pannauksen jälkeen eluoitiin 1,0 X 10^8 fagia. Tästä menettelytavasta valittiin 20 kloonia Fab-kirjastosta niiden kyvyn vuoksi sitoutua HIV-1:n IIIB-kannaasta olevaan glykosyloituun yhdistelmä-DNA-gp120:een. Viisi kloonia valikoitiin gp41:een sitoutumiseen spesifisestä Fab-kirjastosta. Sitten pannatut fagipintakirjastot muutettiin sellaisiksi, jotka ekspressoivat liukoisia Fab-fragmentteja ELISA'lla tapahtuvaa edelleen seulontaa varten alla kuvatulla tavalla.

Kannan IIIB gp120:llä, ja gp41:llä pannauksen lisäksi, otetaan antigeeneinä kombinaatiokirjastojen pannaukseen lukuun myös yhdistelmä-DNA-gp120 (IIIB-kanta), joka on tuotettu baculoviruksessa, ja yhdistelmä-DNA-gp120 (SF2-kanta), joka

on tuotettu kiinanhamsterin munasarjasoluissa, ja jotka on saatu tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Steimer et al.; Science, 254:105-108 (1991). Eräs toinen antigeeni, synteettinen syklinen peptidi, N=CH-$(CH_2)_3$CO[SISGPGRAFYTG]NCH_2CO-Cys-NH_2 (SEKV. ID.NRO 48), joka valmistettiin tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Satterthwait et al., Bulletin of the World Health Organization, 68: suppl., 17-25 (1990), ja joka vastaa keskeistä parhaiten säilynyttä osaa gp120:n V3-silmukasta, liitettiin maleimidiaktivoituun BSA:han. Kirjasto pannattiin käyttämällä 1, 2 tai 4 ELISA-kaivoa, jotka oli päällystetty 1 µg:lla proteiiniantigeeniä tai 10 µg:lla BSA-peptidiä/kaivo. Kullakin antigeenillä suoritettiin neljä pannauskierrosta edellä kuvatulla tavalla. Eluoituja fageja viimeisestä kierroksesta käytettiin XL1-Blue -solujen infektoimiseen. Neljä pannauskierrosta neljää antigeeniä vastaan tuotti eluoidussa fagissa amplifioinnin, joka on 100- ja 1000-kertaisen välillä. Sitten pannatut faginpintakirjastot muutettiin sellaisiksi, jotka ekspressoivat liukoisia Fab-fragmentteja ELISA'lla alla kuvatulla tavalla tapahtuvaa edelleen seulontaa varten.

6) Liukoisten heterodimeerien valmistus ja HIV-1-antigeeneihin sitoutumisen spesifisyyden karakterisointi

Edellä kuvatulla tavalla fagin pinnalla ekspressoitujen mutagenisoitujen heterodimeerien spesifisyyden edelleen karakterisoimiseksi valmistettiin happoeluoidusta fagista liukoisia Fab-heterodimeerejä ja analysoitiin ELISA-määrityksissä HIV-1-peräisellä antigeenillä päällystetyillä levyillä ja kompetitiivisella ELISA'lla.

Liukoisten heterodimeerien valmistamiseksi fagemidi-DNA eristettiin edellä valmistetuista 20 gp120-positiivisesta kloonista ja 5 gp41-positiivista kloonista, ja sulatettiin Spe I:llä ja Nhe I:llä. Sulatus näillä entsyymeillä tuotti yhteensopivat kohesiiviset päät. 4,7-kb DNA-fragmentti, josta puuttui geeni III-osa, puhdistettiin geelillä (0,6-% agaroosi) ja saatettiin liittymään sisäisesti (self-liga-

ted). E. coli XL1-Blue'n transformointi antoi rekombinanttien eristyksen, joista puuttui cpIII-fragmentti. Kloonit tutkittiin cpIII-fragmentin poistumisen suhteen XhoI/XbaI-sulatuksella, jonka pitäisi antaa 1,6-kb fragmentin. Klooneja kasvatettiin 37 °C:ssa 100 ml:ssa SB:tä, joka sisälsi 50 µg/ml karbenisilliiniä ja 20 mM $MgCl_2$:ssa, kunnes saavutettiin OD_{600}-arvo 0,2. Lisättiin IPTG:tä (1 mM), ja viljelmää kasvatettiin yön yli 30 °C:ssa (kasvatus 37 °C:ssa aikaansaa heterodimeerisaannossa vain vähäisen pienenemisen). Solut pelletöitiin sentrifugoimalla nopeudella 4 000 r/min 15 min ajan JA10-roottorissa 4 °C:ssa. Solut suspendoitiin uudelleen 4 ml:aan PBS:ää, joka sisälsi 34 µg/ml fenyylimetyylisulfonyylifluoridia, (PMSF) ja liuotettiin sonikoimalla jäässä (2 - 4 min 50-% teholla). Solujäänne pelletöitiin sentrifugoimalla nopeudella 14 000 r/min JA20-roottorissa 4 °C:ssa 15 min ajan. Supernatanttia käytettiin suoraan ELISA-analyysiin alla kuvatulla tavalla, ja varastoitiin -20 °C:ssa. Kloonien suuren lukumäärän tutkimista varten 10-ml kasvatukset aikaansaivat heterodimeeriä analyysiin riittävästi. Tässä tapauksessa sonikointi suoritettiin 2 ml:ssa puskuria.

Edellä kuvatut määritykset suoritettiin myös gp41-spesifisille klooneille.

a) Seulonta ELISA'lla

Edellä valmistetut liukoiset heterodimeerit määritettiin ELISA'lla. Tätä määritystä varten gp120 ja gp41 sekoitettiin erikseen yksittäisiin mikrotiitterilevyn kaivoihin edellä kuvatulla tavalla pannausmenettelytapaa varten, ja ylläpidettiin yön yli 4 °C:ssa sallimaan proteiiniliuoksen tarttumisen kaivon seinämille. Ylläpitoajanjakson jälkeen kaivot pestiin viidesti vedellä, ja pidettiin tämän jälkeen yhden tunnin ajan 37 °C:ssa 100 µl:n kanssa liuosta, jossa oli 1 % BSA:ta laimennettuna PBS:ään epäspesifisten kohtien salpaamiseksi kaivoissa. Jälkeen päin levyt käännettiin ylösalaisin ja ravisteltiin BSA-liuoksen poistamiseksi. Sitten 25 µl

edellä valmistettuja liukoisia heterodimeerejä, jotka ovat reaktiivisia spesifisen glykoproteiinisubstraatin kanssa, sekoitettiin kuhunkin kaivoon, ja ylläpidettiin 37 °C:ssa yhden tunnin ajan immunoreaktiotuotteiden muodostamiseksi. Ylläpitoajanjakson jälkeen kaivot pestiin sitten kymmenesti vedellä sitoutumattoman liukoisen vasta-aineen poistamiseksi, ja ylläpidettiin sitten 25 µl:n kanssa 1:1000-laimennosta sekundaarisesta vuohi-anti-humaani-IgG $F(ab')_2$:sta, joka oli konjugoitu alkaliseen fosfataasiin laimennettuna PBS:ään, joka sisälsi 1 % BSA:ta. Kaivoja ylläpidettiin yhden tunnin ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen kaivot pestiin kymmenesti vedellä, minkä jälkeen kehitettiin 50 µl:lla p-nitrofenyylifosfaattia (PNPP). Värinkehitystä tarkkailtiin 405 nm:llä. Positiiviset kloonit antoivat 10 min kuluttua A405-arvot >1 (enimmäkseen >1,5), kun taas negatiiviset kloonit antoivat arvot 0,1 - 0,2.

gp120-reaktiivisen Fab:n likimääräiset konsentraatiot määritettiin ELISA'lla käyttämällä kerrostus-ELISA'a (sandwich ELISA) tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Zebedee et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3175-3179 (1992), ja esitetään kuvion 6 ensimmäisessä sarakkeessa. Lisäksi, koska Fab't ekspressoidaan E. coli'ssa ja oikein kokoonpannun proteiinin fraktio voi vaihdella, myös gp120:n kanssa reagoivan Fab:n määrä määritettiin ELISA-titrauksella. Myös nämä tiedot esitetään kuviossa 6 toisessa sarakkeessa.

HIV-1-peräisiä antigeenejä vastaan pannatuilla klooneilla, kun pannatut fagikirjastot oli muutettu sellaisiksi, jotka ekspressoivat liukoisia Fab-fragmentteja, käytettiin 30 - 40 koloniaa transformoimaan XL1-Blue-soluja, ja supernatantit seulottiin ELISA-määrityksissä pannaukseen käytettyä antigeeniä vastaan. Yleensä yli 80 % supernatanteista testattiin positiivisiksi. Sitten kustakin antigeenipannauksesta valittiin edustava lukumäärä positiivisia lisäanalyysiin.

(b) Kompetitiivinen ELISA liukoisella gp120:llä ja CD4:llä

Sitten edellä olevassa ELISA'ssa määritetyt immunoreaktiiviset heterodimeerit analysoitiin kompetitiivisella ELISA'lla valittujen heterodimeerien affiniteetin määrittämiseksi. ELISA suoritettiin edellä kuvatulla tavalla mikrotiitterikaivoilla, jotka oli erikseen päällystetty 5 µg:lla/ml gp120:ta tai liukoista CD4:ää (American Biotechnologies) 0,1 M bikarbonaattipuskurissa pH-arvossa 8,6. Liukoisen tai vapaan gp120:n kasvavat konsentraatiot konsentraatioalueella 10^{-11} - 10^{-7} M laimennettuna 0,5 % BSA/0,025 % Tween 20/PBS:ään sekoitettiin liukoisten heterodimeerien kanssa, joiden laimennokset määritettiin titrauskokeissa, jotka antoivat tulokseksi OD-arvojen oleellisen pienenemisen 2-kertaisen laimennoksen kanssa. CD4-kompetitiomäärityksiä varten liukoisen tai vapaan CD4:n kasvavia konsentraatioita konsentraatioalueella 10^{-11} - 10^{-6} M laimennettuna 0,5 % BSA/0,025 % Tween 20/PBS:ään sekoitettiin liukoisten heterodimeerien kanssa. Levyjä pidettiin 90 - 120 min ajan 37 °C:ssa, ja pestiin varovasti kymmenesti 0,05 % Tween 20/PBS:llä ennen alkalinen fosfataasi-leimatun vuohi-anti-humaani-IgG $F(ab')_2$:n sekoittamista laimennoksena 1:500, minkä jälkeen pidettiin 1 tunti 37 °C:ssa. Kehittäminen suoritettiin ELISA'lle kuvatulla tavalla.

Neutralointikyvyn välisen suhteen osoittamiseksi alla esimerkissä 3 kuvatulla tavalla voitiin suhteuttaa HIV-1-spesifisten Fab'ien antigeeninsitomisaffiniteettiin, suoritettiin kompetitiiviset ELISA't, joissa liukoinen gp120 kilpaili ELISA-levyille päällystetyn gp120:n kanssa Fab-sitomisesta. Kuviossa 7 osoitetaan, että kaikki Fab'it kilpailivat gp120:een sitoutumisesta IC_{50}:llä noin 10^{-9} M vapaata gp120:tä. Lisäksi kuten esimerkissä 3 esitetään, ei antigeeniaffiniteetin ja neutraloinnin välillä ole korrelaatiota. Fabs-testit sisälsivät Fab't 4, 12, 21 ja 7, jotka ovat samojen ryhmien jäseniä määritettynä sekvenssianalyysillä ja -vertailulla, kuten esimerkissä 4 kuvataan. Fab't 13, 27, 6, 29, 2 ja 3 ovat kaikki eri ryhmien jäseniä määritettynä sekvenssianalyysillä ja -vertailulla, kuten esimer-

kissä 4 kuvataan. Silmukka 2 on Fab-fragmentti, joka on valittu samasta kirjastosta kuin muut Fab't, mutta joka tunnistaa V3-silmukan. Vain V3-silmukkapeptidillä suoritettiin kompetitio SF2-kannasta olevan gp120:n kanssa.

Sen tutkimiseksi, voitaisiinko neutralointi assosioida gp120-CD4 -vuorovaikutuksen estämisen kanssa, suoritettiin kompetitio-ELISA't liukoisella CD4:llä, joka kilpailee Fab'-ien kanssa sitoutumisesta gp120:llä päällystettyihin ELISA-kaivoihin. Tulokset esitetään kuviossa 8. P4D10 ja silmukka 2 ovat kontrolleja, joiden ei odotettu kilpailevan CD4:n kanssa. P4D10 on hiiri-monoklonaalista vasta-ainetta, joka reagoi gp120 (IIIB):n V3-silmukan kanssa. Silmukka 2-Fab-kompetitio suoritettiin gp120 (SF2):ta käyttämällä. Kuten kuviossa 8 esitetään, kaikkien Fab'ien sitoutuminen kontrolleja lukuunottamatta estyi IC_{50}:llä noin 10^{-8} M liukoista CD4:ää. Lisäksi neutraloivien ja neutraloimattomien Fab'ien välillä ei havaittu eroa CD4:llä estettyyn gp120:een. Tämä merkitsee, että on epätodennäköistä, että CD4-gp120 -vuorovaikutuksen estäminen on tärkeä tekijä HIV-1-viruksen Fab-neutraloinnissa.

Samanlaiset kompetitiomääritykset suoritettiin Fab'eilla, jotka pannattiin neljää HIV-1-peräistä antigeeniä vastaan. 19 Fab'illa, jotka johdettiin pannauksesta gp120 (IIIB):n vastaan, nähtiin näennäiset affiniteetit (1/konsentraatio 50-%:isella inhibitiolla) gp120 (IIIB):lle alueella 10^{7} - 10^{-9} M ollen enimmäkseen 1 - 3 X 10^{-8} M. Pannausmenettelytavalla on taipumus valita voimakkaasti lujien sitojien suhteen, joten odotettiin suhteellisen kapeaa affiniteettien vyöhykettä. 16 Fab'ista, jotka oli johdettu gp160 (IIIB):n vastaisesta pannauksesta 6 oli reaktiivisia myös gp120 (IIIB):llä, ja kompetitio-ELISA't osoittivat, että niillä oli samanlaiset näennäiset affiniteetit kuin gp120-pannatuilla Fab'eilla. Ei-gp120-reaktiiviset kloonit gp160-pannauksesta osoittivat alhaisemman ELISA-reaktiivisuuden gp160:llä, eivätkä ne voineet kilpailla tyydyttävästi gp160:n kanssa.

Ne voidaan suunnata gp41:tä vastaan, mutta niitä ei käsitelty tässä. 8 Fab'illa, jotka olivat peräisin pannauksesta gp120 (SF2):ta vastaan, nähtiin voimakas ELISA-reaktiivisuus gp120 (IIIB):n kanssa, ja ne antoivat samanlaiset näennäiset sitoutumisaffiniteetit. 4 Fab'ia johdettiin pannauksesta V3-silmukkapeptidiä vastaan. Näistä Fab'eista, 2 reagoi ELISA'-ssa gp120 (SF2):n kanssa, mutta mikään ei reagoinut gp120 (IIIB):n kanssa. Näiden silmukansitojien näennäinen sitoutumisaffiniteetti gp120 (SF2):een oli 10^{-8} M.

Tutkimuksen saattamiseksi loppuun Fab'ien kantaristireaktiivisuuden mielessä niitä, jotka oli johdettu gp120- ja gp160 (IIIB)-pannauksista, tutkittiin ELISA-reaktiivisuuden suhteen gp120 (SF2):lla. Kaikki olivat reaktiivisia. Sen vuoksi kaikki tutkituista Fab'eista, lukuun ottamatta niitä, jotka valittiin pannaamalla V3 -silmukkapeptidiä vastaan, sitoutuivat IIIB- ja SF2-kannoista olevaan gp120:een.

Fab'it seulottiin ELIDSA-kaivoihin immobilisoituun gp120 (IIIB):een sitoutumisen CD4-eston suhteen. Kaikilla, jälleen V3-silmukansitojia lukuun ottamatta, nähtiin herkkyyttä CD4-inhibitiolle. Estovakiot olivat alueella 10^{-7} - 10^{-9} M.

Otetaan lukuun myös kompetitio-ELISA-määritys, jossa keksinnön mukaisten yhdistelmä-DNA-HIV-1-Fab'ien sitoutuminen suoritetaan keksinnön mukaisten Fab'ien ylimäärän läsnä ollessa, samoin kuin niiden HIV-1-vasta-aineiden, polyklonaalisten tai monoklonaalisten, joita on läsnä joko oireettomien tai oireellisten potilaiden seerumeissa, tai jotka on saatu muulla tavalla kuten EBV-transformoinnilla ja vastaavilla tavoilla. Eksogeenisesti sekoitetun vasta-aineen kyky kilpailla keksinnön mukaisen karakterisoidun Fab'n sitoutumisesta sallii ekvivalenttien vasta-aineiden tunnistuksen ainutrlaatuisten epitooppien ja sitoutumisspesifisyyksien lisäksi.

3. Humaani-yhdistelmä-DNA-Fab-fragmenttien neutralointiak-

tiivisuus HIV-1:tä vastaan in vitro
Vasta-aineiden sitoutuminen viruksiin voi antaa tulokseksi infektoivuuden menetyksen eli neutraloinnin, ja vaikka se ei ole ainoa virusten vastainen puolustusmekanismi, on laajalti hyväksyttyä, että vasta-aineilla on suoritettavana tärkeä tehtävä. Vasta-aineneutraloinnin taustalla olevien molekyyliperiaatteiden ymmärtäminen on kuitenkin rajallista, ja seuraa vasta-aineen muiden efektorifuntioiden ymmärryksen perässä. Sellaista ymmärrystä vaaditaan järkiperäiseen rokotteiden suunnitteluun ja passiivisen vasta-aineen tehokkaimpaan käyttöön ennaltaestossa tai terapiassa. Tämä on erityisen tärkeää ihmisen immuunikatoviruksilla.

Joukko tutkimuksia on johtanut yleiseen johtopäätökseen, että virukset neutraloituvat useammalla kuin yhdellä mekanismilla, ja käytetty mekanismi riippuu tekijöistä kuten viruksen luonne, tunnistettu epitooppi, vasta-aineen isotyyppi, viruksen sisääntuloon käytetty solureseptori ja virus:vasta-aine -suhde. Neutraloinnin päämekanismeja voidaan pitää virionien aggregoitumista, viruksen solureseptoriin kiinnittymisen ja kiinnitystä seuraavien tapahtumien, kuten virus- ja solumembraanien fuusioitumisen ja virionin sekundaarisen kuoren avautumisen estona. Yksi kolmannen mekanismin tärkeistä ominaispiirteistä on, että se voi vaatia paljon vähemmän kuin suunnilleen stökiometriset määrät vasta-ainetta, joita odotetaan ensimmäisiltä kahdelta mekanismilta, koska kriittisten kohtien pienen lukumäärän miehitys voi olla neutralointiin riittävä. On esimerkiksi osoitettu, että influenssa A -virionin neutralointi noudattaa "single hit" -kinetiikkaa, joka on kuvattu julkaisussa: Outlaw et al.; Epidemiol. Infect., 106:205-220 (1992).

On suoritettu intensiivisiä tutkimuksia HIV-1:n vasta-aineneutraloinnilla. Katsausta varten, katso Nara et al., FASEB J., 5:2437-2455 (1991). Useimmat ovat keskittyneet yhteen ainoaan lineaariseen epitooppiin viruksen kuoriglykoproteiini gp120:n kolmannella hypervariaabelilla domeenilla,

joka tunnetaan V3-silmukkana. Tämän silmukan vastaisten vasta-aineiden ehdotetaan neutraloivan estämällä virus- ja solumembraanien fuusiota. Neutraloitumisen tulokseksi antava silmukkaan sitoutuminen voi tapahtua ennen virus-solu -vuorovaikutusta tai gp120:en CD4:ään sitoutumisen jälkeen. Katso Nara, teoksessaa Retroviruses of Human Aids and Related Animal Diseases, toimittaja Girard et al., s. 138-150 (1988); Linsely et al., J. Virol., 62:3695-3702 (1988); ja Skinner et al., J. Virol., 67:4195-4200 (1988). V3-silmukan ominaispiirteitä ovat sekvenssin muuntelu silmukan sisällä [Goudsmit et al., FASEB J., 5:2427-2436 (1991) ja Albert et al., AIDS, 4:107-112 (1990)] ja silmukan vastaisten neutraloivien vasta-aineiden herkkyys sekvenssin variaatioille silmukan ulkopuolella [Nara et al., FASEB J., 5:2437-2455 (1991); Albert et al., yllä; McKeating et al., AIDS, 3:777-784 (1989); ja Wahlberg et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 7:983-990 (1991). Siten anti-V3-silmukka-vasta-aineet ovat usein kantaspesifisiä, ja mutaatiot silmukassa in vivo voivat aikaansaada mekanismin viraaliselle paolle vasta-aineneutraloinnista.

Viime aikoina on kohdistettu huomattavasti kiinnostusta vasta-aineisiin, jotka voivat estää CD4:n sitoutumisen gp120:een. Joukko ryhmiä on kuvannut näiden vasta-aineiden ominaispiirteitä (a) konformaatio-, ts. ei-lineaaristen epitooppien kanssa reagoiviksi, (b) virusisolaattien laajan joukon kanssa reagoiviksi ja (c) vallitseviksi neutraloiviksi vasta-aineiksi ihmisissä pitempien infektioajanjaksojen jälkeen. Katso, Berkower, et al., J. Virol., 65:5983-5990 (1991); Steimer et al., Science, 254:105-108 (1991); Ho et al., J. Virol., 65:489-493 (1991); Kang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 88:6171-6175 (1991); Posner et al., J. Immunol., 146:4325-4332 (1991); ja Tilley et al., Res. Virol., 142:247-259 (1991). Tämän tyyppiset neutraloivat vasta-aineet vaikuttaisivat edustavan mahdollisten terapeuttisten aineiden lupaavaa kohdetta. Näiden vasta-aineiden neutralointimekanis(t) on/ovat tuntemat(on/tomia), vaikka on

joitain viitteitä siitä, että tämä ei ehkä ole viruksen kiinnittymisen esto, koska joukko hiiri-monoklonaalisia vasta-aineita, jotka estävät CD4:n gp120:een sitoutumisen, ovat joko ei-neutraloivia tai vain heikosti neutraloivia.

HIV-1:n kuorewn vastaisten monoklonaalisten humaani-vasta-aineiden neutralointi tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Burton et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:10134-10137 (1991), kombinaatiokirjastoja käyttämällä sallii neutralointiongelmaan uuden lähestymistavan. Tietäen gp120:n kolmiulotteisen rakenteen puutteen ja viruksen kompleksisuuden, lähestymistavassa yritetään hyödyntää neutralointia molekyylitasolla sukulaisvasta-aineiden käyttäytymisen kautta. Tämä on mahdollista seuraavista syistä: (1) kombinaatiolähestymistapa sallii humaani-vasta-aineiden suurten lukumäärien nopean luomisen; (2) vasta-aineet (Fab-fragmentit) ekspressoidaan E. colssai ja voidaan sekvensöidä helposti; ja (3) vasta-aineilla on samanlaiset sekvenssit ja yhteiset rakenneaihelmat sallien funktionaalisten erojen mielekkään korreloinnin primaarisen rakenteen kanssa.

Neutralointitutkimukset suoritettiin tässä kuvatulla tavalla humaani-yhdistelmä-DNA-Fab-fragmenteilla gp120:n vastaisilla 20 kloonilla, jotka valmistettiin esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla tavalla, ja joista kaikki ovat kanta-ristireaktiivisia ja CD4 estää niitä sitoutumasta gp120:een. Tässä esitetyt tulokset osoittavat, että neutralointia ei aikaansaanut virusaggregoituminen tai gp120-molekyylien verkkoutuminen virionipinnalla, eikä se korreloinut liukoisen CD4:n ja yhdistelmä-DNA-gp120:n välisen vuorovaikutuksen eston kanssa.

Tässä kuvattuja neutralointitutkimuksia suoritettiin myös humaani-yhdistelmä-DNA-Fab-fragmenteilla gp41-reaktiivisilla klooneilla, jotka valmistettiin esimerkeissä 1 ja 2 kuvatulla tavalla. Tulokset esitetään alla.

HIV-1-immunoreaktiivisten humaani-yhdistelmä-DNA-Fab'ien neutralointikyvyn mittaamiseksi suoritettiin kaksi erilaista määritystä, p24-ELISA-määritys ja synsytiummääritys. Eräs lisämääritys, täplämääritys, suoritettiin gp41-reaktiivisten Fab'ien neutralointitehokkuuden määrittämiseksi. Täplämäärityksissä CD4+-soluja kasvatettiin liukoisten gp41-reaktiivisten Fab'ien läsnä ollessa tai puuttuessa ennen viruksella siirrostusta. Infektoivuuden esto, jota kutsutaan myös neutraloinniksi, vasta-aineilla, ilmaistiin täplänmuodostus-%:na viljelmissä verraten soluihin, jotka altistettiin pelkästään PBS:lle.

Joitakin näistä määrityksistä varten yhdistelmä-DNA-Fab'it puhdistettiin ensin. 1-l SB-viljelmiä, jotka sisälsivät 50 µg/ml karbenisilliinia ja 20 mM $MgCl_2$:ta, siirrostettiin sopivilla klooneilla ja indusoitiin 7 tuntia myöhemmin 2 mM IPTG:llä ja kasvatettiin yön yli 30 °C:ssa. Solupelletit sonikoitiin, ja tulokseksi saadut supernatantit konsentroitiin tilavuuteen 50 ml. Suodatetut supernatantit lisättiin 25-ml proteiini-G-anti-Fab-kolonniin, pestiin 120 ml:lla puskuria nopeudella 3 ml/min, ja eluoitiin sitruunahapolla pH-arvossa 2,3. Sitten neutraloidut fraktiot konsentroitiin ja vaihdettiin 50 mM MES:iin pH-arvossa 6,0, ja lisättiin 2-ml Mono-S-kolonniin nopeudella 1 ml/min. Gradientti 0 - 500 mM NaCl:ää ajettiin nopeudella 1 ml/min Fab'n eluoituessa alueella 200 - 250 mM NaCl. Konsentroinnin jälkeen Fab'it olivat positiivisia titrattaessa ELISA'lla gp120:ta vastaan, ja antoivat yhden ainoan vyöhykkeen kohdalla 50 kD 10 - 15-%:isella SDS-PAGE'lla. Konsentraatio määritettiin absorbanssimittauksella 280 nm:llä käyttämällä ekstinktiokerrointa (1 mg/ml) 1,4.

a. Neutralointi p24-ELISA-määrityksellä mitattuna

Tätä määritystä varten HIV-1 IIIB:lla tai MN-infektoitujen ääreisverenkierron mononukleaarisolujen (PBMC) laimennettuja kudosviljelysupernatantteja ($50TCID_{50}$ (50-%:isesti kudosviljelmän infektoiva annos), 100 µl) pidettiin 2 tunnin ajan 37

°C:ssa sarjalaimennoksilla (1:2), alkaen esimerkissä 2b6) valmistettujen yhdistelmä-DNA-Fab-supernatanttien laimennoksella 1:20. Aikaansaatiin myös kontrolli-Fab-supernatantteja, jotka sisälsivät ihmisen neutraloivia seerumeja, tunnettua ihmisen neutraloivaa monoklonaalista vasta-ainetta 2F5 ja Fab-fragmenttia, joka oli johdettu tuosta vasta-aineesta papaiinisulatuksella, ja tunnettua hiiren neutraloivaa monoklonaalista vasta-ainetta ja sen $F(ab')_2$-fragmenttia, joka kuvataan julkaisussa: Broliden et al.; J. Virol., 64:936-940 (1990). PBMC:tä (1×10^5 solua) sekoitettiin virus/vasta-aine -seokseen, ja pidettiin 1 tunnin ajan 37 °C:ssa. Tämän jälkeen solut pestiin, ja pidettiin RPMI 1640-väliaineessa (GIBCO), jota oli täydennetty 10 %:lla naudan sikiön seerumia, 1 %:lla glutamiinia, antibiooteilla ja IL-2:lla. Kasvatusväliaine vaihdettiin päivinä 1 ja 4. Ajankohtana 7 päivää infektion jälkeen supernatantit kerättiin, ja analysoitiin HIV-1-p24-antigeeni-kaappaus-ELISA'lla tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Sundqvist et al.; J. Med. Virol., 29:170-175 (1989), jonka sisältö liitetään täten tähän viitteeksi. Neutralointi määriteltiin positiiviseksi, jos kasvatussupernatantissa tapahtui 80-%:inen tai suurempi optisen tiheyden pieneneminen aallonpituudella 490 nm verrattuna negatiiviseen Fab'iin tai negatiiviseen ihmisen seerumiin. Testit kaikilla Fab'eilla, mAb'eilla ja seerumeilla toistettiin ainakin kahdessa tapauksessa.

b. Synsytiuminmuodostukseen perustuva kvantitatiivinen infektoivuusmääritys

Kvantitatiivinen neutralointimääritys HIV-1:n MN-kannalla suoritettiin tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Nara et al.; AIDS Res. Human Retroviruses, 3:283-302 (1987), jonka sisältö liitetään täten tähän viitteeksi. CEM-SS-kohdesolujen yksisolukerroksia kasvatettiin viruksen kanssa vasta-aineen läsnä ollessa tai puuttuessa, ja määritettyyn synsytioidenmuodostusyksiköt lukumäärä 3 - 5 päivää myöhemmin. Määrityksissä käytettiin ekvivalentti määrä virusta eri testattujen vasta-ainekonsentraatioiden suoran vertailun

sallimiseksi. Määritykset olivat toistettavissa viruksen eloonjääntifraktioalueella 1 - 0,001 vasta-ainekonsentraation 2 - 4-kertaisella erolla ($P<0,001$).

c. Neutralointimääritysten tulokset cp120:llä

Määritykset toistettiin yleensä ainakin kahdesti toistettavilla tuloksilla. Kuviossa 6 esitettyjä tuloksia varten gp120-spesifiset Fab-supernatantit jaettiin kahteen osaan, joista toista käytettiin p24-määrityksessä ja toista käytettiin synsytiummäärityksessä. Viiva (-) ilmaisee, ettei p24-määrityksessä ollut neutralointia 1:20-laimennoksella eikä 1:16-laimennoksella synsytiummäärityksessä (jolloin useimmilla klooneilla ei ollut havaittavaa neutralointia 1:4-laimennoksella). Neutralointitiitterit ilmaistaan kuviossa. p24-määrityksellä tiitteri vastaa suurinta laimennosta, joka tuottaa ELISA'ssa absorbanssin >80-% alenemisen. Synsytiummäärityksessä, Fab't 4 ja 12 tuottivat >95-%:isen neutraloinnin supernatantin 1:4-laimennoksella, ja 80- ja 70-%:isen alenemisen 1:128-laimennoksella, vastaavasti. Nämä Fab't olivat tehokkaita neutraloijia molemmissa määritystyypeissä. Niiden on myös osoitettu neutraloivan infektiota IIIB- ja RF-kannalla käyttämällä proviraalisen integraation PCR-pohjaista määritystä. Fab'eilla 6 ja 7 ei nähty neutralointia synsytiummäärityksessä, mutta muilla supernatanttivalmisteilla nähtiin aktiivisuutta. Fab 13 oli johdonmukaisen tehokasta p24-määrityksessä, muttei synsytiummäärityksessä. Joukolla muita klooneja nähdään alhaisemman neutralointikyvyn tasot.

Fab'it puhdistettiin edellä kuvatulla tavalla klooneista joidenkin valikoimasta, ja käytettiin molemmissa neutralointimäärityksissä. Kuten kuviossa 9 esitetään, Fab'it 4 ja 12 olivat jälleen tehokkaita molemmissa määrityksissä samanlaisilla tasoilla esimerkiksi synsytiummuodostuksen 50-%:isella estolla Fab-konsentraatiolla noin 20 nM (1 μg/ml). Esitetyt tulokset on johdettu synsytiummäärityksestä, jossa käytetään MN-kantaa. Fab'it 7 ja 21 olivat yhtä tehokkaita synsytium-

määrityksessä, mutta jonkin verran vähemmän tehokkaita p24-määrityksessä. p24-määritys osoitti yli 80-%:isen HIV-1-MN-kannan neutraloitumisen Fab 4:llä tasolla 3, Fab 7:llä tasolla 15, Fab 12:lla tasolla 3, Fab 13:lla tasolla 4 ja Fab 21:llä tasolla 7 µg/ml, vastaavasti. Fab 13 oli kuitenkin tehoton synsytiummäärityksessä tasolla 25 µg/ml. IIIB-kannalla havaittiin yli 80-%:inen neutraloituminen Fab 4:llä tasolla 13, Fab 7:llä tasolla 15, Fab 12:lla tasolla 7 ja Fab 21:llä tasolla 14 µg/ml, vastaavasti. Vaikka Fab 11 ei ollut puhdistamattomana tehokasta neutralointimäärityksissä, kuten kuviossa 6 esitetään, se oli puhdistuksen jälkeen HIV-1:n neutraloinnissa yhtä tehokasta kuin Fab 12. Tästä syystä Fab on talletettu kansainväliseen talletuslaitokseen ATCC kuten esimerkissä 7 kuvataan, yhdessä Fab 12:n ja Fab 13:n ohella.

Kuvioissa 6 ja 9 esitetyistä tiedoista voidaan vetää joukko johtopäätöksiä. On ilmeistä, että HIV-1 voidaan neutraloida ilman virioniaggregoitumista tai gp120-molekyylien verkkoutumista virionin pinnalle, koska yhdenarvoiset Fab-fragmentit ovat tehokkaita. Tämän keksinnön edelleen varmentamiseksi tuotettiin Fab-fragmentti tunnetun neutraloivan monoklonaalisen ihmisen vasta-aineen papaiinisulatuksella. Kuten kuviossa 6 esitetään, Fab-fragmentti oli HIV-1:n MN-kannan neutraloinnissa suunnilleen yhtä tehokasta kuin koko IgG. Tämä on johdonmukaista tulosten kanssa Fab'eilla, jotka valmistettiin kahdesta V3-silmukan vastaisesta monoklonaalisesta hiiri-vasta-aineesta. Monoklonaalisen hiiri-vasta-aineen $F(ab')_2$-fragmentti oli MN-kannan neutraloinnissa hieman tehottomampaa kuin emä-IgG. Kiinnostavalla tavalla fragmentit näistä kontrollivasta-aineista olivat suhteellisen huonoja HIV-1:n IIB-kannan neutraloinnissa. Tulokset osoittavat myös, että käytetyn kahden määrityksen välillä vaikuttaa olevan eroa, koska Fab 13 oli johdonmukaisesti tehokas toisessa määrityksessä muttei toisessa. Pääasialliset muuttujat olivat viruksen ja vasta-aineen inkubointiaika ennen infektointia (2 tuntia p24-määrityksessä ja 0,5 tuntia synsytium-

määrityksessä), infektioon käytettyjen virusten määrä, viruksen lisäämiseen käytetyt solut (ihmisen PBMC't ensin mainitulle ja H9-solut viimeksi mainitulle) ja infektoidut solut (ihmisen PBMC't ensin mainituilla ja CEM.SS -solut viimeksi mainituilla). Näistä, on suuri mahdollisuus, että kahdessa määrityksessä käytetty MN-virus, joka on kasvanut sukupolven erilaisissa soluissa, on kriittisesti erilainen.

d. Neutralointimääritysten tulokset gp41:lle

gp41-reaktiivisilla Fab'eilla oli spesifisyyttä gp41:n konformaatioepitoopille, mukaan lukien aminohappotähteet asemissa 565 - 585 ja 644 - 663. Viisi valittua gp41-spesifistä Fab'ia saivat nimet DL 41 19, DO 41 11, GL 41 1, MT 41 12 ja SS 41 8. Neutralointimääritykset suoritettiin edellä gp120-reaktiivisille Fab'eille kuvatulla tavalla. Täplämäärityksissä esitetty tieto on Fab-konsentraatio yksikössä μg/ml, joka vaadittiin 50-%:isen neutraloinnin saavuttamiseen. Tiedot toisille kahdelle neutralointimääritykselle ilmaistaan myös yksikössä μg/ml Fab'ia, joka vaaditaan neutraloimaan infektion määriteltynä p24:n kuvauksessa ja edellä olevissa synsytiummäärityksissä. Taulukossa 4 esitetään tulokset kolmesta neutralointimäärityksestä, täplä-, synsytium- ja p24-määrityksestä. MN- ja IIIB HIV-kantoja käytettiin taulukossa 4 esitetytllä tavalla määrityksiin. Lyhenne "ND" tarkoittaa määrittämätöntä kun se ilmaistaan taulukossa.

Taulukko 4

Määritys/kanta	Täplä		Synsytium	P24	
Fab	MN	IIIB	IIIB	MN	IIIB
DL 41 19	<4	<40	1,4	ND	ND
DO 41 11	<40	7,1	2,3	0,9	ND
GL 41 1	<4	<4	1,7	ND	3,5
MT 41 12	<40	<40	5,5	4,5	4,5
SS 41 8	<4	<4	2,2	ND	7,1

Kuten taulukossa 4 osoitetaan, kaikki viisi Fab'ia olivat tehokkaita neutraloimassa sekä HIV:n sekä MN- että IIIB-kantojen neutraloinnissa joko täplä-, synsytium- tai p24-määrityksissä. Fab'eilla DL 41 19 ja DO 41 11 oli kantaspesifisyyttä täplämäärityksessä, jossa ensin mainittu oli 10-kertaisesti tehokkaampaa täplänmuodostuksen estossa MN-kannalla kuin IIIB-kannalla. Vastakkainen spesifisyys nähtiin DO 41 11 -Fab'illa. Kuitenkin molemmilla Fab'eilla oli verrattavissa oleva neutralointi synsytiummäärityksellä mitattuna. Kaksi Fab'ia, GL 41 1 ja SS 41 8, olivat yhtä tehokkaita täplänmuodostuksen estossa joko MN- tai IIIB-kannalla. Fab MT 41 12 oli samalla lailla ei-kantaspesifistä, vaikka neutralointi vaati 10-kertaisesti enemmän vasta-ainetta. Kantaepäspesifisyys oli ilmeinen, kun Fab MT 41 12:ta käytettiin p24-määrityksissä, joissa sama vasta-ainemäärä oli yhtä tehokas. Kaikki viisi vasta-ainetta neutraloivat IIIB:a synsytiummäärityksessä mitattuna.

Siten viisi gp41-spesifistä Fab'ia neutraloivat HIV-1-MN:ää ja -IIIB:tä ainakin kahdessa kolmesta määrityksestä, joita käytettiin neutralointiaktiivisuuden määritykseen. Lisäksi kantaspesifisyys oli vallitsevaa kahdessa viidestä määrityksestä täplämäärityksellä mitattuna. Näiden erilaisten neutralointiominaispiirteiden pohjalta gp41-spesifiset Fab't aikaansaavat käyttökelpoisia terapeuttisia reagensseja HIV-1:n neutralointiin.

4. HIV-1-spesifisten monoklonaalisten vasta-aine-Fab'ien ja vastaavan johdetun aminohappotähdesekvenssin välinen nukleiinihapposekvenssianalyysi

Neutraloivien ja heikosti neutraloivien tai neutraloimattomien Fab'ien välisen suhteen tutkimiseksi sekvensöitiin vaihtelevat domeenit 32 kloonille, jotka ekspressoivat humaani-anti-gp120-Fab'eja, jotka on valmistettu esimerkissä 2, mukaan lukien ne 20 kuviossa 6 lueteltua, joille neutralointiaktiivisuus määritettiin. Lisäksi sekvensöitiin myös viisi gp41-spesifistä Fab'ia.

Nukleiinihappo sequencing suoritettiin on kaksijuosteisella DNA:lla käyttäen Sequenase 1.0:aa (USB, Cleveland, OH) ja sopivia alukkeita, jotka hybridisoituvat sekvensseihin Cg1-domeenilla (SEQGb: 5′ GTCGTTGACCAGGCAGCCCAG 3′ SEKV. ID.NRO 49) tai Ck-domeenilla (SEQKb: 5′ ATAGAAGTTGTTCAGCAGGCA 3′ SEKV. ID.NRO 50). Vaihtoehtoisesti sekvensöinnissä käytettiin yksijuosteista DNA:ta ja T3-aluketta (5′ ATTAACCCTCACTAAAG 3′, SEKV. ID.NRO 51) tai sellaista, joka hybridisoituu sekvenssiin Ck-domeenilla (KEF: 5′ GAATTCTAAACTAGCTAGTTCG 3′ SEKV. ID.NRO 52).

32 gp120-spesifisen kloonin nukleiinihapposekvensseistä johdettujen vaihtelevien raskaiden ja keveiden ketjujen aminohappotähdesekvenssit esitetään vastaavasti kuvioissa 10 ja 11. Ryhmitykset tehdään raskaan ketjun sekvensseissä olevien samankaltaisuuksien pohjalta. Pisteet ilmaisevat identtisyyden ensimmäisen sekvenssin kanssa kussakin osassa. SEKV. ID.NROt luetellaan itse kuvioissa vastaavan johdetun raskaan ja keveän ketjun aminohappotähdesekvenssien oikealla puolella (V_H SEKV. ID.NRO 53 - 81 ja V_L SEKV. ID.NRO 82 - 113).

Johdettujen sekvenssien sijoituksessa rinnan keskenään ja Genbank-tiedoston kanssa käytettiin MacVector-ohjelmistoa. Raskaan ketjun CDR3-sekvenssien analyysiä varten tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Sanz, J.; Immunol., 147:1720-1729 (1991), suurinta osaa 5′-nukleotidista pidettiin ensimmäisenä nukleotidina H-ketjun vaihtelevan alueen kodonin 95 jälkeen, kuten kuvataan teoksessa: Kabat et al; Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, Washington, DC (1991). Suurin osa 3′-nukleotidista määrättiin viimeiseen tunnistamattomaan nukleotidiin ennen kuin sekvenssi täsmäsi julkaistujen mikrobilinjan JH -geenien kanssa. CDR3-sekvenssit analysoitiin DNASTAR-ohjelmistoa käyttämällä. Sekvenssivertailut suoritettiin sekä ALIGN- että COMPARE-ohjelmilla mikrobilinja D -geenin määrittämiseksi, joka antoi parhaan homologian kautta lin-

jan. Seuraavassa vaiheessa käytettiin SEQCOMP-ohjelma ainakin kuuden nukleotidin sekvenssi-identtisyyden löytämiseksi mikrobilinja D-geenien joko koodaavan juosteen tai käänteisen komplementin löytämiseksi.

gp41-spesifisyen Fab'ien raskaan ja keveän ketjun sekvenssit esitetään kuvioissa 18 ja 19, vastaavasti. CDR3-raskaan ketjun aminohappotähdesekvenssissä on Fab'ien välillä suurempi vaihtelu kuin vaihtelevan domeenin millään muulla alueella.

a. Vasta-aineiden järjestäminen ryhmiin raskaan ketjun sekvenssin mukaan

Sekvensöitiin 32 gp120-kloonin V_H- ja V_L-domeenit, ja V_H-domeeneja verrattiin MacVector-ohjelmistoa käyttäen. Tämä analyysi osoitti välittömästi, että joukko klooneja, mukaan lukien eri antigeenejä vastaan pannaukseen valitut, ovat keskenään lähisukuisia. Tälle poikkeus ovat V3-silmukkapeptidiä vastaan pannaamalla valitut Fab'it, jotka eivät ole sukua Fab'eille, jotka valittiin gp120/160-antigeenejä vastaan pannaamalla. Kuviossa 10 osoitetaan, että gp120/160-pannauksesta peräisin olevat V_H-sekvenssit voidaan järjestää 7 ryhmään. Tässä käsitellään yleisiä ominaispiirteitä, jotka ilmenevät aminohapposekvenssien vertailusta.

Sekvenssien sukulaisuus ryhmän sisällä vaihtelee huomattavasti. Esimerkiksi ryhmässä, joka alkaa kloonilla numero b8, aminohapposekvenssit ovat hyvin samanlaiset. Kuusi kloonia oli identtisiä, ja loppuosassa oli enintään 5 eroa vallitsevaan sekvenssiin verrattuna (EQ-ero pois jätetystä 5'-alukkeesta johtuen). Vain yhdessä kloonissa oli yksinkertainen ero CDR3-alueella. Keskimääräinen poikkeavuus kaikissa tämän ryhmän sekvensseissä vallitsevasta sekvenssistä on 1,1 aminohappotähdettä/vaihteleva domeeni. Tämä määrä vastaa poikkeavuuksien suuruusluokkaa, joka voisi syntyä PCR:stä. Vakioiden domeenien sekvensöinti osoitti PCR-virhetaajuuden noin 1 emäsmuutosta/domeeni.

Vastakohtana ryhmässä, jonka otsikkona on klooni b3, ei ollut kahta täysin identtistä kloonia. Keskimääräinen ero konsensusryhmäsekvenssistä on 3,3 tähdettä/sekvenssi, ja määritys CDR3:lle yksinään on 1,3. Sen vuoksi vaikuttaa todennäköiseltä, että raskaat ketjut tässä ryhmässä ovat keskenään somaattisia variantteja.

Ryhmä, jonka otsikkona on klooni 1, edustaa kolmatta muotoa. Kloonit b1 ja b14 ovat identtisiä samoin kuin kloonit b2 ja B2. Kloonien kahden ryhmän välillä esiintyy kuitenkin 23 aminohapon erot. Kloonit b24 ja B30 ovat suunnilleen yhtä hyvin erilaistuneet (13 - 25 eroa) kummastakin näistä kahdesta kloonien ryhmästä tai keskenään. Silti CDR3-alueet ovat hyvin samanlaiset. Tälle kaavalle voidaan ehdottaa joukkoa selityksiä: 1) kaikki tämän ryhmän kloonit ovat peräisin samasta mikrobilinjageenistä, jossa on tapahtunut laajaa somaattista mutaatiota, 2) on tapahtunut oleellisesti tekijäinvaihdunta(cross-over) -tapahtumia yhdistäen eri mikrobilinjageenejä uudelleen saman DJ-yhdistelmän kanssa, 3) "konvergentti evoluutio"-prosessi on johtanut samaan DJ-yhdistelmään liittyvien eri mikrobilinjageenien valintaan.

b. gp120-sitojista olevien V_L-domeenien sekvenssit

Fab'ien V_L-sekvenssit järjestettiin kuviossa 10 määriteltyihin ryhmiin näytetään kuviossa 11. Välittömästi selvää oli laaja ketjupromiskuiteetti, josta oli todisteena eri kevei-den ketjujen pariutuminen saman tai hyvin samanlaisen raskaan ketjun kanssa antigeeninsitomiskyvyn säilyessä, ja todellakin, enimmäkseen, antigeeniaffiniteetilla, joka on verrattavissa kuvion 10 kanssa. Tätä promiskuiteettia voidaan tutkia edelleen edellä tarekasteltuihin ryhmiin vertaamalla.

Klooni b8 -ryhmä, jossa raskaan ketjun jäsenet olivat identtisiä tai hyvin samanlaisia, tuottivat myös 4 keveää ketjua, jotka olivat identtisiä tai hyvin samanlaisia (alle 3 aminohapon erot). Sen vuoksi tälle ryhmälle voidaan kuvata val-

litseva raskas-keveä ketju -yhdistelmä. Yhdellä jäsenellä (klooni b8) oli sama tai hyvin lähisukuinen V_L-geeni, mutta ilmeni, että se käytti eri Jk-geeniä. Kaksi muuta jäsentä (kloonit B8 ja b18) olivat tärkeimmälle sekvenssille kaukaisempaa sukua (7 - 12 eroa). Kahdessa muussa kloonissa (b13 ja B26) käytettiin Vk-geeniä eri perheestä, Vk3:a verrattuna Vk1:een, ja sen vuoksi ne eivät olleet tärkeimmälle sekvenssille sukua.

Klooni b3 -ryhmässä, jonka ehdotettiin sisältävän yhden ainoan raskaan ketjun somaattisia variantteja, nähtiin huomattava keveän ketjun vaihtelevuus siten, ettei ollut kahta jäsentä, jotka olisivat olleet keskenänä lähisukuisia. Vk3-Jk2 -yhdistelmät olivat vallitsevia, mutta myös Vk3-Jk3- ja Vk1-Jk3-yhdistelmiä esiintyi.

Toisaalta klooni b1 -ryhmässä oli todisteita siitä, että raskaat ketjut olivat vavalokoivampia keveä ketju -partnerinsa suhteen. Täten lähisukuiset raskaat ketjut ilmenivät pariutuneen sukulais-keveiden ketjujen kanssa. Identtisillä raskas ketju -pareilla (b1 ja b14; b2 ja B2) oli hyvin samanlaiset keveät ketjut (2 ja 4 aminohapo erot, vastaavasti), kun taas erilaisilla raskailla ketjuilla (b24 ja B30) oli erilaiset keveät ketjut, jotka eivät olleet keskenään tai muiden ryhmäjäsenten kanssa sukua. Klooni 4 -ryhmä aikaansaa erään toisen esimerkin tästä ilmiöstä siinä, että 4 lähisukuista raskasta ketjua oli muodostanut parin 3 lähisukuisen keveän ketjun kanssa (vallitseva raskas-keveä ketju -yhdistelmä), lukuunottamatta klooni b7 -keveää ketjua, joka oli erilainen.

Yhteenvetona, raskaan ketjun (V_H) sekvenssit järjestettiin 7 ryhmään, joissa ryhmän kullakin jäsenellä oli identtinen tai hyvin samanlainen CDR3 -alue rajallisella lukumäärällä eroja muualla. Kun keveät ketjut (V_L) pakotettiin niiden raskas ketju -partnerien määrittelemiin ryhmittymiin, havaittiin huomattavaa keveän ketjun sekvenssin vaihtelua. Tämä ketju-

promiskuiteetti-ilmiö on havaittu aikaisemmin, ja se voidaan ymmärtää kuvion 11 avulla. Selvä neutralointikyky rajoittui kahteen sekvenssien ryhmään. Ensimmäinen ryhmä koostui Fab'-eista 4, 7, 12 ja 21, joissa oli hyvin samanlaiset raskaat ja keveät ketjut. Eräs toinen ryhmä koostui Fab'eista 13, 8, 18, 22 ja 27. Vain Fab 13:lla nähtiin selvä neutralointikyky, vaikka muilla nähtiin melkoisesti heikompi aktiivisuus. Kiinnostavalla tavalla Fab 13:lla oli tässä ryhmässä keveä ketju, joka oli erilainen kuin ryhmän muilla jäsenillä.

5. Yksittäisen kloonin raskaan ja keveän ketjun sekoitus kirjastoa vastaan

Mahdollisten funktionaalisten raskas-keveä ketju -yhdistelmien edelleen tutkimiseksi kloonin b12 raskas ketju (kutsutaan myös nimellä Fab 12 vastaavalle liukoiselle Fab -valmisteelle), joka esitetään kuviossa 10, yhdistettiin esimerkissä 2 valmistetun alkuperäisen keveä ketju -kirjaston kanssa uuden kirjasto H12-LCn'n konstruoimiseksi. Lisäksi b12 -keveä ketju yhdistettiin alkuperäisen raskas ketju -kirjaston kanssa kirjasto Hn-L12'n konstruoimiseksi. Nämä kaksi kirjastoa vietiin 3 pannauskierroksen läpi gp120 (I-IIB):tä vastaan esimerkissä 2b5) kuvatulla tavalla. Tulokseksi saaduista immunoreaktanttiklooneista ekspressoidut Fab'it analysoitiin edellä esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Valittiin klooni b12, joska tämä Fab neutraloi HIV-1:tä in vitro, kuten esimerkissä 3 osoitetaan.

Sekoitetun kirjaston valmistuksen toteuttamiseksi kloonin b12 Dd-geenistä alkuperäisen keveän ketjun kirjaston kanssa b12-raskas ketju alikloonattiin ensin pComb2-3:ssa ekspressoituun tetanustoksoidisitomiskohtaan. Sitten keveän ketjun kirjasto kloonattiin tähän konstruktioon, jolloin saatiin kirjasto, jossa oli 1 x 10^7 jäsentä. Alikloonausvaihetta käytettiin alkuperäisellä keveällä ketjulla kontaminoitumisen ja alkuperäisen keveän ketjun yliedustuksen välttämiseksi. Samanlainen menettelytapa otettiin käyttöön raskaiden ketjujen sekoittamiseksi kloonista b12 olevan keveän ketjun

kanssa, jolloin saatiin kirjasto, jossa oli 3 x 10^6 jäsentä. Kloonaus- ja pannausmenettelytavat suoritettiin edellä alkuperäiselle kirjastolle kuvatulla tavalla.

11 keveää ketjua, jotka yhdistyivät b12-raskaan ketjun kanssa ja sitovat gp120:ta pannauksessa, valittiin sattumanvaraisesti seuraavaan kompetitio-ELISA'an ja sekvenssinaalyysiin. Näiden sekoitettujen yhdistelmien näennäiset affiniteetit olivat samanlaiset IC_{50}:llä noin 10^{-8} - 10^{-9} M. Järjestettiin sekvenssit, joissa 3:n ryhmä oli hyvin samanlainen kuin alkuperäinen b12-keveä ketju, ja muilla 8:lla oli monia eroja alkuperäiseen verrattuna, joidenkin alaryhmittymien ollessa mahdollisia.

Kuviossa 12 esitetään sekvenssit keveille ketjuile, jotka sitoutuvat b12-raskas ketjuklooniin. Sekvenssejä verrataan kloonista b12 olevaan alkuperäisen keveän ketjun sekvenssiin. Keveät ketjut tunnistetaan numeroilla, jotka eivät vastaa alkuperäisen keveän ketjun klooneja; vasta valituille, uudet keveät ketjut sisältäville klooneille annetut numerot ovat siten mielivaltaisia. Näiden keveiden ketjujen sekvenssit luetellaan myös sekvenssiluettelossa SEKV. ID.-NROsta 114 SEKV. ID.NROon 122. Jotkin keveän ketjun sekvenssit ovat identtisiä. gp120:n kanssa immunoreaktiivisuuden lisäksi näistä sekoitetuista klooneista eristetyt uudet Fab't testattiin synsytiummäärityksessä HIV-1-infektion neutraloinnin suhteen esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Neljällä sekoitetulla monoklonaalisella Fab-vasta-aineella, joista kussakin oli raskas ketju kloonista b12, tunnetusta HIV-1:tä neutraloivasta kloonista, ja uudet keveät ketjut, jotka saivat nimet L28, L25, L26 ja L22, oli kaikilla noin 60-%:inen neutralointi synsytiummäärityksessä määrällä 0,4 µg/ml puhdistettua Fab'tä. Tämä vaikutus oli samanarvoinen kuin alkuperäisen kloonin b12 raskaan ja keveän ketjun parilla saatu vaikutus. Maksimaalinen noin 80-%:inen neutralointi saatiin H12/L28- ja H12/L25-Fab'eilla tasolla 0,7 µg/ml, joka oli samanarvoinen kuin alkuperäisen kloonin b12

raskas/keveä -pari. H12/L22- ja H12/L26-Fab'eista tulokseksi saatu neutralointi tasoittui tasolle 60 % Fab-konsentraatioilla 0,4 - 1,0 µg/ml. Siten gp120-immunoreaktiivisten ja HIV:tä neutraloivien Fab'ien lisäksi, jotka saatiin alkuperäisessä kirjastossa, joka valmistettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla, sekoittamalla tunnetun neutraloivan raskaan ketjun keveiden ketjujen kirjaston kanssa, on saatu uusia, HIV-1:tä neutraloivia Fab-monoklonaalisia vasta-aineita.

Valittiin sattumanvaraisesti myös kymmenen raskasta ketjua, jotka which recombined with the b12 keveä ketju were also randomly chosen. Yksi oli hyvin samanlainen kuin alkuperäinen b12-raskas ketju, mutta muissa on useita eroja. Siitä huolimatta V-D- ja D-J-liitokset olivat oleellisen identtiset, viitaten siihen, että kloonit olivat luultavasti syntyneet samasta uudelleenjärjestyneestä B-solukloonista somaattisella modifikaatiolla. Kompetitio-ELISA ei paljastanut varienttien välillä affiniteetissa mitään selvää eroa alun perin analysoituihin verrattuna.

Kuviossa 13 esitetään sekvenssit raskaista ketjuista, jotka sitoutuvat b12-keveän ketjun klooniin. Sekvenssejä verrataan kloonista 12 olevan alkuperäisen raskaan ketjun sekvenssiin. Raskaat ketjut tunnistetaan numeroilla, jotka eivät vastaa alkuperäisen keveän ketjun klooneja; täten uudet raskaat ketjut sisältäville, vasta valituille klooneille annetut nimet ovat mielivaltaisia. Näiden keveiden ketjujen sekvenssit luetellaan myös sekvenssiluettelossa SEKV. ID.NRO 123:sta 132:een. Jotkin keveän ketjun sekvenssit ovat identtisiä. gp120:n kanssa immunoreaktiivisuuden lisäksi uudet kloonit testattiin synsytiummäärityksessä HIV-1-infektion neutraloinnin suhteen esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Kahdella sekoitetulla monoklonaalisella Fab-vasta-aineella, joissa oli kummassakin keveä ketju kloonista b12, joka on tunnettu HIV-1:tä neutraloiva klooni, ja uudet raskaat ketjut, joiden nimet olivat H2 ja H14, oli synsytiummäärityksessä noin 40-%:inen neutralointi määrällä 1,0 ja 0,5 µg/ml

puhdistettua Fab:tä, vastaavasti. Tämä vaikutus oli samansuuruinen kuin vaikutus, joka saatiin alkuperäisen kloonin b12 raskaan ja keveän ketjun parilla konsentraatiossa 2 µg/ml. Maksimaalinen, noin 50-%:inen neutralointi saatiin Fab'llä, jossa oli uusi H14-ketju, tasolla 1,0 µg/ml verrattuna 80-%:iseen neutralointiin määrällä 0,7 µg/ml alkuperäistä klooni b12-raskas/keveä -paria. Siten gp120-immunoreaktiivisten ja HIV:tä neutraloivien Fab'ien lisäksi, jotka saatiin alkuperäisessä kirjastossa, joka valmistettiin esimerkissä 2 kuvatulla tavalla, sekoittamalla tunnettua neutraloivaa keveää ketjua raskaiden ketjujen kirjaston kanssa on saatu uusia HIV-1:tä neutraloiviamonoklonaalisia Fab-vasta-aineita.

Täten tämä sekoitusprosessi paljasti useita muita raskaan ja keveän ketjun partnereita, jotka sitoutuvat gp120:een, ja joiden affiniteetti oli samanarvoinen kuin esimerkissä 2 valmistetusta alkuperäisestä kirjastosta saadut affiniteetit. Tällä lähestymistavalla voidaan helposti saada lisää HIV-1:tä neutraloivia vasta-aineita alkupeäisessä kirjastossa läsnä oleviin verrattuna. Raskaan ketjun sekoituksesta syntyvien kloonien kompleksisuus viittaa myös siihen, että tätä lähestymistapaa voidaan käyttää somaattisen muuttumisen etenemisen kartoitukseen.

Kombinaatiokirjastot yhdistävät raskaita ja keveitä ketjuja sattumanvaraisesti niin, että voidaan määrittää, missä laajuudessa sellaisista kirjastoista johdetut vasta-aineet edustavat vasteena in vivo tuotettuihin. Periaatteessa, raskas/keveä -ketjuyhdistelmään kiinnittyvä antigeeni voisi syntyä sattumanvaraisesti, ts. kumpikaan ketju ei osallistu antigeenin sitomiseen in vivo, mutta yhdistelmä sitoo antigeeniä in vitro.

Käytettävissä olevat tiedot viittaavat kuitenkin siihen, että raskaat ketjut, immuunikirjastoista, jotka osallistuvat antigeenin lujasti sitomiseen in vitro, syntyvät antigeenis-

pesifisistä klooneita in vivo. Ensin, tutkimukset eivät yleensä ole onnistuneet tunnistamaan suuriaffiniteettisitojia ei-immunisoiduissa IgG-kirjastoissa. Katso julkaisuja: Persson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:2432-2436 (1991); ja Marks et al., Eur. J. Immunol., 21:985-991 (1991).

Lisäksi, kuten edellä kuvattiin, gp120-sitojia ei havaittu pannattaessa luuydin-IgG-kirjastoa HIV-seronegatiivisesta luovuttajasta gp120:tä vastaan. Toiseksi, raskaat ketjut, jotka liittyvät immunisoiduista kirjastoista oleviin sitojiin, olivat kirjastossa tyypillisesti suhteellisen suurella taajuudella, mikä osoittaa, että ne olivat vahvasti edustettuja immunisoiduissa eläimissä eristetyssä mRNA:ssa. Katso julkaisuja: Caton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:6450-6454 (1990); ja Persson et al., yllä. Kolmanneksi, immunisoiduista kirjastoista olevat raskaat ketjut vaikuttivat sanelevan spesifisyyden yhdistettäessä erilaisten keveiden ei-sukulaisketjujen kanssa esimerkissä 6 kuvatulla tavalla. Neljänneksi, tässä suoritettu intraklonaalisten raskaan ketjun varianttien eristäminen osoitti, että oli kloonattu aktiivinen vasta-ainevaste. Täten tunnetun raskaan ketjun sekoittaminen keveän ketjun sitojan kanssa ja käänteisesti on edullista tässä keksinnössä käyttöön, koska uusia neutraloivia Fab'eja voidaan saada in vivo muodostuvien lisäksi.

Raskaan ketjun promiskuiteetti, ts. raskaan ketjun kyky muodostaa pareja erilaisten keveiden ketjuen kanssa antigeeniaffiniteetin säilyessä, edustaa vakavia ongelmia in vivo keveä ketju-partnerien tunnistukselle. Tämä ei koske ainoastaan täsmällistä määritelmää partnereista, jotka ovat syntyneet samasta B-solusta, vaan myös sellaista, joka sisältää somaattisia muunnoksia kummasta hyvänsä parista. Vallitsevien raskas/keveä -ketjuyhdistelmien olemassaolo, erityisesti sellainen, johon liittyvät intraklonaaliset keveän ketjun variantit, viittaavat siihen, että osallistu-

vat keveät ketjut ovat hyvin edustettuja kirjastossa, ja luultavasti osallistuvat antigeeninsitomiseen in vivo. Promiskuiteetti tarkoittaa kuitenkin, että vaikka joitain yhdistelmiä luultavasti esiintyy in vivo, ei voida olla varmoja, ettei sekoiteta immuonipartneriketjuja rekombinaatiossa. Esimerkiksi käytännölisesti katsoen identtisen keveän ketjun (b6, B20) esiintyminen 2:ssa 33:sta kloonista viittaa siihen, että se on kirjastossa luultavasti yliedustettu, johdonmukaisesti antigeeni-stimuloitujen kloonien in vivo-osallistumisen kanssa. Ei kuitenkaan ole tapaa tietää, onko keveän ketjun in vivo-partneri b6- tai B20-raskas ketju vai itse asiassa muu raskas ketju, joka syntyy stimuloidusta kloonista.

Kombinaatiokirjastosta syntyvät keveät ketjut eivät voi olla niitä, joita käytetään in vivo. Siitä huolimatta on kiinostavaa huomata, että jotkin raskaat ketjut vaikuttavat suhteellisen nirsoilta keveä ketju-partnerin suhteen, kun taas toiset vaikuttavat olevan lähes välinpitämättömiä. Tätä havaintoa on lievennettävä keksinnöllä, että ilmeisen nirsot raskaat ketjut tästä analyysistä hyväksyvät sekalaisia keveitä ketjuja säilyttäen antigeeninsitomisen binaarisessa plasmidijärjestelmässä, kun parinmuodostukset pakotetaan alla esimerkissä 6 esitetyllä tavalla sen sijaan, että ne valitaan kompetitiivisessa tilanteessa.

Kahdessa raportissa verrataan raskas/keveä -ketjuyhdistelmiä, jotka syntyvät kombinaatiokirjastoista ja hybridoomista immunisoiduissa hiirissä. Kirjasto vaikuttaa alkavan mRNA:-lla ja heijastaa sen vuoksi luultavasti plasmasolupopulaatioita. Vaastakohtana hybridoomien ajatellaan heijastavan aktivoituja muttei lopullisesti erilaistuneita B-solupopulaatioita, ja EBV-transformaation heijastavan lepotilassa olevia B-solupopulaatioita.

Riippumatta siitä, mitkä keveän ketjun autenttisuutta koskevat perusteet ovat, kuvion 19 raskaat ketjut edustavat usei-

ta kiinnostavia ominaispiirteitä. Useimmin käytetty raskas ketju on klooni b8 -tyyppiä. Voitaisiin väittää, että tämä käyttö yksinkertaisesti edustaa PCR-amplifioinnin harhaa. Kuitenkin VH1a- ja VH3a -alukkeiden tässä ryhmässä amplifioimien kloonien suunnilleen yhtäsuurten lukumäärien esiintyminen todistaa tätä käsitystä vastaan. Lisäksi intraklonaalisten varianttien olemassaolo joissain ryhmissä osoittaa, että ainakin otetaan näytteitä alkuperäisen kirjaston eri geeneistä.

Tässä kloonatuilla vasta-aineilla on kvalitatiivinen suhde oireettoman luovuttajan seerumissa läsnä olevien polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa. Anti-gp120 (IIIB)-vasta-aineiden tiitteri oli noin 1:3000, jolloin yli 50 % reaktiivisuudesta estyy CD4:llä tai klooneista 12, 13 ja 14 olevien Fab'ien sekoituksella. Anti-gp120 (SF2)-vasta-aineiden tiitteri oli noin 1:800. Lisäksi lyhyen rajoitetun V3-silmukkapeptidin vastaisen seerumin tiitteri oli 1:500, ja jälleen täysimittaisen MN-V3-silmuikkapeptidin tiitteri oli vain 1:300. "Anti-CD4-kohta-vasta-aineiden" tärkeys vaikuttaa yleiseltä luovuttajilla, joilla on pitempiaikainen HIV-infektio siinä, että Fab'ien 12, 13 ja 14 sekoitus pystyi estämään seerumi-vasta-ainereaktiivisuuden suuren osuuden sitoutumisen gp120 (IIIB):n kanssa 26:ssa 28:sta testatusta luovuttajasta.

Fab'ien kyky neutraloida viruksia on ollut kiistanalainen alue. Yksi ongelmista on ollut, että Fab't on klassisesti luotu IgG:n papaiinisulatuksella. Jos Fab'llä, kuten tilanne usein on, on vähentynyt aktiivisuus suhteessa emä-IgG:hen, niin voi olla vaikeaa sulkea pois IgG-kontaminaatio Fab'n valmistuksessa. Yhdistelmä-DNA-Fab't neutraloivat kuitenkin epäilyksettä virusta, kuten tässä osoitetaan.

Vaikuttaa siltä, ettei HIV-1:n neutraloinnin mekanismi vaadi virioniaggregoitumista eikä gp120-verkkoutumista. Lisäksi CD4/gp120 -vuorovaikutuksen estolla ei ole korrelaatiota

neutralointiin. Keksinnön mukaisten kloonattujen neutraloivien Fab'ien olemassaolo sallinee molekyyliominaispiirteet, jotka suovat neutralointipotentiaalin tutkimisen. Esimerkiksi Fab 13:n sisältävien kloonien ryhmän tapauksessa tuon neutraloivan kloonin keveän ketjun ainutlaatuinen luonne viittaa siihen, että ketjusekoituskokeet, joissa 13-keveä ketju yhdistettiin muiden tuossa ryhmässä olevien raskaiden ketjujen kanssa, voisivat olla paljastavia. Raskaiden ketjujen, jotka ovat muodostaneet pareja kahden erilaisen keveän ketjun kanssa, on osoitettu säilyttävän antigeeniaffiniteettinsa, mutta sillä on muuttunut hienospesifisyys, kuten esimerkissä 6 osoitetaan.

Tässä tehdystä havainnosta suuresta lukumäärästä Fab'eja, joista vain rajallinen lukumäärä on voimakkaasti neutraloivia, voi olla tärkeitä seurauksia. Jos malli toistuu koko vasta-aineilla, vaikuttaisi siltä, että suuri osa gp120-rakenteesta voi olla eräässä mielessä "houkutin" ("decoy"), ts. immuunijärjestelmä voi ponnistella huomattavasti tuottaakseen vasta-aineita, joilla on suuri affiniteetti mutta rajallinen anti-viraalinen funktio. Tilanteen pahentamiseksi tehottomat vasta-aineet voivat sitoutua gp120:een ja estää voimakkaasti neutraloivien vasta-aineiden sitoutumisen. Tästä on ilmeisiä seurauksia rokotukselle, joka olisi suunniteltava etupäässä tuomaan esiin keksinnön mukaisia neutraloivia vasta-aineita.

6. Kombinaatiokirjaston valittujen raskaan ja keveän ketjun DNA-sekvenssien sekoittaminen binaarisessa plasmidijärjestelmässä

On kehitetty replikoniyhteensopivien plasmidien binaarinen järjestelmä raskaiden ja keveiden ketjujen sekalaisen rekombinaation potentiaalin testaamiseksi kombinaatio-vasta-ainekirjastoista eristettyjen humaani-Fab-fragmenttien ryhmän sisällä. Järjestelmän tehokkuus osoitetaan keksinnön mukaiselle kombinaatiokirjastolle, joka on johdettu oireettoman HIV-luovuttajan luuydinkirjastosta.

a. Binaarisen plasmidijärjestelmän konstruointi

Keksinnössä käytettävät binaariset plasmidit pTAC01H ja pTC01 sisältävät pelB -johtoalueen ja multippelit kloonauskohdat Lambda Hc2:sta ja Lambda Lc3:sta, vastaavasti, ja sarjan replikoniyhteensopivia ekspressiovektoreita pFL281 ja pFL261. Sekä pFL281 että pFL261 on kuvattu julkaisussa: Larimer et al.; Prot. Enc., 3:227-231 (1990), jonka sisältö liitetään täten tähän viitteeksi. pFL261:n ja pFL281:n nukleotidisekvenssit ovat EMBL-, GenBank- ja DDBJ -nukleotidisekvenssitietokannoissa tulonumeroilla M29363 ja M68946. Plasmidi pFL281 perustuu plasmidiin pFL260, joka myös kuvataan julkaisussa: Larimer et al., yllä, ja jonka tulonumero on M29362. Plasmidien pFL260 ja pF1281 välinen ainoa ero on, että pFL281:stä puuttuu pFL260:b 60-bp sekvenssi Eag I-kohdan ja the Xma III-kohdan välistä, antaen tulokseksi toisen kahdesta BamH I-kohdasta menetyksen. Tämä deleetio on tarpeen sallimaan BamH I Hc2-fragmentin kloonauksen ekspressiovektoriin tässä kuvatulla tavalla.

Replikoniyhteensopivissa ekspressiovektoreissa on kolme yhteistä elementtiä: (i) f1 yksijuosteiset DNA-page-intergeeniset IG-alueet; (ii) ankarasti säädelty tac-promoottori ja lac-operaattori; ja (iii) rbs-ATG -alue, jossa on spesifiset kloonauskohdat. Plasmidivektorit poikkeavat antibiootiresistenssimerkeiltään ja plasmidireplikoneiltaan: pFL261:ssä on geeni, joka koodittaa klooriamfenikoliasetyylitransferaasia (cat), ja joka antaa klooriamfenikoliresistenssin, ja p15A-replikonin; pFL281 sisältää geenin, joka koodittaa ß-laktamaasia (bla), joka antaa ampisilliiniresistenssin, ja ColE1-replikonin (ori) pMB1:stä. p15A- ja ColE2-replikonitr sallivat molempien plasmidien rinnan tapahtuvan ylläpidon samassa E. coli -isännässä.

Esimerkeissä 1a2) ja 1a3) valmistetut Hc2- ja Lc2-vektorit, muutettiin plasmidimuotoon käyttämällä standardimenetelmiä, jotka ovat ammattimiehelle tuttuja ja jotka kuvataan käsikirjassa: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989), ja sulatettiin seuraavaksi Xho I-Spe I:llä (pHc2) ja Sac I-Xba I (pLc2:ta varten). Synteettiset linkkerit sulatettuihin pHc2- ja Lc2-plasmideihin insertiota varten valmistettiin American Synthesis-laitteella. Linkkerit insertoitiin kloonauskohtien välisen etäisyyden lisäämiseksi sulatusten tehokkuuden lisäämiseksi. 5'- ja 3'-linkkerit kaksijuosteiden linkkeri-insertin valmistamiseksi pHc2:een olivat 5' TCGAGGGTCGGTCGGTCTCTAGACGGTCGGTCGGTCA 3' (SEKV. ID.NRO 133) ja 5' CTAGTGACCGACCGACCGTCTAGAGACCGACCGACCC 3' (SEKV. ID.NRO 134), vastaavasti. 5'- ja 3'-linkkerit kaksijuosteisen linkkeri-insertin valmistamiseksi pLc2:een olivat 5' CGGTCGGTCGGTCCTCGAGGGTCGGTCGGTCT 3' (SEKV. ID.NRO 135) ja 5' CTAGAGACCGACCGACCCTCGAGGACCGACCGACCGAGCT 3' (SEKV. ID.NRO 136), vastaavasti. Linkkerioligonukleotidien parit liitettiin erikseen vastaaviin, sulatettuihin, vasikansuolifosfataasilla käsiteltyihin vektoreihin.

Seuraavaksi pHc2:n ja pLc2:n multippelit kloonauskohdat siirrettiin ekspressiovektoreihin pFL281 ja pFL261, vastaavasti. Tämän prosessin suorittamiseksi sekä Lc2:n että Hc2:n multippelit kloonausalueet amplifioitiin erikseen PCR:llä tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Gram et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580 (1992), ja kuten kuvataan esimerkissä 2b käyttämällä Vent-polymeraasia (New England Biolabs) valmistajan suositusten mukaan. Eteenpäin-aluke, 5' CAAGGAGACAGGATCCATGAAATAC 3' (SEKV. ID.NRO 137) suunniteltiin aikaansaamaan pelB-johtosekvenssin "flush"-fuusion kloonausvektorien pFL261 ja pFL281 ribosomin sitoutumiskohtiin sisäisellä BamH I-kohdallaan, joka ilmaistaan alleviivatuilla nukleotideilla. Käänteisaluke 5' AGGGCGAATTGGATCCCGGGCCCCC 3' (SEKV. ID.NRO 138) suunniteltiin emäspariuttamaan alavirtaan pHc2/pLc2:n emävektorin kiinnostuksen kohteena olevalle alueelle ja luomaan toisen BamH I-kohdan. Sitten tulokseksi saadut Hc2- ja Lc2-PCR-amplifiointituotteet sulatettiin BamH I:llä aikaansaamaan yksijuosteiset BamH I-päätteet seuraavaa BamH I-linearisoituihin

pFL281- ja pFL261-vektoreihin liittämistä varten, vastaavasti. Tulokseksi saatua keveän ketjun vektoria, joka sisälsi Lc2-insertin, ja joka sai nimen pTC01, käytettiin tässä muodossa, kun taas raskaan ketjun vektoria modifioitiin edelleen histidiinihännällä sallimaan Fab-fragmenttien puhdistuksen immobilisoidulla metalliaffiniteettikromatografialla tavalla, joka kuvataan julkaisussa: Skerra et al.; Bio/Technology, 9:273-278 (1991). Tätä varten synteettiset linkkerioligonukleotidit, vastaavasti 5'- ja 3'-linkkerit, 5' CTAGTCATCATCATCATCATTAAGCTAGC 3' (SEKV. ID.NRO 139) ja 5' CTAGGCTAGCTTAATGATGATGATGATGA '3 (SEKV. ID.NRO 140) insertoitiin Spe I-kohtaan, itse asiassa poistaen dekapeptidipäätesekvenssin luoden raskaan ketjun vektorin, joka sai nimen pTAC01H. Fab-fragmentin ekspressiota kaikissa seuraavissa kloonauskokeissa pakjotettiin pakotettiin ylös lisäämällä kaikkiin väliaineisiin ja levyille 1 % (paino/tilavuus) glukoosia.

b. Ekspressioplasmidien konstruointi

Keveän ketjun vaihtelevan alueen ekspressiota varten edellä valmistettu pTC01 sulatettiin ensin Sac I:llä ja Xba I:llä; sitten saatiin yksittäiset keveän ketjun insertit sulattamalla erikseen 22 esimerkissä 2 kuvatulla tavalla valmistetuista ja seulotuista ja kuviossa 7 luetelluista pComb2-3-plasmideista, jotka sitoutuvat gp120:een samalla entsyymien yhdistelmällä, ja eristämällä 0,7-kb fragmentin käyttämällä alhaisen sulamispisteen agaroosigeelielektroforeesia, minkä jälkeen seurasi b-agaroosisulatus. Ketjunsekoituskokeita varten valittiin seuraavat edustavat jäsenet kustakin kuviossa 7 esitetyistä seitsemästä ryhmästä: b11; b6; b4-b12-b7-b21; b3; s8; b1-b14-b24; b13-b22-B26-b8-b18-b27-B8-B35-s4; ja yksi silmukkapeptidinsitomisklooni, p35. Eri ryhm't ilmaistaan puolipiste-erotuksin kun taas saman ryhmän jäsenet erotetaan viivoilla. Tulokseksi saadut eristetyt keveät ketjut liitettiin erikseen PTC01:een yön yli 16 °C:ssa standardiolosuhteissa käyttämällä 21 keveän ketjun pTC01-ekspressiovektorin muodostamiseksi insertti/vektori -moo-

lisuhdetta 5:1.

Raskaan ketjun vaihtelevan domeenin ekspressiota varten edellä valmistettu pTAC01H sulatettiin ensin Xho I:llä ja Spe I:llä; sitten saatiin raskaan ketjun insertit 20 pComb2-3-plasmidin erillisillä PCR-amplifiointireaktioilla keveän ketjun inserteistä. Restriktiosulatuksen sijasta raskaan ketjun inserttien eristykseen käytettiin PCR:ää, jotta saataisiin raskas ketju ilman cpIII-geeniankkurisekvenssiä vektorissa. PCR-reaktiota varten käytettiin esimerkeissä 2a1) ja 2a2) kuvatulla tavalla vastaavia 5′- ja 3′-alukkeita, 5′ CAGGTGCAGCTCGAGCAGTCTGGG 3′ (VH1a) (SEKV. ID.NRO 42) ja 5′ GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGGG 3′ (CG1z) (SEKV. ID.NRO 44) amplifioimaan alueen, joka vastaa raskasta ketjua. Tuloksesi saadut PCR-tuotteet puhdistettiin alhaisen sulamispisteen elektroforeesilla, sulatettiin Xho I:llä ja Spe I:llä, puhdistettiin uudelleen, ja liitettiin erikseen samalla lailla valmistettuun raskaan ketjun pTAC01H-vektoriin käyttämällä 21 raskaan ketjun pTAC01H-ekspressiovektorin muodostamiseen vektori/insertti-moolisuhdetta 1:2.

c. Binaaristen plasmidien kotransfektio

Valmistettiin $CaCl_2$-kompetentteja XL1-Blue-soluja (Stratagene; recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, lac, {F′ proAB, $lacI^q$, ZDM15, Tn10(tet^R)}), ja transformoitiin noin 0,5 µg:lla puhdistettua DNA:ta kustakin plasmidista 20 keveän ketjun vektorin ohjattuihin risteytyksiin kunkin kanssa 20:tä raskaan ketjun vektorin kanssa. Molempien plasmidien ja episomin läsnäolon suhteen valittiin siirrostamalla transformantteja kolmoisantibioottiagarlevyille (100 µg/ml karbenisilliiniä, 30 µg/ml klooriamfenikolia, 10 µg/ml tetrasykliiniä, 32 g/l LB-agar), jotka sisälsivät 1 % glukoosia.

Konstruoitiin binaarinen plasmidijärjestelmä, joka koostui kahdesta replikoniyhteensopivasta plasmidista tavalla, joka esitetään 14:ää. Raskaan ketjun pTAC01H-vektori esitetään

kaavamaisesti kuviossa 14A, ja keveän ketjun pTC01-vektori esitetään kaavamaisesti kuviossa 14B. Molemmissa ekspressiovektoreissa on samanlaiset kloonauskohdat, mukaan lukien pel B-johtosekvenssit fuusioituina ribosomin sitoutumiskohtiin ja tac-promoottorit BamH I-kohtien kautta, kuten kuviossa 15 esitetään. Multippelien kloonauskohtien nukleotidisekvenssit yhdessä tac-promoottorin, ribosomin sitoutumiskohtien (rbs) ja alleviivattujen relevanttien restriktiokohtien ohella keveän ketjun vektorille, pTC01, ja raskaan ketjun vektorille, pTAC01H, esitetään vastaavasti kuviossa 15A ja kuviossa 15B. Sekvenssit luetellaan myös sekvenssiluettelossa, kuten piirrosten lyhyessä kuvauksessa kuvataan. Raskaan ketjun vektori pTAC01H sisältää myös $(His)_5$-hännän sallimaan yhdistelmä-DNA-Fab-fragmenttien puhdistuksen immobilisoidulla metalliaffiniteettikromatografialla. Molempien plasmidien läsnäolon samassa bakteerisolussa suhteen valitaan molempien antibioottien läsnäololla väliaineissa. Ekspressio estyy kasvun aikana osaksi glukoosia lisättäessä ja indusoituu IPTG:tä lisättäessä huoneenlämpötilassa. Näissä olosuhteissa molemmat plasmidit ovat stabiileja solun sisällä ja ylläpitävät Fab fragmentin ekspressiota määritettynä ELISA'lla käyttäen vuohi-anti-humaani-kappa- ja vuohi-anti-humaani-IgG1-vasta-aineita.

d. Yhdistelmä-DNA-Fab-fragmenttien valmistus

Bakteeriviljelmiä antigeenisitomisaktiivisuuden määritykseen kasvatettiin 96-kaivoisillakufosviljelylevyillä (Costar #3596). Sekoitettiin kaivoa kohden 250 µl Superbroth'ia [SB sisälsi seuraavia valmistusaineita litraa kohden: 10 g 3-(N-morfolino)propaanisulfonihappoa, 30 g tryptonia, 20 g hiivauutetta pH-arvossa 7,0 25 °C:ssa), joka sisälsi 30 µg/ml klooriamfenikolia, 100 µg/ml karbenisilliinia ja 1 % (paino/tilavuus)] glukoosia, ja siirrostettiin yhdellä ainoalla kaksoistransformantilla, joka valmistettiin esimerkissä 6c edellä. Sitten siirrostettuja levyjä pidettiin kohtuullisesti sekoittaen (200 r/min) horisontaalisekoittimessa 7 - 9 tunnin ajan 37 °C:ssa, kunnes A_{550} oli noin 1 - 1,5. Solut

kerättiin sentrifugoimalla mikrotiitterilevyä (1,500 X g 30 min ajan 4 °C:ssa), supernatantit heitettiin pois, ja solut suspendoitiin uudelleen ja indusoitiin yön yli huoneenlämpötilassa tuoreessa väliaineessa, joka sisälsi 1 mM IPTG:tä, muttei glukoosia. Solut kerättiin sentrifugoimalla, suspendoitiin 175 µl:aan PBS:ää (10 mM natriumfosfaattia, 160 mM NaCl:ää pH-arvossa 7,4 lämpötilassa 25 °C), joka sisälsi 34 µg/ml fenyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF) ja 1,5 % (paino/tilavuus) streptomysiinisulfaattia, ja liuotettiin kolmella pakastus/sulatus-syklillä välillä -80 °C ja 37 °C. Tulokseksi saadut raakauutteet kirkastettiin osaksi sentrifugoimalla kuten edellä ennen analysoimista antigeeninsitomis-ELISA'lla.

e. Suhteellisten affiniteettien analyysi ja määritys
Suhteelliset affiniteetit määritettiin kuten edellä esimerkissä 2b6) sen jälkeen kun kaivot oli päällustetty 0,1 µg:lla antigeeniä. Valitut antigeenit sisälsivät tetanustoksoidia ja yhdistelmä-DNA-gp120 (kanta IIIB):tä ja gp120 (kanta SF2):ta. Kutakin antigeeniä varten testattiin negatiivinen kontrolliuute XL1-Blue-soluista, jotka oli kotransformoitu pTC01:llä ja pTAC01H:lla määrittämään, oliko määrityksessä muilla E. colissa olevilla komponenteilla mitään affiniteettia antigeenejä kohtaan. Kukin uute määritettiin BSA-sitomisaktiivisuuden ja BSA-positiivisia klooneja pidettiin negatiivisina. Valmistettiin kaikki mahdolliset yksinkertaiset transformantit, jotka ekspressoivat vain yhtä ketjua tavalla, joka kuvattiin kaksoistransformanteille, ja havaittiin, ettei niillä ollut affiniteettia mihinkään käytetyistä antigeeneistä. Määrityksen luonteesta johtuen ei voitu määrittää, johtuiko tämä itse yksittäisten ketjujen sitoutumisen puutteesta vai ekspression tai laskostumisen puuttumisesta.

f. Raskaiden ja keveiden ketjujen suorien risteymien tulokset gp120/gp160-sitoutumisvasta-aineiden sarjan sisällä
Fab-fragmentit, jotka oli johdettu saman oireettoman HIV-

luovuttajan luuytimestä, mutta jotka oli pannattu gp120 (IIIB):tä, gp160 (IIIB):tä ja gp120 (SF2):ta vastaan, määrättiin yhteen seitsemästä ryhmästä niiden raskaiden ketjujen CDR3:n aminohapposekvenssien perusteella esimerkissä 4 kuvatulla tavalla. Samasta kirjastosta eristettiin vasta-aineita pakotetulle (constrained) hypervariaabelille v3-silmukkamaiselle peptidille JSISIGPGRAFYTGZC (SEKV. ID.NRO 141). Ketjunsekoituskokeissa valittiin seuraavat edustavat jäsenet kustakin seitsemästä ryhmästä, jotka esitetään kuviossa 7: b11; b6; b4-b12-b7-b21; b3; s8; b1-b14-b24; b13-b22-B26-b8-b18-b27-B8-B35-s4; ja yksi silmukkapeptidiä sitova klooni, p35. Klooneilla b4, b7, b12 ja b21 nähtiin HIV:n vastaista neutralointiaktiivisuutta tarkkailtaessa infektion estoa synsytiuminmuodostuksella, ja klooneilla b13, b12 ja b4 tarkkailtaessa p24-tuotantoa esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Kloonattiin keveät ja raskaat ketjut alkuperäisistä konstruktioista, ja kotransformoitiin kaikki mahdolliset binaariyhdistelmät XL1-Blue -soluihin edellä kuvatulla tavalla.

Täydellisen risteytyksen tulokset esitetään kuviossa 16. Kuten on odotettavissa, eri Fab-fragmenteista peräisin olevilla identtisillä ketjuilla oli samanlaiset sitoutumisominaisuudet, esimerkiksi b18HC, b27HC, B8HC, B35HC, s4HC. Alkuperäisten raskaiden ketjujen risteymillä alkuperäisten keveiden ketjujen kanssa oli kussakin tapauksessa selvästi alkuperäinen sitomisaktiivisuus. Vähäisempiä eroja esiintyi joidenkin raskaiden ketjujen välillä, joilla oli identriset variaabelin domeenin sekvenssit, esimerkiksi b4 ja b12 (konstantteja domeeneja ei sekvensöity millekkään konstruktioista). Poikkeus on b8HC, joka oli variaabelilta domeeniltaan identtinen b18HC:n, b27HC:n, B8HC:n, B35HC:n ja s4HC:n kanssa, mutta jolla silti nähtiin enemmän ristireaktiivisuutta. Todennäköisesti tämä johtuu ekspressiotasojen eroista solussa tai eroista konstantin domeenin sekvensseissä. Raskaiden ketjujen välillä esiintyi selviä eroja niiden taipumuksessa hyväksyä eri keveitä ketjuja ja edelleen sitoa

antigeeniä, mutta jopa vähiten promiskuoosi raskas ketju ryhmässä, joka pannattiin gp120 (IIIB):tä vastaan, b1HC, teki yhä niin 43 %:ssa risteymistään. Kirjon toisessa päässä 5 raskasta ketjua, b11HC, b6HC, b12HC, b7HC ja b8HC, risteytyivät tuottavasti tämän ryhmän kaikkien keveiden ketjujen kanssa. Yksityiskohtaisesti tutkituilla raskas ketju-risteytyksillä (kaikki s4HC:stä, B35HC:stä ja B26HC:stä; useimmat b12HC:stä ja b12HC:stä), ei havaittu merkittäviä eroja näennäisessä sitomisaffiniteetissa Fab-fragmenttien välillä käytettäessä samaa raskasta ketjua mutta eri keveitä ketjuja kuten esitetään kuviossa 17, jossa IC_{50} kilpailusta liukoisen gp120 (IIIB):n kanssa oli noin 10^{-8} M.

Alkuperäisen seitsemän ryhmän sisällä, jotka järjestettiin raskaiden ketjujen CDR3:n sekvenssin mukaan ja jotka ilmaistaan vaakasuorilla ja pystysuorilla viivoilla kuviossa 16, esiintyi täydellinen promiskuiteetti, ts. raskaat ja keveät ketjut näiden CDR3:n määrittämien ryhmien sisällä olivat täysin vapaasti keskenään pareja muodostavia. Kuitenkin oli puutetta promiskuiteetista muiden ryhmien välillä, esimerkiksi, b1HC-b24HC:n ja b13LC-s4LC:n välillä. Näiden sekvenssipohjaisten ryhmien analyysissä proteiiniantigeeni, jota vastaan fagi-"display"-kirjasto pannattiin, ei ollut kriittinen tekijä. Poikkeus tähän tapaukseen oli p35HC:n risteys kaikkien keveiden ketjujen kanssa; ainoa risteytys, joka sitoutui joko gp120:een (SF2-kanta) tai alkuperäiseen antigeeniin, silmukkapeptidiin, oli risteytys, joka sisälsi alkuperäisen raskaan ja keveän ketjun.

Toisin kuin raskaat ketjut, ei mikään keveistä ketjuista risteytynyt tuotteliaasti kaikkien raskaiden ketjujen kanssa, eikä mikään erottunut muista keveistä ketjuista epätavallisen alhaisella promiskuiteetilla.

Neutralointimääritykset suoritettiin esimerkissä 3 kuvatulla tavalla, ohjattu risteytyminen, joka oli tulosta kloonista b12 olevan raskaan ketjun parinmuodostuksesta kloonista b21

olevan keveän ketjun kanssa, oli tehokas HIV-1:n neutraloinnissa.

g. Raskaiden ja keveiden ketjujen interantigeeniset risteymät

Sen määrittämiseksi, voidaanko samasta kirjastosta peräisin olevien suuriaffiniteettisten Fab-fragmenttien risteymistä tehdyt johtopäätökset ulottaa kirjastoille, jotka eivät ole sukua, ei-sukulais-gammalk-Fab-fragmentti (P3-13), joka on spesifinen tetanustoksoidille ja joka oli eri luovuttajasta, valittiin risteytysten uuteen sarjaan [klooni 3 julkaisussa: Persson et al.; Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88:2432-2436 (1991)]. Uutteet koetettiin tetanustoksoidilla tai gp120 (IIIB):llä. Tiedot varmistavat gp120-risteymäkokeesta saadut tulokset, että raskas ketju määrää sitomisaktiivisuuden antigeeniä kohtaan. Kloonin P3-13 raskas ketju muodosti parin keveiden ketjujen b4, b12, b21 ja b14 kanssa tuottaen Fab-fragmentin, jolla on affiniteettia tetanustoksoidia kohtaan; P3-13:n keveä ketju muodosti parin b3:n, b6:n, b11:n ja b14:n raskaiden ketjujen kanssa tuottaen Fab-fragmentin, jolla oli affiniteettia gp120 (IIIB):tä kohtaan. Mikään keveistä ketjuista, joka oli peräisin gp120-sitojista, ei pystynyt antamaan gp120-spesifisyyttä yhdistelmänä P3-13-raskaan ketjun kanssa.

Samalla lailla oli P3-13-keveä ketju kyvytön luomaan tetanustoksoidispesifisyyttä yhdistelmänä minkään raskaista ketjuista kanssa, joka oli peräisin gp120-sitojista, varmistaen raskaan ketjun dominanssin vasta-aine/antigeeni-vuorovaikutuksessa. Kiinnostavalla tavalla kaikki kolme keveää ketjuä, joilla nähtiin voimakas tetanustoksoidin vastainen signaali (b4, b12, b21), olivat saman ryhmän jäseniä lajiteltaessa niiden alkuperäisten raskaiden ketjujen CDR3'ien mukaan. Kuten ei-sukulaiskirjastojen välisistä risteymistä voitaisiin odottaa, ei ainoastaan ollut alhaisempi promiskuiteettiaste, ts. ketjut pariutuivat tuotteliaasti paljon harvempien komplementaaristen ketjujen kanssa, vaan näennäisten

affiniteettivakioiden alue kompetitiiviusella ELISA'lla määritettynä oli paljon leveämpi ($6,3 \times 10^{6}$ - $6,3 \times 10^{-8}$ M). Alkuperäisen P3-13-keveän ketjun korvaaminen P3-13-Fab-fragmentissa toisella keveällä ketjulla alensi Fab'n affiniteettia tetanustoksoidia kohtaan 10 - 100-kertaisesti (tasolta $6,3 \times 10^{-8}$ M tasolle $6,3 \times 10^{-6}$ M). P3-13:n keveän ketjun risteytyksissä HIV-pannausten kaikkien raskaiden ketjujen kanssa tuotteliailla risteytyksillä oli samanlaiset affiniteetit gp120 (IIIB):hen ($2,5 \times 10^{7}$ - $6,3 \times 10^{-7}$ M), lukuunottamatta b14HC/P3-13LC:tä, jonka signaali oli liian heikko näennäisen sitoutumisvakion varmaan määritykseen. Nämä affiniteetit olivat 5-kertaisesti alhaisemmat kuin kuin alkuperäisten keveiden ketjujensa kanssa olevilla gp120-raskailla ketjuilla.

Siten tulokset osoittavat, että ketjun sekoitus on yhä edelleen eräs in vitro muttei in vivo sallittu menettely, jonka voidaan odottaa auttavan vasta-aineen vaihtelevuuden laajentamisessa luonnollisen ulkopuolelle. Keksinnön mukaisen binaarisen järjestelmän nujertava ominaispiirre on sen kyky luoda suuret lukumäärät (useita satoja) ohjattuja risteytyksiä karakterisoitujen keveiden ja raskaiden ketjujen välillä ilman tarvetta kloonata uudelleen yksittäisiä ketjuja kutakin risteytystä varten alkuvektorikonstruoinnin jälkeen. Käytettäessä yhdistelmänä fagi-"display"-menetelmän ja biologisten määritysten kanssa se sallii antigeeniä sitovien kloonien poolin kiinnostavimman alaryhmän nopean analyysin ketjunsekoituksella tarkoituksena biologisesti tai kemiallisesti aktiivisten vasta-aineiden löytäminen. Tässä tutkittujen antigeenien ryhmällä useimmat raskaat ketjut yhdistyivät joukon keveitä ketjuja kanssa tuottaen antigeeniä sitovan Fab-fragmentin.

Nämä tulokset ovat tärkeitä merkkejä kombinaatiovasta-ainekirjastojen monimuotoisuudesta. Vaikka ei ole mahdollista ennustaa luotettavasti keveän ja raskaan ketjun alkuperäisiä in vivo-yhdistelmiä yksityisten ketjujen hämmästyttävästä

promiskuiteetista johtuen, yhdistelmävasta-ainekirjastot hyödyntävät sitä tosiseikkaa, että jopa etäistä sukua olevat saman antigeenin vastaiset Fab'it voivat yhdistyä in vitro antamaan ketjuyhdistelmiä, joita ei esiinny in vivo. Itse asiassa sen jälkeen kun on tunnistettu määrättyu lukumäärä vasta-aineita, joilla on osoitettu olevan jotain biologista tai kemiallista aktiivisuutta, voi olla parempi sekoittaa niiden yksittäisiä ketjuja ohjatusti kuin jatkaa näytteenkeräystä sattumanvaraisesti sitojien samasta poolista. Laajennuksena, tässä järjestelmässä havaittu promiskuiteetti osoittaa, että kirjastoissa, jotka on konstruoitu käyttämällä degeneroituneita, kemiallisesti syntetisoituja oligonukleotideja, pitäisi olla huomattava joustavuus, jossa erilliset synteettiset raskaat ketjut voivat muodostaa parin erillisten synteettisten keveiden ketjujen kanssa luoden erillisiä, antigeeniä sitovia Fab-fragmentteja. Kombinaatiokirjastojen moniomuotoisuus yhdistettynä ketjunsekoituksen kanssa pitäisi sallia kolmiulotteisen avaruuden laajan hyödyntämisen ratkaisten täten ongelman, kuinka approksimoida molekyylejä vasta-aineen, substraatin ja kofaktorin kolmikomponenttikompleksissa.

7. Materiaalien talletus

Seuraavat solulinjat on talletettu 30. syyskuuta 1992 kansainväliseen talletuslaitokseen the American Type Culture Collection (ATCC), 1301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA:

Solulinja	ATCC-tulonumero
E. coli MT11	ATCC 69078
E. coli MT12	ATCC 69079
E. coli MT13	ATCC 69080

Edellä luetellut talletukset, MT11, MT12 ja MT13 ovat bakteerisoluja (E. coli), jotka sisältävät ekspressiovektorin pComb2-3 Fab'ien vastaavaa ekspressiota varten, joita merkitään nimillä b11 (klooni b11), b12 (klooni b12), ja b13 (klooni b13), ja jotka valmistettiin esimerkissä 2b. Raskaan

ja keveän ketjun vaihtelevien domeenien sekvenssit luetellaan kuviossa 10 ja 11, vastaavasti. Tämä talletus tehtiin kansainvälisen Budapestin sopimuksen mukaan. Tämä varmistaa elävän viljelmän ylläpidon 30 vuoden ajan talletuspäiväyksestä. Organismit ovat saatavilla ATCC'sta Budapestin sopimuksen ehtojen mukaan, mikä varmistaa viljelmän jälkeläisten pysyvän ja rajoittamattoman saatavuuden yleisölle relevantin US-patenttijulkaisun julkaisemisen yhteydessä tai minkä hyvänsä US- tai muun maan patenttihakemuksen nähtäville panon yhteydessä, kumpi hyvänsä tapahtuu aikaisemmin, ja varmistaa jälkeläisten saatavuuden laitokselle U.S. Commissioner of Patents ja Trademarks määräämälle 35 U.S.C. §122:n mukaan ja laitoksen U.S. Commissioner of Patents ja Trademarks sääntöjen mukaan (mukaan lukien 37 CFR §1.14 viitaten erityisesti 886 OG 638:aan). Tämän patenttihakemuksen siirron saaja on hyväksynyt, että viljelmätalletus kuolisi tai katoaisi tai dtuhoutuisi sopivissa olosuhteissa kasvatettaessa, se korvattaisiin tiedotettaessa nopeasti saman viljelmän elävällä näytteellä. Talletetun kannan saatavuutta ei ole pidettävä lupana keksinnön toteuttamiseen ristiriidassa minkä hyvänsä hallituksen patenttilakiensa mukaan myöntämien oikeuksien kanssa.

Edellä olevaa kirjallista selitystä pidetään riittävänä mahdollistamaan ammattimiehelle keksinnön harjoittamisen. Keksinnön suoja-ala ei rajoitu talletettuihin solulinjoihin, koska talletettu suoritusmuoto on tarkoitettu keksinnön yhden näkökannan yhdeksi kuvaukseksi, ja kaikki solulinjat, jotka ovat funktionaalisesti samanarvoisia, kuuluvat keksinnön suoja-alaan. Talletettu materiaali ei muodosta tunnustusta, että tähän sisältyvä kirjallinen kuvaus on riittämätön keksinnön minkään näkökannan, mukaan lukien sen parhaan suoritustavan toteuttamisen sallimiseen, eikä sen saa katsoa rajoittavan patenttivaatimusten suoja-alaa erityisiin kuvauksiin, joita se edustaa. Itse asiassa keksinnön eri modifikaatiot tässä esitettyjen ja kuvattujen lisäksi ilmenevät ammattimiehille edellä olevasta kuvauksesta, ja kuuluvat

oheisten patenttivaatimusten suoja-alaan.

SEVENSSILUETTELO

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:
(A) VASTAANOTTAJA: The Scripps Research Institute, Office of Patent Counsel
(B) KATU: 10666 North Torrey Pines Road, TPC 8
(C) KAUPUNKI: La Jolla
(D) VALTIO: CA
(E) MAA: USA
(F) POSTINUMERO: 92037
(G) PUHELIN: 619-554-2937
(H) TELEFAX: 619-554-6312

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: HUMAN NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 151

(iv) TIETOKONEELLA LUETTAVISSA OLEVA MUOTO:
(A) VÄLINEEN TYYPPI: Disketti
(B) TIETOKONE: IBM PC-yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, versio #1.25 (EPO)

(v) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT
(A) HAKEMUSNUMERO: PCT/US93/09328
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 1993-09-30

(vi) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
(A) HAKEMUSNUMERO: US 07/954,148
(B) JÄTTÖPÄIVÄ: 1992-09-30

(2) SEKVENSSIN ID NO: 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 173 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:1:

GGCCGCAAAT TCTATTTCAA GGAGACAGTC ATAATGAAAT ACCTATTGCC TACGGCAGCC 60

GCTGGATTGT TATTACTCGC TGCCCAACCA GCCATGGCCC AGGTGAAACT GCTCGAGATT 120

TCTAGACTAG TTACCCGTAC GACGTTCCGG ACTACGGTTC TTAATAGAAT TCG 173

(2) SEKVENSSIN ID NO: 2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 173 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:2:

TCGACGAATT CTATTAAGAA CCGTAGTCCG GAACGTCGTA CGGGTAACTA GTCTAGAAAT 60

CTCGAGCAGT TTCACCTGGG CCATGGCTGG TTGGGCAGCG AGTAATAACA ATCCAGCGGC 120

TGCCGTAGGC AATAGGTATT TCATTATGAC TGTCTCCTTG AAATAGAATT TGC 173

(2) SEKVENSSIN ID NO: 3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 131 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:3:

TGAATTCTAA ACTAGTCGCC AAGGAGACAG TCATAATGAA ATACCTATTG CCTACGGCAG 60

CCGCTGGATT GTTATTACTC GCTGCCCAAC CAGCCATGGC CGAGCTCGTC AGTTCTAGAG 120

TTAAGCGGCC G 131

(2) SEKVENSSIN ID NO: 4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 139 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:4:

TCGACGGCCG CTTAACTCTA GAACTGACGA GCTCGGCCAT GGCTGGTTGG GCAGCGAGTA 60

ATAACAATCC AGCGGCTGCC GTAGGCAATA GGTATTTCAT TATGACTGTC TCCTTGGCGA 120

CTAGTTTAGA ATTCAAGCT 139

(2) SEKVENSSIN ID NO: 5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 10 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: sisäinen fragmentti

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:5:

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
1 5 10

(2) SEKVENSSIN ID NO: 6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 26 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:6:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu
20 25

(2) SEKVENSSIN ID NO: 7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 23 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:7:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu
20

(2) SEKVENSSIN ID NO: 8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 198 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:8:

TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAATTTCA 60

CACAGGAGGA AGGATCCATG AAATACCTAT TGCCTACGGC AGCCGCTGGA TTGTTATTAC 120

TCGCTGCCCA ACCAGCCATG GCCGAGCTCG GTCGGTCGGT CCTCGAGGGT CGGTCGGTCT 180

CTAGAGTTAA GCGGCCGC 198

(2) SEKVENSSIN ID NO: 9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 198 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:9:

GCGGCCGCTT AACTCTAGAG ACCGACCGAC CCTCGAGGAC CGACCGACCG AGCTCGGCCA 60

TGGCTGGTTG GGCAGCGAGT AATAACAATC CAGCGGCTGC CGTAGGCAAT AGGTATTTCA 120

TGGATCCTTC CTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAT TATACGAGCC 180

GATGATTAAT TGTCAACA 198

(2) SEKVENSSIN ID NO: 10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:10:

Met Lys Thr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Leu
20

(2) SEKVENSSIN ID NO: 11 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 220 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:11:

TGTTGACAAT TAATCATCGG CTCGTATAAT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAATTTCA 60

CACAGGAGGA AGGATCCATG AAATACCTAT TGCCTACGGC AGCCGCTGGA TTGTTATTAC 120

TCGCTGCCCA ACCAGCCATG GCCCAGGTGA AACTGCTCGA GGGTCGGTCG GTCTCTAGAC 180

GGTCGGTCGG TCACTAGTCA TCATCATCAT CATTAAGCTA 220

(2) SEKVENSSIN ID NO: 12 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 220 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:12:

TAGCTTAATG ATGATGATGA TGACTAGTGA CCGACCGACC GTCTAGAGAC CGACCGACCC 60

TCGAGCAGTT TCACCTGGGC CATGGCTGGT TGGGCAGCGA GTAATAACAA TCCAGCGGCT 120

GCCGTAGGCA ATAGGTATTT CATGGATCCT TCCTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC 180

AATTCCACAC ATTATACGAG CCGATGATTA ATTGTCAACA 220

(2) SEKVENSSIN ID NO: 13 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 28 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: N-terminaalinen

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:13:

Met Lys Thr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu Leu Glu
20 25

(2) SEKVENSSIN ID NO: 14 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 7 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: C-terminaalinen

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:14:

Thr Ser His His His His His
1 5

(2) SEKVENSSIN ID NO: 15 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 32 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:15:

GGCCGCAAAT TCTATTTCAA GGAGACAGTC AT 32

(2) SEKVENSSIN ID NO: 16 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:16:

AATGAAATAC CTATTGCCTA CGGCAGCCGC TGGATT 36

(2) SEKVENSSIN ID NO: 17 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 32 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:17:

GTTATTACTC GCTGCCCAAC CAGCCATGGC CC 32

(2) SEKVENSSIN ID NO: 18 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:18:

CAGTTTCACC TGGGCCATGG CTGGTTGGG 29

(2) SEKVENSSIN ID NO: 19 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:19:

CAGCGAGTAA TAACAATCCA GCGGCTGCCG TAGGCAATAG 40

(2) SEKVENSSIN ID NO: 20 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 38 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:20:

GTATTTCATT ATGACTGTCT CCTTGAAATA GAATTTGC 38

(2) SEKVENSSIN ID NO: 21 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:21:

AGGTGAAACT GCTCGAGATT TCTAGACTAG TTACCCGTAC 40

(2) SEKVENSSIN ID NO: 22 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 38 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:22:

CGGAACGTCG TACGGGTAAC TAGTCTAGAA ATCTCGAG 38

(2) SEKVENSSIN ID NO: 23 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 33 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:23:

GACGTTCCGG ACTACGGTTC TTAATAGAAT TCG 33

(2) SEKVENSSIN ID NO: 24 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 28 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:24:

TCGACGAATT CTATTAAGAA CCGTAGTC 28

(2) SEKVENSSIN ID NO: 25 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 34 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:25:

TGAATTCTAA ACTAGTCGCC AAGGAGACAG TCAT 34

(2) SEKVENSSIN ID NO: 26 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:26:

AATGAAATAC CTATTGCCTA CGGCAGCCGC TGGATT 36

(2) SEKVENSSIN ID NO: 27 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 31 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:27:

GTTATTACTC GCTGCCCAAC CAGCCATGGC C 31

(2) SEKVENSSIN ID NO: 28 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:28:

GAGCTCGTCA GTTCTAGAGT TAAGCGGCCG 30

(2) SEKVENSSIN ID NO: 29 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 48 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:29:

GTATTTCATT ATGACTGTCT CCTTGGCGAC TAGTTTAGAA TTCAAGCT 48

(2) SEKVENSSIN ID NO: 30 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:30:

CAGCGAGTAA TAACAATCCA GCGGCTGCCG TAGGCAATAG 40

(2) SEKVENSSIN ID NO: 31 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 27 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:31:

TGACGAGCTC GGCCATGGCT GGTTGGG 27

(2) SEKVENSSIN ID NO: 32 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:32:

TCGACGGCCG CTTAACTCTA GAAC 24

(2) SEKVENSSIN ID NO: 33 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 666 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:33:

CCATTCGTTT GTGAATATCA AGGCCAAGGC CAATCGTCTG ACCTGCCTCA ACCTCCTGTC 60

AATGCTGGCG GCGGCTCTGG TGGTGGTTCT GGTGGCGGCT CTGAGGGTGG TGGCTCTGAG 120

GGTGGCGGTT CTGAGGGTGG CGGCTCTGAG GGAGGCGGTT CCGGTGGTGG CTCTGGTTCC 180

GGTGATTTTG ATTATGAAAA GATGGCAAAC GCTAATAAGG GGGCTATGAC CGAAAATGCC 240

GATGAAAACG CGCTACAGTC TGACGCTAAA GGCAAACTTG ATTCTGTCGC TACTGATTAC 300

GGTGCTGCTA TCGATGGTTT CATTGGTGAC GTTTCCGGCC TTGCTAATGG TAATGGTGCT 360

ACTGGTGATT TTGCTGGCTC TAATTCCCAA ATGGCTCAAG TCGGTGACGG TGATAATTCA 420

CCTTTAATGA ATAATTTCCG TCAATATTTA CCTTCCCTCC CTCAATCGGT TGAATGTCGC 480

CCTTTTGTCT TTAGCGCTGG TAAACCATAT GAATTTTCTA TTGATTGTGA CAAAATAAAC 540

TTATTCGGTG TCTTTGCGTT TCTTTTATAT GTTGCCACCT TTATGTATGT ATTTTCTACG 600

TTTGCTAACA TACTGCGTAA TAAGGAGTCT TAATCATGCC AGTTCTTTTG GGTATTCCGT 660

TATTAT 666

(2) SEKVENSSIN ID NO: 34 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 211 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: tuntematon

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(v) FRAGMENTTITYYPPI: sisäinen fragmentti

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:34:

```
Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro
1               5                  10                  15

Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
            20                  25                  30

Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
        35                  40                  45

Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp PheAsp
    50                  55                  60

Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala
65                  70                  75                  80

Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val
                85                  90                  95

Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser
            100                 105                 110

Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn
        115                 120                 125
```

```
Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn
    130                 135                 140

Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg
145                 150                 155                 160

Pro Phe Val Phe Ser Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys
                165                 170                 175

Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val
            180                 185                 190

Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn
        195                 200                 205

Lys Glu Ser
    210
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 35 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 48 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:35:

GAGACGACTA GTGGTGGCGG TGGCTCTCCA TTCGTTTGTG AATATCAA 48

(2) SEKVENSSIN ID NO: 36 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:36:

TTACTAGCTA GCATAATAAC GGAATACCCA AAAGAACTGG 40

(2) SEKVENSSIN ID NO: 37 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:37:

TATGCTAGCT AGTAACACGA CAGGTTTCCC GACTGG 36

(2) SEKVENSSIN ID NO: 38 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 27 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:38:

ACCGAGCTCG AATTCGTAAT CATGGTC 27

(2) SEKVENSSIN ID NO: 39 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 31 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:39:

AGCTGTTGAA TTCGTGAAAT TGTTATCCGC T 31

(2) SEKVENSSIN ID NO: 40 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 708 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:40:

GAGACGACTA GTGGTGGCGG TGGCTCTCCA TTCGTTTGTG AATATCAAGG CCAAGGCCAA 60

TCGTCTGACC TGCCTCAACC TCCTGTCAAT GCTGGCGGCG GCTCTGGTGG TGGTTCTGGT 120

GGCGGCTCTG AGGGTGGTGG CTCTGAGGGT GGCGGTTCTG AGGGTGGCGG CTCTGAGGGA 180

GGCGGTTCCG GTGGTGGCTC TGGTTCCGGT GATTTTGATT ATGAAAAGAT GGCAAACGCT 240

AATAAGGGGG CTATGACCGA AAATGCCGAT GAAAACGCGC TACAGTCTGA CGCTAAAGGC 300

AAACTTGATT CTGTCGCTAC TGATTACGGT GCTGCTATCG ATGGTTTCAT TGGTGACGTT 360

TCCGGCCTTG CTAATGGTAA TGGTGCTACT GGTGATTTTG CTGGCTCTAA TTCCCAAATG 420

GCTCAAGTCG GTGACGGTGA TAATTCACCT TTAATGAATA ATTTCCGTCA ATATTTACCT 480

TCCCTCCCTC AATCGGTTGA ATGTCGCCCT TTTGTCTTTA GCGCTGGTAA ACCATATGAA 540

TTTTCTATTG ATTGTGACAA AATAAACTTA TTCCGTGGTG TCTTTGCGTT TCTTTTATAT 600

GTTGCCACCT TTATGTATGT ATTTTCTACG TTTGCTAACA TACTGCGTAA TAAGGAGTCT 660

TAATCATGCC AGTTCTTTTG GGTATTCCGT TATTATGCTA GCTAGTAA 708

(2) SEKVENSSIN ID NO: 41 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 201 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:41:

TATGCTAGCT AGTAACACGA CAGGTTTCCC GACTGGAAAG CGGGCAGTGA GCGCAACGCA 60

ATTAATGTGA GTTAGCTCAC TCATTAGGCA CCCCAGGCTT TACACTTTAT GCTTCCGGCT 120

CGTATGTTGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTCACA CAGGAAACAG CTATGACCAT 180

GATTACGAAT TCGAGCTCGG T 201

(2) SEKVENSSIN ID NO: 42 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:42:

CAGGTGCAGC TCGAGCAGTC TGGG 24

(2) SEKVENSSIN ID NO: 43 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:43:

GAGGTGCAGC TCGAGGAGTC TGGG 24

(2) SEKVENSSIN ID NO: 44 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 30 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:44:

GCATGTACTA GTTTTGTCAC AAGATTTGGG 30

(2) SEKVENSSIN ID NO: 45 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:45:

GACATCGAGC TCACCCAGTC TCCA 24

(2) SEKVENSSIN ID NO: 46 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 24 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:46:

GAAATTGAGC TCACGCAGTC TCCA 24

(2) SEKVENSSIN ID NO: 47 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 53 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:47:

GCGCCGTCTA GAACTAACAC TCTCCCCTGT TGAAGCTCTT TGTGACGGGC AAG 53

(2) SEKVENSSIN ID NO: 48 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 12 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: sisäinen fragmentti

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:48:

Ser Ile Ser Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Gly
1 5 10

(2) SEKVENSSIN ID NO: 49 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:49:

GTCGTTGACC AGGCAGCCCA G 21

(2) SEKVENSSIN ID NO: 50 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 21 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:50:

ATAGAAGTTG TTCAGCAGGC A 21

(2) SEKVENSSIN ID NO: 51 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 17 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:51:

ATTAACCCTC ACTAAAG 17

(2) SEKVENSSIN ID NO: 52 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 22 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:52:

GAATTCTAAA CTAGCTAGTT CG 22

(2) SEKVENSSIN ID NO: 53 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:53:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Thr Glu Phe Lys Pro Pro Gly Ser Ser Val Lys
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Ile Gly Gly Ile Thr Pro Thr Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Thr Pro Ile Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ile Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Glu Arg Arg Glu Arg Gly Trp Asn Pro Arg Ala Leu Arg
            100                 105                 110

Gly Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Phe Val Ser Pro
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 54 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:54:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Ala Ala Val Gln Lys Pro Gly Ser Ser Val Arg
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asp Asn Phe Ala Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Gly Ile Thr Pro Thr Ser Gly Thr Ala Thr Tyr Ser Gln Lys
    50                  55                  60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Asp Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Glu Arg Arg Glu Arg Gly Trp Asn Pro Arg Ala Leu Val
            100                 105                 110

Gly Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 55 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:55:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Thr Glu Phe Lys Pro Pro Gly Ser Ser Val Lys
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Ile Gly Gly Ile Thr Pro Thr Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Thr Pro Ile Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ile Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Glu Arg Arg Glu Arg Gly Trp Asn Pro Arg Ala Leu Arg
            100                 105                 110

Gly Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Phe Val Ser Pro
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 56 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:56:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ile Phe Ser Asp Phe Ala Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Met Gly Gly Ile Thr Pro Thr Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Ala Ala Thr Pro Arg Val
65                  70                  75                  80

Tyr Met Glu Leu Arg Ile Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Glu Arg Arg Glu Arg Gly Trp Asn Pro Arg Ala Leu Arg
            100                 105                 110

Gly Ala Leu Glu Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Pro
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 57 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 128 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:57:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Ala Ala Val Gln Lys Pro Gly Ser Ser Val Arg
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asp Asn Phe Ala Ser Asn
            20                  25                  30

Tyr Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Gly Ile Thr Pro Thr Ser Gly Thr Ala Thr Tyr Ser Gln Lys
    50                  55                  60

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Asp Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Glu Arg Arg Glu Arg Gly Trp Asn Pro Arg Ala Leu Val
            100                 105                 110

Gly Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 58 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 128 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:58:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Ser Asn
            20                  25                  30

His Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Met Gly Gly Ile Thr Pro Thr Ser Gly Thr Ala Asp Tyr Ala Gln Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Ala Arg Val Thr Ile Ser Ala His Glu Phe Thr Pro Ile Val
65                  70                  75                  80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Gln His Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Thr Glu Arg Arg Glu Arg Gly Trp Asn Pro Arg Ala Leu Arg
            100                 105                 110

Gly Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 59 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:59:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asn Asp Leu Glu Asp Lys Met Phe Leu
65                  70                  75                  80

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Ser Asp Met Val Thr Gly Val Arg Asn His
            100                 105                 110

Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 60 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:60:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asp Leu Glu Asp Lys Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Phe Asp Met Met Ala Gly Val Arg Asn His
            100                 105                 110
```

```
Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 61 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:61:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asp Leu Glu Asp Lys Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
```

Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Ser Asp Met Met Ala Gly Val Arg Asn His
100 105 110

Leu Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

(2) SEKVENSSIN ID NO: 62 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:62:

Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Thr
20 25 30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
35 40 45

Lys Arg Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
50 55 60

Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asn Asp Leu Glu Asp Lys Met Phe Leu
65 70 75 80

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

```
Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Ser Asp Met Met Thr Gly Val Arg Asn His
            100                 105                 110

Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 63 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:63:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Ser Cys Glu Ser Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asp Leu Glu Asp Lys Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80
```

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Ser Asp Met Met Ala Gly Val Arg Asn His
100 105 110

Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120 125

(2) SEKVENSSIN ID NO: 64 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:64:

Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Thr
20 25 30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
35 40 45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
50 55 60

```
Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asn Asp Leu Glu Asp Lys Met Phe Leu
65                  70                  75                  80

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Ser Asp Met Met Thr Gly Val Arg Asn His
            100                 105                 110

Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 65 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:65:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45
```

```
Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Ser His Tyr Pro Gly Pro Val Glu
    50                  55                  60

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

Glu Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Lys Tyr Pro Arg Tyr Tyr Asp Met Met Arg Gly Val Arg Asn His
        100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
    115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 66 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:66:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
1               5                   10                  15

Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val Ile His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met Gly Trp Ile
```

35 40 45

Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe Gln Asp Arg
50 55 60

Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu
65 70 75 80

Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val
85 90 95

Gly Pro Tyr Ser Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120

(2) SEKVENSSIN ID NO: 67 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:67:

Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val Ile His
20 25 30

```
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met Gly Trp Ile
        35                  40                  45

Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe Gln Asp Arg
    50                  55                  60

Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Asp Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu
65                  70                  75                  80

Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Val
                85                  90                  95

Gly Pro Tyr Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Lys Val Ile Val Ser Ser
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 68 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:68:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
1               5                   10                  15

Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn Phe Val Ile His
            20                  25                  30
```

```
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp Met Gly Trp Ile
        35                  40                  45

Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys Phe Gln Asp Arg
    50                  55                  60

Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Asp Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu
65                  70                  75                  80

Arg Ser Leu Arg Ser Thr Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Val
                85                  90                  95

Gly Pro Tyr Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn Tyr Tyr Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Lys Val Ile Val Ser Ser
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 69 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 130 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:69:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala Trp Met Ala
            20                  25                  30
```

```
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Ala Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Thr Pro Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Pro Arg Tyr Phe Asp Leu Leu Ser Gly Gln Tyr Arg Arg
            100                 105                 110

Val Ala Gly Ala Phe Asp Val Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125

Ser Pro
    130
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 70 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 130 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:70:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15
```

```
Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala Trp Met Ala
            20                  25                  30

Trp Val Gly Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Gly Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Ala Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Thr Pro Val Lys
    50                  55                  60

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

Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Pro Arg Tyr Phe Asp Leu Leu Ser Gly Gln Tyr Arg Arg
            100                 105                 110

Val Ala Gly Ala Phe Asp Val Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125

Ser Pro
    130
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 71 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 130 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:71:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Ala Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Thr Pro Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Asn Leu Glu Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asp Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Gln Lys Pro Ser Tyr Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Gln Tyr Arg Arg
            100                 105                 110

Val Ala Gly Ala Phe Asp Val Trp Gly His Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125

Ser Pro
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 72 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:72:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Glu Ala Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Arg Asn Tyr Ala Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
                85                  90                  95

Ile Gly Leu Lys Gly Glu His Tyr Asp Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Pro
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 73 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:73:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Glu Ala Val Val Gln Pro Gly Thr Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
                85                  90                  95

Ile Gly Leu Lys Gly Glu His Tyr Asp Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Pro
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 74 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:74:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Glu Ala Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Arg Asn Tyr Ala Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
                85                  90                  95

Ile Gly Leu Lys Gly Glu His Tyr Asp Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Pro
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 75 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:75:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Glu Ala Val Val Gln Pro Gly Thr Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
      85                  90                  95

Ile Gly Leu Lys Gly Glu His Tyr Asp Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Pro
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 76 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:76:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Glu Ala Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
                85                  90                  95

Ile Gly Leu Lys Ala Glu His Tyr Asp Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Pro
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 77 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:77:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Glu Ala Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Arg Asn Tyr Ala Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Leu Ile
        35                  40                  45

Lys Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp
                85                  90                  95

Ile Gly Leu Lys Gly Glu His Tyr Asp Ile Leu Thr Ala Tyr Gly Pro
            100                 105                 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 78 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:78:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
    50                  55                  60

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

Gln Met Asn Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Arg Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Met Met Gly Gly Val Arg Lys His
            100                 105                 110

Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ser Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 79 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 128 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:79:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Glu Gly Ser Gly Phe Thr Phe Pro Asn Ala Trp Met Thr
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile
        35                  40                  45

Lys Ser Lys Phe Asp Gly Gly Ser Pro His Tyr Ala Ala Pro Val Glu
    50                  55                  60

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

Gln Met Asn Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Thr Arg Tyr Pro Arg Tyr Ser Glu Met Met Gly Gly Val Arg Lys His
            100                 105                 110

Phe Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Ser Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 80 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 122 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:80:

```
Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gln Ile
        35                  40                  45

Ser Ser Ser Gly Ser Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Glu Met
65                  70                  75                  80

Thr Ser Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
                85                  90                  95

Arg Arg Leu Val Thr Phe Gly Gly Val Val Ser Gly Gly Asn Ile Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 81 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 126 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:81:

```
Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg
1               5                  10                  15

Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Asn Phe Ser Asp Asp Thr Met His
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile
        35                  40                  45

Ser Tyr Glu Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asp Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn
                85                  90                  95

Thr Arg Glu Asn Ile Glu Ala Asp Gly Thr Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr
            100                 105                 110

Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 82 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 107 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:82:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

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

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 83 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 106 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:83:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

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

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Val Pro Arg Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 84 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:84:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

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

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Arg Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 85 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 106 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:85:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg
1               5                  10                  15
```

```
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

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

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Val Pro His Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 86 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:86:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                   10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ile Ser Asn Tyr Leu
            20                  25                  30
```

```
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Trp Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 87 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:87:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                   10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asn Tyr Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45
```

```
Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Ser Pro Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 88 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:88:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                   10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Val Asn Asn Asn Phe Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly
        35                  40                  45

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

```
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Asp Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asp Ser Pro Leu Tyr Ser
                85                  90                  95


Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 89 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 105 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:89:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr
1               5                   10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Asn Trp Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly
50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80
```

```
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Phe Pro Lys Phe Gly
                85                  90                  95

Pro Gly Thr Val Val Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 90 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:90:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asn Asn Tyr Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Ser Ser Thr Arg Gly Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Gly
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Gly Asn Ser Val Tyr Thr
                85                  90                  95
```

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

(2) SEKVENSSIN ID NO: 91 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 104 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:91:

Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Asn Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
1 5 10 15

Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Ile Ser Ser Lys Arg Leu Ala Trp Tyr
20 25 30

Gln His Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Val Cys Pro
35 40 45

Asn Arg Ala Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
50 55 60

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
65 70 75 80

Met Tyr Tyr Cys Gln Tyr Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln
85 90 95

Gly Thr Lys Val Glu Ile Thr Arg
100

(2) SEKVENSSIN ID NO: 92 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 104 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:92:

```
Gln Ser Pro Ser His Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Ile Leu
1               5                  10                  15

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ala Pro Tyr Leu Ala Trp Tyr
            20                  25                  30

Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile Tyr Gly Ala Ser
        35                  40                  45

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
65                  70                  75                  80

Ile Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Gln Ser Pro Val Leu Phe Gly Gln
                85                  90                  95

Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
            100
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 93 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 105 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:93:

```
Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Asp Arg Ala Thr Leu
1               5                  10                  15

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser
        35                  40                  45

Met Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Arg Gly Ser Val Ser Gly
    50                  55                  60

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
65                  70                  75                  80

Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Phe Gly Thr Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Gly
                85                  90                  95

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 94 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 104 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:94:

```
Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
1               5                  10                  15

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Phe Ser Ser Asn Phe Leu Ala Trp Tyr
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Val His Pro
        35                  40                  45

Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
65                  70                  75                  80

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ala Ser Leu Val Ser Phe Gly Pro
                85                  90                  95

Gly Thr Lys Val His Ile Lys Arg
            100
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 95 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:95:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg Arg Val
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 96 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:96:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser His Ser Ile Arg Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Val Lys Gly Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Gly Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 97 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:97:

```
Glu Leu Thr Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile Arg Ser Arg Arg Val
            20                  25                  30

Arg Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 98 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:98:

```
Glu Leu Thr Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Asp Arg
1               5                  10                  15
```

```
Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Asn Ile Arg Ser Arg Arg Val
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Phe Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 99 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:99:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                   10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Gln Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu
            20                  25                  30
```

```
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Gln Leu Asp Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 100 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 104 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:100:

```
Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
1               5                   10                  15

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ser Ser
        35                  40                  45
```

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
65                  70                  75                  80

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Val Tyr Thr Phe Gly Gln
                85                  90                  95

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 101 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 106 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:101:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                   10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
        35                  40                  45

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

```
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Val Ala Thr Tyr Ser Cys Gln Asn Tyr Asp Ser Ala Pro Trp Thr Phe
                85                  90                  95


Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 102 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:102:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                   10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
            20                  25                  30


Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45


Ala Ser Ser Leu Gln Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80
```

```
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Pro Leu Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 103 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:103:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                   10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Thr
        35                  40                  45

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

Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe
                85                  90                  95
```

```
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 104 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:104:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                   10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 105 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:105:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala
        35                  40                  45

Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Gln Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 106 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 104 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:106:

```
Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
1               5                  10                  15

Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
            20                  25                  30

Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
        35                  40                  45

Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr
    50                  55                  60

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
                85                  90                  95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 107 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:107:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
        35                  40                  45

Ala Ser Asn Ser Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Arg Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Gln Asn Val Pro Leu Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 108 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:108:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His Leu Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
        35                  40                  45

Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 109 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:109:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
1               5                  10                  15

Ile Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
            20                  25                  30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
        35                  40                  45

Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65                  70                  75                  80

Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Asn Thr Pro Pro Trp Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 110 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 108 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:110:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Asn Ser Asn Tyr Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Val Val Ile Tyr
        35                  40                  45

Ser Thr Ser Arg Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Asp Ala Gln Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 111 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 93 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:111:

```
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Asn Ser Asn
1               5                  10                  15
```

```
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Arg Val Val
            20                  25                  30

Ile Tyr Ser Thr Ser Arg Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
        35                  40                  45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
    50                  55                  60

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Asp Ala Gln
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                85                  90
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 112 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 104 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:112:

```
Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr
1               5                   10                  15

Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr
            20                  25                  30

His Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser Asp Ala Ser
        35                  40                  45
```

```
Asp Leu Glu Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala
    50                  55                  60

Thr Tyr Phe Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Gly
65                  70                  75                  80

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Leu Ile Thr Phe Gly Gly Gly
                85                  90                  95

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 113 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 96 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:113:

```
Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
1               5                   10                  15

Gly Thr Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
            20                  25                  30

Leu Leu Ile Phe Asp Ala Ser Thr Arg Asp Thr Tyr Ile Pro Asp Thr
        35                  40                  45

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr Ile Ser Ser
    50                  55                  60
```

```
Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Phe Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn
65                  70                  75                  80

Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Thr
                85                  90                  95
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 114 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:114:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Asp Arg
1               5                   10                  15

Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Asn Ile Arg Ser Arg Arg Val
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95
```

```
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Phe Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 115 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:115:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Asn Ile Arg Ser Arg Arg Val
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val Ile His
        35                  40                  45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Phe Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 116 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:116:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Asn Val Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Ile Ser Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Val Ser Ser Arg Ala Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 117 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:117:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Asn Ala Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Ile Ser Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Lys Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 118 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:118:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Asn Thr Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Arg Ile Gly Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln His Arg Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Gly Val Ser Asn Arg Ala Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 119 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:119:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Ile Leu Ser Cys Lys Thr Ser His Asn Ile Trp Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Ser Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

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

Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ala Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 120 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:120:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Thr Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Ile Leu Ser Cys Lys Thr Ser His Asn Ile Trp Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Ser Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

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

Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ala Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 121 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:121:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Ser Thr Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15

Ala Ile Leu Ser Cys Lys Thr Ser His Asn Ile Trp Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Val Lys Ser Gly Leu Pro Pro Arg Leu Leu Ile His
        35                  40                  45

Gly Val Ser Arg Arg Ala Gly Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Ala Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Ala
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Ser
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Phe Asn Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 122 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 107 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:122:

```
Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Asn Pro Gly Glu Arg
1               5                  10                  15
```

```
Ala Val Leu Ser Cys Arg Thr Ser Arg Asn Ile Trp Ser Arg Arg Leu
            20                  25                  30

Ala Trp Tyr Gln Val Arg Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile His
        35                  40                  45

Gly Val Ser Lys Arg Ala Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Ala Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Thr Tyr Gly Gly Ser Ser Tyr Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gln Gly Asn Lys Leu Asp Ile Arg Arg
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 123 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 126 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:123:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly His Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Thr Glu Ile Pro Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Gly Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Thr Asn Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 124 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:124:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly His Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Thr Glu Ile Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Arg Asn Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 125 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:125:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly His Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Thr Glu Ile Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 126 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:126:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Phe Asn Pro Ala Asn Gly Ile Lys Glu Ile Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Phe Thr Gly Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Val Glu Leu Arg Asn Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Pro Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 127 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:127:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly His Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Thr Glu Ile Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Arg Asn Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Phe Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 128 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:128:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly His Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Thr Glu Ile Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Arg Asn Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 129 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 125 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:129:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Thr Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Pro Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Lys Ile Val Asn Gly Glu Lys Lys Tyr Ser Gln Lys
    50                  55                  60

Phe Val Asp Arg Val Thr Phe Thr Gly Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Met Glu Val Arg Gly Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Met Asp Pro Gln Ala Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 130 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:130:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Phe Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asn Lys Glu Phe Ser Ala Lys
    50                  55                  60

Phe Arg Asp Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Asp Ala Asn Thr Ala
65                  70                  75                  80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Pro Tyr Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 131 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:131:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Thr Gln Asp Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Lys Glu Ile Ser Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ala Ser Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 132 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:132:

```
Gln Val Lys Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Phe Val Leu His Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly His Arg Pro Glu Trp
        35                  40                  45

Met Gly Trp Ile Asn Pro Ala Asn Gly Val Thr Glu Ile Pro Pro Lys
    50                  55                  60

Phe Gln Asp Arg Val Ser Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Gly Thr Val
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Glu Leu Thr Asn Leu Arg Phe Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Ala Arg Val Gly Glu Trp Thr Trp Asp Asp Ser Pro Gln Asp Asn
            100                 105                 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 133 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 37 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:133:

TCGAGGGTCG GTCGGTCTCT AGACGGTCGG TCGGTCA 37

(2) SEKVENSSIN ID NO: 134 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 37 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:134:

CTAGTGACCG ACCGACCGTC TAGAGACCGA CCGACCC 37

(2) SEKVENSSIN ID NO: 135 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 32 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:135:

CGGTCGGTCG GTCCTCGAGG GTCGGTCGGT CT 32

(2) SEKVENSSIN ID NO: 136 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 40 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:136:

CTAGAGACCG ACCGACCCTC GAGGACCGAC CGACCGAGCT 40

(2) SEKVENSSIN ID NO: 137 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 25 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:137:

CAAGGAGACA GGATCCATGA AATAC 25

(2) SEKVENSSIN ID NO: 138 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 25 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:138:

AGGGCGAATT GGATCCCGGG CCCCC 25

(2) SEKVENSSIN ID NO: 139 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Perimän DNA

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:139:

CTAGTCATCA TCATCATCAT TAAGCTAGC 29

(2) SEKVENSSIN ID NO: 140 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 29 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(iii) HYPOTEETTINEN: EI

(iv) ANTI-SENSE: EI

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:140:

CTAGGCTAGC TTAATGATGA TGATGATGA 29

(2) SEKVENSSIN ID NO: 141 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 13 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(v) FRAGMENTTITYYPPI: sisäinen fragmentti

(ix) OMINAISPIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Modifioitu kohta
(B) SIJAINTI: 1
(D) MUU INFORMAATIO: /leima= J

(ix) OMINAISPIIRRE:
(A) NIMI/AVAIN: Modifioitu kohta
(B) SIJAINTI: 13
(D) MUU INFORMAATIO: /leima= ZC

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:141:

Ser Ile Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Gly
1 5 10

(2) SEKVENSSIN ID NO: 142 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 126 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:142:

Leu Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser
1 5 10 15

Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Leu Ser Ser Phe Asp Trp Asn
20 25 30

Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile
35 40 45

```
Tyr Pro Ser Gly Asn Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Val
    50                  55                  60

Thr Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Val Lys Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn
                85                  90                  95

Thr Gly Arg Thr Ile Glu Glu Ile Gly Asn Phe Phe Asp Ile Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 143 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 122 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:143:

```
Leu Leu Lys Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Ser Cys Val Ile Ser Ala Phe Ser Phe Ser Gly Tyr Asn Ile Asn
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
        35                  40                  45
```

```
Ser Met Ser Thr Gly Ser Leu Ser Tyr Ala Asp Ser Met Lys Gly Arg
    50                  55                  60

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

Ser Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
                85                  90                  95

Thr Pro Leu Val Gly Arg Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Val
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 144 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 132 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:144:

```
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Asn
            20                  25                  30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ala Tyr Ile
        35                  40                  45
```

```
Ser Ser Ser Arg Lys Tyr Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Tyr Ser Val Phe Leu Gln Leu
65                  70                  75                  80

Asp Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
                85                  90                  95

Arg Asp Phe Tyr Ser Gly Phe Gly Arg Arg Asp Asp Phe His Leu His
            100                 105                 110

Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
        115                 120                 125

Ser Thr Lys Gly
    130
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 145 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 126 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:145:

```
Leu Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
1               5                   10                  15

Arg Ile Ser Cys Val Ala Ser Gly Asp Ile Phe Tyr Ser Tyr Ala Met
            20                  25                  30
```

```
Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Ser
        35                  40                  45

Ile Ser Gly Thr Gly Gly Ser Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    50                  55                  60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Thr Leu Tyr Leu Gln
65                  70                  75                  80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
                85                  90                  95

Asp Arg Gly Pro Arg Ile Gly Ile Arg Gly Trp Phe Asp Ser Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        115                 120                 125
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 146 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 124 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:146:

```
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
1               5                   10                  15

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Leu Tyr Ser Ser Phe Ala Met Ser
            20                  25                  30
```

```
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Ala Trp Val Ser Thr Ile
        35                  40                  45

Ser Ala Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    50                  55                  60

Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ile Tyr Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asp Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn
                85                  90                  95

Phe Arg Ala Phe Ala Arg Asp Pro Trp Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 147 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 109 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:147:

```
Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Val Ile Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30
```

```
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Gly
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
            100                 105
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 148 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 112 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:148:

```
Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Phe Ser Cys Arg Ser Ser His Ser Ile His Thr Arg
            20                  25                  30

Arg Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
        35                  40                  45
```

```
Ile His Gly Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Ser Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Val Tyr Gly Ala Ser Ser
                85                  90                  95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Arg Lys Arg Thr Val Val
            100                 105                 110
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 149 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 111 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:149:

```
Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45
```

```
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Ala Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Gly Ser His
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
            100                 105                 110
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 150 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 111 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:150:

```
Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Gln Gly Ile Gly Arg Phe
            20                  25                  30

Phe Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ala Ala Asp Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
            100                 105                 110
```

(2) SEKVENSSIN ID NO: 151 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 112 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEQ ID NO:151:

```
Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Val
        35                  40                  45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80
```

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Patenttivaatimukset

1. Ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp120:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 78 tai 79, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, jolla monoklonaalisella vasta-aineella on immunoglobuliinin raskaan ja keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssit pareina, joilla on SEKV. ID.NRO 66:95, 67:96, 72:102, 66:97, 73:107, 74:103, 70:101, 68:98, 75:104, 72:105, 78:110, 66:118, 66:122, 66:121, 66:115, 79:124, 79:132 tai 66:98, tai niiden konservatiivisia substituutioita.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, jota monoklonaalista vasta-ainetta tuottaa ATCC 69078, ATCC 69079 tai ATCC 69080.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on monoklonaalista vasta-ainetta, jota tuottaa ATCC 69078, ATCC 69079 tai ATCC 69080.

5. Ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp120:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u

siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 110, 115, 118, 121, 122, 124 tai 132, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

6. Polynukleotidisekvenssi, joka koodittaa ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin osaa, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp120:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää mainitun, immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 75, 78 tai 79, tai aminohappotähdesekvenssin konservatiivisia substituutioita, ja tälle komplementaariset polynukleotidisekvenssit.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukaiset polynukleotidisekvenssit, t u n n e t u t siitä, että polynukleotidi on DNA:ta.

8. Polynukleotidisekvenssi, joka koodittaa ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssiosaa, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp120:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on a monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää mainitun, immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 110, 115, 118, 121, 122, 124 tai 132, tai aminohappotähdesekvenssin konservatiivisia substituutioita, ja

tälle komplementaariset polynukleotidisekvenssit.

9. Ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp41:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisen vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 142, 143, 144, 145 tai 146, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, jolla monoklonaalisella vasta-aineella on immunoglobuliinin raskaan ja keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssit pareina, joita ovat SEKV. ID.NRO 142:147, 143:148, 144:149, 145:150 tai 146:151, ja näiden konservatiivisia substituutioita.

11. Ihmisen monoklonaalinen vasta-aine, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp41:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 147, 148, 149, 150 tai 151, tai näiden konservatiivisia substituutioita.

12. Polynukleotidisekvenssi, joka koodittaa ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin osaa, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp41:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on

monoklonaalinen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää mainitun, immunoglobuliinin raskaan ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 142, 143, 144, 145 tai 146, tai aminohappotähdesekvenssin konservatiivisia substituutioita, ja tälle komplementaariset polynukleotidisekvenssit.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen polynukleotidisekvenssi, t u n n e t t u siitä, että polynukleotidi on DNA:ta.

14. Polynukleotidisekvenssi, joka koodittaa ihmisen monoklonaalisen vasta-aineen immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin osaa, joka pystyy immunoreagoimaan ihmisen immuunikatovirus(HIV) -glykoproteiini gp41:n kanssa ja neutraloimaan HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalisella vasta-aineella on monoklonaalisen vasta-aineen sitomisspesifisyys, joka monoklonaalinen vasta-aine käsittää mainitun, immunoglobuliinin keveän ketjun vaihtelevan alueen aminohappotähdesekvenssin, joka on SEKV. ID.NRO 147, 148, 149, 150 tai 151, tai aminohappotähdesekvenssin konservatiivisia substituutioita, ja tälle komplementaariset polynukleotidisekvenssit.

15. Isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 6, 8, 12 tai 14 mukaisen polynukleotidisekvenssin.

16. DNA-ekspressiovektori, tunnettu siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 6, 8, 12 tai 14 mukaisen polynukleotidisekvenssin.

17. Menetelmä ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) osoittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että näyte, jonka epäillään sisältävän HIV:tä, saatetaan kontaktiin diagnostisesti tehokkaan määrän kanssa patenttivaatimuksen 1, 5, 9 tai 11 mukaisen monoklonaalisen vasta-aineen kanssa, ja määritetään, immunoreagoiko monoklonaalinen vasta-aine näytteen

kanssa.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että osoitus tapahtuu in vivo.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on osoitettavasti leimattu leimalla, joka on radioisotooppi tai paramagneettinen leima.

20. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että osoitus tapahtuu in vitro.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on leimattu osoitettavasti leimalla, joka on radioisotooppia, fluoresoivaa yhdistettä, kolloidista metallia, kemiluminoivaa yhdistettä, bioluminoivaa yhdistettä tai entsyymiä.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monoklonaalinen vasta-aine on sidottu kiinteään faasiin.

23. Menetelmä passiivisen immunoterapian aikaansaamiseksi ihmisen immuunikatovirus(HIV) -sairauteen ihmisellä, t u n n e t t u siitä, että ihmiselle annetaan immunoterapeuttisesti tehokas määrä patenttivaatimuksen 1, 5, 9 tai 11 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että passiivinen immunoterapia aikaansaadaan ennaltaestävästi.

25. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että anto on parenteraalista antoa.

26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että parenteraalinen anto on ihonalainen, lihaksensisäinen, vatsaontelonsisäinen, ontelonsisäinen, transdermaalinen tai laskimonsisäinen injektio.

27. Patenttivaatimuksen 25 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että parenteraalinen anto on vähittäin tapahtuvalla perfuusiolla.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vähittäin tapahtuvalla perfuusio on laskimonsisäisellä tai peristalttisella tavalla.

29. Patenttivaatimuksen 25 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että immunoterapeuttisesti tehokas määrä on noin 0,1 - 300 mg/kg.

30. Menetelmä aktiivisen immunoterapian indusoimiseksi ihmisen immuunikatovirus(HIV) -sairauteen ihmisellä, t u n n e t t u siitä, että ihmiselle annetaan immunogeenisesti tehokas määrä anti-idiotyyppivasta-ainetta patenttivaatimuksen 1, 5, 9 tai 11 monoklonaaliselle vasta-aineelle.

31. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää ainakin yhden annoksen patenttivaatimuksen 1, 5, 9 tai 11 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta farmakologisessa väliaineessa.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu koostumus sisältää kahta tai useampaa erilaista monoklonaalista vasta-ainetta.

33. Reagenssipakkaus, joka on käyttökelpoinen osoittamaan ihmisen immuunikatoviruksen (HIV) lähteessä, jonka epäillään sisältävän HIV:tä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kantajavälineen, joka on jaettu osastoihin ottamaan tiiviis-

ti rajoitettuun tilaan yhden tai useita säiliöitä, jotka sisältävät patenttivaatimuksen 1, 5, 9 tai 11 mukaista monoklonaalista vasta-ainetta.

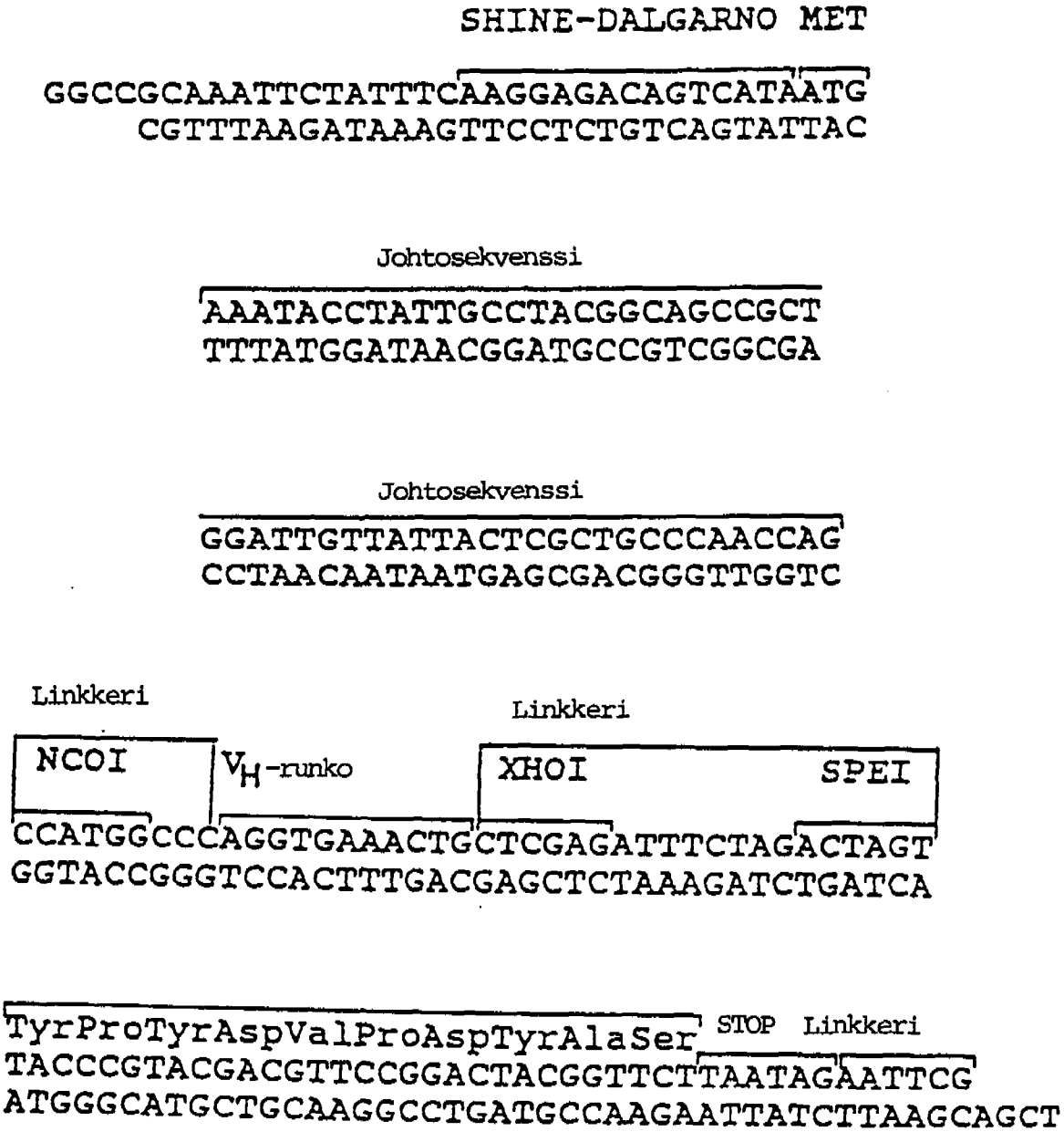

SHINE-DALGARNO MET
GGCCGCAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATG
CGTTTAAGATAAAGTTCCTCTGTCAGTATTAC
Johtosekvenssi
AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCT
TTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGA
Johtosekvenssi
GGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
CCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC
Linkkeri
NCOI
V_H-runko
Linkkeri
XHOI
SPEI
CCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGATTTCTAGACTAGT
GGTACCGGGTCCACTTTGACGAGCTCTAAAGATCTGATCA
TyrProTyrAspValProAspTyrAlaSer
STOP
Linkkeri
TACCCGTACGACGTTCCGGACTACGGTTCTTAATAGAATTCG
ATGGGCATGCTGCAAGGCCTGATGCCAAGAATTATCTTAAGCAGCT

FIG. 1

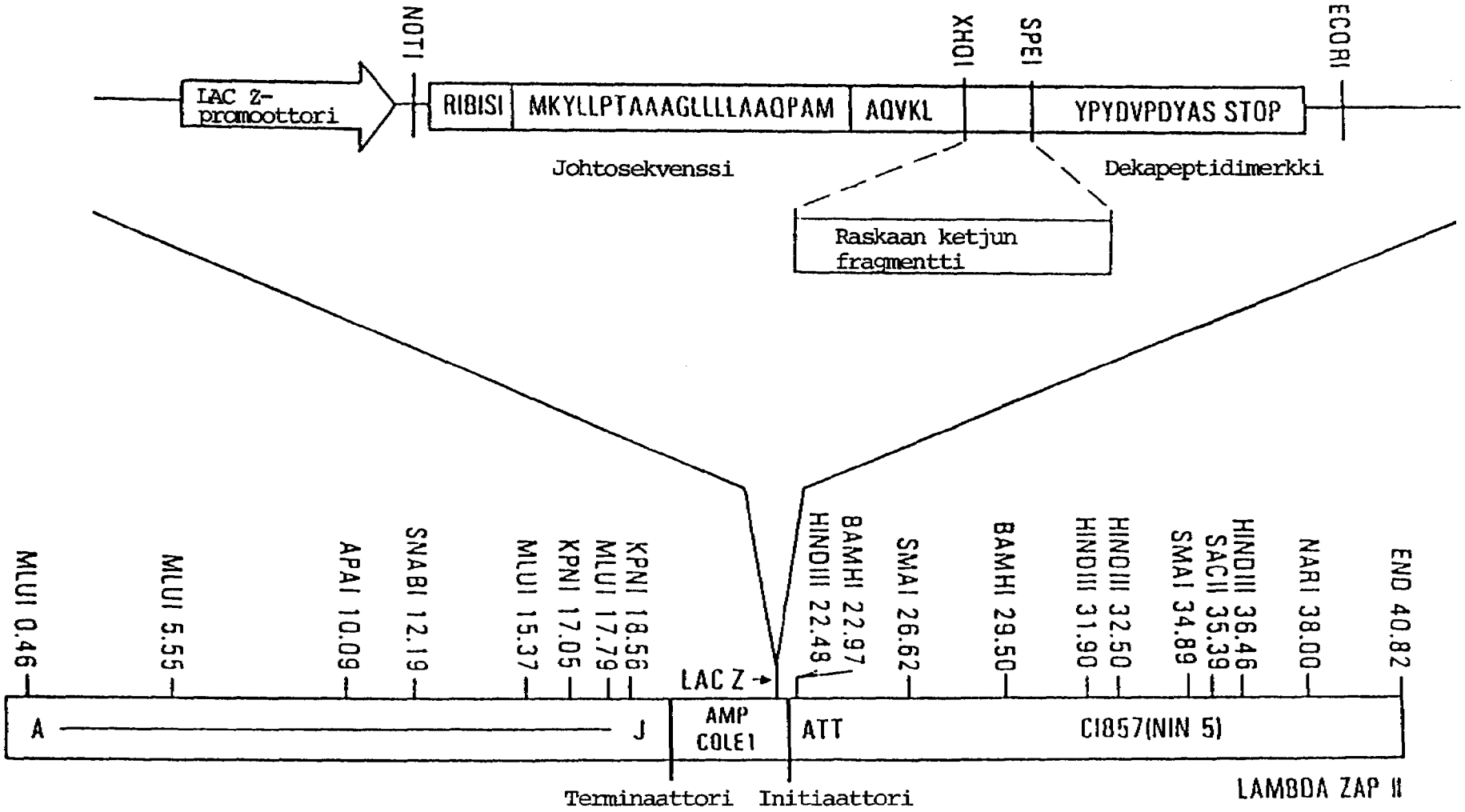

NOTI
XHOI
SPEI
ECORI
LAC Z-
promoottori
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM
AQVKL
YPYDVPDYAS STOP
Johtosekvenssi
Dekapeptidimerkki
Raskaan ketjun
fragmentti
MLUI 0.46
MLUI 5.55
APAI 10.09
SNABI 12.19
MLUI 15.37
KPNI 17.05
MLUI 17.79
KPNI 18.56
HINDIII 22.48
BAMHI 22.97
SMAI 26.62
BAMHI 29.50
HINDIII 31.90
HINDIII 32.50
SMAI 34.89
SACII 35.39
HINDIII 36.46
NARI 38.00
END 40.82
LAC Z
A
J
AMP
COLE1
ATT
CI857(NIN 5)
Terminaattori
Initiaattori
LAMBDA ZAP II

FIG.2

ECOR I SHINE-DALGARNO MET

TGAATTCTAAACTAGTCGCCAAGGAGACAGTCATAATGAAAT
TCGAACTTAAGATTTGATCAGCGGTTCCTCTGTCAGTATTACTTTA

Johtosekvenssi

ACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
TGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTC

NCO I SAC I XBA I Not I

CCATGGCCGAGCTCGTCAGTTCTAGAGTTAAGCGGCCG
GGTACCGGCTCGAGCAGTCAAGATCTCAATTCGCCGGCAGCT

FIG.3

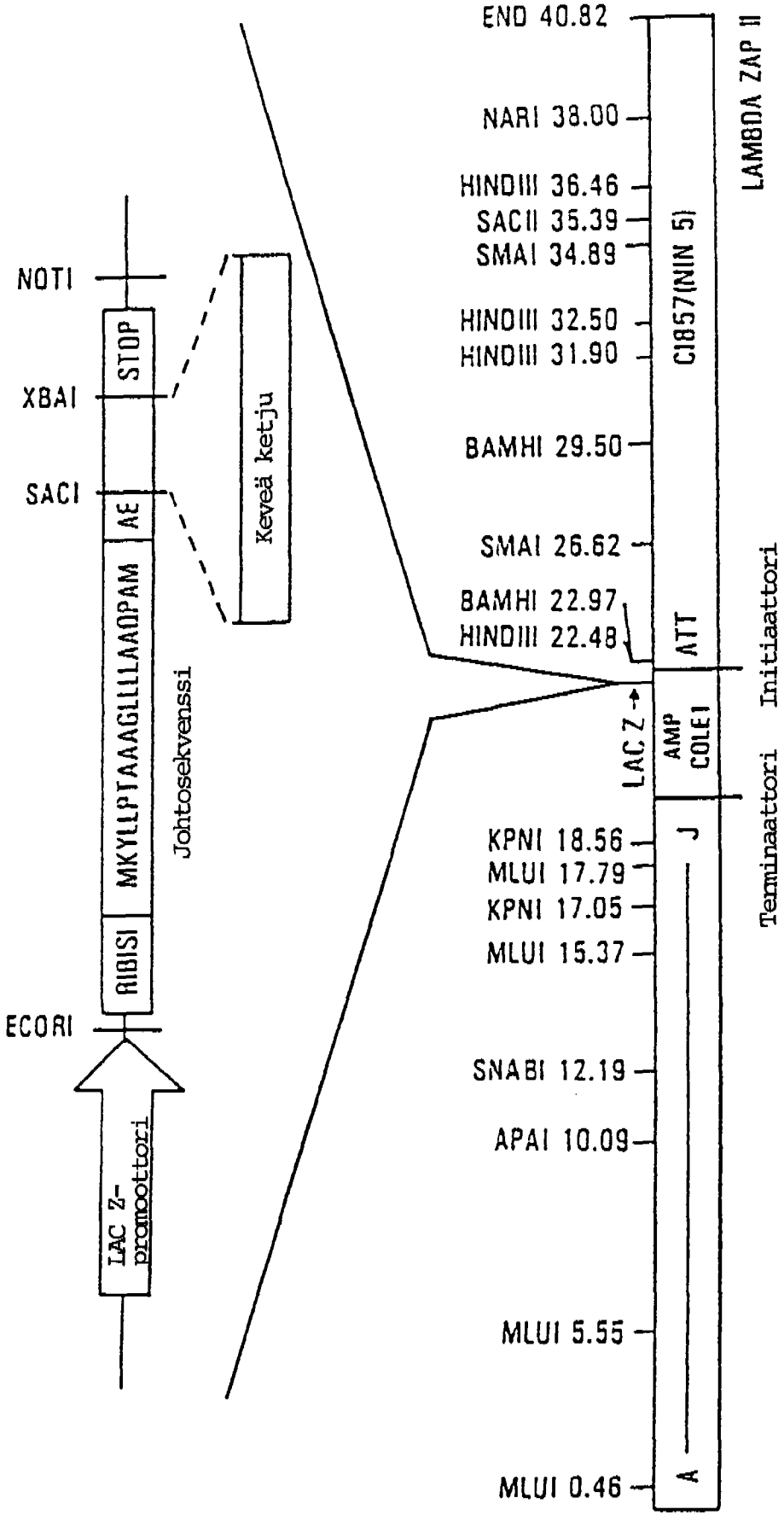

END 40.82
NARI 38.00
HINDIII 36.46
SACII 35.39
SMAI 34.89
HINDIII 32.50
HINDIII 31.90
BAMHI 29.50
SMAI 26.62
BAMHI 22.97
HINDIII 22.48
KPNI 18.56
MLUI 17.79
KPNI 17.05
MLUI 15.37
SNABI 12.19
APAI 10.09
MLUI 5.55
MLUI 0.46
LAMBDA ZAP II
CI857(NIN 5)
ATT
AMP
COLE1
LAC Z
J
A
Terminaattori
Initiaattori
NOTI
XBAI
SACI
ECORI
STOP
AE
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLAAQPAM
Johtosekvenssi
Keveä ketju
LAC Z-promoottori

FIG.4

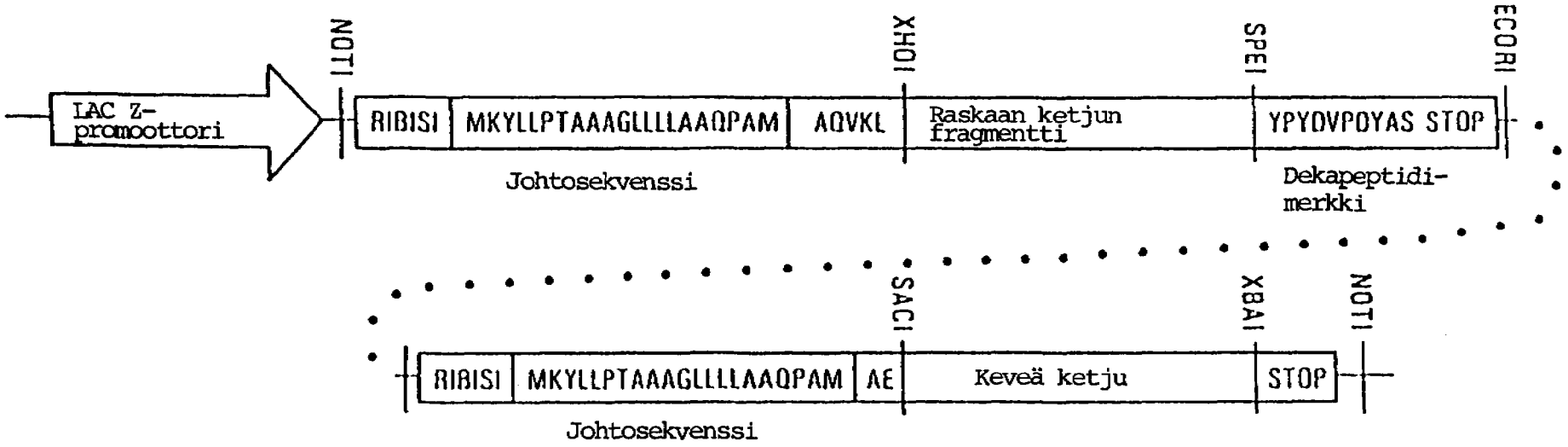

NOTI
XHOI
SPEI
ECORI
LAC Z-promoottori
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM
AQVKL
Raskaan ketjun fragmentti
YPYDVPDYAS STOP
Johtosekvenssi
Dekapeptidi-merkki
SACI
XBAI
NOTI
RIBISI
MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAM
AE
Keveä ketju
STOP
Johtosekvenssi

FIG.5

Klooni nro	Fab-konsentraatio (µg/ml)	ELISA-tiitteri	p24-määritys		Synsytium-määritys
			MN	IIIB	MN
1	1.8	1:8	-	-	-
2	3.1	1:64	-	-	-
3	4.1	1:32	-	-	-
4	25.0	1:16	40	80	>128
5	2.4	1:128	-	-	-
6	4.0	1:64	-	-	-
7	4.5	1:64	20	20	32
8	14.0	1:256	20	20	-
11	11.0	1:128	-	-	-
12	6.0	1:64	80	40	>128
13	6.1	1:128	80	80	-
18	0.9	1:128	-	20	-
20	6.9	1:256	-	-	32
21	8.5	1:32	20	20	32
22	8.6	1:64	20	20	-
24	0.7	1:32	-	-	-
27	10.0	1:64	20	20	32
29	16.0	1:1024	-	-	-
31	9.3	1:128	-	-	-
35	8.9	1:64	-	-	-
2F5mAb	10.0		40	160	
2F5Fab	5.0		40	20	
F58mAb	10.0		160	40	
F58F(ab')$_2$	200.0		40	20	

FIG. 6

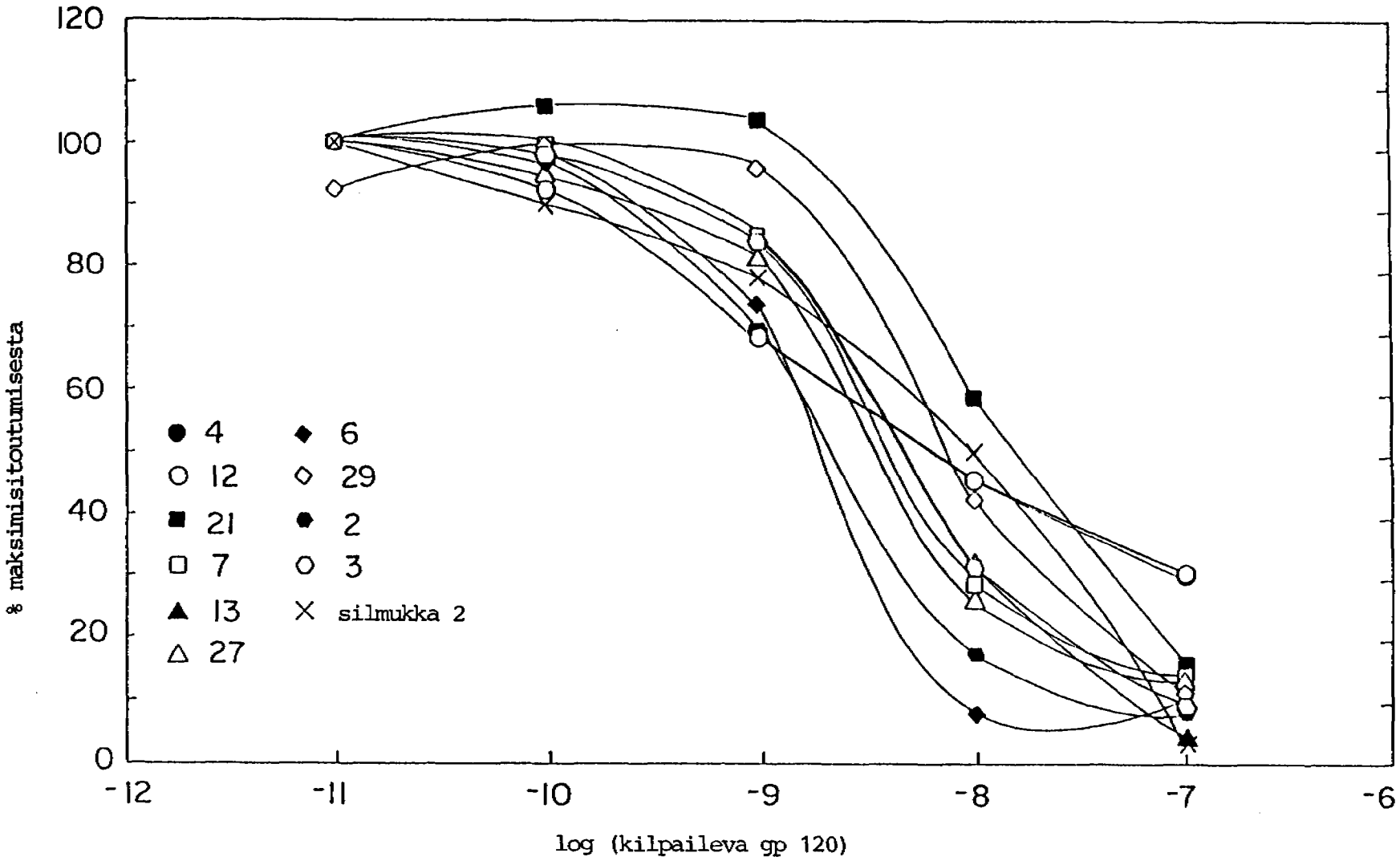

120
100
80
60
40
20
0
% maksimisitoutumisesta
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
log (kilpaileva gp 120)
4
12
21
7
13
27
6
29
2
3
silmukka 2

FIG.7

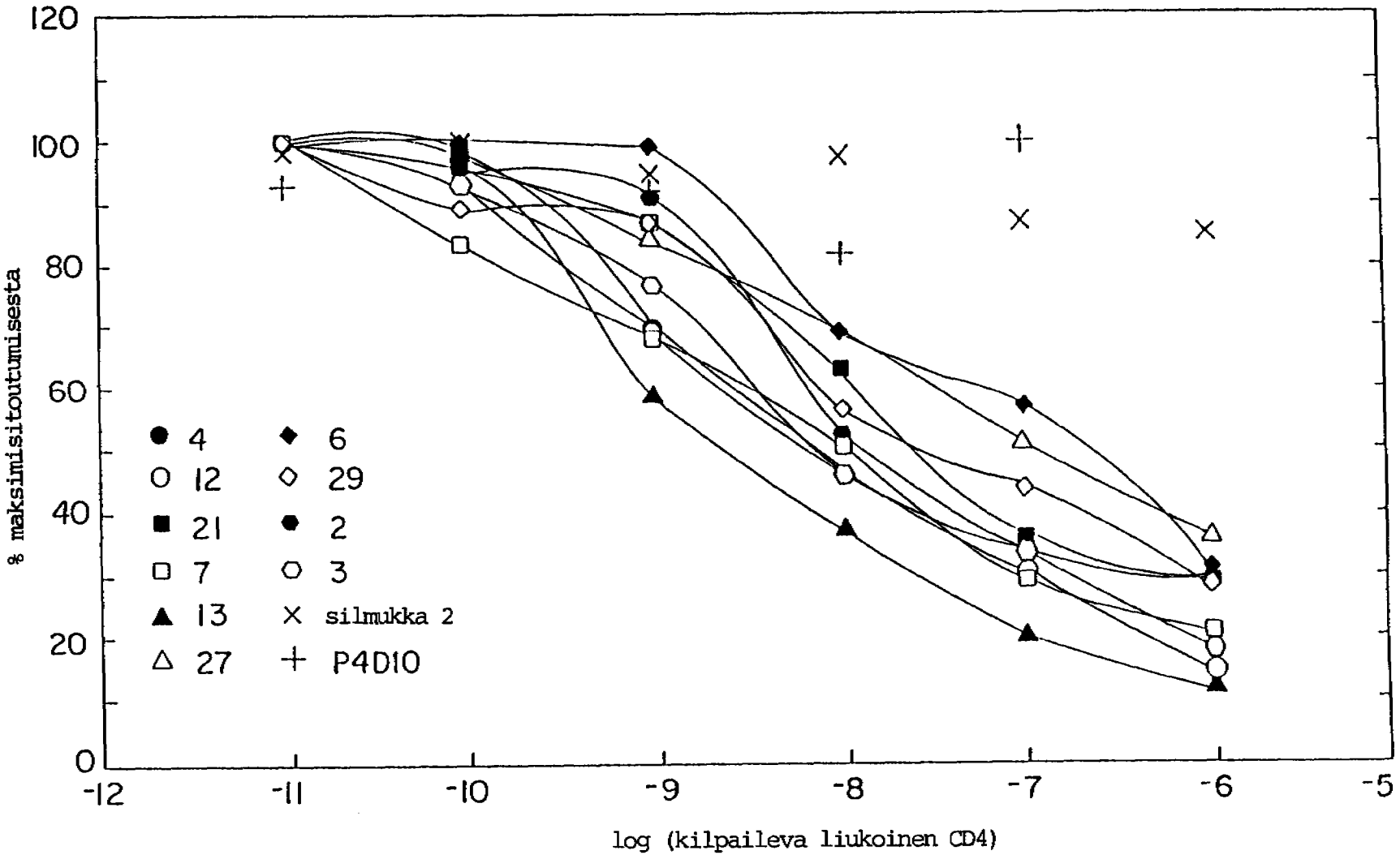

120
100
80
60
40
20
0
% maksimisitoutumisesta
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log (kilpaileva liukoinen CD4)
4
6
12
29
21
2
7
3
13
silmukka 2
27
P4D10

FIG.8

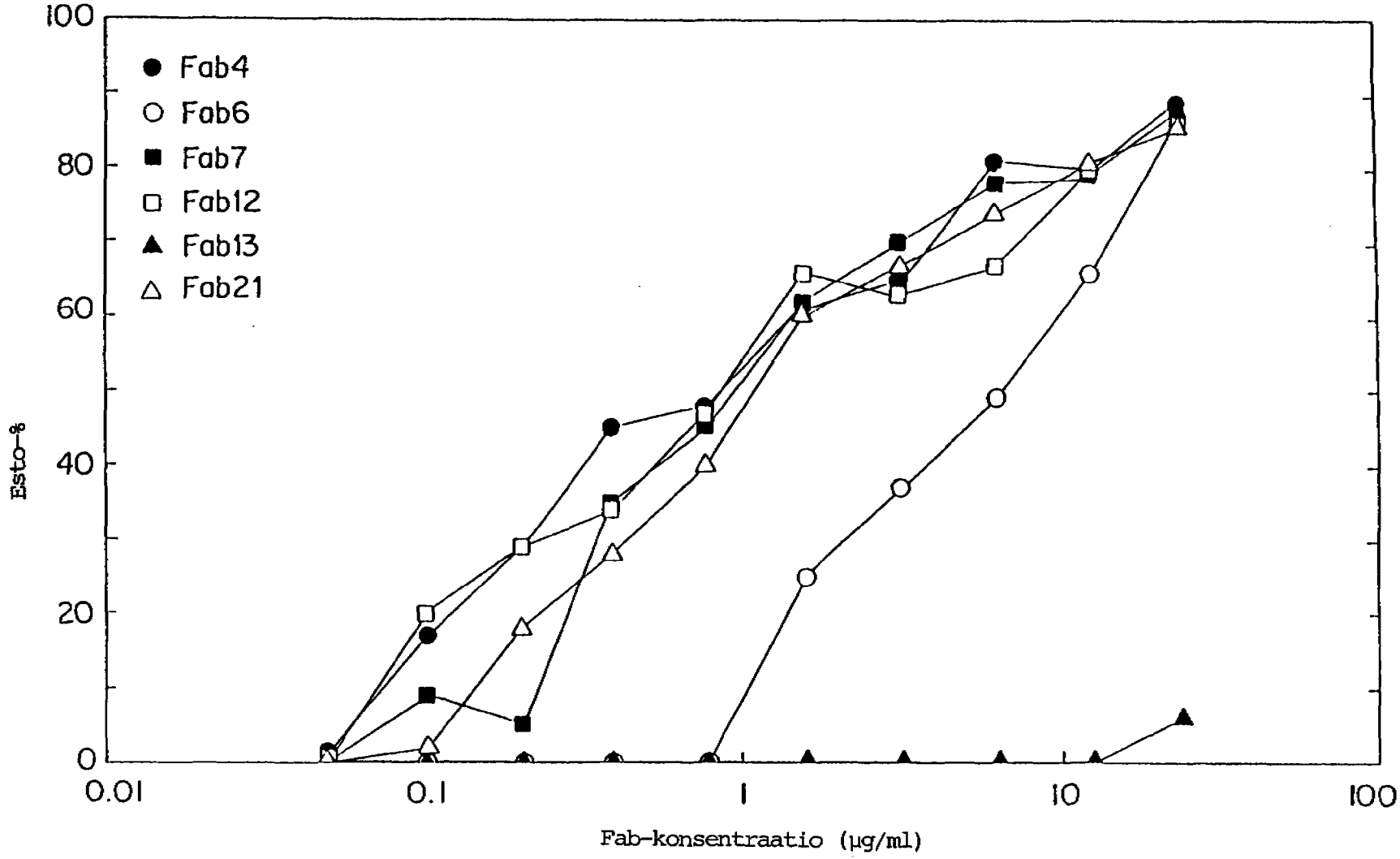

100
80
60
40
20
0
Esto-%
Fab4
Fab6
Fab7
Fab12
Fab13
Fab21
0.01
0.1
1
10
100
Fab-konsentraatio (µg/ml)

FIG.9

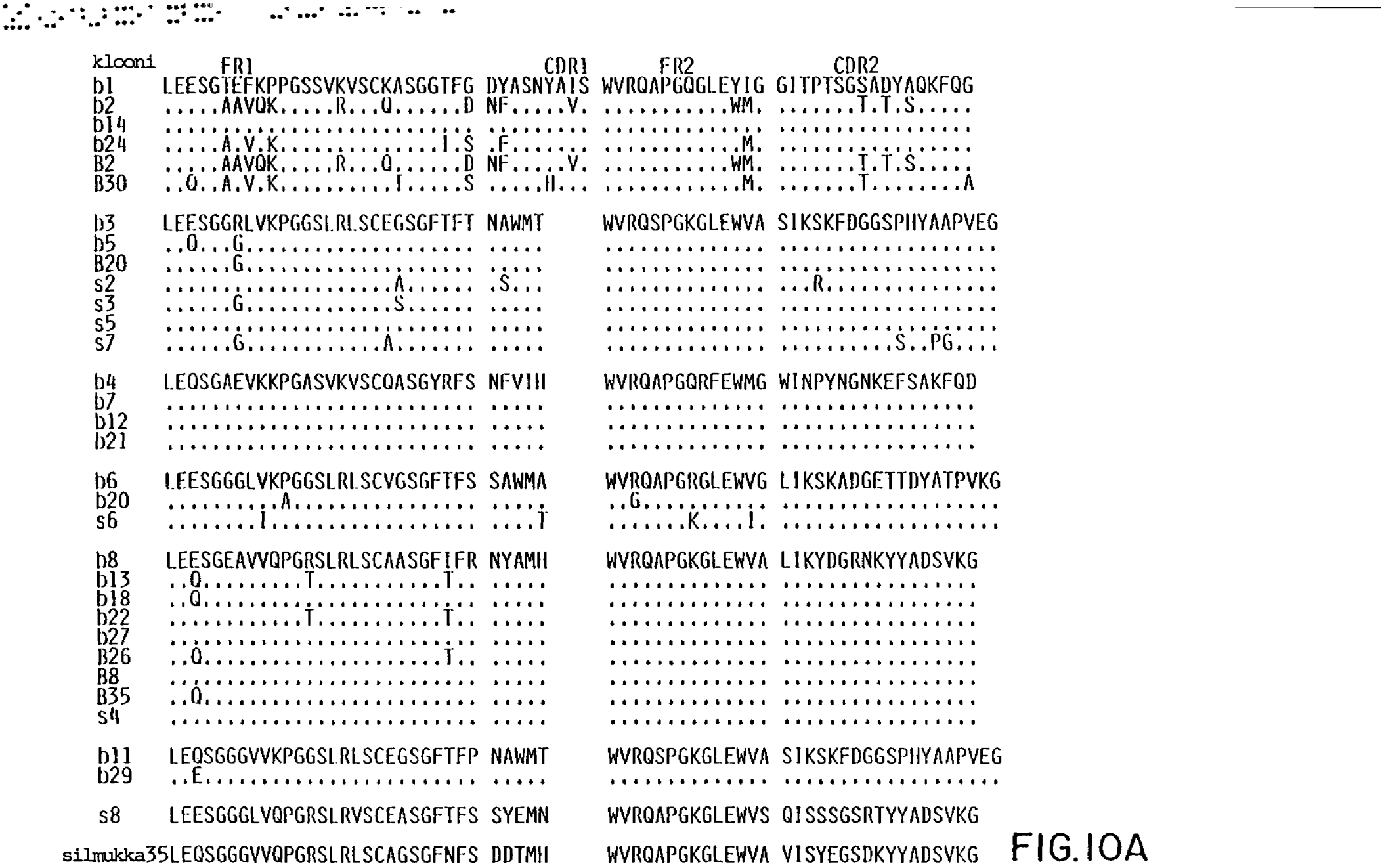

klooni FR1 CDR1 FR2 CDR2
b1 LEESGTEFKPPGSSVKVSCKASGGTFG DYASNYAIS WVRQAPGQGLEYIG GITPTSGSADYAQKFQG
b2 .....AAVQK.....R...Q.....D NF.....V. .....WM. .....T.T.S.....
b14 ....
b24 .....A.V.K.....I.S .F..... .....M. .....
B2 .....AAVQK.....R...Q.....D NF.....V. .....WM. .....T.T.S.....
B30 ..Q..A.V.K.....T.....S .....H... .....M. .....T.....A
b3 LEESGGRLVKPGGSLRLSCEGSGFTFT NAWMT WVRQSPGKGLEWVA SIKSKFDGGSPHYAAPVEG
b5 ..Q...G..... ....
B20 .....G..... ....
s2 .....A..... .S... ....R.....
s3 .....G.....S..... ....
s5 ....
s7 .....G.....A..... ....S..PG....
b4 LEQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFS NFVIH WVRQAPGQRFEWMG WINPYNGNKEFSAKFQD
b7 ....
b12 ....
b21 ....
b6 LEESGGGLVKPGGSLRLSCVGSGFTFS SAWMA WVRQAPGRGLEWVG LIKSKADGETTDYATPVKG
b20 .....A..... ....G..... .....
s6 .....I..... ....T .....K....I. .....
b8 LEESGEAVVQPGRSLRLSCAASGFIFR NYAMH WVRQAPGKGLEWVA LIKYDGRNKYYADSVKG
b13 ..Q.....T.....T.. ....
b18 ..Q..... ....
b22 .....T.....T.. ....
b27 ....
B26 ..Q.....T.. ....
B8 ....
B35 ..Q..... ....
s4 ....
b11 LEQSGGGVVKPGGSLRLSCEGSGFTFP NAWMT WVRQSPGKGLEWVA SIKSKFDGGSPHYAAPVEG
b29 ..E..... ....
s8 LEESGGGLVQPGRSLRVSCEASGFTFS SYEMN WVRQAPGKGLEWVS QISSSGSRTYYADSVKG
silmukka35 LEQSGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFNFS DDTMH WVRQAPGKGLEWVA VISYEGSDKYYADSVKG

FIG.10A

FR3	CDR3	FR4	J-geeni	SEQ ID NO
RVTISADRFTPILYMELRSLRIEDTAIYYCAR	ERRERGWNPRALRGALDF	WGQGTRVFVSP	J_H3	53
.....APL...I.....DD...V.....	.....V....V	.....T.		54
.....	.....	.....		55
.....AA..RV.....S...V.F...	.....EV	.....T.I...		56
.....APL...I.....DD...V.....	.....V....V	.....T.I..S		57
.....IIE....V.....SDQH.T....T	I	.....T.I..S		58
RFSISRNDLEDKMFLEMSGLKAEDTGVYYCAT	KYPRYSDMVTGVRNHFYMDV	WGKGTTVIVSS	J_H6	59
..T.....L.....	.....F..MA.....	..T.....		60
..T.....L.....	.....MA.....L....	.....		61
.....	.....M.....	.....		62
..T.....L.....	.....MA.....	.....		63
.....	.....M.....	.....		64
..T....YI...L.....	.....Y..MR....Y....	.....		65
RVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCAR	VGPYSWDDSPQDNYYMDV	WGKGTTVIVSS	J_H6	66
.....D.....I.....	....T.....	.....K.....		67
.....	.....	.....		68
.....D.....T...I.....	....T.....	.....K.....		68
RFSISRNNLEDTVYLQMDSLRADDTAVYYCAT	QKPRYFDLLSGQYRRVAGAFDV	WGHGTTVTVSP	J_H3	69
.....	.....	.....		70
..T.....N.....	...S.YN.....	.....		71
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DIGLKGEHYDILTAYGPDY	WGQGTLVTVSS	J_H4	72
..S.....E.....	.....	....A.....		73
.....	.....	.....		74
..S.....E.....	.....	....A.....		75
.....	.....	.....		72
.....	.....A.....	.....		76
.....	.....	.....		72
.....	.....	.....		77
.....	.....	.....		72
RFTISRNDLEDKVFLQMNGLKAEDTGVYYCAT	RYPRYSEMMGGVRKIIFYMDV	WGKGTTVSVSS	J_H6	78
.....	.....	.....		79
RFTISRDNAKNSLYLEMTSLRVDDTAVYYCAR	GRRLVTFGGVVSGGNI	WGQGTMVTVSS	J_H3	80
RFTISRDNSENTLYLQMDSLRADDTALYYCAR	NTRENIEADGTAYYSYYMDV	WGKGTTVTVSS	J_H6	81

FIG. 10B

klooni	FR1	CDR1	FR2	CDR2
b1	ELTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISNYLA	WYQQKPGKVPRLLIY	AASTLQP
b2	.....I.....	.....N....	....R.....	.....S
b14	.....I.....	.....	.....K....	.....S
B2	.....I.....	.....N....	....R...A.N....	.....S
b24	.....GT..L.P.E.A.LS.	....SVISNYLA	.....QA.....	GV.NRAT
B30	.....GI..L.P.E.A.LS.	....SVSNNYLA	....R..QA.....	G..NRAT
b3	ELTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASHRVNNNFLA	WYQQKPGQAPRLLIS	GASTRAT
b5	ELTQSPASVSASVGDTVTITC	RASQDIHNWLA	WYQQQPGKAPKLLIY	AASSLQS
B20	ELTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSLSNNYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GSSTRGT
s2	QSPDTLSLNPGERATLSC	RASHRISSKRLA	WYQHKRGQAPRLLIY	VCPNRAG
s3	QSPSHLSLSPGERAILSC	RASQRVSAPYLA	WYQQRPGQAPRLVIY	GASTRAT
s5	QSPGTLSLSPGDRATLSC	RASQSLSSSFLA	WYQQKPGQAPRLLIY	SASMRAT
s7	QSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSFSSNFLA	WYQQKPGQAPRLLIY	VHPNRAT
b4	ELTQSPGTLSLSPGERATFSC	RSSHSIRSRRVA	WYQHKPGQAPRLVIH	GVSNRAS
b7	.....T.....L..	.T.....L.	...V.G.....L.Y	.....G
b12	....A.....	.....R	.....	.....
b21	....A.....D.....	....N.....	.....	.....
b6	ELTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAGQSISSNYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASNRAT
s6	.....A....	..S..L.N....	.....	.S.T...
b20	.....SS..A.V.D.V.IT.	.TS.G..NYLA	.....KV.K....	...TLQS
b8	ELTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQR
b18	.....	....N.N....	.....E.....H	T.FN..S
b22	.....	.....S...	.....	.....S
b27	.....	.....S...	.....	.....S
B35	.....	.....S...	.....	.....S
s4	.....	....T..S...	.....	.....S
b13	.....	Q...D.R....	.....	D..NSET
B26	.....	Q...D...H..	.....	D..N.ET
B8	.....I....	....T.N....	.....	G..N..S
b11	ELTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQRVNSNYLA	WYQQKPGQTPRVVIY	STSRRAT
b29	.....	.....	.....	.....
s8	TQSPSSVSASVGDTVTFTC	RASQDIRNYLN	WYHQKPGKAPKLLIS	DASDLEI
silmukka 35	SPGERATLSC	RASQSVGTNLA	WYQQKPGQAPRLLIF	DASTRDT

FIG. 11A

FR3	CDR3	FR4	J-geeni	SEQ ID NO
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	QKYNSAPRT	FGQGTKVEIKRT	JK1	82
...T.....	.....V...	..G.....	JK4	83
.....	.....	.....	JK1	84
...P.....	.....V.I.	..G.....	JK4	85
.I.D.....R.E...F.V.S.	.Q.GTS.W.	.....	JK1	86
.I.D.....A.....I...	.Q.H.S.Y.	.....L....	JK2	87
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDDFAVYYC	QQYGDSPLYS	FGQGTKLEIKRT	JK2	88
GVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGNSFPK	FGPGTVVDIKR	JK3	89
GIPDRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QHYGNSVYT	FGQGTKLEIKR	JK2	90
GVPDRFSGSGSGTDFTLTYSRLEPEDFAMYYC	QYYGGSSYT	FGQGTKVEITR	JK2	91
DIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYC	QVYGQSPVL	FGQGTKLEMKR	JK2	92
GIPDRFRGSVSGTDFILTITRLEPEDFAVYYC	QRFGTSPLYT	FGQGTKLEMKR	JK2	93
GVPDRFSGSGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYC	QQYGASLVS	FGPGTKVIIKR	JK3	94
GISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC	QVYGASSYT	FGQGTKLERKRT	JK2	95
..P.....S.L.....V...	.Q..S.R..	.....I...	JK2	96
.....	.....	.....	JK2	97
.....L.....	.....	.....DF...	JK2	98
GIPDRFSGSGSGTDFTLSISRLEPEDFAVYYC	QQYGTSPYT	FGQGTQLDIKRT	JK2	99
.....G.....T.....	....N.V..	.....K.E...	JK2	100
.G.S.....T.NS.Q...V.T.S.	.N.DSA.W.	.....KV....	JK1	101
GVPSRFSGSGSGTDFTLSISSLQPEDFATYYC	QQSYSIPPLT	FGGGTKVEIKRT	JK4	102
.....TA...E...T.R.....	.....T.YT	..Q.....	JK2	103
.....T.....	.....T.YT	..Q...L.....	JK2	104
.....T.....	.....T.QT	..Q...L.....	JK2	105
.....T.....	.....T.YT	..Q...L.....	JK2	104
.....G.....T.....	.....T.YT	..Q...L.....	JK2	106
.....R...FT.....V.....	..HQNV.LT	.....	JK4	107
.....FT.....I.....	..YDNL.LT	.....	JK4	108
.....T.....F.	....NT..WT	..Q.....	JK1	109
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQFGDAQYT	FGQGTKLEIKRT	JK2	110
.....	.....	.....	JK2	111
GVPSRFSGSGSATYFSFTISSLQPEDIGTYYC	QQYADLIT	FGGGTKVEIKRT	JK4	112
YIPDTFSGSGSGTDFALTISSLQSEDFGFYYC	QQYDNWPPT	FGQGTKLEVKRT	JK2	113

FIG. 11B

klooni	FR1	CDR1	FR2	CDR2
HIV-H12/L12	ELTQAPGTLSLSPGERATFSC	RSSHSIRSRRVR	WYQHKPGQAPRLVIH	GVSNRAS
HIV-H12/LC11	....S.....D.....	....N.....A	.....	.....
HIV-H12/LC24	....S.....D.....	....N.....A	.....	.....
HIV-H12/LC22	....S.....	....N.....A	.....	.....T
HIV-H12/LC1	....S.D....NV.....L..	.A..R.S...LA	.....R.....L.Y	...S..G
HIV-H12/LC7	....S.D....NA.....L..	.A..R.S...LA	.....R.....L.Y	.....G
HIV-H12/LC28	....S.D....NT.....L..	.A..R.G...LA	....RR.....L.Y	.....G
HIV-H12/LC13	....S.....T.....IL..	KT..N.W...LA	...L.S.....L.Y	...K..G
HIV-H12/LC3	....S.....T.....IL..	KT..N.W...LA	...L.S.....L.Y	...K..G
HIV-H12/LC5	....S.....T.....IL..	KT..N.W...LA	...L.S.....L.Y	...K..G
HIV-H12/LC26	....S.....ST.....IL..	KT..N.W...LA	...V.S.LP...L..	...R..G
HIV-H12/LC25	....S.....N.....VL..	.T.RN.W...LA	...VRR.....L..	...K..G
HIV-H12/L12	ELTQAPGTLSLSPGERATFSC	RSSHSIRSRRVR	WYQHKPGQAPRLVIH	GVSNRAS

FIG.12A

FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
GISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC	QVYGASSYT	FGQGTKLERKR	97
.....L.....	.....	.....DF..	114
.....L.....	.....	.....DF..	114
.....L.....	.....	.....DF..	115
.VP.....S...S.L.....M...	.T..G....	.....VDI..	116
.VP.....S...S.L.....I...	.T..G....	.....TVDI..	117
.VP.....S.L.....I...	.T..G....	.....VDI..	118
..P.....A.....S.....V...	.T..G.A..	.....DI..	119
..P.....A.....S.....V...	.T..G.A..	.....DI..	119
..P.....A.....S.....V...	.T..G.A..	.....I..	120
..P.....AR.....S.L..A...V...	.T..G...S	.....DFN.	121
.VP.....AR.....S.L.....V.F.	.T..G....	....N..DIR.	122
GISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC	QVYGASSYT	FGQGTKLERKR	97

FIG. 12B

	FR1	CDR1	FR2	CDR2
H12/L12	LEQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFS	NFVIH	WVRQAPGQRFEWMG	WINPYNGNKEFSAKFQD
HC1	QVKL.....	...L.	.A.....H.P....	....A..VT.IPP....
HC2	QVKL.....	...L.	.A.....H.P....	....A..VT.I.P....
HC3	QVKL.....	...L.	.A.....H.P....	....A..VT.I.P....
HC7	QVKL.....I.....T	...L.	.A.....P....	.F..A..I..I.P....
HC9	QVKL.....	...L.	.A.....H.P....	....A..VT.I.P....
HC10	QVKL.....L.....	...L.	.A.....H.P....	....A..VT.I.P....
HC11	QVKL....T.....I..K.....T	..PL.	.....P....	..KIV..E.KY.Q..V.
HC12	QVKL.....	.....	.....	.....R.
HC13	QVKL.....	...L.	.A....T.DL....	....A..V..I.P....
HC14	QVKL.....	...L.	.A.....H.P....	....A..VT.IPP....
H12-L12	LEQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFS	NFVIH	WVRQAPGQRFEWMG	WINPYNGNKEFSAKFQD

FIG.13A

FR3	CDR3	FR4	SEQ ID NO
RVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCAR	VGPYSWDDSPQDNYYMDV	WGKGTTVIVSS	66
..SL.R....G.V.L..TN..F.....	..EWT.....	.......T.	123
..SL.G....S.V.L...N..F.....	..EWT.....	..R....T	124
..SL.G....S.V.L.....F.....	..EWT.....	.....	125
..S..G....S...V...N.....	..PWT.....	.....	126
..SL.G....S.V.L...N..F.....	..EWT...F.....	.....	127
..SL.G....S.V.L...N..F.....	..EWT.....	.....T	128
.....T.....V.G.....T.....	..EWT..MD..A.....	.....T	129
........D.....I.....	....T.....	.....	130
..SL.G....S.V.L.....F.....	..EWT.....	.....	131
..SL.R....G.V.L..TN..F.....	..EWT.....	.....	132
RVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCAR	VGPYSWDDSPQDNYYMDV	WGKGTTVIVSS	66

FIG. 13B

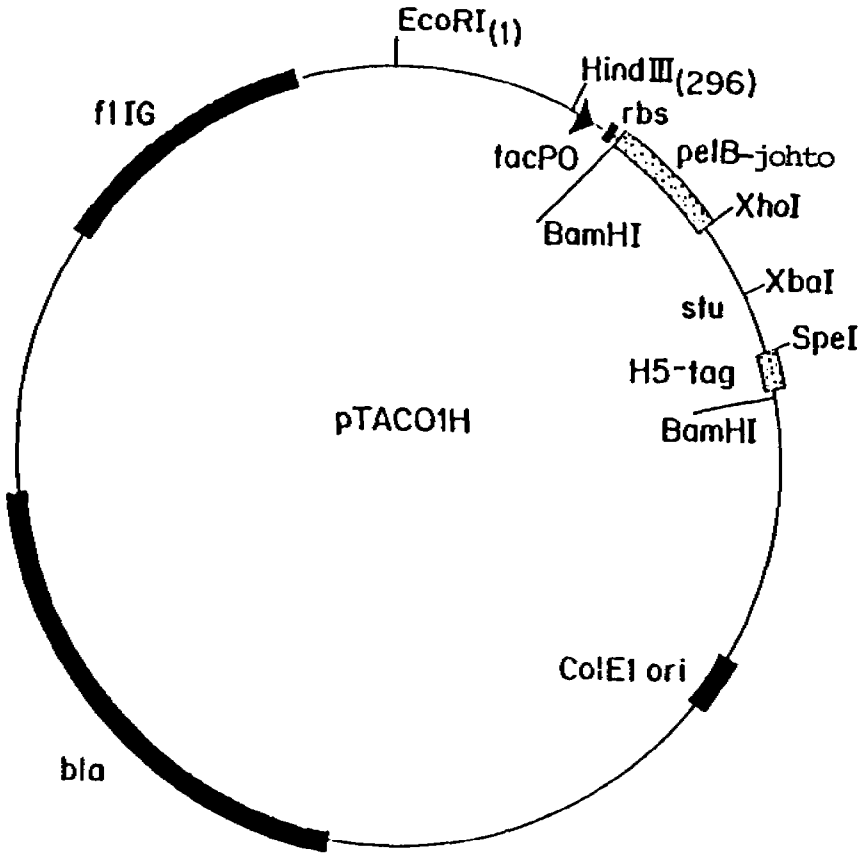


FIG.14A

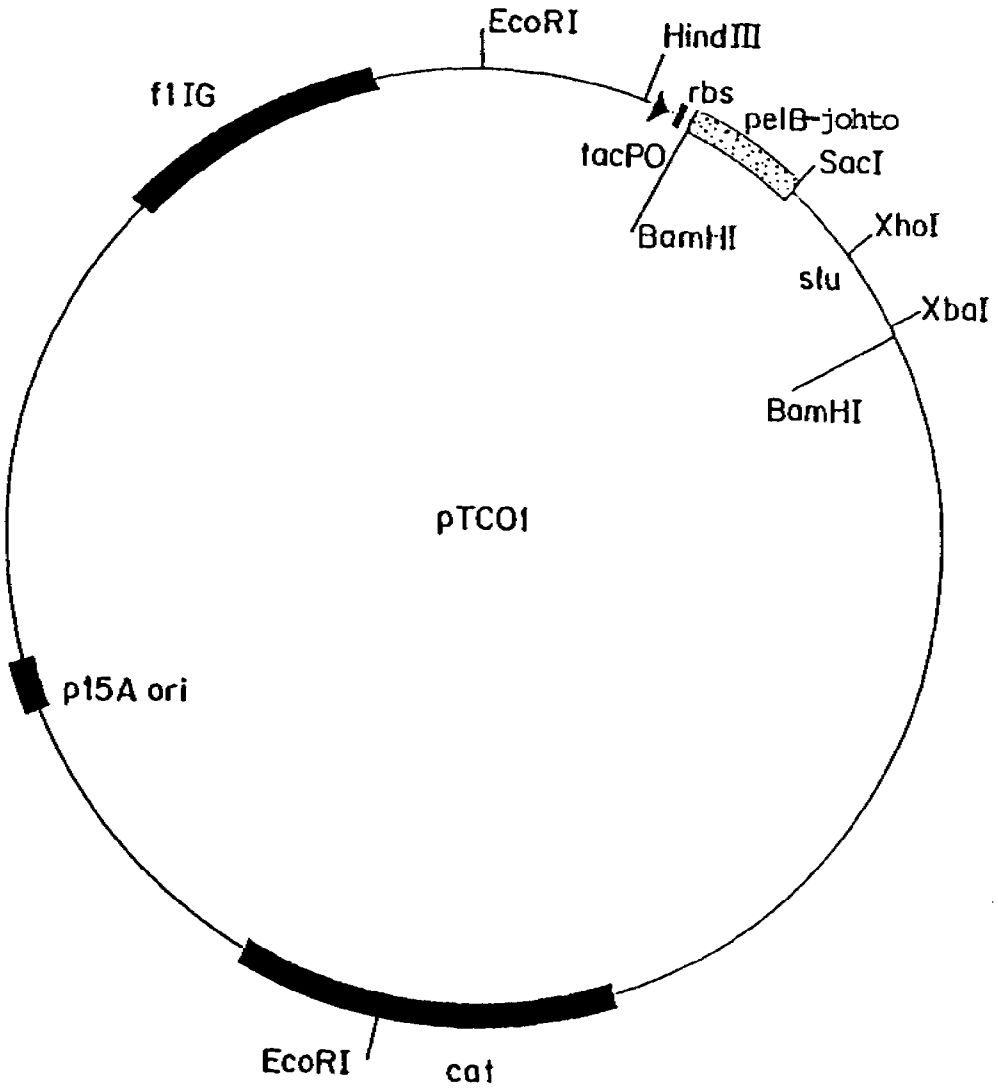


FIG.14B

tac-promoottori rbs BamHI pelB-johto

MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGly

TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAGGAAGGATCCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA

ACAACTGTTAATTAGTAGCCGAGCATATTACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTCCTTCCTAGGTACTTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCT

SacI XhoI XbaI

LeuLeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaGluLeu STOP

TTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCGAGCTCGGTCGGTCGGTCCTCGAGGGTCGGTCGGTCTCTAGAGTTAAGCGGCCGC

AACAATAATGAGCGACGGGTTGGTCGGTACCGGCTCGAGCCAGCCAGCCAGGAGCTCCCAGCCAGCCAGAGATCTCAATTCGCCGGCG

FIG. 15A

tac-promoottori rbs BamHI pelB-johto

MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGly

TGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAGGAAGGATCCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA

ACAACTGTTAATTAGTAGCCGAGCATATTACACACCTTAACACTCGCCTATTGTTAAAGTGTGTCCTCCTTCCTAGGTACTTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCT

XhoI XbaI SpeI $(His)_5$-häntä

LeuLeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaGlnValLysLeuLeuGlu ThrSerHisHisHisHisHisHisSTOP

TTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCCATGGCCCAGGTGAAACTGCTCGAGGGTCGGTCGGTCTCTAGACGGTCGGTCGGTCACTAGTCATCATCATCATCATTAAGCTA

AACAATAATGAGCGACGGGTTGGTCGGTACCGGGTCCACTTTGACGAGCTCCCAGCCAGCCAGAGATCTGCCAGCCAGCCAGTGATCAGTAGTAGTAGTAGTAATTCGAT

FIG. 15B

	b11	b6	*b4	*b12	b7	b21	b3	q b13	q b22	B26	S b8	S b18	S b27	S B8	S B35	S s4	Y b1	Y b14	b24	s8	p35
b11	+	+	w	+	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
b6	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−
b4	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
b12	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
b7	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	w	−	−	w	−
b21	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
b3	+	+	−	+	+	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
b13	w	w	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	w	−
*b22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
B26	w	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
b8	+	+	+	+	+	−	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
b18	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	w	−	−
b27	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
B8	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
*B35	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	w	−	−
s4	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
b1	+	+	+	+	+	−	−	+	w	−	+	w	−	−	−	−	+	+	+	−	−
b14	w	+	+	+	+	w	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−
b24	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−
s8	w	+	+	+	+	−	w	+	+	w	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−
p35	+	+	+	+	+	−	+	w	w	w	+	w	w	w	w	+	w	−	−	−	*

FIG. 16

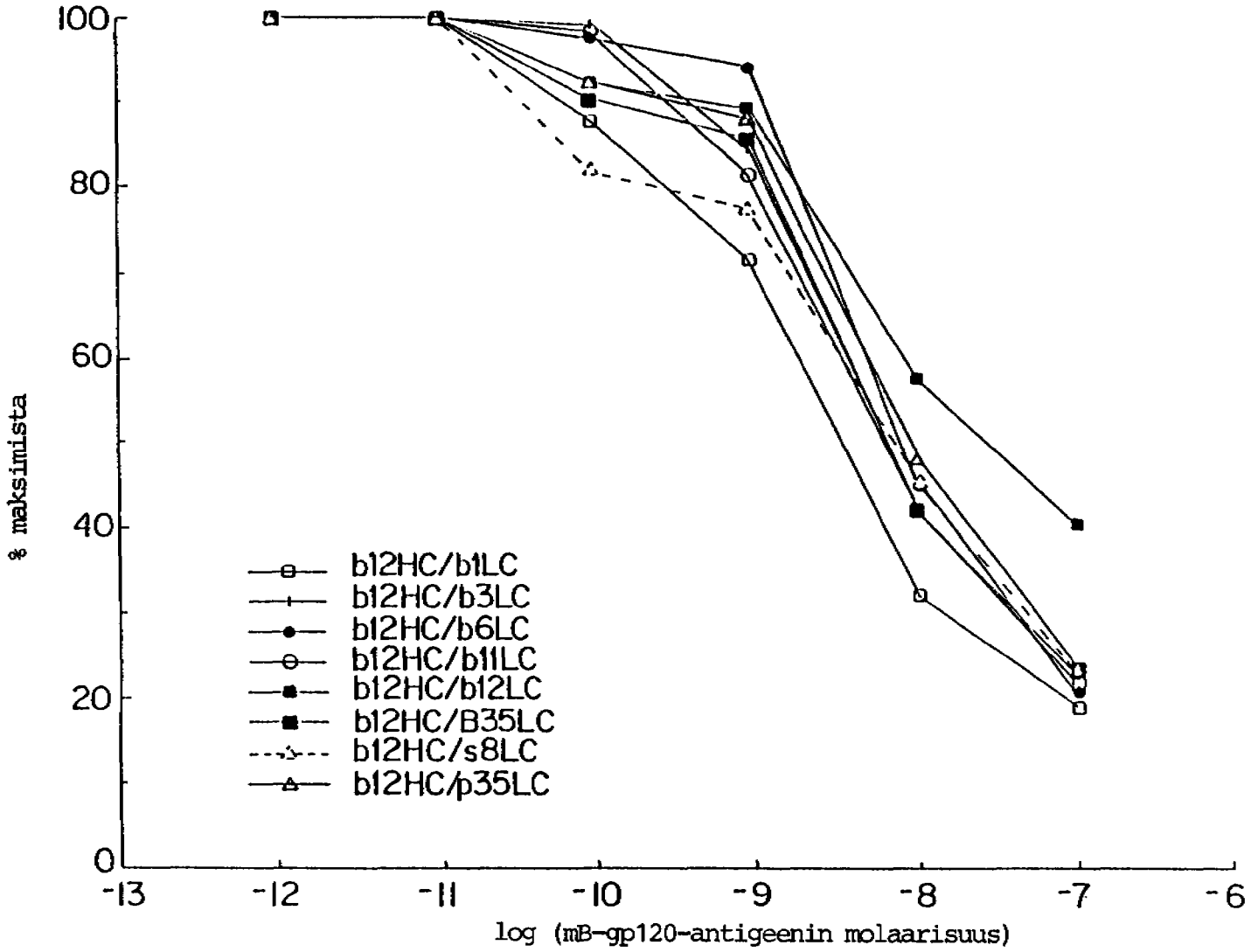

100
80
60
40
20
0
% maksimista
b12HC/b1LC
b12HC/b3LC
b12HC/b6LC
b12HC/b11LC
b12HC/b12LC
b12HC/B35LC
b12HC/s8LC
b12HC/p35LC
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
log (mB-gp120-antigeenin molaarisuus)

FIG.17

klooni	FR1	CDR1	FR2	CDR2
DL 41 19	LLESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSLS	SFDWN	WIRQPAGKGLEWIG	RIYPSGNTHYNPSLRS
DO 41 11	LLKSGGGLVKPGGSLRLSCVISAFSFS	GYNIN	WVRQAPGKGLEWVS	SISMSTGSLSYADSMKG
GL 41 1	LLESGGGLVKPGGSLRLSCSASGFTFS	SYGMN	WVRQAPGKGPEWVA	YISSSRKYTEYADSVKG
MT 41 12	LLEQSGGGLVQPGGSLRISCVASGDIFYSYAMS		WVRQAPGKGLEWVA	SISGTGGSNYYADSVKG
SS 41 8	LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLYS	SFAMS	WVRQAPGKGLAWVS	TISASGGSTKYADSVKG

FIG. 18A

FR3	CDR3	FR4
RVTMSRDTSKNQFSVKLTSVTAADTALYYCAR	ENTGRTIEEIGNFFDI	WGQGTLVTVSSASTKG
RFTISRDNAKNSVYLEMSSLTAEDTAMYYCAA	RTPLVGRALDI	WGQGTVVTVSSASTKG
RFTISRENAKYSVFLQLDSLTAEDTAIYYCAR	GRDFYSGFGRRDDFHLHYMDV	WGKGTTVTVSSASTKG
RFTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR	DRGPRIGIRGWFDS	WGQGTLVTVSSASTKG
RFIISRDNSKNTIYLQMDSLRAEDTAVYYCAK	NFRAFARDPWGD	WGQGTLVTVSSASASTK

FIG. 18B

klooni	FR1	CDR1	FR2	CDR2
DL 41 19	MAELTQSPGTLSLSPGERVIVSC	RASQSVSSNYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASNRAT
DO 41 11	MAELTQSPGTLSLSPGERATFSC	RSSHSIHTRRVA	WYQHKPGQAPRLVIH	GVSNRAS
GL 41 1	MAELTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSNGYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASTRAT
MT 41 12	MAELTQSPSSLSASVGDRVTITC	RPSQGIGRFFN	WYQQKPGKAPNLLIY	AADILQS
SS 41 8	MAELTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLVIF	GAYSRAT

FIG. 19A

FR3	CDR3	FR4
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSGT	FGQGTKVEIKRT
GISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPEDFALYYC	QVYGASSYT	FGQGTKLERKRTVV
DIPDRFSGSGSGADFTLAISRLEPEDFAVYYC	QQYAGSHT	FGQGTKLEIKRTVA
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPYT	FGQGTRLDIKRTVA
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYGSSPIT	FGPGTKVDIKRTVA

FIG. 19B