



FI 000110385B



SUOMI - FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 110385 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.01.2003

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/12, 15/62, C07K 14/435, A61K 39/35
G01N 33/53

(21) Patentihakemus - Patentansökning

941757

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

15.04.1994

(24) Alkupaivä - Löpdag

15.10.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

16.06.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US92/08637

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

16.10.1991 US 777859 P

08.05.1992 US 881396 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Immologic Pharmaceutical Corporation, One Kendal Square, Building 600, Cambridge, MA 02139
AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Garman, Richard D., 21 Fessenden Road, Arlington, MA 02174, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Greenstein, Julia L., 174 Mount Vernon Street, West Newton, MA 02165, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Kuo, Mei-Chang, 5 Cox Road, Winchester, MA 01890, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Rogers, Bruce L., 54 Richardson Road, Belmont, MA 02178, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä suvun *Dermatophagoides* proteiiniallergeenien eristetyin peptidin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en isolerad peptid av en proteinallergen hos släktet *Dermatophagoides*

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Annual review of Immunology vol. 9 (1991) p. 67-95, Clinical and Experimental Allergy vol. 21 (1991) p. 161-166

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö antaa Dermatophagoides-suvun tärkeimpien proteiiniallergeenien eristetyt peptidit. Tämän keksinnön piiriin kuuluvissa peptideissa on ainakin yksi T-solu-epitoppi, tai edullisesti proteiiniallergeenin ainakin kaksi T-solu-epitoppia, jotka on valittu allergeeneista Der p I, Der p II, Der f I tai Der f II. Keksintö kuuluu myös modifioituihin peptideihin, joilla on samantaiset tai kohonneet terapeuttiset ominaisuudet kuin vastaavalla, luonnostaan esiintyvällä allergeenilla tai sen osalla, mutta vähentyneet sivuvaikutukset. Keksintö antaa lisäksi nukleiinihapposekvenssit, jotka koodaavat keksinnön peptidejä. Annetaan myös

menetelmät käsitellä tai diagnosoida pölypunkkien herkkyyttä yksilössä ja terapeuttiset koostumukset, joissa on yksi tai useampi keksinnön peptidi.

Föreliggande uppfinning avser isolerade peptider från de viktigaste proteinallergenerna hos släktet Dermatophagoides. Peptider, som uppfinningen omfattar, innehåller åtminstone en T-cell epitop, eller företrädesvis åtminstone två T-cell epitoper av en proteinallergen utvald från allergenerna Der p I, Der p II, Der f I eller Der f II. Uppfinningen hänför sig också till modifierade peptider med likadana eller ökade terapeutiska egenskaper som motsvarande, naturligt förekommande allergen eller del därav, men med minskade sidoeffekter. Uppfinningen tillhandahåller vidare nukleinsyresekvenser som kodar uppfinningens peptider. Metoder för behandling eller diagnostisering av känslighet för dammkvalster hos en individ och terapeutiska sammansättningar innehållande en eller flera av uppfinningens peptider tillhandahålls också.

Menetelmä suvun *Dermatofagoides* proteiiniallergeenien eristey-
tyn peptidin valmistamiseksi

5 Tämä hakemus on osajatkkoa U.S.S.N. 07/881 396:lle, joka on
otsikoitu "Dermatofagoidien (pölypunkki) tärkeimpien aller-
geenien T-solu-epitootit", jätetty 8. toukokuuta, 1992, mikä
on osajatkkoa U.S.S.N. 07/777 859:lle, joka on otsikoitu "Der-
matofagoidien (pölypunkki) tärkeimpien allergeenien T-solu-
10 epitootit", jätetty 16. lokakuuta, 1991, jonka opetukset on
liitetty tähän viitteeksi.

Äskettäiset raportit ovat dokumentoineet ryhmän I (esim. Der
p I ja Der f I) ja ryhmän II (esim. Der p II ja Der f II)
15 proteiiniallergeenien vasteiden tärkeydestä pölypunkkialler-
giassa. Esimerkiksi on dokumentoitu, että yli 60 %:lla poti-
laista on ainakin 50 % heidän anti-punkki-vasta-aineista koh-
distettu näihin proteiineihin (esim. Lind, P. et al., Aller-
gy, 39:259-274 (1984); van der Zee, J.S. et al., Journal Al-
20 lergy and Clinical Immunology, 81:884-896 (1988)). On mah-
dollista, että lapsilla on suuremman asteen reaktiivisuus
ryhmän I ja ryhmän II allergeeneille (Thompson, P.J., et al.,
Immunology, 64:301-314 (1988)). Allergia suvun Dermatopha-
goides (D.) punkkeihin liittyy yhteen olotilojen kanssa, ku-
25 ten astma, nuha ja synnynnäinen ihottuma. Kaksi lajia, D.
pteronyssinus ja D. farinae ovat vallitsevia, ja sen seurauk-
sena on uhrattu melkoista vaivannäköä yritettäessä tunnistaa
allergeenit, joita nämä kaksi lajia tuottavat.

30 Yhteistä vaivannäköä on tehty karakterisoimaan geenikloo-
nauksella tärkeimmät allergeenit sekä D. pteronyssinuksesta
että D. farinaesta. Sen seurauksena lukuisat julkaisut ovat
raportoineet useiden allergeenien täydellisistä nukleotidi-
sekvensseistä, Der p I (Thomas, W.R., et al., International
35 Archives of Allergy and Applied Immunology, 85:127-129
(1988); ja Chua, K.Y., et al., Journal of Experimental Medi-

cine, 167:175-182 (1988), Der p II (Chua, K.Y., et al., International Archives of Allergy and Applied Immunology, 91:118-123 (1990)), Der f I (Dilworth, R.J., et al., Clinical and Experimental Allergy 21:25-32 (1991)), Der f II (Yuuki, T., et al., Japan Journal Allergol., 39:557-461 (1990); ja Trudinger, M. et al., Clinical and Experimental Allergy 21:33-37 (1991) ja pienimolekyyllipainoinen allergeeni (Ovey, E.R., Journal of Experimental Medicine, 170:1457-1462 (1989)) mukaanluettuina.

CDNA:n, jotka koodaavat Der p I:tä ja Der f I:tä, julkaistut nukleotidisekvenssit osoittavat, että nämä kaksi proteiinia ovat erittäin homologisia aminohappotasolla (81 % identtisyys) ja että valmiit proteiinituotteet koostuvat 222:sta ja 223:sta jäännöksestä, vastaavasti (Chua, K.Y., et al., Journal of Experimental Medicine, 167:175-182 (1988); ja Dilworth, R.J., et al., supra)). Proteiiniallergeenit Der p II ja Der f II koostuvat molemmat 129:stä jäännöksestä ja ovat myös erittäin homologisia (88 % identtisyys) aminohapposekvenssissä (Trudinger, M., supra; Yuuki, T. et al., supra; Chua, K.Y., et al., International Archives of Allergy and Applied Immunology, 91:118-123 (1990)).

CDNA-kloonien, jotka koodaavat Der p I:tä ja Der f I:tä, eristys on sallinut vasta-ainetutkimukset rekombinanttiantigeeneihin (Green, W.K., et al., International Archives of Allergy and Applied Immunology, 92:30-38 (1990); Chua, K.Y., et al., International Archives of Allergy and Applied Immunology, 91:124-129 (1990)). Der p I:n komplementaarisia DNA-fragmentteja on ekspressoitu E. colissa ja IgE-sitomitutkimukset kerätyillä ihmisen punkki-allergia-IgE-seerumeilla ovat osoittaneet sitomisja ei-sitomis-alueet läpi molekyylin (Thomas, W.R., et al., teoksessa: Epitopes of Atopic Allergens, Proceedings of Workshop from XIV Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Berliini, syyskuu, 1989, ss. 77-82). Der p I T-solu-epitoopeista on raportoitu (O'Hehir, R.E., Annual Review Immunology, 9:67-95

(1991); Stewart, G.A., et al., teoksessa: Epitopes of Atopic Allergens, Proceedings of Workshop from XIV Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Berliini, syyskuu, 1989, ss. 41-47; Yessel, H. et al., teoksessa: T cell Activation in Health and Disease: Discrimination Between Immunity and Tolerance, konferenssi 22-26, syyskuuta, 1990, Trinity Collegy, Oxford, U.K. ja Hessel, H., et al., Journal of Immunology, 148 (3):738-745 (helmikuun 1., 1992).

Tämä keksintö tarjoaa suvun Dermatophagoides tärkeimpien proteiiniallergeenien eristettyjen peptidien valmistusmenetelmän. Keksinnön piiriin kuuluvissa peptideissä on ainakin yksi proteiiniallergeenin T-solu-epitoppi, edullisesti ainakin kaksi T-solu-epitoppia, jotka on valittu allergeeneistä Der p I, Der p II, Der f I tai Der f II. Tämä keksintö tarjoaa lisäksi peptidejä, joissa on ainakin kaksi aluetta, kummankin alueen sisältäessä ainakin yhden punkkiproteiiniallergeenin T-solu-epitopin. Alueet on johdettu samoista tai erilaisista suvun Dermatophagoides proteiiniallergeeneistä.

Keksintö tarjoaa myös modifioituja peptidejä, joilla on samanlaiset lisääntyneet terapeuttiset ominaisuudet, kuten vastaavalla, luonnostaan esiintyvällä allergeenillä tai sen osalla, mutta vähentyneet sivuvaikutukset, samoin kuin modifioituja peptidejä, joilla on parantuneet ominaisuudet, kuten lisääntynyt liukoisuus ja stabiilisuus. Keksinnön peptidit kykenevät modifoimaan pölypunkkiherkässä yksilössä, joille niitä annetaan, yksilön allergisen vasteen pölypunkkiallergeeniä tai allergeeniä, joka on immunologisesti ristiinreagoiva pölypunkkiallergeenin kanssa, vastaan. Annetaan myös pölypunkkiherkkyyden käsittely- ja diagnoosimenetelmät yksilössä ja terapeuttiset koostumukset, joihin sisältyy yksi tai useampi keksinnön peptideistä.

Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Kuvio 2a osoittaa adaptorit, joita käytettiin Der p I:n ja Der f I:n ekspressiossa ja kuvio 2b osoittaa alukkeet Der f II:n ja Der p II:n amplifikaatiossa ja Der f II:n mutageneesin alukkeen.

5

Kuvio 3 osoittaa erilaisia peptidejä, joilla on toivotut pituudet, johdettuna Der p I:n ja Der p II:n proteiiniallergeeneistä.

10

Kuvio 4 osoittaa erilaisia peptidejä, joilla on toivotut pituudet, johdettuna Der f I:n ja Der f II:n proteiiniallergeeneistä.

15

Kuvio 5 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 33 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro joko puhdistettu natiivi (N) tai rekombinantti (R) Der p I proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der p I-peptideihin prosenttina vasteista T-solun stimulaatioindeksin (S.I.) kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitetun summan.

20

25

Kuvio 6 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 16 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f I proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäinmeneviin Der f I-peptideihin prosenttina vasteista T-solun stimulaatioindeksin (S.I.) kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitetun summan.

30

35

Kuvio 7 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 14 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der p I proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der p I-peptideihin ja olennaisesti yhteensopiviin Der f I-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden

keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 8 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 8 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f I proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der f I-peptideihin ja olennaisesti yhteensopiviin Der p I-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 9 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 29 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der p II proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der p II-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 10 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 10 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f II proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der f II-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 11 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 10 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f II proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der f II-peptideihin ja olennaisesti yhteensopiviin Der p II-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 12 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 26 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der p II proteiini ja vaste analysoitu erilaisiin päällekkäin meneviin Der f II-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 13 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 33 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der p I proteiini ja vaste analysoitu halutun pituisiin valittuihin peptideihin, jotka on johdettu Der f I-proteiiniallergeenisestä, prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 14 on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 9 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f I proteiini ja vaste analysoitu halutun pituisiin valittuihin peptideihin, jotka on johdettu Der f I-proteiiniallergeenisestä, prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille ja peptidivasteiden luokitettun summan.

Kuvio 15a on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 30 yhteen sopivasta potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f I proteiini ja vaste analysoitu halutun pituisiin valittuihin peptideihin, jotka on johdettu Der p I ja Der f I-proteiiniallergeeneistä, prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin peptidille.

Kuvio 15b on graafinen esitys, joka on johdettu samoista tiedoista, jotka nähdään kuviossa 15a osoittaen T-solujen,

joissa on ollut alukkeena Der p I, vasteen edullisiin Der p I peptideihin analysoituna prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä (edellä jokainen palkki), positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin (edellä jokainen palkki suluissa) peptidille ja peptidivasteiden luokitetun summan.

Kuvio 16a on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 9 yhteen sopivasta potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der f I proteiini ja vaste analysoitu halutun pituisiin valittuihin peptideihin, jotka on johdettu Der f I ja Der p I-proteiiniallergeeneistä, prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, ja positiivisten vasteiden, joiden S.I on vähintään 2, keskimääräisen, T-solun stimulaatioindeksin peptidille.

Kuvio 16b on graafinen esitys, joka on johdettu samoista tiedoista, jotka nähdään kuviossa 16a osoittaen T-solujen, joissa on ollut alukkeena Der p I, vasteen edullisiin Der f I- ja Der p I-peptideihin prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä ja positiivisten vasteiden, joiden S.I on vähintään 2, keskimääräisen, T-solun stimulaatioindeksin peptidille.

Kuvio 17a on graafinen esitys esittäen T-solujen vasteet 29 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der p II-proteiini ja vaste analysoitu halutun pituisiin valittuihin peptideihin, jotka on johdettu Der p II-proteiinista, vasteella, joiden S.I on vähintään 2, T-solun stimulaatioindeksin peptidille.

Kuvio 17b on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet 30 potilaasta, joissa on ollut alukkeina in vitro Der p II-proteiini ja vaste analysoitu valittuihin peptideihin, jotka on johdettu Der p II-proteiinista, prosenttina vasteista S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä (edellä jokainen palkki), positiivisten vasteiden keskimää-

räisen T-solun stimulaatioindeksin (edellä jokainen palkki suluissa) peptidille ja peptidivasteiden luokitetun summan (X-akseli).

5 Kuvio 18c on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet
4 yhteen sopivasta potilaasta, joissa on ollut alukkeina in
vitro punkin ryhmä I allergeeni ja vaste analysoitu edulli-
siin peptideihin Der p I ja Der f I prosenttina vasteista
S.I.:n kanssa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä,
10 positiivisten vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioin-
deksin peptidille.

Kuvio 18d on graafinen esitys esittäen T-solulinjojen vasteet
6 yhteen sopivasta potilaasta, joissa on ollut alukkeina in
15 vitro punkin ryhmä I allergeeni ja vaste analysoitu edulli-
siin peptideihin Der p II prosenttina vasteista S.I.:n kans-
sa, joka on vähintään 2 testatuissa yksilöissä, positiivisten
vasteiden keskimääräisen T-solun stimulaatioindeksin pepti-
dille.

20

Kuviot 19a-19b ovat graafisia esityksiä tuloksista, joissa
IgE:n sitoutuu suoraan affiniteetti-puhdistettuihin ja rekombinantti Der p I ja Der p II proteiineihin ja tiettyihin
Der p I ja Der p II päällekkäin meneviin peptideihin.

25

Kuviot 20a-20b ovat graafisia esityksiä tuloksista, joissa
IgE:n sitoutuu suoraan affiniteetti-puhdistettuihin ja rekombinantti Der f I ja Der f II proteiineihin ja tiettyihin
Der p I ja Der p II päällekkäin meneviin peptideihin.

30

Kuviot 21a-21h ovat graafisia esityksiä tuloksista, joissa
IgE sitoutuu suoraan biokemiallisesti puhdistettujen punkkiallergeenien (PMA) seokseen ja erilaisiin peptideihin,
jotka on johdettu Der p I:stä, Der f I:stä ja Der f II:sta.

35

Kuvio 22 on viiden Der p I kloonin (a)-(e) aminohapposekvenssien yhdistetty rivi, joka kuvaa polymorfismia Der p I-prote-

iinissa. Numerointi viittaa Der p I(a) kloonin sekvenssiin. Symbolia (-) käytetään osoittamaan, että Der p I kloonin aminohappojäännös on identtinen Der p I(a):n vastaavien aminohapposekvenssien kanssa tuossa asemassa. Näiden kloonien aminohapposekvenssit osoittavat, että saattaa olla merkittävää muunnelmaa Der p I:ssä, viiden polymorfisen aminohappojäännöksen kanssa, jotka ovat viidessä sekvenssissä.

Kuvio 23 on kolmen Der p II kloonin aminohapposekvenssien yhdistetty rivi (c), (1) ja (2), joka kuvaa polymorfismia Der p II proteiinissa. Numerointi viittaa Der p II(c) kloonin sekvenssiin. Symbolia (.) käytetään osoittamaan, että Der p II kloonin aminohappojäännös on identtinen Der p I(c):n vastaavien aminohapposekvenssien kanssa tuossa asemassa.

Kuvio 24 on kuuden Der f II kloonin (s.o. pFL1, pFL2, MT3, MT5, MT18 ja MT16) aminohapposekvenssien yhdistetty rivi (c), (1) ja (2), joka kuvaa polymorfismia Der p II-proteiinissa. Numerointi viittaa Der f pFL1 kloonin sekvensseihin. Symbolia (.) käytetään osoittamaan, että Der f II kloonin aminohappojäännös on identtinen Der f II pFL1:n vastaavien aminohapposekvenssien kanssa tuossa asemassa.

Kuvio 25 osoittaa valitun peptidin nukleotidi- ja aminohapposekvenssit, mihin sisältyy erilaisia alueita, jotka on johdettu Der p I-, Der p II- ja Der f I-proteiiniallergeeneistä.

Kuvio 26 osoittaa valitun peptidin nukleotidi- ja aminohapposekvenssit, mihin sisältyy erilaisia alueita, jotka on johdettu Der p I-, Der p II- ja Der f I-proteiiniallergeeneistä.

Kuvio 27 osoittaa valitun peptidin nukleotidi- ja aminohapposekvenssit, mihin sisältyy erilaisia alueita, jotka on johdettu Der p I-, Der p II- ja Der f I-proteiiniallergeeneistä.

Kuvio 28 osoittaa modifioitujen peptidien aminohapposekvenssit keksinnön mukaisesti.

Tämä keksintö tarjoaa eristettyjä peptidejä, jotka on johdettu suvun Dermatophagoides tärkeimmistä proteiiniallergeeneista. Kuten tässä on käytetty, viittaa peptidi tai proteiinin fragmentti aminohapposekvenssiin, jolla on vähemmän aminohappojäännöksiä kuin proteiinin koko aminohapposekvenssillä.

Keksinnön peptideihin kuuluvat peptidit, jotka on johdettu

Der p I:stä (SEQ ID Nro: 1 ja 2), Der p II:sta (SEQ ID Nro: 3 ja 4), Der f I:stä (SEQ ID Nro: 5 ja 6) ja Der f II:sta (SEQ ID Nro: 7 ja 8), mihin sisältyy ainakin yksi allergeenin T-solu-epitoppi.

Keksinnön piiriin kuuluvat myös peptidit, jotka koostuvat

ainakin kahdesta alueesta, jokaisen alueen sisältäessä suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin ainakin yhden T-solu-epitopin. Sellaisen peptidin jokainen alue on johdettu samoista tai erilaisista punkkiallergeeneistä. Eristetyt

peptidit tai eristettyjen peptidien alueet, joissa jokaisessa on punkkiallergeenin ainakin kaksi T-solu-epitoppia ovat erityisen toivottuja lisääntyneeseen terapeuttiseen tehokkuuteen. Peptidit, jotka ovat immunologisesti samankaltaisia (esim. vasta-aineen tai T-solun ristiinreagoimisella) tämän keksinnön peptidien kanssa kuuluvat myös keksinnön piiriin.

Peptidejä, jotka ovat immunologisesti samankaltaisia vasta-aineen ristiinreagoimisella, sitovat vasta-aineet, jotka ovat spesifisiä suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin peptidille. Peptidit, jotka ovat immunologisesti samankaltaisia T-solun ristiinreagoimisella, kykenevät reagoimaan samojen T-solujen kanssa kuin keksinnön peptidi.

Keksinnön eristettyjä peptidejä voidaan tuottaa rekombinantti DNA-tekniikoilla isäntäsolussa, joka on transformoitu nukleiinihapolla, jonka sekvenssi koodaa sellaista peptidiä. Keksinnön eristettyjä peptidejä tuottaa myös kemiallisella synteesillä. Tietyissä rajoitetuissa tilanteissa voidaan eris-

tettyjä peptidejä voidaan tuottaa proteiiniallergeenin kemiallisella pilkkomisella. Kun peptidi tuotetaan rekombinantitekniikoilla, isäntäsoluja, jotka on transformoitu nukleiinihapolla, jonka sekvenssi koodaa peptidiä tai nukleiinihapposekvenssin toiminnallista ekvivalenttia, viljellään alustassa, joka on sopiva soluille ja peptidit voidaan puhdistaa soluviljelmäalustasta, isäntäsoluista tai molemmista käyttämällä tunnettuja peptidien ja proteiinien puhdistuksen alan tekniikoita, ioninvaihtokromatografia, geelisuodatus, ultrasuodatus, elektroforeesi ja immunopuhdistus peptidille, suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenille, josta peptidi on johdettu, tai sen osalle spesifisten vasta-aineiden kanssa. Keksinnön eristetyissä peptideissä ei olennaisesti ole solumateriaalia tai viljelyalustaa, kun tuotetaan rekombinantti-DNA-tekniikoilla, tai ei ole olennaisesti kemiallisia prekursoreita tai muita kemikaaleja, kun syntetisoitu kemiallisesti.

Tämä keksintö tarjoaa ekspressiovektoreita ja isäntäsoluja, jotka on transformoitu ekspressoimaan keksinnön nukleiinihapposekvenssejä. Nukleiinihapposekvenssiä, joka koodaa punktiallergeeniä, tai ainakin yhtä sen fragmenttia, voidaan ekspressoida bakteerisoluiissa, kuten E. coli, hyönteissolut (bakulovirus), hiiva tai nisäkässolut, kuten kiinan hamsterin munasarjan solut (CHO). Sopivia ekspressiovektoreita, promootoreita, vahvistajia ja muita ekspressiokontrollielementtejä voidaan löytää teoksessa Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, toinen toimitus, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Muut sopivat ekspressiovektorit, promoottorit, vahvistajat ja muut ekspressiokontrollielementit ovat ammattimiehille tuttuja. Ekspressio nisäkäs-, hiiva- tai hyönteissoluissa johtaa osittaiseen tai täydelliseen rekombinanttimateriaalin glykosylaatioon ja minkä tahansa ketjun väliseen tai sisäiseen disulfididisidosten muodostumiseen. Sopivia vektoreita ekspressioon hiivassa ovat YepSec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6: 229-234); pMFa (Kurjan ja Herskowitz (1982) Cell 30: 933-

943); JRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113-123) ja pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Näitä vektoreita on vapaasti saatavilla. Bakulovirus- ja nisäkäs-ekspressiosysteemejä on myös saatavilla. Esimerkiksi bakulovirussysteemiä on kaupallisesti saatavilla (PharMingen, San Diego, CA) ekspressioon hyönteissoluissa, kun taas pMSG-vektoria on kaupallisesti saatavilla (Pharmacia, Piscataway, NJ) ekspressioon nisäkässoluissa.

Ekspressioon E. colissa sopivia vektoreita ovat muun muassa, pTRC (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315); pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia); pMAL (N.E. Biolabs, Beverly, MA); pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ); pET-11d (Novagen, Madison, WI) Jameel et al., (1990) J. Virol. 64:3963-3966; ja pSEM (Knapp et al. (1990) BioTechniques 8:280-281). pTRC:n ja pET-11d:n käyttö esimerkiksi johtaa ei-fuusioituneen proteiinin ekspressioon. pMAL:n, pRIT5:n, pSEM:n ja pGEX:n käyttö johtaa allergeenin, joka on fuusioitunut maltoosi E:tä sitovaan proteiiniin (pMAL), proteiini A:han (pRIT5), lyhennettyyn β -galaktosidaasiin (PSEM) tai glutationi S-transferaasiin (pGEX), ekspressioon. Kun punkkiproteiiniallergeeniä, fragmenttia tai sen fragmentteja ekspressoidaan fuusioproteiinina, on erityisen edullista tuoda entsyymaattinen pilkkomiskohta fuusioliittymään kantajaproteiinin ja punkkiproteiiniallergeenin tai sen fragmentin väliin. Punkkiproteiiniallergeeni tai sen fragmentti voidaan sitten saada takaisin fuusioproteiinista entsyymaattisella pilkkomisella entsyymaattisesta kohdasta biokemiallisella puhdistuksella käyttämällä proteiinien ja peptidien puhdistuksen tavanomaisia tekniikoita. Sopivia entsyymaattisia pilkkomiskohtia ovat veren hyytymistekijä Xa:n tai trombiinin, joita varten on kaupallisesti saatavilla sopivia entsyymejä ja pilkkomisen protokollia, esim. Sigma Chemical Company, St. Louis, MO ja N.E. Biolabs, Beverly, MA. Erilaisilla vektoreilla on myös erilaiset promoottorialueet sallien jatkuvan tai indusoituvan ekspression, esimerkiksi IPTG-induktio (PRTC, Amann et al., (1988)

supra; pET-11d, Novagen, Madison, WI) tai lämpötila-induktio (pRIT5, Pharmacia, Piscataway, NJ).

5 Jotta saadaan keksinnön eristettyjä proteiineja, jaetaan punkkiallergeeni toivotun pituiseen ei-päällekkäin meneviin peptideihin tai toivotun pituisiin päällekkäin meneviin peptideihin, kuten esimerkissä 3 keskustellaan, joka voidaan tuottaa rekombinanttisesti, synteettisesti tai tietyissä rajoitetuissa tilanteissa, allergeenin kemiallisella pilkkomisella. Peptidit, joissa on ainakin yksi T-solu-epitoppi, 10 kykenevät saamaan aikaan T-solun vasteen, kuten stimulaatio (s.o. lisääntyminen tai imunesteen erityys) ja/tai kykenevät indusoimaan T-solun vastustuskyvyttömyyden (s.o. sieto). Jotta määritetään peptidit, joissa on ainakin yksi T-solu- 15 epitoppi, eristetyt peptidit testataan esimerkiksi T-solubiologian tekniikoilla, jotta määritetään, saavatko peptidit aikaan T-solu-vasteen tai indusoituuko T-solun vastustuskyvyttömyys. Ne peptidit, joilla havaitaan saatavan aikaan T-solu-vaste tai indusoivan T-solun vastustuskyvyttömyyden, 20 määritetään sellaisiksi, joilla on T-solua stimuloivaa aktiivisuutta.

25 Kuten esimerkeissä keskustellaan, ihmisen T-solua stimuloiva aktiivisuus voidaan testata viljelemällä T-soluja, jotka saatiin yksilöstä, joka on herkkä punkkiallergeenille (s.o. yksilö, jolla on IgE:n välittämää immuunivastetta punkkiallergiaan) peptidien kanssa, jotka on johdettu allergeenistä ja määrittämällä, tapahtuuko T-solujen lisääntymistä vasteena peptidille mitattuna, esim. trituroidun tymidiinin solun 30 sisäänotolla. Stimulaatioindeksejä T-solujen peptideihin kohdistuville vasteille voidaan laskea maksimaalisena CPM:nä suhteessa peptidiin jaettuna kontrolli CPM:llä. T-solun stimulaatioindeksiä (S.I.), joka on yhtä suuri tai suurempi kuin kaksi kertaa taustataso, pidetään "positiivisenä". Positiivisia tuloksia käytetään laskemaan keskimääräinen stimulaatioindeksi jokaiselle peptidille testattujen peptidien ryhmälle. Tämän keksinnön edullisissa peptideissa on ainakin yksi

T-solu-epitoppi ja keskimääräinen T-solu-stimulaatioindeksi on suurempi tai yhtä suuri kuin 2,0. Peptidiä, jonka T-solun stimulaatioindeksi on suurempi tai yhtä suuri kuin 2,0, pidetään hyödyllisenä terapeuttisena aineena. Edullisilla peptideillä on keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi, joka on vähintään 2,5, edullisemmin ainakin 3,5, jopa edullisemmin ainakin 4,0 ja edullisimmin ainakin 5,0.

Lisäksi edullisilla peptideillä on positiivisyysindeksi (P.I.), joka on vähintään noin 100, edullisemmin ainakin 150, jopa edullisemmin ainakin noin 200 ja edullisimmin ainakin noin 250. Peptidin positiivisyysindeksi määritetään kertomalla keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi yksilöiden prosentilla, yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille, populaatiossa (esim. edullisesti ainakin 9 yksilöä, edullisemmin ainakin 16 yksilöä tai enemmän, edullisemmin ainakin 29 yksilöä tai enemmän, tai jopa edullisemmin ainakin 30 yksilöä tai enemmän), joilla on T-soluja, jotka vastaavat peptideihin. Täten positiivisyysindeksi edustaa sekä T-soluvasteen voimakkuutta peptidiin (S.I.) että T-soluvasteen frekvenssiä peptidiin yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille, populaatiossa. Esimerkiksi, kuten kuviossa 5 nähdään, peptidi DPI-1:llä on keskimääräinen S.I. 4,7 ja 73 % positiivisista vasteista testattujen yksilöiden ryhmässä, johti positiivisyysindeksiin 343.1. Der p I peptideihin, joilla oli positiivisyysindeksi ainakin noin 150 ja keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi ainakin noin 4, kuuluvat: DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:34); DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36; ja DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37).

Jotta määritetään tarkat T-solu-epitopit, esimerkiksi hienokartoitustekniikoilla, modifioidaan peptidi, jolla on T-solua stimuloivaa aktiivisuutta ja täten sisältäen ainakin yhden T-solu-epitopin määritettynä T-solubiologian tekniikoilla, lisäämällä tai deletoimalla aminohappojäännöksiä peptidin joko amino- tai karboksipäässä ja testataan, jotta määrite-

tään muutos T-solureaktiivisyydessä modifioituun peptidiin. Jos kahdella tai useammalla peptidillä, joilla on sama päälekkäisyyden alue natiivissa proteiinisekvenssissä, havaitaan olevan ihmisen T-solua stimuloivaa aktiivisuutta määritettynä

5 T-solubiologian tekniikoilla, voidaan tuottaa lisäpeptidejä, joissa on kaikki tai osa sellaisista peptideistä ja nämä lisäpeptidit voidaan testata samanlaisella menetelmällä. Tämän tekniikan jälkeen peptidit valitaan ja tuotetaan rekombinanttisesti tai synteettisesti. Peptidit valitaan perustuen

10 erilaisiin tekijöihin, T-soluvasteen voimakkuus peptidiin mukaanluettuna (esim. stimulaatioindeksi), yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille, T-soluvasteen frekvenssi polulaa-tiossa peptidiin ja peptidin mahdollinen ristiinreagoiminen suvun Dermatophagoides muiden allergeenien kanssa. Näiden

15 valittujen peptidien fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet (esim. liukoisuus, stabiilisuus) tutkitaan, jotta määritetään, ovatko peptidit sopivia käytettäviksi terapeuttisissa koostumuksissa tai vaativatko peptidit modifikaatiota, kuten tässä kuvattiin. Valittujen peptidien tai modifioitujen peptidien kyky stimuloida ihmisen T-soluja (esim. indusoida

20 lisääntymistä, imunesteen erittymistä) määritetään.

Lisäksi keksinnön edulliset peptidit eivät sido immuno-globuliini E:tä (IgE) tai sitovat IgE:tä olennaisesti vähem-mässä määrin kuin proteiiniallergeeni, mistä peptidi on johdettu, sitoo IgE:tä. Standardin immunoterapian tärkeimmät

25 komplikaatiot ovat IgE-välitettyjä vasteita, kuten anafylaktio. Immunoglobuliini E on välittäjänä anafylaktisissa reaktioissa, jotka johtuvat antigeenin sitomisesta ja ristiinreagoimisesta IgE:hen syöttösoluissa tai basofiileissä ja välittäjäaineiden vapautumisesta (esim. histamiini, sero-toniini, eosinofiiliset kemotaktiset tekijät). Täten anafylaktiota voitaisiin välttää yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille, polulaation olennaisessa prosenttiosuudessa

30 käyttämällä peptidin tai peptidien immunoterapiaa, joka ei sido IgE:tä olennaisena prosenttiosuutena (esim. ainakin noin 75 %) yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille, polulaa-

tiossa tai jos peptidi sitoo IgE:tä sellainen sitominen ei johda välittäjäaineiden vapautumiseen syöttösoluista tai basofiileistä. Anafylaktion riskiä voitaisiin vähentää käyttämällä peptidin tai peptidien immunoterapiaa, jolla on vähentynyt IgE-sitominen. Lisäksi, peptidit joilla on minimaalinen IgE:tä stimuloiva aktiivisuus, ovat toivottuja te-
 5 peuttiseen tehokkuuteen. Minimaalinen IgE:tä stimuloiva aktiivisuus viittaa IgE-tuottoon, joka on vähemmän kuin IgE-tuoton määrä ja/tai IL-4 tuottoon, jota stimuloi natiivi
 10 proteiiniallergeeni (esim. Der p I).

Keksinnön peptidi annettuna yksilölle, joka on herkkä pölypunkille, kykenee modifioimaan yksilön allergista vastetta allergeeniin. Erityisesti keksinnön peptidit, jotka sisältävät ainakin yhden punkkiallergeenin T-solu-epitootin tai
 15 ainakin kaksi aluetta, jotka on johdettu punkkiallergeenistä, jokaisen koostuessa ainakin yhdestä T-solu-epitootista, annettuna yksilölle, joka on herkkä pölypunkille, kykenee modifioimaan yksilön allergista vastetta allergeeniin. Kuten
 20 tässä on käytetty yksilön pölypunkkiallergeenin allergisen vasteen modifiointia voidaan kuvata ei-vasteelliseksi tai oireiden pienentämiseksi punkkiallergeenille altistamisen jälkeen, määritettynä standardeilla kliinisillä menetelmillä (katso esim. Varney et al., British Medical Journal 302: 265-
 25 269 (1990)) mukaanluettuna punkkiproteiiniallergeenissä indusoimien astmaattisten oireiden pienenemisen. Kuten tässä on viitattu, sisältyy oireiden pienenemiseen mikä tahansa vähentäminen yksilön allergisessa vasteessa allergeeniin sen jälkeen, kun yksilö on lopettanut käsittely hoito-ohjeet
 30 keksinnön peptidillä tai proteiinilla. Tämä pienentäminen voi olla subjektiivista (s.o. potilas tuntee olonsa mukavammaksi allergeenin läsnäollessa). Oireiden pienentäminen voidaan määrittää yhtä hyvin kliinisesti käyttämällä alalla tunnettuja standardi ihotestejä.

Tässä kuvatun työn tuloksena on tuotettu peptidejä, jotka on johdettu punkkiallergeeneistä, joissa on ainakin yksi T-solu-

epitooppi. T-solu-epitooppien uskotaan olevan mukana aloittamassa ja säilyttämässä immuunivasteita punkkiallergeen(e)ille, jo(t)ka on (ovat) vastuussa punkkiallergian kliinisistä oireista. Näiden T-solu-epitooppien ajatellaan laukaisevan aikaisia tapahtumia T-auttajasolutasolla sitomalla sopivaan HLA-molekyyliin antigeenin, joka edustaa solua, pinnalla, ja stimuloivan asiaankuuluvaa T-solun alapopulaatiota. Nämä tapahtumat johtavat T-solun lisääntymiseen, imunesteen erittämiseen, paikallisiin tulehduksellisiin reaktioihin, lisäämmuunisolujen värväämiseen kohtaan ja B-soluryöpyn aktivointiin johtaen vasta-aineiden tuottoon. Eräs näiden vasta-aineiden isotyyppi, IgE, on pohjimmiltaan tärkeä allergisten oireiden kehityksessä ja sen tuottoon vaikutetaan aikaisin ryöpytapahtumissa, T-auttajasolutasolla eritettyjen imunes-

15 teiden luonteella. T-solu-epitooppi on peruselementti tai pienin yksikkö, jonka T-solureseptori tunnistaa, missä epitoopissa on aminohappojäännöksiä, jotka ovat oleellisia reseptorin tunnistukselle, mikä voi olla viereinen ja/tai ei-viereinen proteiinin aminohapposekvenssissä. Aminohapposek-

20 venssit, jotka matkivat T-solu-epitooppien aminohapposekvenssejä ja jotka modifioivat allergisen vasteen suvun Derma-
tophagoides proteiiniaallergeeneihin, kuuluvat tämän keksinnön piiriin.

25 Punkkiallergisten potilaiden altistaminen tämän keksinnön peptideille saattaa tehdä vastustuskykyiseksi tai vastustuskyvyttömäksi sopivat T-solun alapopulaatiot siten, että ne tulevat vasteettomiksi punkkiallergeen(e)ille ja eivät ota osaa immuunivasteen toimeenpanemiseen sellaisen altistamisen jälkeen. Lisäksi tämän keksinnön peptidin antaminen saattaa modifioida imuneste-eritysprofiilia verrattuna altistamiseen luonnostaan esiintyvälle punkkiallergeenille tai sen osalle (esim. johtaa IL-4:n vähenemiseen ja/tai IL-2:n lisääntymiseen). Lisäksi altistaminen keksinnön peptidille saattaa vaikuttaa T-solu-alapopulaatioihin, jotka normaalisti ottavat osaa punkkiallergeeni(e)n vasteeseen, siten että nämä T-solut vedetään pois allergeenin normaalin altistamisen koh-

dasta (kohdista) (esim. nenän limakalvo, iho ja keuhkot) peptidin terapeuttisen antamisen kohtaa (kohtiin). Tämä T-solu-alapopulaatioiden uudelleenjakaantuminen saattaa parantaa tai vähentää yksilön immuunisysteemin kykyä panna toimeen

5 immuunivaste punkkiallergeen(e)in normaaliin altistamiskoh-
taan, johtaen allergisten oireiden pienenemiseen.

Keksinnön eristetyissä peptideissä on ainakin yksi suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin T-solu-epitoppi ja sen

10 mukaisesti keksinnön peptidissä on proteiinin ainakin liki-
määrin 7 aminohappojäännöstä. Terapeuttista tehokkuutta var-
ten keksinnön terapeuttisissa koostumuksissa on edullisesti
ainakin kaksi punkkiallergeenin T-solu-epitoppia. Sen mukai-
sesti keksinnön eristetyissä peptideissä on ainakin kaksi T-
15 solu-epitoppia ja sen mukaisesti peptidissä on ainakin liki-
määrin 8 aminohappojäännöstä ja edullisesti 15 aminohappo-
jäännöstä. Lisäksi keksinnön terapeuttisissa koostumuksissa
on edullisesti riittävä prosenttiosuus koko proteiinialler-
geenin T-solu-epitoopeista siten, että koostumuksen antamisen
20 terapeuttiset hoito-ohjeet yksilölle, joka on herkkä pölypun-
kille, johtavaa yksilön T-solujen vastuskykyisyyteen prote-
iiniallergeenille. Synteettisesti tuotetut keksinnön peptidit
sisältävät likimäärin 45 aminohappojäännökseen asti pituudel-
taan ja edullisimmin likimäärin 30 aminohappoon asti pituu-
25 deltaan ovat erityisen toivottuja, koska pituuden kasvu saat-
taa johtaa vaikeuksiin peptidisynteesissä samoin kuin ei-
toivotun ominaisuuden säilyttämiseen (esim. immunoglobuliinin
sitominen tai entsyymaattinen aktiivisuus) johtuen konforma-
tionaalisen samankaltaisuuden säilyminen peptidin ja prote-
30 iiniallergeenin, mistä se on johdettu, välillä. Kaikilla
kuviossa 3 ja kuviossa 4 nähdyillä peptideillä havaittiin
olevan ihmisen T-solua stimuloivaa aktiivisuutta.

Edullisissa peptideissä on kaikki tai osa tärkeän T-solureak-
35 tiivisyyden alueista Der p I-, Der f I-, Der p II- ja Der f
II-proteiiniallergeenien alueella, s.o. alue 1, alue 2, alue
3, alue 4, alue 5, alue 6a, alue 6b, alue 7, alue 8, alue 9

ja alue 10. Jokainen alue on kuvattu seuraavasti: alue 1 koostuu Der p I- ja Der f I-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 1-28; alue 2 koostuu Der p I- ja Der f I-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 36-68; alue 3 koostuu Der p I- ja Der f I-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 74-109; alue 4 koostuu Der p I- ja Der f I-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 118-139; alue 5 koostuu Der p I- ja Der f I-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 141-166; alue 6a koostuu Der p I- ja Der f I-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 161-185; alue 6b koostuu Der p I- ja Der f I-allergeenien aminohappojäännöksistä 173-201; alue 7 koostuu Der p II- ja Der f II-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 1-26; alue 8 koostuu Der p II- ja Der f II-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 33-67; alue 9 koostuu Der p II- ja Der f II-allergeenien aminohappojäännöksistä 79-104 ja alue 10 koostuu Der p II- ja Der f II-proteiiniallergeenien aminohappojäännöksistä 107-129.

Edulliset peptidit, jotka on johdettu Der p I proteiinista, sisältävät kaikki tai osan seuraavista peptideistä: DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-2 (SEQ ID Nro:10); DP I-3 (SEQ ID Nro:11); DP I-4 (SEQ ID Nro:12); DP I-11.1 (SEQ ID Nro:13); DP I-12.1 (SEQ ID Nro:14); DP I-5 (SEQ ID Nro:15); DP I-13 (SEQ ID Nro:17); DP I-14 (SEQ ID Nro:18); DP I-15 (SEQ ID Nro:19); DP I-6.1 (SEQ ID Nro:20); DP I-7.1 (SEQ ID Nro:21); DP I-8 (SEQ ID Nro:22); DP I-9 (SEQ ID Nro:23); DP I-16 (SEQ ID Nro:24); DP I-10 (SEQ ID Nro:25); DP I-17 (SEQ ID Nro:26); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:28); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29); DP I-22.2 (SEQ ID Nro:30); DP I-22.3 (SEQ ID Nro:31); DP I-22.4 (SEQ ID Nro:32); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-23.2 (SEQ ID Nro:34); DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35); DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37); DP I-27.1 (SEQ ID Nro:38); DP I-28.1 (SEQ ID Nro:39) ja DP I-28.2 (SEQ ID Nro:40), missä peptidin osalla on keskimääräinen T-solu-stimulointi-indeksi, joka on olennaisesti yhtä suuri tai suurempi kuin peptidin, josta se on johdettu,

keskimääräinen T-solun stimulointiindeksi, kuten kuviossa 5 ja kuviossa 13 nähdään. Edullisemmin, peptidit, jotka on johdettu Der p I proteiinista, sisältävät kaikki tai osan seuraavista peptideistä: DP I-21.2, DP I-22.2, DP I-23.1, DP I-25.2, DP I-26.1, DP I-27.1 ja DP I-28.1 ja edullisimmin peptidit, jotka on johdettu Der p I proteiinista, sisältävät kaikki tai osan seuraavista peptideistä: DP I-21.2, DP I-23.1 ja DP I-26.1, missä peptidin osalla on keskimääräinen T-solun stimulointi-indeksi, joka on olennaisesti yhtä suuri tai suurempi kuin peptidin, josta se on johdettu, keskimääräinen T-solun stimulointi-indeksi, kuten kuviossa 5 ja kuviossa 13 nähdään.

Edullisiin peptideihin, jotka on johdettu Der f I-, Der p II- ja Der f II-proteiineista kuuluvat: DF I-1 (SEQ ID Nro:72); DF I-2.1 (SEQ ID Nro:73); DF I-3 (SEQ ID Nro:74); DF I-4 (SEQ ID Nro:75); DF I-11 (SEQ ID Nro:76); DF I-12 (SEQ ID Nro:77); DF I-5 (SEQ ID Nro:78); DF I-13 (SEQ ID Nro:79); DF I-14 (SEQ ID Nro:80); DF I-15 (SEQ ID Nro:81); DF I-6 (SEQ ID Nro:82); DF I-7 (SEQ ID Nro:83); DF I-8.1 (SEQ ID Nro:84); DF I-8 (SEQ ID Nro:85); DF I-9 (SEQ ID Nro:86); DF I-16 (SEQ ID Nro:87); DF I-10 (SEQ ID Nro:88); DF I-17 (SEQ ID Nro:89); DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90); DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DF I-22.2 (SEQ ID Nro:93); DF I-22.4 (SEQ ID Nro:94); DF I-23.1 (SEQ ID Nro:95); DF I-23.2 (SEQ ID Nro:96); DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-25.2 (SEQ ID Nro:98); DF I-26.1 (SEQ ID Nro:99); DF I-27.1 (SEQ ID Nro:100); DF I-28.1 (SEQ ID Nro:101); DF I-28.2 (SEQ ID Nro:102); DP II-20 (SEQ ID Nro:50); DP II-20.1 (SEQ ID Nro:51); DP II-20.2 (SEQ ID Nro:52); DP II-20.3 (SEQ ID Nro:53); DP II-20.4 (SEQ ID Nro:54); DP II-20.5 (SEQ ID Nro:55); DP II 20.6 (SEQ ID Nro:56); DP II-1 (SEQ ID Nro:14); DP II-2 (SEQ ID Nro:42); DP II-3.1 (SEQ ID Nro:43); DP II-4 (SEQ ID Nro:44); DP II-5 (SEQ ID Nro:45); DP II-6 (SEQ ID Nro:46); DP II-7 (SEQ ID Nro:47); DP II-8 (SEQ ID Nro:48); DP II-9 (SEQ ID Nro:49); DP II-1.1 (SEQ ID Nro:57); DP II-1.2 (SEQ ID Nro:58); DP II-2.1 (SEQ ID

Nro:59); DP II-2.2 (SEQ ID Nro:60); DP II-2.3 (SEQ ID Nro:61); DP II-21 (SEQ ID Nro:62); DP II-22 (SEQ ID Nro:63); DP II-26 (SEQ ID Nro:64); DP II-26.1 (SEQ ID Nro:65); DP II-23 (SEQ ID Nro:66); DP II-23.1 (SEQ ID Nro:67); DP II-24 (SEQ ID Nro:68); DP II-25 (SEQ ID Nro:69); DP II-25.1 (SEQ ID Nro:70); DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71); DF II-1 (SEQ ID Nro:103); DF II-2 (SEQ ID Nro:104); DF II-13.1 (SEQ ID Nro:105); DF II-3.1 (SEQ ID Nro:106); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107); DF II-4.3 (SEQ ID Nro:108); DF II-15 (SEQ ID Nro:109); DF II-16 (SEQ ID Nro:110); DF II-17 (SEQ ID Nro:111); DF II-18 (SEQ ID Nro:112); DF II-19 (SEQ ID Nro:113); DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114); DF II-21 (SEQ ID Nro:115) ja DF II-22 (SEQ ID Nro:116) tai peptidien, joissa on ainakin yksi T-solu-epitooppi, osista. Peptidin, joka on johdettu Der f I:stä, Der p II:sta ja Der f II:sta, osalla on edullisesti keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi yhtä suuri tai suurempi kuin peptidin, josta se on johdettu, kuten kuviossa 10, kuviossa 15a, kuviossa 15b ja kuviossa 16 on osoitettu, keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi. Peptideissä, jotka on johdettu Der p II- ja Der f I-proteiineista, on edullisemmin kaikki tai osa seuraavista peptideistä: DF I-22.2, DP II-20.6, DP II-22, DP II-24 ja DP II-25.23.

Eräs tämän keksinnön suoritusmuoto hahmottelee suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin peptidin. Peptidi tai sen osa koostuu ainakin yhdestä proteiiniallergeenin T-solu-epitopista ja sen kaava on X_n-Y-Z_m . Kaavan mukaisesti Y on aminohapposekvenssi, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu: DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90); DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DF I-22.2 (SEQ ID Nro:93); DF I-22.4 (SEQ ID Nro:94); DF I-23.1 (SEQ ID Nro:95); DF I-23.2 (SEQ ID Nro:96); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-25.2 (SEQ ID Nro:98); DF I-26.1 (SEQ ID Nro:99); DF I-27.1 (SEQ ID Nro:100); DF I-28.1 (SEQ ID Nro:101); DF I-28.2 (SEQ ID Nro:102); DF I-1 (SEQ ID Nro:72); DP II-20 (SEQ ID Nro:50); DP II-20.1 (SEQ ID Nro:51); DP II-20.2 (SEQ ID Nro:52); DP II-20.3 (SEQ ID Nro:53); DP II-20.4 (SEQ ID Nro:54); DP II-20.5

(SEQ ID Nro:55); DP II 20.6 (SEQ ID Nro:56); DP II-1 (SEQ ID Nro:41); DP II-1.1 (SEQ ID Nro:57); DP II-1.2 (SEQ ID Nro:58); DP II-2.1 (SEQ ID Nro:59); DP II-2.2 (SEQ ID Nro:60); DP II-2.3 (SEQ ID Nro:61); DP II-21 (SEQ ID Nro:62); DP
 5 II-22 (SEQ ID Nro:63); DP II-26 (SEQ ID Nro:64); DP II-26.1 (SEQ ID Nro:65); DP II-23 (SEQ ID Nro:66); DP II-23.1 (SEQ ID Nro:67); DP II-24 (SEQ ID Nro:68); DP II-25 (SEQ ID Nro:69); DP II-25.1 (SEQ ID Nro:70); DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71); DF II-1 (SEQ ID Nro:103); DF II-2 (SEQ ID Nro:104); DF II-13.1
 10 (SEQ ID Nro:105); DF II-3.1 (SEQ ID Nro:106); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107); DF II-4.3 (SEQ ID Nro:108); DF II-15 (SEQ ID Nro:109); DF II-16 (SEQ ID Nro:110); DF II-17 (SEQ ID Nro:111); DF II-18 (SEQ ID Nro:112); DF II-19 (SEQ ID Nro:113); DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114); DF II-21 (SEQ ID Nro:115) ja DF II-22 (SEQ ID Nro:116). Lisäksi X_n ovat aminohappojäännöksiä, jotka ovat aminopään Y:n vieressä proteiiniaallergeenin aminohapposekvenssissä ja Z_m ovat aminohappojäännöksiä, jotka ovat karboksipään Y:n vieressä proteiiniaallergeenin aminohapposekvenssissä. Kaavassa n on 0-30 ja
 15 m on 0-30.

Eräs toinen tämän keksinnön suoritusmuoto tarjoaa peptidejä, joissa on ainakin kaksi aluetta, kummankin alueen koostuessa ainakin yhdestä suvun Dermatophagoides proteiiniaallergeenin
 25 T-solu-epitopista ja sen mukaisesti jokaisessa alueessa on ainakin likimäärin 7 aminohappojäännöstä. Näissä peptideissä, joissa on ainakin kaksi aluetta, voi olla yhtä monta aminohappojäännöstä kuin toivotaan ja edullisesti niissä on ainakin noin 14, jopa edullisemmin noin 30 ja edullisimmin ainakin
 30 noin 40 punkkiaallergeenin aminohappojäännöstä. Jokaisessa sellaisen peptidin alueessa on edullisesti 45 aminohappojäännökseen asti pituudelta, edullisemmin 40 aminohappojäännökseen asti pituudelta ja edullisimmin 30 aminohappojäännökseen asti pituudelta, sillä alueen pituuden lisääntyminen saattaa johtaa vaikeuksiin peptidisynteesissä samoin kuin ei-toivotun ominaisuuden säilyttämiseen (esim. immunoglobuliinin sitominen tai entsymaattinen aktiivisuus) johtuen konformaationaali-

sen samankaltaisuuden ylläpitämisestä peptidin ja proteiini-
allergeenin, josta se on johdettu, välillä. Jos toivottua
alueiden aminohapposekvenssit voidaan tuottaa ja liittää
yhteen linkkerillä lisäämään sensitiivisyyttä prosessointiin
5 antigeeniä edustavilla soluilla. Sellainen linkkeri voi olla
mikä tahansa ei-epitoppi aminohapposekvenssi tai muu sopiva
liittävä tai yhdistävä aine. Jotta saadaan edullisia peptide-
jä, joissa on ainakin kaksi aluetta, kummassakin ainakin yksi
T-solu-epitoppi, alueet järjestetään konfiguraatioon, joka
10 on erilainen kuin allergeenin alueissa luonnostaan esiintyvä
konfiguraatio tai erilaisten punkkiproteiiniallergeenien
yhdistelmä. Esimerkiksi alueet, joissa on T-solu-epitoppi
(-epitoppeja), voidaan järjestää ei-vierekkäiseen konfigu-
raatioon ja voidaan johtaa edullisesti samasta proetiinial-
15 lergeenistä tai proteiiniallergeenien yhdistelmästä. Ei-vie-
rekkäinen määritetään alueiden järjetelmäksi, jossa on T-
solu-epitoppi (-epitoppeja), jo(t)ka on (ovat) erilainen
(erilaisia) kuin aminohapposekvenssin alueet, joita on läsnä
proteiiniallergeenissä, joista alueet on johdettu. Lisäksi
20 ei-vierekkäiset alueet, joissa on T-solu-epitoppeja, voidaan
järjestää ei-peräkkäiseen järjestykseen (esim. järjestys,
joka on erilainen kuin natiivin proteiiniallergeenin järjes-
tys, josta T-solu-epitopin (-epitoppeja) sisältävä(t) alu-
e(et) on johdettu, missä aminohapposekvenssit on järjestetty
25 aminopäästä karboksipäähän). Peptidissä voi olla ainakin 15
%, ainakin 30 %, ainakin 50 % tai 100 % asti punkkiallergee-
nin T-solu-epitoppeja.

Yksittäiset peptidialueet voidaan tuottaa ja testata, jotta
30 määritetään, mitkä alueet sitovat immunoglobuliini E:tä, joka
on spesifinen punkkiallergeeneille ja mikä sellaisista alu-
eista voisi aiheuttaa välittäjäaineiden vapautumisen (esim.
histamiini) syöttösoluista tai basofiileistä. Ne peptidialu-
eet, joiden havaittiin sitovan immunoglobuliini E:tä ja aihe-
35 uttavan välittäjäaineiden vapautumisen syöttösoluista tai
basofiileistä suuremmassa kuin noin 10-15 % testuista aller-

gisista seerumeista, eivät edullisesti sisälly peptidialueisiin, jotka ovat järjestyneet keksinnön peptideistä.

5 Edullisissa keksinnön peptideissä on kaksi tai useampi alueista johdettu samoista tai erilaisista punkkiallergeeneistä (esim. Der p I, Der p II, Der f I ja Der f II). Yksi alue voidaan johtaa esimerkiksi Der p I:stä ja yksi alue voidaan johtaa Der p II:sta; yksi alue voidaan johtaa esimerkiksi Der p I:stä ja yksi alue voidaan johtaa Der f I:stä; yksi
10 alue voidaan johtaa esimerkiksi Der p II:sta ja yksi alue voidaan johtaa Der f I:stä; yksi alue voidaan johtaa esimerkiksi Der p II:sta ja yksi alue voidaan johtaa Der f II:sta; yksi alue voidaan johtaa esimerkiksi Der p I:stä ja yksi alue voidaan johtaa Der f II:sta; yksi alue voidaan johtaa esimerkiksi Der f I:stä ja yksi alue voidaan johtaa Der f II:sta.
15 Lisäksi alueet voidaan johtaa samasta proteiiniallergeenistä, esim. Der p I ja Der p I, jne.

20 Keksinnön peptidin alueet sisältävät edullisesti kaikki tai osan edellä keskustelluista tärkeimmistä T-solureaktiivisuuden alueista jokaisen punkkiallergeenin alueella (s.o. Der p I:n ja Der f I:n alueet 1-6a-6b ja Der p II:n ja Der f II:n alueet 7-10). Esimerkiksi yhdessä alueessa voi olla kaikki tai osa alueesta 1 (Der p I:n ja Der f I:n aminohappojäännökset 36-68). Keksinnön peptideissä voi olla kaikki tai osa
25 kahdesta tai useammasta näistä alueista (s.o. alueet 1-10) ja edullinen tuloksena oleva peptidi ei sido IgE:tä ja aiheuttaa välittäjäaineiden vapautumisen syöttösoluista tai basofiileistä. Edullisissa peptideissä, jotka on johdettu Der p I:stä ja Der f I:stä, sisältävät koko tai osan alueesta 1, alueesta 2, alueesta 3 ja mahdollisesti alueesta 4. Edullisissa peptideissä, jotka on johdettu Der p II:sta ja Der f II:sta, sisältävät koko tai osan alueesta 7 ja alueesta 8 ja
30 alueesta 10. Lisäksi, jos yhden näistä alueista havaitaan sitovan IgE:tä ja aiheuttavan välittäjäaineiden vapautumisen syöttösoluista tai basofiileistä, sitten on edullista että peptidissä ei ole sellaisia alueita, vaan mieluummin sisältä-

35

vät erilaisia alueita, jotka on johdettu sellaisista alueista, jotka eivät sido IgE:tä tai välittäjäaineiden vapautumisen syöttösoluista tai basofiileistä.

- 5 Esimerkkeihin edullisista alueista kuuluvat kaikki tai osa seuraavista aminohapposekvensseistä: DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29-); DP I-22.2 (SEQ ID Nro:30); DP I-22.3 (SEQ ID Nro:13); DP I-22.4 (SEQ ID Nro:32); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-23.2 (SEQ ID Nro:34); DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35); DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37); DP I-27.1 (SEQ ID Nro:38); DP I-28.1 (SEQ ID Nro:39); DP I-28.2 (SEQ ID Nro:40); DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DF I-1 (SEQ ID Nro:72); DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90); DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DF I-22.2 (SEQ ID Nro:93); DF I-22.4 (SEQ ID Nro:94); DF I-23.1 (SEQ ID Nro:95); DF I-23.2 (SEQ ID Nro:96); DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-25.2 (SEQ ID Nro:98); DF I-26.1 (SEQ ID Nro:99); DF I-27.1 (SEQ ID Nro:100); DF I-28.1 (SEQ ID Nro:101); DF I-28.2 (SEQ ID Nro:102); DP II-20 (SEQ ID Nro:50); DP II-20.1 (SEQ ID Nro:-51); DP II-20.2 (SEQ ID Nro:52); DP II-20.3 (SEQ ID Nro:53); DP II-20.4 (SEQ ID Nro:54); DP II-20.5 (SEQ ID Nro:55); DP II-20.6 (SEQ ID Nro:56); DP II-1 (SEQ ID Nro:41); DP II-1.1 (SEQ ID Nro:57); DP II-1.2 (SEQ ID Nro:58); DP II-2.1 (SEQ ID Nro:59); DP II-2.2 (SEQ ID Nro:60); DP II-2.3 (SEQ ID Nro:61); DP II-21 (SEQ ID Nro:62); DP II-22 (SEQ ID Nro:63); DP II-26 (SEQ ID Nro:64); DP II-26.1 (SEQ ID Nro:65); DP II-23 (SEQ ID Nro:66); DP II-23.1 (SEQ ID Nro:67); DP II-24 (SEQ ID Nro:68); DP II-25 (SEQ ID Nro:69); DP II-25.1 (SEQ ID Nro:70); DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71); DF II-1 (SEQ ID Nro:103); DF II-2 (SEQ ID Nro:104); DF II-13.1 (SEQ ID Nro:105); DF II-3.1 (SEQ ID Nro:106); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107); DF II-4.3 (SEQ ID Nro:108); DF II-15 (SEQ ID Nro:109); DF II-16 (SEQ ID Nro:110); DF II-17 (SEQ ID Nro:111); DF II-18 (SEQ ID Nro:112); DF II-19 (SEQ ID Nro:113); DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114); DF I-21 (SEQ ID Nro:115) ja DF II-22 (SEQ ID Nro:116), sellaisten alueiden

aminohapposekvenssien ollessa, kute kuviossa 3 ja kuviossa 4 on näytetty, tai sellaista alueiden osia, joissa on ainakin yksi T-solu-epitoppi.

- 5 Edullisissa peptideissä on kahden tai useamman alueen erilaisia yhdistelmiä, jokaisen koostuessa kaikista tai osasta edellä keskustelluista edullisista tärkeän T-solureaktiivisyyden alueista. Edullisissa peptideissä on kahden tai useamman alueen erilaisia yhdistelmiä (jokaisella alueella ollen
- 10 aminohapposekvenssi, kuten kuviossa 3 ja kuviossa 4 nähdään) mukaanluettuina: DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-
- 15 25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-23.1 (SEQ ID Nro:39); DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36) ja DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37); DF I-
- 20 21.2 (SEQ ID Nro:91) ja DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:90); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92) ja DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DF I-25.1 (SEQ ID Nro:35); DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90), DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92) ja DF I-23.1 (SEQ ID Nro:
- 25 :95); DF I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35) ja DF I-1 (SEQ ID Nro:72); t) DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35), DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33) ja DF I-21.1 (SEQ ID Nro:91); DP I-1 (SEQ ID Nro:9), DP I-
- 30 25.1 (SEQ ID Nro:35); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33) ja DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90); DP II-22 (SEQ ID Nro:63) ja DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71); DP II-22 (SEQ ID Nro:63); DP II-25.2 (SEQ ID Nro:715) ja DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID
- 35 Nro:71), DP II-20.6 (SEQ ID Nro:56), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29), DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DP II-23.1 (SEQ ID

Nro:33); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID
 Nro:71), DP II-20.6 (SEQ ID Nro:56), DP I-21.1 (SEQ ID
 Nro:27); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID
 Nro:36); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID
 5 Nro:71), DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID
 Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP II-22 (SEQ ID
 Nro:63); DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71), DP I-21.1 (SEQ ID
 Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-23.1 (SEQ ID
 Nro:33); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID
 10 Nro:71),; DP I-1 (SEQ ID Nro:9) ja DP I-22.1 (SEQ ID
 Nro:29); DF II-4,5 (SEQ ID Nro:107) ja DF II-2 (SEQ ID
 Nro:104); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107) ja DF II-19.1 (SEQ ID
 Nro:114); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107), DF II-2 (SEQ ID
 Nro:104) ja DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114); DF II-4.5 (SEQ ID
 15 Nro:107), DF II-2 (SEQ ID Nro:104) ja DF II-9 (SEQ ID
 Nro:86); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107) ja DF I-21.1 (SEQ ID
 Nro:90); DF II-4,5 (SEQ ID Nro:107); DP II-22 (SEQ ID Nro:63)
 ja DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71) ja i') DF II-4,5 (SEQ ID
 Nro:107), DF II-2 (SEQ ID Nro:104) ja DP II-22 (SEQ ID
 20 Nro:63).

Lisäksi tulevissa edullisissa peptideissä on kahden tai
 useamman alueen yhdistelmä ja niihin sisältyvät seuraavat
 yhdistelmät: DP I-21.1, DP I-23.1, DP I-26.1, DP II-20.6, DP
 25 II-22, DP II-25.2 ja DF II-22.2; DP I-21.2, DF II-22.2; DP I-
 21.2, DF I-22.2, DP I-23.1, DP I-25.2, DP I-26.1, DP I-27.1,
 DP II-20.6, DP II-22, DP II-24 ja DP II-25.2; DP I-23.1, DP
 I-21.2, DP I-22, DF I-22.2, DP II-20.6 ja DP II-25.2; DF I-
 23.1, DP I-21.1, DF I-22.2, DP II-20.6 ja DP I-25.2; DP I-
 30 23.1, DF I-22 ja DP II-22 ja DP II-20.6; DP I-26.1, DF I-22.2
 ja DP II-25.2; DP I-21.2, DF I-22.2 ja DP II-22 ja DP I-21.2
 ja DP II-22.

Edullisimmissa peptideissä on kahden tai useamman alueen
 35 yhdistelmä (jokaisella alueella ollen aminohapposekvenssi,
 kuten kuviossa 3 ja kuviossa 4 nähdään), joka on johdettu
 punkkiaallergeeneistä Der p I, Der p II ja Der f I, joista

jokaisella mainitulla edullisella peptidillä on seuraava spesifinen perättäinen aminohapposekvenssien järjestys, kuten kuvioissa 25-27 nähdään: DPI-26.1, DPII-25.2, DFI-22, DPII-20,6 ja DPI-21.2, vastaavasti; DPII-25.2, DFI-22.2, DPI-23.1, DPII-22, DPI-21.2 ja DPII-20.6, vastaavasti; ja DPII-25.2, DFI-21.2, DPI-23.1, DPI-26.1, DPII-22, DPII-20.6 ja DFI-22.2, vastaavasti. Edellä olleiden peptidien nukleiinihapposekvenssit on näytetty kuvioissa 25, 26 ja 27, vastaavasti.

- 10 Tämän keksinnön piirissä suvun Dermatophagoides proteiini-
allergeenien peptidejä voidaan käyttää menetelmissä käsitellä
ja estää allergisia reaktioita punkkiallergeeneille. Täten
eräs tämän keksinnön näkökohta tarjoaa terapeuttisia koostu-
muksia, joihin sisältyvät Der p I-, Der p II-, Der f I- tai
15 Der f II-peptidit, mukaanluettuna ainakin yksi T-solu-epi-
tooppi, tai edullisesti ainakin kaksi T-solu-epitooppia ja
farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja tai laimennin. Eräässä
toisessa näkökohdassa terapeuttisissa koostumuksissa on far-
maseuttisesti hyväksyttävä kantaja tai laimennin ja pepti-
20 deissä on ainakin kaksi aluetta, jokaisen alueen sisältäessä
ainakin yhden punkkiallergeenin T-solu-epitoopin ja johdettu
samasta tai erilaisesta punkkiproteiiniallergeenistä.

- Edullisiin terapeuttisiin koostumuksiin sisältyy ainakin yksi
25 suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin peptidi. Koostu-
muksessa on riittävä prosenttiosuus ainakin yhden proteiini-
allergeenin T-solu-epitooppeja siten, että koostumuksen anta-
misen terapeuttiset hoito-ohjeet yksilölle, joka on herkkä
pölypunkille, johtavat yksilön T-solujen proteiiniallergeenin
30 sietoon. Koostumuksessa on edullisesti riittävä prosentti-
osuus yhden tai useamman proteiiniallergeenin T-solu-epi-
tooppeja, siten että ainakin noin 40 % ja edullisemmin aina-
kin noin 60 % jokaisen proteiinin T-solu-reaktiivisyydestä on
mukana koostumuksessa. Sellaisia koostumuksia voidaan antaa
35 yksilölle hoitamaan ja estämään herkkyyttä pölypunkille tai
allergeenille, joka on immunologisesti ristiinreagoiva pöly-
punkin kanssa.

Tämän keksinnön terapeuttisten koostumusten antaminen yksilön herkkyyden poistamiseksi voidaan suorittaa käyttämällä tunnettuja tekniikoita. Esimerkiksi peptidiä, joka on johdettu pölypunkkiaallergeenistä, jossa on ainakin yksi T-solu-epitoooppi, voidaan antaa yhdistelmänä sopivan laimentimen, kantajan ja/tai adjuvantin kanssa. Jotta indusoidaan T-solun vastustuskyvyttömyys yksilössä, annetaan terapeuttista koostumusta edullisesti ei-immunogeenisessä muodossa, esim. siinä ei ole adjuvanttia. Farmaseuttisesti hyväksyttäviin laimentimiin kuuluvat suolaliuos ja vesipitoiset puskuriliuokset. Farmaseuttisesti hyväksyttäviin kantajiin kuuluvat polyetyleeniglykoli (Wie et al. International Archives of Allergy and Applied Immunology 64:84-99 (1981)) ja liposomit (Strejan et al., Journal of Neuroimmunology 7:27 (1984)). Sellaisia koostumuksia annetaan yleensä ruiskulla (ihonalaisesti, suonsisäisesti, jne), suun kautta annettuna (esim. kapselin muodossa), hengittämällä, ihon läpi annettuna tai peräsuonen kautta annettuna. Keksinnön terapeuttisia koostumuksia annetaan yksilöille, jotka ovat herkkiä pölypunkille, annoksina ja ajallisesti pitkään, jotta vähennetään yksilön herkkyyttä (s.o. vähennetään allergista vastetta) pölypunkkiaallergeenille. Yhtä tai useampaa samaa tai erilaista terapeuttista koostumusta voidaan antaa terapeuttisesti tehokkaana määränä samanaikaisesti tai peräkkäin yksilölle, joka on herkkä pölypunkille. Terapeuttisten koostumusten tehokkaat määrät vaihtelevat tekijöiden mukaan, kuten yksilön herkkyyden aste pölypunkeille, ikä, sukupuoli ja yksilön paino ja peptidin kyky stimuloida T-soluvastetta yksilössä.

Vielä eräässä tämän keksinnön näkökohdassa tarjotaan koostumus, jossa on ainakin kaksi peptidiä (esim. ainakin kahden peptidin fysikaalinen seos), joissa kummassakin on ainakin yksi suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin T-solu-epitoooppi. Peptidit on johdettu samasta tai erilaisesta punkkiaallergeenistä. Sellaisia koostumuksia voidaan antaa terapeuttisen koostumuksen muodossa farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen kanssa. Yhtä tai useampaa sa-

maa tai erilaista terapeuttisia koostumuksia voidaan antaa terapeuttisesti tehokkaana määränä samanaikaisesti tai peräkkäin yksilölle, joka on herkkä pölypunkille.

5 Peptidien koostumukset ja edulliset yhdistelmät, joita voidaan antaa samanaikaisesti tai peräkkäin (koostuen peptideistä, joissa on aminohapposekvenssit, jotka nähdään kuviossa 3 ja kuviossa 4), kuuluvat seuraavat yhdistelmät: DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-23.1 (SEQ ID Nro:39); DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29), DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29), DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36) ja DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37); DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91) ja DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90), DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92) ja DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91), DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92) ja DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-1 (SEQ ID Nro:72) ja DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DF I-1 (SEQ ID Nro:72), DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92) ja DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97); DF I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DF I-25.1 (SEQ ID Nro:35); DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90), DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92) ja DF I-23.1 (SEQ ID Nro:95); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92); DP I-1 (SEQ ID Nro:9), DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33), DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35) ja DF I-1 (SEQ ID Nro:72); DP I-1 (SEQ ID Nro:9), DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35), DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33) ja DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91); DP I-1 (SEQ ID Nro:9), DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35), DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33) ja DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90); DP II-22 (SEQ ID Nro:63) ja DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71); DP II-22 (SEQ ID

Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71) ja DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71), DP II-20.6 (SEQ ID Nro:56), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29), DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27) ja DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71), DP II-20.6 (SEQ ID Nro:56), DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71), DP I-12.1 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71), DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27), DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29) ja DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP II-22 (SEQ ID Nro:63), DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71), DP I-1 (SEQ ID Nro:9) ja DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29); DF II-4,5 (SEQ ID Nro:107) ja DF II-2 (SEQ ID Nro:104); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107) ja DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107), DF II-2 (SEQ ID Nro:104) ja DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107), DF II-2 (SEQ ID Nro:104) ja DF II-9 (SEQ ID Nro:86); DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107) ja DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90); DF II-4,5 (SEQ ID Nro:107); DP II-22 (SEQ ID Nro:63) ja DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71) ja DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107), DF II-2 (SEQ ID Nro:104) ja DP II-22 (SEQ ID Nro:63) ja DP I-26.1, DP II-25.2, DP I-22, DP II-20,6 ja DP I-21.2.

Tämä keksintö tarjoaa myös menetelmät määrittää yksilöiden herkkyys pölypunkki-allergeeneihin, mihin sisältyy että yhdistetään verinäyte, joka on saatu yksilöstä, tämän keksinnön peptidin kanssa olosuhteissa, jotka ovat sopivat sitomaan verikomponentteja peptidin kanssa ja määritetään laajuus, mihin sellainen sitominen tapahtuu. Laajuus, mihin sellainen sitominen tapahtuu, määritetään määrittämällä T-solutoiminta, T-solulisisäntyminen tai niiden yhdistelmä.

On myös mahdollista modifioida keksinnön peptidin rakenne sellaisiin tarkoituksiin kuin lisätä liukoisuutta, vahvistaa terapeuttista tai estävää tehoa tai stabiilisuutta (esim. varastointisaika ex vivo ja resistenssi proteolyttistä hajo-

tusta vastaan in vivo). Sellainen modifioitu peptidi voidaan tuottaa, jossa aminohapposekvenssiä on muutettu, kuten aminohapposubstituutiolla, deletiolla tai additiolla, modifioimaan immunogeenisyyttä ja/tai vähentämään allergeenisyyttä tai mihin on lisätty komponentti samaa tarkoitusta varten.

Peptidiä voidaan modifioida esimerkiksi siten, että se säilyttää kykyänsä indusoida T-solun vastustuskyvyttömyyttä ja sitoo MHC-proteiineja ilman kykyä indusoida vahvaa lisääntyvää vastetta tai mahdollisesti mitään lisääntyvää vastetta, kun annetaan immunogeenisessä muodossa. Tässä tapauksessa voidaan kriittiset sitomisjäännökset T-solu-reseptorille määrittää käyttämällä tunnettuja tekniikoita (esim. jokaisen jäännöksen substituutio ja T-solu-reaktiivisuuden läsnäolon tai puuttumisen määrittäminen). Niitä jäännöksiä, jotka näyttävät olevan olennaisia olemaan vuorovaikutuksessa T-solu-reseptorin kanssa, voidaan modifioida korvaamalla olennainen aminohappo toisella, edullisesti samanlaisella aminohappojäännöksellä (varovainen substituutio), jonka läsnäolon on osoitettu lisäävän, vähentävän, mutta ei poistavan tai ei vaikuttavan T-solu-reaktiivisyyteen. Lisäksi niitä aminohappojäännöksiä, jotka eivät ole olennaisia T-solu-reseptorivuorovaikutukselle, voidaan modifioida korvaamalla toisella aminohapolla, jonka mukaanliittäminen saattaa lisätä, vähentää tai ei vaikuttaa T-solu-reaktiivisyyteen, mutta ei poista sitomista merkitykselliseen MHC:hen.

Lisäksi keksinnön peptidejä voidaan modifioida korvaamalla aminohappo, jonka on osoitettu olevan olennainen vuorovaikutukseen MHC-proteiinikompleksin kanssa toisen, edullisesti samanlaisen aminohappojäännöksen kanssa (varovainen substituutio), jonka läsnäolon on osoitettu lisäävän, vähentävän, mutta ei poistavan tai ei vaikuttavan T-solu-aktiivisuuteen. Lisäksi aminohappojäännöksiä, jotka eivät ole olennaisia vuorovaikutukseen MHC-proteiinikompleksin kanssa, mutta jotka silti sitovat MHC-proteiinikompleksin, voidaan modifioida korvaamalla toisella aminohapolla, jonka liittäminen saattaa

lisätä, ei vaikuttaa, tai vähentää mutta ei poista T-solun reaktiivisyyttä. Edullisia aminohapposubstituutioita ei olennaisiin aminohappoihin ovat, mutta eivät rajoitu substituutioihin alaniinilla, glutamiinihapolla tai metyyliaminonohapolla.

Eräs toinen esimerkki peptidien substituutiosta on kysteini-jäännösten substituutio edullisesti seriinillä, treoniinilla, leusiinilla tai glutamiinihapolla minimoimaan dimerisaatio disulfididisidosten kautta. Esimerkiksi Der p II- tai Der f II-peptidin stabiilisuutta, johon sisältyy kummankin allergeenin 10 ensimmäistä aminohappojäännöstä, voidaan lisätä korvaamalla kysteini, joka sijaitsee kahdeksannessa aminohappojäännöksessä, edullisesti alaniinilla tai glutamiinihapolla tai vaihtoehtoisesti seriinillä tai treoniinilla.

Jotta lisätään stabiilisuutta ja/tai reaktiivisyyttä, voidaan peptidejä modifioida liittämään yksi tai useampi polymorfismi proteiiniallergeenin aminohapposekvenssiin luonnon alleelista muunnelmasta, kuten kuvioissa 25-27 osoitetaan. Lisäksi D-aminohapot, ei-luonnolliset aminohapot tai ei-aminohappo-analogit voidaan substituoida tai lisätä tuottamaan modifioitu peptidi tämän keksinnön piirissä. Lisäksi tämän keksinnön peptidit voidaan modifioida käyttämällä polyetyleeniglykoli- (PEG) menetelmää, Sehon, A. ja avustajat (Wie et al, supra) tuottamaan peptidi, joka on konjugoitunut PEG:n kanssa. Lisäksi PEG voidaan lisätä keksinnön peptidin kemiallisen synteesin aikana. Peptidien tai niiden osien modifikaatioihin voidaan liittää myös pelkistys/alkylaatio (Tarr teoksessa: Methods of Protein Microcharacterization, J.E. Silver toim. Humana Press, Clifton, NJ, ss. 155-194 (1986); asylaatio (Tarr, supra); esteröinti (Tarr, supra); kemiallinen kytkemisen sopivaan kantajaan (Mishell ja Shiigi, toim. Selected Methods in Cellular Immunology, WH Freeman, San Francisco, CA (1980); U.S patentti 4 939 239); tai laimea formaliinikäsittely (Marsh International Archives of Allergy and Applied Immunology 41: 199-215 (1971)).

Eräässä toisessa suoritussuodossa voidaan peptidejä, jotka ovat allergeeniryhmässä (esim. Der p I tai Der p II), modifioida lisäämään T-solu-reaktiivisyyttä. Annettuna ristiinreagoivuus ryhmän I ja ryhmän II allergeenien sisällä, yhden ryhmäallergeenin peptidi, joka voi olla vähemmän reaktiivinen kuin toisen ryhmäallergeenin peptidi vastaten aminohappoasemaa, peptidissä voi olla yksi tai useampi aminohapoista substituotuna yhdellä tai useammalla aminohapoista vastaavasta peptidistä (esim. peptidi DF II-1, jäännös 17[metioniini] Der f II aminohapposekvenssissä voi olla substituoitu aminohapolla, joka sijaitsee jäännöksessä 17 Der p II[leusiini] lisäämään Der f II peptidin reaktiivisyyttä). Lisäksi peptidejä voidaan modifioida liittämällä polymorfismi, joka on seurausta luonnon alleelisesta variaatiosta, proteiiniallergeenin aminohapposekvenssiin. Peptidien modifikaatiot, joissa liitetään yksi tai useampi näitä polymerfismeja, saattaa johtaa lisääntyneeseen stabiilisuuteen ja/tai reaktiivisyyteen.

Jotta helpotetaan puhdistusta ja mahdollisesti lisätään keksinnön peptidien liukoisuutta, on mahdollista lisätä reportteriryhm(i)ä peptidirunkoon. Esimerkiksi polyhistidiini voidaan lisätä peptidiin puhdistamaan peptidi immobilisoidulla metalli-ioni-affiniteettikromatografiolla (Hochuli, E. et al., Bio/Technology, 6:1321-1325 (1988)). Lisäksi voidaan tuoda spesifisiä endoproteaasipilkkomiskohtia, jos toivottua, peptidin reportteriryhmän ja aminohapposekvenssien väliin helpottamaan peptidien, joissa ei ole soveltumattomia sekvenssejä, eristystä. Jotta yksilöltä poistetaan herkkyys proteiiniantigeeniin onnistuneesti, saattaa olla tarpeellista lisätä peptidin liukoisuutta lisäämällä toiminnallisia ryhmiä peptidiin tai ei liittämällä hydrofobisia T-solu-epitoppeja tai alueita, joissa on hydrofobisia epitoppeja peptideissä.

Jotta mahdollisesti avustetaan oikeata T-solu-epitoppien antigeeniprosessointia peptidissä, voidaan alueiden väliin rakentaa kanonisia proteaasiherkkiä kohtia rekombinanttisesti

tai synteettisesti, jokaisen sisältäessä ainakin yhden T-solu-epitoopin. Esimerkiksi varautuneet aminohappoparit, kuten KK tai RR, voidaan viedä alueiden väliin peptidissä peptidin rekombinanttirakentamisen aikana. Saatu peptidi voidaan tehdä herkäksi katepsiinin ja/tai trypsiinin kaltaisten entsyymien pilkkomiselle synnyttämään peptidiosia, joissa on yksi tai useampi T-soluepitooppi. Lisäksi sellaiset varautuneet aminohapot voivat johtaa peptidin liukoisuuden lisääntymiseen.

DNA:n, joka koodaa keksinnön peptidiä, kohdistettua mutageenesia voidaan käyttää modifioimaan peptidin rakennetta. Sellaisiin menetelmiin voi sisältyä PCR (Ho et al., Gene, 77:51-59 (1989)) tai mutatoitujen geenien kokonaissynteesi (Hostomsky, Z., et al., Biochem. Res. Comm., 161:1056-1063 (1989)). Jotta lisätään bakteeriekspressiota, voidaan käyttää edellä mainittuja menetelmiä muiden menetelmien yhteydessä muuttamaan eukaryoottisia kodoneita DNA-rakenteissa, jotka koodaavat keksinnön peptideitä, sellaisiksi joita edullisesti käytetään E. colissa.

Spesifisiä esimerkkejä keksinnön peptideistä, jotka on modifioitu yhdellä tai useammalla edellä keskustelluista modifikaatiomenetelmistä, ovat mutta ei rajoitu DPI-23.1-peptidin modifikaatioihin, kuten kuviossa 28 on osoitettu ja DPII-22-peptidin, kuten kuviossa 28 on osoitettu. Spesifisemmin, peptidien 23.1 modifikaatioihin sisältyy varautuneiden aminohappojen (23.1.2), varautuneiden aminohappoparien (23.1.1) lisääminen lisäämään liukoisuutta ja kysteiinijäännöksen korvaaminen seriinillä 23.1.3. tai glutamiinihapon (23.1.4.) lisäämään liukoisuutta. Muutoksiin peptidiin 22 kuuluvat varautuneiden aminohappoparien (22.1 ja 22.1) lisääminen lisäämään liukoisuutta.

Tämä keksintö tarjoaa myös nukleiinihapot, joissa on sekvenssit, jotka koodaavat keksinnön peptidejä. Nukleiinihapot, joita käytettiin missä tahansa tämän keksinnön suoritustavo-

dossa, voivat olla cDNA, kuten tässä on kuvattu tai vaihtoehtoisesti voivat olla mikä tahansa oligodesoksinukleotidisekvenssi, jossa on kaikki tai osa tässä edustetusta sekvenssistä tai niiden toiminnalliset ekvivalentit. Sellaisia oligonukleotidisekvenssejä voidaan tuottaa kemiallisesti tai mekaanisesti käyttämällä tunnettuja tekniikoita. Oligonukleotidisekvenssin toiminnallinen ekvivalentti on sellainen, joka on 1) sekvenssi, joka kykenee hybridisoitumaan täydellisesti komplementaariseen oligonukleotidiin jonka kanssa SEQ ID Nro:1, SEQ ID Nro:3, SEQ ID Nro:5 ja SEQ ID Nro:7 sekvenssi (tai vastaavat sekvenssiosat) tai niiden fragmentit hybridisoituvat tai 2) sekvenssi (tai vastaava sekvenssiosa), joka on komplementaarinen SEQ ID Nro:1:n, SEQ ID Nro:3:n, SEQ ID Nro:5:n ja SEQ ID Nro:7:n kanssa ja/tai 3), sekvenssi, joka koodaa tuotetta (esim. polypeptidi tai peptidi), jolla on samat tuotteen, jota SEQ ID Nro:1:n, SEQ ID Nro:3:n, SEQ ID Nro:5:n ja SEQ ID Nro:7:n sekvenssi (tai vastaava sekvenssiosa) koodaa, toiminnalliset luonteenominaisuudet.

Tätä keksintöä valaistaan lisää seuraavilla ei-rajoittavilla esimerkeillä.

Esimerkki

Natiivin punkkiallergeenin puhdistaminen

Seuraava on kuvaus työstä, joka tehtiin pölypunkkien Dermatophagoides pteronyssinus ja Dermatophagoides farinae ryhmä I ja ryhmä II allergeenien puhdistamiseksi niiden natiivissa muodossa primäärisinä antigeeneinä ihmisen T-solu-epitooppi-kartoitusta varten.

Kaikki neljä proteiiniallergeenia Der f I, Der p I, Der f II ja Der p II puhdistettiin immunoaffiniteetillä käytetyistä punkkiviljelyalustoista, jotka saatiin joko Commonwealth Sera Laboratories Melbourne, Australia tai Tri Larry G. Arlian, Wright State University Dayton, Ohio. Valmistettiin 10 % (w/v) vesipitoinen uute kuivuneesta käytetyistä punkkiviljelyalustoista PBS:ään (Phosphate Buffered Saline) sekoittamal-

la yön yli 4°C:ssa. Liukenematon materiaali poistettiin sentrifugoimalla 10 000 x g 1 h 4°C. Sitten supernatantti suodattettiin tyhjössä läpilyöntipaperilla Whatman #1 paperilla ja sentrifugoitiin uudestaan 15 000 x g 1 h 4°C. Lopullinen
 5 suodatus suoritettiin 0,45 m selluloosa-asetaattisuodattimen läpi.

Monoklonaalisia vasta-aineita 4C1 ja 6D6 (University of Virginia, NC) käytettiin ryhmän I tai ryhmän II punkkiallergeenien immunoaffiniteettipuhdistukseen, vastaavasti (Chapman et al., J. Allergy Clin. Immunol. 80: 1479-1484 (1987); Heymann et al., J. Allergy Clin. Immunol. 83: 1055-1067 (1989)). 4C1 monoklonaalinen vasta-aine reagoi epitoopin kanssa, jonka
 10 jakavat sekä Der f I- että Der p I-proteiinit; samalla lailla 6D6 monoklonaalinen vasta-aine reagoi sekä Der f II- että Der p II-proteiinien
 15 kanssa.

Jokaista monoklonaalista vasta-ainetta varten vatsaonteloon kertyvä neste kytkettiin kiinni 50 % ammoniumsulfaattiin ja
 20 vasta-aineet kytkettiin CNBr-aktivoituun Sepharose 4B:hen (Pharmacia) 100 mM NaHCO₃:ssa, 500 mM NaCl:ssä, pH 8,3, yön yli 4°C.

Monoklonaali-vasta-ainepylväät tasapainotettiin PBS:ssä ja
 25 suodatetut uutteen laitettiin 15 ml/h. Sitten pylväs pestiin 20 tilavuudessa PBS:ää, jonka jälkeen suoritettiin ankarampi pesu 20 tilavuudella PBS:ää, johon oli laitettu mukaan 500 mM NaCl:ää. Proteiinit eluoitiin 500 mM NaCl:ssä, 100 mM glysiinissä pH 11,0 ja fraktioiden proteiinisisältö arvioitiin
 30 spektrofotometrillä absorbanssissa 280 nm. Piikkifraktiot kerättiin ja dialysoitiin perusteellisesti PBS:ää vastaan, konsentroitiin negatiivisellä painedialyysilaitteella (saatu Amiconilta, Beverly MA) ja käytettiin punkki ryhmän I tai
 35 ryhmän II allergeenien T-solu-epitooppikartoitukseen. Proteiineja saatiin puhtauksina, jotka vaihtelivat 80 % (ryhmä II) - 90 % (ryhmä I).

Käytettiin käänteisfaasi HPLC-kromatografiaa puhdistamaan lisää immunoaffiniteetilla puhdistettua ryhmä II punkkiproteiinia allergeniä Heymann et al., olosuhteiden mukaisesti, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 1055-1067 (1989). Lyhyesti, immunoaffiniteetti-puhdistettua proteiinia laitettiin 5 µm 300 Å C-8 pylvääseen (Applied Biosystems Inc.) 0,1 % til./til. TFA/H₂O. Virtausnopeus pylväälle oli 1 ml/min, 0-60 % asetonitriili/0,1 % TFA-gradientilla yli 60 min. Ryhmä II proteiinit eluoituivat noin 45 % asetonitriili/0,1 % TFA. Fraktioista analysoitiin puhtaus SDS-polyakryyliamidigeelialektroforeesilla, jonka jälkeen oli densitometrinen pyyhkäisykartoitus. Niitä fraktioita, joiden ryhmä II proteiinin puhtaus oli suurempi kuin 90 %, käytettiin sen jälkeen allergenin ihmisen T-solukartoitukseen.

Esimerkki 2

Rekombinantti punkkiallergeenin ekspressio

Seuraavana on kuvaus työstä, joka tehtiin tuottamaan pölypunkkien Dermatophagoides pteronyssinus ja Dermatophagoides farinae ryhmä I ja ryhmä II allergenejä rekombinanttiproteiineina E. colissa.

Kaikki neljä proteiinia Der f I, Der p I, Der f II ja Der p II fuusioitiin niiden valmiissa aminopäissä johtavan sekvenssin MGHHHHHHEF:n kanssa (missä EcoRI restriktiokohta GAATTC koodaa aminohappoja EF). Koska aminohappojen H₆-venymä koordinoi Ni⁺⁺-ionit NTA-agaroosipylväisiin (Diagen GmbH), tätä aktiivisuutta hyödynnettiin rekombinanttiproteiinien puhdistuksessa (Hochuli et al., Biotechnology 86: 1321-1325 (1988-)). Lopuksi kaikki 4 allergeniä alakloonattiin ekspresiovektoriin pET 11d (Studier et al., Methods in Enzymology 185: 60-88 (1990) faagi T7 gn 10 promoottorin transkriptionaalisen kontrollin alaisena.

cDNA:t, jotka koodaavat D. pteronyssinus ja D. farinae ryhmä I allergenejä, saatiin tri Wayne Thomasilta plasmidimuodossa alakloonina λgt11:sta (Chua et al., J. Exp. Med. 167: 175-182

(1988); Dilworth et al., Clin. Exp. Allergy 21: 25-32 (1991-)). Der p I cDNA oli kloonattu M13 RF-plasmidilta EcoRI-fragmenttina pUC18:aan, Tri Roland Buelow, ImmuLogic (Palo Alto), kun taas Der f I cDNA manipuloitiin suoraan M13mp19 RF-plas-
 5 midi Df I(1):ltä.

cDNA:t subkloonattiin ensimmäiseksi ekspressiovektoriin pTrc-99A His₆ insertti RRRS, joka on pTrc99A:n modifioitu versio (Amann et al., Gene 69: 301-315 (1988)). Alkuperäistä vekto-
 10 ria modifioitiin lisäämällä synteettinen adaptori (joka koostuu kahdesta komplementaarisesta oligonukleotidista), joka koodaa johtavaa sekvenssiä MGHHHHHEF:ää sen NcoI (MG)- ja EcoRI-kohtien välissä polylinkkerin 5'-päässä ja RRS (Retro Regulatory Sequence) sen Hind III-kohtaan polylinkkerin 3'-
 15 päässä. Johtavaa sekvenssiä käytettiin puhdistusapuna, kuten edellä kuvattiin, samalla kun RRS lisättiin kohottamaan rekombinanttilähetin stabiilisuutta ja täten lisäämään rekombinantti proteiinisaantoa (Skoglund et al., Gene 88: 1-5 (1990)). Lopuksi insertti, tässä tapuksessa Amb a I.1 cDNA,
 20 joka koodaa lyhyen villakon tärkeätä allergeeniä (Rafnar et al., J. Biol. Chem. 226: 1229-1236 (1991)), subkloonattiin lukuraamissa H₆ johtajan kanssa EcoRI:na PstI-fragmenttiin.

Jotta ekspressoidaan punkin ryhmä I allergeenejä, Amb a I.1
 25 cDNA pilkottiin EcoRI/Hind III pilkkomisella ja korvattiin adaptoreilla Φ EcoRI/Hind III yliriippuvien kanssa (koostuen komplementaarisesta oligonukleotidien parista). Nämä adaptorit (kuvio 2a) koodasivat valmiin Der p I:n NH₂-pään 5 ensimmäistä aminohappoa, Pst I-kohtaan, ja valmiin Der f I:n NH₂-
 30 pään 10 ensimmäistä aminohappoa, Hpa I-kohtaan. Vektorin EcoRI-kohdan ja Φ EcoRI-kohdan adaptoreissa ligaation jälkeen, tuhotaan EcoRI-kohta vektorissa, jättäen EcoRI-kohdan, jota koodataan sisäisesti, adaptorille ainoana EcoRI-kohtana väli-
 35 muotorakenteissa pTrc99A His₆ 5' pl RRS ja Trc99A His₆ 5' fl RRS. Der p I cDNA insertoitiin Pst I/EcoRI-fragmenttina Pst I/EcoRI-pilkottuun pTrc99A His₆ 5' pl RRS:ään, kun taas Der f I cDNA insertoitiin HpaI/EcoRI-fragmenttina HpaI/EcoRI-pil-

kottuun pTrc99A His₆ 5' fl RRS:ään. Jokaisen rakenteen 5'-pään sekvenssi, pTrc99A His₆ 5' pl RRS ja pTrc99A His₆ fl RRS varmistettiin didesoksi-ketjuterminaatio DNA-sekvenssoinnilla käyttämällä SequenaseTM II-testipakkausta (U.S. Biochemicals). Sekä H₆ pl että H₆ fl koodauskasetit pilkottiin NcoI/-NheI-pilkkomisella (NheI-kohta pilkkoi RRS-adaptorin 3'-päästä) ja insertoititiin NcoI/NheI-pilkottuun pET11d:hen. Nämä kaksi rakennetta, pET11d His₆ pl RRS ja pET11d His₆ fl RRS, transformoitiin kompetentteihin BL21[DE3]-bakteereihin rekombinanttiproteiinien ekspressiota varten. BL21[DE3] sisältää rekombinantti faagi λ-lysogeeniä, DE 3, faagin T7 RNA-polymeraasigeenin kanssa UV5-promoottorin transkriptionaalisen kontrollin alaisena. T7 RNA polymeraasigeeniekspressio induoidaan lisäämällä IPTG:tä (isopropyli-B-D-tiogalaktopyrano-puoli), joka puolestaan johtaa rekombinanttigeenin, joka on pET-vektorin T7 gn 10-promoottorin 3'-subkloonattu, ekspression korkeaan tasoon.

cdNA:t, jotka koodaavat D. pteronyssinuksen ja D. farinaen ryhmä II allergeeneja, saatiin myös Tri Wayne Thomakselta plasmidimuodossa alaklooneina λgt11:sta (Chua et al., Int. Arch. Appl. Immun. 91: 118-123 (1990); Trudinger et al., Clin. Exp. Allergy 33: 33-37 (1991)). Alkuperäinen Der p II cdNA oli subkloonattu M13 RF-plasmidilta pCA- ja pGEX-vektoreihin, Tri Roland Buelow, ImmuLogic (Palo Alto). Tri Thomaksen ryhmä toimitti Der f II cdNA:n subkloonattuna pGEX:iin. Molempia GEX-plasmideja, joissa oli ryhmä II cdNA:t, käytettiin mallisäikeenä PCR-ampilifikaatioon saman 5'/3' antisense alukeparin kanssa (kuvio 2b). Alukkeet suunniteltiin fuusioimaan EcoRI-kohdan (GAATTC, joka koodaa aminohappoja EF) lukuraamissa valmiin ryhmä II proteiinien NH₂-pään kanssa ja laittamaan ryhmän II koodausalueen PstI-kohta 3'. MJ Research Thermal Controller, jossa oli 30 X (94°C 1 min/55°C 1 min. 30 sek/72°C 2 min) ohjelma, käytettiin yhdessä Perkin Elmerin reagenssien - Cetus Gene Amp testipakkauksen kanssa. PCR-tuotteet pilkottiin EcoRI/PstI:llä ja subkloonattiin EcoRI/PstI-pilkottuun M13mp19RF:ään. Suoritettiin DNA-sekvens-

sianalyysi varmistamaan PCR-tuotteiden sekvenssi. Oi- keat M13RF:t EcoRI/PstI-pilkottiin, eristettiin niiden ryhmä II cDNA:t ja subkloonattiin EcoRI/PstI-pilkottuun pTrc99A His₆ Amb a I.1 RRS:ään (joka toimi vaihtamaan ryhmä II cDNA:t villakon cDNA:han (kuvio 1)).

Der f II cDNA:lla oli sekvenssi-polymorfismia asemassa 54 (s.o. treoniinijäännös isoleusiinin paikalla). Jotta tämä polymorfismi muutetaan, suoritettiin kohdistettu T₅₄ mutage-
 10 neesi Der ff cDNA:ssa käyttämällä Muta-gene-testipakkausta, Bio-Rad Laboratories, perustuen Kunkel menetelmään, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985). Alkuperäinen M13mp1-9RF T₅₄ Der f II cDNA:n kanssa transformoitiin CJ236-baktee-
 15 reihin, jotka sietävät urasiilin liittämisen tymidiinin paikalle DNA-replikaation aikana, ja yk- sijuosteinen faagi DNA valmistettiin mallisäikeeksi. Mutageeninen 17 emäsparin aluke (kuvio 2b) hybridisoitiin faagi mallisäie DNA:han. T4 DNA-
 20 polymeraasia käytettiin kopioimaan mallisäie DNA, jossa oli ollut alukkeena mutageeninen oligonukleotidi, ja T4 DNA-li- gaasi toimi sulkemaan aukot DNA-juosteessa. Reaktio transfor- moitiin MV1190-bakteereihin, jotka ovat villityyppiä toimit-
 25 tamaan urasiilijäännöksiä DNA:sta ja siksi replikoivat selek- tiivisesti mutagenisoitua (ei-urasiiliä sisältävää) juostetta ja yksijuosteinen faagi-DNA valmistettiin rekombinantti-
 30 (valkoiset) plakeista. Lukuisille rekombinanteille tehtiin DNA-sekvenssianalyysi ja Der f II cDNA:t, joissa oli oikea I⁵⁴-sekvenssi, subkloonattiin EcoRI/PstI-fragmentteina Eco- RI/PstI-pilkottuun pTrc99A His₆ Amb a I.1 RRS:ään.

30 Koska eräs aikaisempi työ oli osoittanut, että pET11d-vektori, useimmissa tapuksissa, kykeni ekspressoimaan rekombinant-
 tiproteiineja korkeammilla tasoilla kuin pTrc99A-vektori, kaksi punkki ryhmän II cDNA:ta subkloonattiin H₆-fuusioprotei-
 35 iineina T7-vektoriin. pTrcppA His₆ f II RRS ja pTrc99A His₆ p II RRS NcoI/NheI-pilkottiin, cDNA-insertit eristettiin ja subkloonattiin NcoI/NheI-pilkottuun pET11dHis₆ pl:ään (kuvio

1). Rekombinanttiplasmidit transformoitiin BL 21[DE3]-bakteereihin ekspressiota varten.

5 BL21 DE3 isäntäbakteerit, joissa oli pET11d punkkiaallergeenin ekspressiorakenteet, levitettiin tuoreeltaan BHI-agarimaljalle (3,7 % w/v, Difco Brain Heart Infusion; 1,5 % w/v Difco agari), johon oli laitettu mukaan 200 µg/ml ampisilliinia, ja inkuboitiin yön yli 37°C:ssa. Yksittäispesäke ympätettiin 2 ml:aan 200 µg/ml ampisilliini/BH1-alustaan (3,7 % w/v Difco Brain Heart Infusion) ja ravisteltiin 300 rpm 37°C:ssa, kunnes sameaa mutta ei kyllästettyä. Sitten lisättiin 2 ml viljelmää 100 ml:aan 200 µg/ml ampisilliini/BH1-alustaan, ravisteltiin 300 rpm 37°C:ssa, kunnes sameaa mutta ei kyllästettyä, missä pisteessä viljelmä jaettiin 18 X 500 ml (9 l) 200 µg/ml ampisilliini/BH1-alustaan ja ravisteltiin 300 rpm 37°C:ssa. Kun viljelmän OD₅₉₅ saavutti 1,0, indusoitiin rekombinanttimolekyylien ekspressio lisäämällä IPTG:tä 400 µM:iin ja annettiin jatkua 2 h.

20 Bakteerit kerättiin sentrifugoimalla 10 000 X 15 min ja suspendoitiin uudestaan 1/20 tilavuuteen lyysauspuskuriä (0,2 mg/ml lysotsyymi, 100 mM NaPO₄ pH 8,0, 50 mM NaCl), inkuboitiin jäissä 30 min ja jäädytettiin -70°C:een. Jäätäneet bakteerit rikottiin nopealla sulattamisella 37°C:ssa ja sonikoidtiin 5 kertaa 20 sek 30 sekunnin välein. Sonikoidut näytteet 25 sentrifugoitiin 15 000 X g erottamaan liukoiset ja hiukkasia koostuvat bakteeriproteiinit. Liukoiset proteiinit kaadettiin pois ja pelletoidut proteiinit suspendoitiin uudestaan 6 M guanidiini HCl:ään, 100 mM 2-merkaptotaetanoliiin, 100 mM NaPO₄:ään, 10 mM Tris pH 8,0. Tämä suspensio sentrifugoitiin 30 15 000 X g ja supernatantti poistettiin, säädettiin pH 8,0:ksi 10 N NaOH:lla ja laitettiin NTA-agarosipylvääseen, joka oli tasapainotettu 6 M guanidiini HCl:ssä, 100 mM NaPO₄:ssä, 10 mM Tris:ssä pH 8,0. Pylväs pestiin 6 M guanidiini 35 HCl:llä, 100 mM NaPO₄:llä, 10 mM Tris:llä pH 8,0, kunnes ulos virtaava neste OD₂₈₀ saavutti taustan. Pylvään puskuuri säädettiin 8 M urealle, 100 mM NaPO₄:lle, 10 mM Tris:lle pH 8,0.

Tasapainotuksen jälkeen suoritettiin ankarampi pesu 8 M ureassa, 100 mM NaOAc:ssä, 10 mM Tris:ssä pH 6,3, kunnes ulos virtaavan nesteen OD₂₈₀ saavutti taustan. Rekombinantti punkkiproteiini (H₆-fuusiona) eluoitiin sitten 8 M ureassa, 100 mM NaOAc:ssä, 10 mM Tris:ssä pH 4,5 ja kerättiin annoksina, jonka OD₂₈₀-profiilia tarkkailtiin. Proteiinipiikki dialysoitiin 3 kertaa 500 tilavuuteen PBS:ää ihmisen T-soluanalyysiä varten. Saanto rajoittui 10-70 mg rekombinanttiproteiinia/l puhtauden rajoittuessa (määritettynä densitometrisellä pyyhkäisyllä) 80 - (Der f II) 95 %.

Jotta puhdistettiin lisää rekombinantti Der f II-proteiiniallergeenia, käytettiin käänteisfaasi HPLC-kromatografiaa. Likimäärin 100 mg His₆-Der f II-proteiinia pelkistettiin 20 mM DTT:ssä 36°C:ssa 30 min ja sitten laitettiin Pharmacia PRO RPC HR 10/10 tilavuuteen 0,1 % v/v TFA/H₂O. Pylvään virtausnopeus oli 1,5 ml/min, gradientilla 0-70 % asetonitriiliä 0,1 % TFA:ssa yli 40 min, jonka jälkeen gradientilla 0-100 % asetonitriiliä 0,1 % TFA:ssa. His₆-Der f II-proteiini eluotui 54-96 % asetonitriiliä. Fraktioiden, jotka havaittiin 214 nm:ssä ja 280 nm:ssä, puhtaus analysoitiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi/densitometrisellä pyyhkäisyllä. Niitä fraktioita, joiden His₆-Der f II-proteiinin puhtaus oli suurempi kuin 95 %, käytettiin myöhemmin allergeneen ihmisen T-solukartoitukseen. Saanto preparatiivisesta käänteisfaasi HPLC:lta oli noin 69 %.

Nukleotidisekvenssipolymorfismin määrittäminen Der p I-, Der p II- ja Der f II-allergeeneissa

Sekvenssipolymorfismia odotettiin nukleiinihapposekvenssissä, joka koodaa Der p I:tä, Der p II:ta, Der f I:tä ja Der f II:ta, johtuen luonnollisesta alleelisesta muunnelmasta yksittäisten punkkien joukossa. On löydetty lukuisia nukleotidi- ja siitä seuraavia aminohapposekvenssipolymorfismeja erilaisten Der p-, Der p II- ja Der f II-kloonien sekvenssoinnin aikana. Aminohapposekvenssin polymorfismit nähdään kuvioissa 22,23 ja 24.

Esimerkki 3Päällekkäin menevien peptidien synteesi

Päällekkäin menevät peptidit Der p, Der f I, Der p II ja Der f II, kuten osoitettu kuvioissa 3 ja 4, syntetisoitiin käyttämällä standardia Fmoc/tBOc synteetikemiala ja puhdistettiin dialyysillä tai käänteisfaasi HPLC:llä. Syntetisoitujen peptidien aminohappojäännökset ovat ulokkeissa peptidin nimen vieressä ja aminohapposekvenssi (yksikirjaimisena koodina) seuraavana peptidin nimestä. Peptidien nimet ovat yhdenmukaiset läpi kuvioiden. Der p I-, Der f I-, Der p II- ja Der f II-proteiinit jaettiin päällekkäin meneviin peptideihin sellaisella tavalla, että päällekkäin menevillä peptideillä Der p I ja Der f I, samoin kuin Der p II ja Der f II on vastaavat aminohappojäännösnumerot, esim. DPI-1:ssä ja DF I-1:ssä molemmissa on Der p I- ja Der f-allergeenien aminohappojäännökset 1-20, vastaavasti. Tämä vastaavuus aminohappoasemassa Der p I- ja Der f I-peptidien välillä tehtiin tarkoituksella ollen testi Der p I ja Der f I T-solu-epitoppeiden ristiinreagoivuudesta ja täten määritetään peptidit, jotka sen jälkeen, kun on annettu yksilölle, joka on herkkä pölypunkille, hoitaisivat herkkyyden sekä Der p I- että Der f I-allergeeneille. Päällekkäin menevien peptidien suunnittelussa ryhmän I ja ryhmän II allergeenien suhdetta tarkasteltiin T-solun ristiinreagoimisen tasolla. Lisäksi ryhmän I allergeenien toimintaa seriiniproteiineina tarkasteltiin ja muiden tunnettujen seriiniproteaasien aminohapposekvenssit, esim. papaiini, aktinidiini, tutkittiin, jotta tunnistetetaan samanlaiset säilyneet ja vaihtelevat alueet ryhmän I allergeeneissa. Odotettiin, että säilyneet alueet ryhmän I allergeeneissä sisältäisivät "jaetut" T-solu-epitopit.

Esimerkki 4

Punkkiallergisen potilaan primääriset T-soluvasteet Der p I- ja Der p II-proteiineihin ja peptideihin

35. Perifeeriset veren mononukleaariset solut (PBMC) puhdistettiin punkkiallergisen potilaan R.B. perifeerisen verinäytteen Ficoll-Hypaque sentrifugauksella ja lisääntyminen analysoi-

tiin suhteessa erilaisiin antigeeneihin, s.o. affinitettipuhdistetut Der p I-, affinitettipuhdistetut Der p II-, erilaiset Der p I- ja Der p II-peptidit. Määritystä varten viljeltiin 5×10^4 PBMC:tä kolmoiskappaleina mikrokaivoissa 7 d

5 37°C:ssa erilaisten antigeenipitoisuuksien läsnäollessa 200 μ l RPMI-1640:ssa, jossa oli 5 % ihmisen AB-seerumia. Jokaiseen kaivoon laitettiin 1 μ Ci titioitua tymidiiniä 16 h. Liittyneet luvut kerättiin lasikuitusuodattimille ja prosessoitiin nestetuikelaskemista varten. Taulukko I osoittaa

10 tämän määrittelyn tulokset. CPM +/- standardijakauma nähdään. Jokaisen vasteen stimulaatioindeksi (S.I.) on ^3H -tymidiini CPM:n, jonka solut ovat liittäneet suhteessa antigeniin jaetuna ^3H -tymidiini CPM:llä, jonka solut ovat liittäneet vain alustaan, suhde. Tulokset soittavat, että tämä potilas vastasi S.I.:llä, joka oli ainakin 2,0, peptideihin DP I-1, DP I-3, DP I-8, DO I-10, DP I-5,2, DP II-4 ja DP II-9. Täten näissä peptideissä on Der p I tai Der p II T-solu-epitoppeja, jotka T-solut tästä erityisen allergisesta potilaasta tunnistavat.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

Taulukko 1

		Konsentraatio		
	Antigeeni	$\mu\text{g/ml}$	CPM $\pm$ S.D.	S.I.
5				
	Alusta	--	1071 $\pm$ 30	--
	Der p I	10	920 $\pm$ 15	0,9
		30	2122 $\pm$ 93	2,0
		100	1492 $\pm$ 13	1,4
10	DP I-1	10	1090 $\pm$ 48	1,0
		30	3527 $\pm$ 73	3,3
		100	2746 $\pm$ 81	2,6
	DP I-2	10	1395 $\pm$ 47	1,3
		30	1283 $\pm$ 34	1,5
15		100	1486 $\pm$ 38	1,4
	DP I-3	10	2608 $\pm$ 52	2,4
		30	1561 $\pm$ 13	1,5
		100	5252 $\pm$ 67	4,9
	DP I-8	10	1439 $\pm$ 32	1,3
20		30	1045 $\pm$ 32	1,0
		100	2272 $\pm$ 40	2,1
	DP I-10	10	1936 $\pm$ 50	1,8
		30	3042 $\pm$ 89	2,8
		100	2644 $\pm$ 63	2,5
25	DP I-5.2	10	1374 $\pm$ 20	1,3
		30	2241 $\pm$ 87	2,1
		100	3132 $\pm$ 111	2,9
	Der p II	10	1113 $\pm$ 35	1,0
		30	2104 $\pm$ 43	2,0
30		100	1057 $\pm$ 27	1,0
	DP II-4	10	2126 $\pm$ 25	2,0
		30	1979 $\pm$ 94	1,8
		100	2314 $\pm$ 116	2,2
	DP II-9	10	3970 $\pm$ 87	3,7
35		30	4464 $\pm$ 86	4,2
		100	2237 $\pm$ 53	2,1

Esimerkki 5T-solu-epitootutkimuksia Der p I:llä

Perifeeriset veren mononukleaariset solut (PBMC) puhdistettiin 60 ml:sta punkkiaallergisten yksilöiden, joilla oli punkkiaallergian kliinisiä oireita ja jotka olivat ihotesti-

5 positiivisia pölypunkille, perifeeristä verta, jota oli käsitelty hepariinilla veren hyytymisajan lisäämiseksi, Ficoll-Hypaque sentrifuugauksella.

10 10^7 PBMC:tä 543 yksilöstä viljeltiin 10 ml:ssa RPMI-1640, jossa oli 5 % kerättyä ihmisen AB seerumia ja johon oli lisätty glutamiinia, penisilliiniä, streptomysiiniä ja HEPES-puskuria 20 μ g/ml:n puhdistettua natiivia Der p I/ml läsnäollessa 37°C:ssa 7 d. Elävät solut puhdistettiin Ficoll-Hypaque

15 sentrifuugauksella ja viljeltiin edelleen 2 viikkoa RPMI-1640/5 % AB seerumissa, jossa oli 5 yksikköä ihmisen rekombinantti IL-2/ml ja 5 yksikköä ihmisen rekombinantti IL-4/ml. Sitten lepäävät T-solut testattiin sekundäärisessä lisääntymistestissä arvioimaan T-soluvasteet erilaisille pölypunkki-

20 proteiineille ja peptideille. Määrittystä varten kasvatettiin 200 μ l:ssa RPMI-1640/5 % AB-seerumia 3 d 37°C:ssa 2×10^4 autologisella Epstein-Barr-viruksella transformoitujen B-solujen läsnäollessa (20 000 rads) antigeeniä esittävinä

25 soluina erilaisten puhdistetun natiivin Der p I- tai synteettisen Der p I peptidikonsentraatioiden kanssa. Jokaiseen kairoon laitettiin sitten 1 μ Ci tritioitua tymidiiniä 16 h.

30 Mukaan laitetut luvut kerättiin lasikuitusuodattimille ja prosessoitiin nestetuikelaskemista varten. Alusta yksin, toimien negatiivisenä kontrollina, ei sisältänyt allergeeniä tai peptidiä. Tämän kokeen tulokset osoittavat, että tämä erityinen potilas vastaa S.I.:llä, joka on vähintään 2,0, lukuisille peptideille, jotka on johdettu Der p I-proteiinista, DP I-1, DP I-2, DP I-4, DP I-11, DP I-5, DP I-13, DP I-15, DP I-6.1, DP I-8, DP I-9, DP I-16, DP I-10 ja DP I-17

35 (tietoja ei näkyvissä).

Edellä ollutta menetelmää seurasi joukko muita pölyallergisia yksilöitä paitsi, että a) yksittäisissä tapauksissa muunneltiin viljelyajan pituutta IL-2:lla ja IL-4:llä; b) yksittäisissä tapauksissa käytettiin T-solujen alukkeina joko puhdistettua natiivia (N) tai rekombinantti (R) Der p I-proteiinia, joko 20 µg/ml tai 10 µg/ml; ja c) yksittäisissä tapauksissa käytettiin röntgen-säteilytettyä (3500 rad) autologista PBMC:tä antigeeniä edustavina soluina sekundaarisessa lisäätymistestissä. Lisäksi kolmen peptidin (DP I-11 (SEQ ID Nro.117), DP I-12 (SEQ ID Nro:118) ja DP II-3 (SEQ ID Nro.119) havaittiin sisältävän pienet määrät konservatiivisiä muutoksia natiivista sekvenssistä niiden aminohapposekvenssiin. Syntetisoitiin kolme lisäpeptidiä (DP I-11.1 (SEQ ID Nro.13), DP I-12.1 (SEQ ID Nro.14) ja DP II-3.1 (SEQ ID Nro.43), joissa ei ollut muutoksia natiivista sekvenssistä. Tehtiin joitakin T-soluanalyyskejä alkuperäisten peptidien kanssa (s.o. DP I-11 ja DP II-3). Sen jälkeen kun oli tehty T-soluanalyysi lisäpeptidien kanssa (s.o. DP I-11.1, DP I-12.1 ja DP II-3.1), ei havaittu merkittävää eroa keskimääräisessä S.I.:ssä tai positiivisten vasteiden prosenttiosuudessa orginaalisten peptidien ja lisäpeptidien välillä. Täten tiedot molemmista peptidiryhmistä oli kerätty.

Yksittäisiä tuloksia pidettiin positiivisinä ja käytettiin, jos yksilö vastasi Der p I-proteiiniin ja ainakin yhteen peptidiin, joka oli johdettu Der p I:stä S.I.:n ollessa 2,0 tai suurempi. Tiivistelmä 33 positiivisen kokeen tuloksesta nähdään taulukossa 5. Lepäävistä T-solulinjoista, joissa oli ollut alukkeena rekombinantti tai natiivi Der p I-stimuloitu PBMC, testattiin reaktiivisuus synteettisiin Der p I-peptideihin. Maksimaalinen vaste jokaiselle peptidille antigeenin titrauksessa ilmaistaan T-solun stimulaatioindeksinä (S.I.). S.I on lukua/min (CPM), jotka solut ovat tuoneet mukanaan, suhteessa peptidiin, joka jaetaan CPM:llä, jonka solut ovat tuoneet ainostaan alustaan. S.I.-arvo suurempi kuin taustataso osoittaa, että peptidissä on T-solu-epitoppi. Kuitenkin yksittäiset S.I.-arvot, jotka ovat suurempia kuin tai yhtä

suuria kuin 2,0 (vaste kaksi kertaa suurempi tai yli tausta), viitataan tässä "positiivisina" tuloksina, käytettiin laskettaessa keskimääräistä T-solun stimulaatioindeksiä jokaiselle peptidille potilaassa tai testattujen potilaiden ryhmässä.

- 5 Suluissa edellä jokainen tanko histogrammissa on keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi laskettuna sen jälkeen, kun on heitetty pois korkein ja alhaisin positiivinen vaste jokaiselle peptidille äärimmäisten syrjässä olevien vaikutuksen minimoimiseksi. T-solun stimulaatioindeksi lasketaan:

10

$$\frac{(\text{CPM T-solu} + \text{APC} + \text{antigeeni})}{\text{CPM T-solu} + \text{APC} + \text{kontrolli}}$$

15

Viiva edustaa peptidivasteen kumulatiivista järjestystä potilaiden ryhmässä. Jotta määritetään kumulatiivinen luokka, 5 peptidiä, joilla on korkein S.I. jokaisessa yksilössä, määritettiin ja määrättiin numeeriseen järjestykseen laskevassa järjestyksessä, 5 edustaessa vahvinta vastetta. Jokaisen peptidin luokat summattiin sitten potilaiden ryhmässä määrittämään peptidin kumulatiivisen luokan. Jokaisen viivan ylä-

20

puolella on prosenttia positiivisia vasteita S.I.:n ollessa vähintään 2,0 testattujen potilaiden peptidiryhmälle. Annettuna prosenttia positiivinen ja keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi, voidaan positiivisyysindeksi (P.I.) jokaiselle peptidille laskea. P.I jokaiselle yksilölle määritetään kertomalla keskimääräinen S.I. prosentilla yksilöitä, yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille (esim. edullisesti ainakin 15 yksilöä, edullisemmin ainakin 30 yksilöä tai enemmän) populaatiossa, jotka vastaavat S.I.:n ollessa ainakin

30

2,0 tuolle peptidille (esim. DP I-1 kuviossa 5, PI olisi noin 343 (73 % x 4,7). P.I. edustaa sen takia sekä T-soluvasteen voimakkuutta peptidiin (S.I.) ja T-soluvasteen frekvenssiä peptidiin, yksilöiden, jotka ovat herkkiä pölypunkille populaatiossa. Kuvio 5 osoittaa että peptideissä DP I-1, DP I-2, DP I-4, DP I-5, DP I-6.1, DP I-7.1, DP I-8, DP I-9, DP I-16 ja DP I-10 on merkittäviä T-solureaktiivisyyden alueita tässä potilaiden paneelissa.

35

Esimerkki 6T-solu-epitootutkimukset Der f I:llä

Suoritettiin samanlaiset kokeet kuin esimerkissä 5 määrittämään Der f I-proteiinin T-solu-reaktiiviset alueet. Esimerkiksi, eristettiin PBMC pölypunkkiallergisesta potilaasta 783, kuten esimerkissä 5 kuvattiin ja stimuloitiin in vitro rekombonantti puhdistetun Der f I:n kanssa 20 µg/ml:ssa.

Lisääntymismäärityksen tulokset Der f I-peptidien kanssa käyttämällä röntgen-säteilytettyä (3500 rad) autologista

PBMC:tä antigeeniä edustavina soluina, osoittavat että tämän potilaan T-solut vastaavat peptideihin DF I-8.1, DF I-9, DF I-6, DF I-10, DF I-2.1, DF I-3, DF I-11, DF I-5, DF I-1 ja DF I-17 (tiedot eivät näy).

Edellä ollut menetelmä tehtiin lukuisissa potilaissa, paitsi yksittäisissä tapauksissa, T-solulinjojen alukkeina olivat affiniteettipuhdistettu Der f I 20 µg/ml tai 10 µg/ml ja röntgen-säteilytettyjä (25 000 rad) autologisia Epstein-Barr-viruksilla transformoituja B-soluja käytettiin antigeeniä edustavina soluina. Tiivistelmä 16 positiivisen kokeen tuloksesta nähdään taulukossa 6. Tiedot analysoitiin, kuten esimerkissä 5 kuvattiin. Tiedot osoittavat että T-solu-reaktiivisyyden merkittäviä alueita Der f I-proteiinissa on löydetty peptideissa DP I-1, DP I-2, DP I-3, DP I-4, DP I-11, DP I-5, DP I-6, DP I-7, DP I-14, DP I-15, DP I-8.1 ja DP I-9.

Esimerkki 7

Tutkimus, joka osoittaa Der p I- ja Der f I- T-solu-epitootpien ristiinreagoivuuden

Der p I- ja Der f I-proteiinit ovat hyvin homologisia (81 % identtisyys). Täten kokeet, samanlaiset kuin esimerkissä 5, suoritettiin määrittämään T-solulinjojen, joiden alukkeina oli ollut Der p I, T-soluvasteet, kun saatu esiin erilaisilla Der p I-peptideillä ja olennaisesti sopivat yhteen Der f II-peptidien kanssa. T-solulinjojen alukkeet in vitro olivat kuten esimerkissä 5 ja vaste sarjaan olennaisesti yhteensopiviin Der p I- ja Der f I-peptideihin testattiin (esim. DP I-1

(Der p I:n aminohappojäännökset 1-20) tai DF I-1 (Der f I:n aminohappojäännökset 1-20). Tiedot analysoitiin, kuten esimerkiksi 5 on kuvattu, paitsi korkeimmat ja alhaisimmat positiivisten vasteiden S.I.-arvot jokaiselle peptidille jätettiin pois keskimääräisistä S.I. laskuista. Joukon sellaisten kokeiden tiivistelmä nähdään kuviossa 7. 14 positiivisen kokeen tulokset osoittavat, että T-solut, joiden alukkeena on ollut Der p I, vastaavat erilaisille Der f I-peptideille osoittaen ristiinreagoivuutta ryhmän I allergeenien sisällä.

10 T-solut, joiden alukkeena on ollut Der p I, vastaavat merkittävästi peptideille DF I-1, DF I-2, DF I-3, DF I-4, DF I-11, DF I-12, DF I-15, DF I-8, DF I-9, DF I-15 ja DF I-6. Joissakin potilaissa Der f I-peptidi oli tehokkaampi stimulaattori T-soluille, joiden alukkeena on ollut Der p I-peptidi. Kuvio

15 8 osoittaa tulokset käänteisistä kokeista, joissa lukuisten potilaiden T-solut, joiden alukkeena on ollut Der f I-proteiini in vitro, ja vaste analysoitiin erilaisiin Der p I-peptideihin ja sarjaan olennaisesti yhteensopiviin Der f I-peptideihin. 8 positiivisen kokeen tulokset osoittavat, että T-

20 solut, joiden alukkeena on ollut Der f I, vastaavat merkittävästi peptideille DP I-1, DP I-3, DP I-4, DP I-11/11.1, DP I-14, DP I-5, DP I-15 ja DP I-8.

Esimerkki 8

T-solu-epitooppikokeet Der p II:n kanssa

Suoritettiin samanlaiset kokeet kuin esimerkissä 5 määrittämään Der f I-proteiinin T-solu-reaktiiviset alueet. Esimerkiksi, eristettiin PBMC pölypunkkiallergisesta potilaasta 348, kuten esimerkissä 5 kuvattiin ja stimuloitiin in vitro

30 20 µg/ml:lla puhdistetun natiivin Der p II:n kanssa. Lisäantymismäärityksen tulokset käyttämällä röntgen-säteilytettyä (25 000 rad) autologisia Epstein-Barr-viruksilla transformoituja B-soluja antigeeniä edustavina soluina. Autologista PBMC:tä antigeeniä edustavina soluina erilaisten Der f I-peptidien kanssa, osoittavat että tämän erityinen potilas vastaa hyvin peptideihin DP II-1, DP II-7, DP II-8, DP II-2 ja DP

35 II-9 (tiedot eivät näy).

Edellä ollut menetelmä tehtiin lukuisissa potilaissa, paitsi yksittäisissä tapauksissa, T-solulinjojen alukkeina olivat rekombinantti Der p II 20 $\mu\text{g/ml}$ tai 3 $\mu\text{g/ml}$ ja röntgen-säteilytettyjä (3 500 rad) autologisia PBMC-soluja käytettiin antigeeniä edustavina soluina. Tiivistelmä 26 positiivisen kokeen tuloksesta nähdään taulukossa 9. Tiedot analysoitiin, kuten esimerkissä 5 kuvattiin, paitsi peptidivasteiden summa analysoitiin antamalla arvo 3,2 tai 1 kolmelle korkeammalle S.I. vasteelle. Alueet, joilla oli merkittävää T-solu-reaktiivisyyttä Der p II-proteiinissa tällä potilaiden paneelilla, löydetään peptideistä DP II-1, DP II-2, DP II-3, DP II-4, DP II-7, DP II-8 ja DP II-9.

Esimerkki 9

T-solu-epitooppikokeet Der f II:n kanssa

Suoritettiin samanlaiset kokeet kuin esimerkissä 5 määrittämään Der f II-proteiinin T-solu-reaktiiviset alueet. Esimerkiksi, stimuloitiin PBMC pölypunkkiallergisesta potilaasta 348 in vitro puhdistetun rekombinantti Der f II:n kanssa ja T-solulinja saatiin esiin B-solujen, joita käytettiin antigeeniä edustavina soluina, joissa on erilaisia päällekkäin meneviä Der f II-peptidejä, läsnäollessa, jotka oli transformoituja röntgen-säteilytetyillä (25 000 rad) autologisilla Epstein-Barr-viruksilla autologista PBMC:tä antigeeniä edustavina soluina. Tämän lisääntymismäärityksen tulokset osoittavat että tämä erityinen potilas vastaa hyvin peptideihin DF II-1, DF II-2, DF II-3.1, DF II-4.5, DF II-15, DF II-16 ja DF II-9.1 (tiedot eivät näy).

Edellä ollutta menetelmää seurattiin 10 potilaassa, paitsi yksittäisissä tapauksissa, T-solulinjojen alukkeet saatiin stimuloimalla potilaan PBMC 20 $\mu\text{g/ml}$ tai 3 $\mu\text{g/ml}$ puhdistettua natiivia Der p II:ta ja määritettiin röntgen-säteilytettujen (3 500 rad) autologisten PBMC:n läsnäollessa antigeeniä edustavina soluina. Tiivistelmä 10 positiivisen kokeen tuloksesta nähdään taulukossa 10. Tiedot analysoitiin, kuten esimerkissä 5 kuvattiin, paitsi korkeinta ja alhaisinta positiivisten

vasteiden S.I.-arvoa jokaiselle peptidille, ei jätetty pois laskuista. Tiedot osoittavat merkittävät alueet T-solu-reaktiivisyyttä Der p II-proteiinissa löydetään peptideistä DF II-, DF II-2, DF II-13.1, DF II-4.5, DF II-15, DF II-17 ja DF II-9.1.

Esimerkki 10

Tutkimus, joka osoittaa Der p II- ja Der f II- T-solu-epitoppien ristiinreagoivuuden

- 10 Tutkimus, joka on samanlainen kuin esimerkissä 7, suoritettiin määrittämään Der p II- ja Der f II-proteiinien T-solun ristiinreagoivuus. T-solut, joissa oli ollut alukkeena Der f II-proteiini, saatiin esiin erilaisilla Der f II-peptideillä ja sarjalla olennaisesti yhteensopivilla Der p II-peptideillä.
- 15 Tiivistelmä 10 positiivisen kokeen tuloksesta nähdään kuviossa 11. Tulokset osoittavat, että T-solut, joiden alukkeena on ollut Der f II, vastaavat merkittävästi peptideille DP II-1, DP II-3/3.1, DP II-4 ja DP II-7. Kuvio 12 osoittaa tulokset käänteisistä kokeista, joissa lukuisten potilaiden
- 20 T-solut, joiden alukkeena on ollut Der p II-proteiini in vitro, ja vaste analysoitiin erilaisiin Der f II-peptideihin. 26 positiivisen kokeen tulokset osoittavat, että T-solut, joiden alukkeena on ollut Der p II, vastaavat merkittävästi peptideille DF II-1, DF II-4.5, DF II-15, DF II-17, DF II-18
- 25 ja DF II-19.1.

Esimerkki 11

Dominoivien peptidien synteesi

- Perustuen esimerkeissä 5-10 kuvattuihin analyysihin, tunnistettiin tärkeimmät T-solu-reaktiivisyyden alueet Der p I:ssä, Der p II:ssa, Der f I:ssä ja Der f II:ssa. Jokaisessa tutkimuksessa kaikki testatut potilaat vastasivat proteiiniallergeeniin (esim. Der p I) ja ainakin yhteen peptidiin, joka oli johdettu T-solureaktiivisyyden tärkeimmältä alueelta proteiinissa. Tunnistettiin T-solureaktiivisyyden 7 tärkeintä
- 35 aluetta (alue 1, alue 2, alue 3, alue 4, alue 5, alue 6a ja alue 6b) Der p I- ja Der f I-proteiineissa. Nämä alueet kuva-

taan seuraavasti: Alue 1, aminohappojäännökset 1-28 Der p I- ja Der f I-proteiineissa; Alue 2, aminohappojäännökset 36-68 Der p I- ja Der f I-proteiineissa; Alue 3, aminohappojäännökset 74-109 Der p I- ja Der f I-proteiineissa; Alue 4, aminohappojäännökset 118-139 Der p I- ja Der f I-proteiineissa; Alue 5, aminohappojäännökset 141-166 Der p I- ja Der f I-proteiineissa; Alue 6a, aminohappojäännökset 161-185 Der p I- ja Der f I-proteiineissa ja Alue 6b, aminohappojäännökset 173-201 Der p I- ja Der f I-proteiineissa.

Samalla lailla tunnistettiin T-solureaktiivisuuden 4 tärkeintä aluetta (alue 7, alue 8, alue 9, ja alue 10) Der p II- ja Der f II-proteiineissa. Nämä alueet kuvataan seuraavasti:

Alue 1, aminohappojäännökset 1-26 Der p II- ja Der f II-proteiineissa; Alue 8, aminohappojäännökset 33-67 Der p II- ja Der f II-proteiineissa; Alue 9, aminohappojäännökset 74-104 Der p I- ja Der f II-proteiineissa; ja Alue 10, aminohappojäännökset 107-129 Der p II- ja Der f II-proteiineissa. Perustuen osittain esimerkeissä 5-10 kuvattuun T-solu-reaktiivisyyteen, peptidit, jotka oli johdettu Der p I:stä, Der f I:stä, Der p II:sta ja Der f II:sta, valittiin ja modifioitiin lisäämällä tai deletoimalla aminohappojäännöksiä peptidin joko 5'- tai 3'-päässä. Suunniteltaessa näitä valittuja peptidejä, otettiin erilaisia tekijöitä huomioon, päällekkäin menevien peptidien luokiteltu summa, prosenttiosuus peptidien vasteista, joiden S.I. oli vähintään 2,0, peptidien mahdollinen ristiinnreagoivuus, peptidien valmistamisen vaikeus, jne. mukaanluettuna. T-solututkimukset, jotka ovat samanlaiset kuin esimerkeissä 5-10 kuvatut, suoritettiin käyttämällä näitä valittuja peptidejä, jotta kuvataan tarkemmin T-solureaktiivisuuden tärkeimmät alueet Der p I- ja Der f I-proteiinin alueilla 1-61 ja 6b ja Der p II- ja Der f II-proteiinin alueilla 7-10.

T-solu-tutkimusten tulokset käyttämällä valittuja peptidejä, jotka on johdettu Der p I-, Der f I-, Der p II- ja Der f II-proteiineista, nähdään kuvioissa 13-18a-d. Esimerkissä 5

kuvattua menetelmää seurattiin T-solulinjoilla lukuisista potilaista, joissa oli ollut alukkeina in vitro Der p I-proteiini, sitten analysoitu vaste valittuihin peptideihin, jotka oli johdettu Der p I-sekvenssistä. 33 positiivisen kokeen tulokset, jotka nähdään kuviossa 13, osoittavat että T-solut, joissa on ollut alukkeena Der p I, vastaavat merkittävästi peptideihin, joita on peptideissä DP I-21.1, DP I-21.2, DP I-22.2, DP I-25.2, DP I-22.1, DP I-23.1, DP I-23.2, DP I 26.1 ja DP I-28.1.

10

Samalla lailla esimerkissä 6 kuvattua menetelmää seurattiin T-solulinjoilla 9 potilaasta, joissa oli ollut alukkeina in vitro Der f I-proteiini, sitten analysoitu vaste valittuihin peptideihin, jotka oli johdettu proteiinista. Tiedot analysoitiin, kuten esimerkissä 6 kuvattiin. Kuviossa 14 osoitetut 9 potilaan tulokset osoittavat T-solureaktiivisuuden valittuihin Der f I:n peptideihin.

20

Eräässä toisessa kokeessa T-solulinjoilla lukuisista potilaista, joissa oli ollut alukkeina in vitro Der p I-proteiini ja analysoitu vaste valittuihin peptideihin, jotka oli johdettu Der p I-proteiinista ja olennaisesti yhteensopiviin peptidien sarjaan, jotka oli johdettu Der f I-proteiinista. Tiedot 30 positiivisesta kokeesta analysoitiin, kuten esimerkissä 5 kuvattiin. Kuten kuviossa 15a osoitettiin, vastaavat T-solut, joissa on ollut alukkeena Der p I, merkittävästi peptideihin DF I-21.1, DF I-21.2, DF I-23.1, DF I-22.2, DF I-22.3, DF I-22.4, DF I-23.2, DF I 25.1, DF I-26.1 ja DF I-27.1. Kuvio 15 b on osajoukko tiedoista, jotka nähdään kuviossa 15a ja osoittaa T-solujen, joissa on ollut alukkeena Der p I, vasteen peptideihin, jotka on analysoitu luokitettulla summalla. Kuvio 15b osoittaa, että DP I-23.1:llä on korkein tämän tutkimuksen peptidien ryhmän luokitettu summa. Kuvio 16a osoittaa tulokset käänteisestä kokeesta, jossa T-solujen alukkeena 9 potilaasta oli in vitro Der f I-proteiini ja saatiin esiin valituilla Der f I-peptideillä ja sarjalla olennaisesti yhteensopivia Der p I-peptidejä. Tulokset osoit-

30

35

tavat, että T-solut 9 potilaasta, joissa oli alukkeena in vitro Der f I, vastaavat valittuihin Der p I-peptideihin. Kuvio 16a osoittaa, että DF I-22.1:llä ja DF I-25.1:llä on korkein stimulaatioindeksi tässä peptidien ryhmässä. Kuvio 16b on osajoukko samoista tiedoista, jotka nähdään kuviossa 16a ja osoittaa edullisten peptidien Der f I ja Der p I vasteen. Kuvio 16b osoittaa, että DF 1-22.2:lla on korkein stimulaatioindeksi tässä edullisten peptidien ryhmässä tässä kokeessa.

Eräässä toisessa kokeessa, jossa seurataan esimerkissä 8 kuvattua menetelmää, analysoitiin 29 potilaan vaste, joissa oli ollut in vitro alukkeena Der p II-proteiini ja saatu esiin valituilla peptideilla, jotka oli johdettu Der p II-sekvenssistä. Kuvio 17a osoittaa, että erään potilaan T-solut, joissa on ollut alukkeena Der p II, vastaavat Der p II:n valittuihin peptideihin. Kuvio 17b osoittaa tulokset kokeesta, joka on samanlainen kuin kuviossa 17a nähty 30 potilaan sarjalla ja jossa on keskiarvosta jätetty pois korkea ja alhainen. Kuvio 17b osoittaa, että DP II-20,6:lla on korkein luokitettu summa tämän kokeen edullisten peptidien tässä ryhmässä. Kuvio 18a osoittaa käänteisen kokeesta, jossa T-solujen alukkeena eräästä potilaasta oli in vitro Der f II-proteiini ja saatiin esiin valituilla peptideilla Der p II-sekvenssistä. Kuvio 18a osoittaa, että 10 potilaan T-solut, joissa on ollut alukkeena Der f II, vastaavat Der p II:n valittuihin peptideihin. Kuten kuviossa 18a on osoitettu, on DP II-25:llä korkein stimulaatioindeksi. Kuvio 18b on osajoukko samoista tiedoista, jotka nähdään kuviossa 18a ja osoittaa T-solulinjojen, joissa on ollut alukkeena Der f II, vasteen edullisiin Der p II-peptideihin, jotka on analysoitu luokitetulla summalla. Kuten kuviossa 18b on osoitettu, on DP II-25.2:lla korkein edullisten peptidien luokitettu summa tässä kokeessa.

Esimerkki 12

Tutkimus, joka osoittaa valitun ryhmän I ja ryhmän II epi-tooppien ristiinreagoivuuden

5 Tutkimus, joka on samanlainen kuin esimerkissä 7 kuvattu, suoritettiin T-solulinjoilla 4 yhteensopivasta potilaasta, joissa oli ollut alukkeena in vitro ryhmä proteiineja Der f:stä ja Der p:stä, sitten vaste analysoitu valittuihin edullisiin peptideihin Der p I:stä ja Der f I:stä. Tulokset kuviossa 18c osoittavat, että T-solureaktiivisyys lukuisiin valittuihin edullisiin Der p I-peptideihin oli olennaisesti sama kuin niiden Der f I kaksoiskappaleelle ja päinvastoin.

15 Kuvio 18d osoittaa tulokset samanlaisesta kokeesta T-solulinjoilla 6 yhteensopivasta potilaasta, joissa oli ollut alukeena in vitro ryhmä II proteiineja Der p:stä ja Der f:stä, sitten vaste analysoitu valittuihin edullisiin peptideihin Der p II:stä ja Der f II:stä. Samalla lailla kuin tulokset kuviossa 18c, solureaktiivisyys lukuisiin valittuihin edullisiin Der p II-peptideihin oli olennaisesti sama kuin niiden Der f II kaksoiskappaleelle ja päinvastoin.

Esimerkki 13

IgE:n suora sitomismääritys punkkiallergeeniproteiineihin ja peptideihin

25 Corning määritysmaljat (#25882-96) peitettiin 5 µg/ml:lla jokaista peittämisantigeenia, jotka on luetteloitu kuvioissa 19, 20 ja 21 50 µl/100 ml/kaivo ja inkuboitiin yön yli 4°C:ssa. Peittävät antigeenit poistettiin ja kaivot blokattiin 0,5 % gelatiinilla PBS:ssä, 300 µl/kaivo 2 h huoneenlämpötila. Ihmisen kerättyä plasmaa (20 potilaan, jotka olivat ihotestipositiivisiä kaupalliselle punkkiuutteelle, plasmanäytteen seos) laimennettiin sarjassa PBS-Tween 20:llä (PBS 0,5 %, jossa oli ei-ioninen detergentti Tween-20, Sigma, St. Louis, MO) ja 100 µl/kaivo lisättiin ja inkuboitiin yön yli 35 4°C:ssa (plasmalaimennukset testattiin kaksoiskappaleina). Lisättiin toinen vasta-aine (biotinyloitu vuohen anti-ihmisen IgE, 1:1000, Kirkegaard & Perry laboratories Inc, Gaithers-

burg, MD), 100 μ l/kaivo 1 h huoneenlämpötila. Tämä liuos poistettiin ja sitten lisättiin streptavidiini-HRPO:ta, 1:10000, (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) 100 μ l/kaivo 1 h huoneenlämpötila (kaikki kaivot pestään 3 kertaa PBS-Tweenillä jokaisen inkubaatiovaiheen välillä). TMB Membrane Peroxidase Substrate systeemi (Kirkegaard G Perry Laboratories) sekoitettiin tuoreeltaan ja lisättiin 100 ml/kaivo. Värin annettiin kehittyä 2-5 min. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 100 ml/kaivo 1 M fosforihappoa.

Maljat luettiin Microplate IL310 Autoreader (Biotech Instruments, Winooski, VT) 450 nm suodattimella. Kaksoiskaivojen absorbanssitason keskiarvo laskettiin. ELISA-määritysten graafiset tulokset (laimennuksen log versus absorbanssi) nähdään kuvioissa 19a-b, 20a-b ja 21a -h. Näissä kuvioteksteissä pystysuoraan luetteloitujen peittävien antigeenien järjestys vastaa järjestyksessä vasemmalta oikealle peittäviä antigeenejä, jotka on luetteloitu jokaiselle histogrammille.

ELISA-määrittelyn tulokset, jotka nähdään kuviossa 19b, osoittavat hyvää sitomista sekä kemiallisesti puhdistetulla Der p II:lla että rekombinantti Der p II:lla (dDer p II) ihmisen IgE:n kanssa ja ei havaittavaa sitomista Der p II-peptideihin. IgE-sitominen Der p-sarjan peptideihin ja proteiineihin (kuviot 20a ja 20b) osoittaa saman reaktiivisyyskuvion kuin Der f-sarja. Tämä tarkoittaa, että ei havaittavaa sitomista Der f I- tai Der f II-peptideihin tai rekombinantti Der f I:een, sitomista vain biokemiallisesti puhdistettuun Der f I:een ja rekombinantti ja biokemiallisesti puhdistettuun Der f II:een. Molemmissa tapauksissa näyttää olevan parempaa sitomista rekombinantti Der p II:een tai Der f II:een kuin biokemiallisesti puhdistettuihin muotoihin. Kaikki johtopäätökset, jotka vedettiin edellä olleista ELISA-määrittystiedoista, vahvistettiin toisella määritysmenetelmällä, pistepilkkuja nitroselluloosapaperille käyttämällä samaa vasta-ainetta ja antigeenireagenssien sarjaa.

Antigeenivalmiste, jota käytettiin positiivisenä kontrolli-

na, oli neljän tärkeän biokemiallisesti puhdistetun punk-
kiallergeenin seos (nimitys PMA Purified Mite Allergen); Der
f I, Der f II, Der p I ja Der p II. Kantaliuos luotiin 100 µg
jokaista proteiinia/ml tai 400 µg kokonaisproteiini/ml, kon-
5 sentraationa. Valmistetta käytettiin jokaiselle peitettylle
ELISA-maljalle. Näiden ELISA-määritysten tulokset nähdään
kuvioissa 21a-h. On selvää sitomista joko puhdistettuun tai
rekombinanttiproteiiniin tai PMA-antigeenivalmisteeseen
jokaisella maljalla osoittaen hyvää IgE-reaktiivisyyttä.
10 Kuitenkin PMA-antigeenivalmiste osoittaa ei-spesifisen reak-
tiivisuuden korkeata astetta osoitettuna taustalaimennukses-
sa, milloin ei ensimmäistä vasta-aineliuosta lisätty. Tämä
ei-spesifinen reaktiivisuus tapahtuu PMA-antigeenin ja bio-
tinyloidun toisen vasta-aineen välillä ja ei sovi havaintoon
15 spesifisestä IgE-reaktiivisyydestä antigeeniin. Käyttämällä
kvantitatiivista arvoa, joka on kaksinkertainen taustaan
verrattuna korkeammassa plasmakonsentraatiossa positiivisena
lukemana, ei ole havaittavaa IgE-reaktiivisyyttä yhteenkään
56 peptidiin, jotka seulottiin tällä menetelmällä.

20 Vaikka keksintöä on kuvattu viittaamalla sen edullisiin suo-
ritusmuotoihin, voidaan muita suorituserityksiä saada aikaan
samoilla tuloksilla. Tämän keksinnön muunnokset ja modifikaat-
iot ovat ilmeisiä ammattimiehille ja tarkoituksena on peit-
25 tää liitteessä olevissa patenttivaatimuksissa kaikki sellaiset
modifikaatiot ja vastaavat, jotka seuraavat keksintöä oikeas-
sa hengessä ja ulottuvuudessa.

SEKVENSSILUETTELO

(1) Yleistä tietoa:

(i) Hakija:

- (A) Nimi: IMMULOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION
- (B) Katu: 610 LINCOLN STREET
- (C) Kaupunki: WALTHAM
- (D) Valtio: MASSACHUSETTS
- (E) COUNTRY: USA
- (F) Postinumero: 02154
- (G) Puhelin: (617) 466-6000
- (H) Telefax: (617) 466-6040

(ii) Keksinnön otsikko: Dermatofagoidien (pölypunkki) tärkeimpien allergeenien T-solu-epitoopit

(iii) Sekvenssien lukumäärä: 119

(iv) Tietokoneen lukema muoto:

- (A) Välinetyyppi: Floppydisk
- (B) Tietokone: IBM PC yhteensopiva
- (C) Toimiva systeemi: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: ASCII teksti

(v) Tämänhetkiset hakemustiedot:

- (A) Hakemusnumero: PCT/US92/08637
- (B) Jättöpäivä: 15-OCT-1992

(vi) Aikaisemmat hakemustiedot:

- (A) Hakemusnumero: US 07/881,396
- (B) Jättöpäivä: 8.5.1992

(A) Hakemusnumero: US 07/777,859

- (B) Jättöpäivä: 15.10.1991

(viii) Patenttiasiamiestiedot:

- (A) Nimi: Mandragouras, Amy E.
- (B) Rekisteröintinumero: 36,207
- (C) Viite/asiarekisterinumero: IMI027FI

(ix) Tietoliikenneinformaatio:

- (A) Puhelin: (617) 227-7400
- (B) Telefax: (617) 227-5941

(2) Inrormaatio SEQ ID Nro:1:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 834 emäsparia
- (B) Tyyppi: nukleiinihappo
- (C) Juoste: yksi
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: cDNA

(ix) Piirre:

(A) Nimi/avain: CDS

(B) Sijainti: 1..738

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:1:

AAA	AAC	CGA	TTT	TTG	ATG	AGT	GCA	GAA	GCT	TTT	GAA	CAC	CTC	AAA	ACT	48
Lys	Asn	Arg	Phe	Leu	Met	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Lys	Thr	15
1				5					10							
CAA	TTC	GAT	TTG	AAT	GCT	GAA	ACT	AAC	GCC	TGC	AGT	ATC	AAT	GGA	AAT	96
Gln	Phe	Asp	Leu	Asn	Ala	Glu	Thr	Asn	Ala	Cys	Ser	Ile	Asn	Gly	Asn	30
			20					25								
GCT	CCA	GCT	GAA	ATC	GAT	TTG	CGA	CAA	ATG	CGA	ACT	GTC	ACT	CCC	ATT	144
Ala	Pro	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Arg	Gln	Met	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	
			35				40					45				
CGT	ATG	CAA	GGA	GGC	TGT	GGT	TCA	TGT	TGG	GCT	TTC	TCT	GGT	GTT	GCC	192
Arg	Met	Gln	Gly	Gly	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	
	50					55					60					
GCA	ACT	GAA	TCA	GCT	TAT	TTG	GCT	CAC	CGT	AAT	CAA	TCA	TTG	GAT	CTT	240
Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ala	His	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	
	65				70					75					80	
GCT	GAA	CAA	GAA	TTA	GTC	GAT	TGT	GCT	TCC	CAA	CAC	GGT	TGT	CAT	GGT	288
Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	
				85					90					95		
GAT	ACC	ATT	CCA	CGT	GGT	ATT	GAA	TAC	ATC	CAA	CAT	AAT	GGT	GTC	GTC	336
Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val	
			100					105					110			
CAA	GAA	AGC	TAC	TAT	CGA	TAC	GTT	GCA	CGA	GAA	CAA	TCA	TGC	CGA	CGA	384
Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser	Cys	Arg	Arg	
			115				120					125				
CCA	AAT	GCA	CAA	CGT	TTC	GGT	ATC	TCA	AAC	TAT	TGC	CAA	ATT	TAC	CCA	432
Pro	Asn	Ala	Gln	Arg	Phe	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	
	130					135					140					
CCA	AAT	GCA	AAC	AAA	ATT	CGT	GAA	GCT	TTG	GCT	CAA	ACC	CAC	AGC	GCT	480
Pro	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln	Thr	His	Ser	Ala	
	145				150					155					160	

ATT GCC GTC ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTA GAC GCA TTC CGT CAT TAT
 528
 Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr
 165 170 175

 GAT GGC CGA ACA ATC ATT CAA CGC GAT AAT GGT TAC CAA CCA AAC TAT
 576
 Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr
 180 185 190

 CAC GCT GTC AAC ATT GTT GGT TAC AGT AAC GCA CAA GGT GTC GAT TAT
 624
 His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr
 195 200 205

 TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACC AAT TGG GGT GAT AAT GGT TAC
 672
 Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr
 210 215 220

 GGT TAT TTT GCT GCC AAC ATC GAT TTG ATG ATG ATT GAA GAA TAT CCA
 720
 Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro
 225 230 235 240

 TAT GTT GTC ATT CTC TAAACAAAAA GACAATTTCT TATATGATTG TCACTAATTT
 775
 Tyr Val Val Ile Leu
 245

ATTTAAATC AAAATTTTTT AGAAAATGAA TAAATTCATT CACAAAAATT AAAAAAAA
 834

(2) Informaatio SEQ ID Nro:2:

(i) Sekvenssiominaisuudet:

- (A) Pituus: 245 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: proteiini

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:2:

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

 Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn
 20 25 30

 Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile
 35 40 45

 Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly Val Ala
 50 55 60

Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu
 65 70 75 80
 Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly
 85 90 95
 Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val
 100 105 110
 Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu Gln Ser Cys Arg Arg
 115 120 125
 Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro
 130 135 140
 Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His Ser Ala
 145 150 155 160
 Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr
 165 170 175
 Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr
 180 185 190
 His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr
 195 200 205
 Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met Ile Glu Glu Tyr Pro
 225 230 235 240
 Tyr Val Val Ile Leu
 245

(2) Informaatio SEQ ID Nro:3:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 588 emäsparia
- (B) Tyyppi: nukleiinihappo
- (C) Juoste: yksi
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: cDNA

(ix) Piirre:

- (A) Nimi/avain: CDS
- (B) Sijainti: 69..509

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:3:

CACAAATTCT TCTTTCTTCC TTACTACTGA TCATTAATCT GAAAACAAAA CCAAACAAAC
60

CATTCAAA ATG ATG TAC AAA ATT TTG TGT CTT TCA TTG TTG GTC GCA GCC
110

Met Met Tyr Lys Ile Leu Cys Leu Ser Leu Leu Val Ala Ala
1 5 10

GTT GCT CGT GAT CAA GTC GAT GTC AAA GAT TGT GCC AAT CAT GAA ATC
158

Val Ala Arg Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile
15 20 25 30

AAA AAA GTT TTG GTA CCA GGA TGC CAT GGT TCA GAA CCA TGT ATC ATT
206

Lys Lys Val Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro Cys Ile Ile
35 40 45

CAT CGT GGT AAA CCA TTC CAA TTG GAA GCC GTT TTC GAA GCC AAC CAA
254

His Arg Gly Lys Pro Phe Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln
50 55 60

AAC ACA AAA ACG GCT AAA ATT GAA ATC AAA GCC TCA ATC GAT GGT TTA
302

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

GAA GTT GAT GTT CCC GGT ATC GAT CCA AAT GCA TGC CAT TAC ATG AAA
350

Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys
80 85 90

TGC CCA TTG GTT AAA GGA CAA CAA TAT GAT ATT AAA TAT ACA TGG AAT
398

Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn
95 100 105 110

GTT CCG AAA ATT GCA CCA AAA TCT GAA AAT GTT GTC GTC ACT GTT AAA
446

Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys
115 120 125

GTT ATG GGT GAT GAT GGT GTT TTG GCC TGT GCT ATT GCT ACT CAT GCT
494

Val Met Gly Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala
130 135 140

AAA ATC CGC GAT TAAATAAACA AAATTTATTG ATTTTGTAAT CACAAATGAT
546

Lys Ile Arg Asp
145

TGATTTTCTT TCCAAAAAAA AAATAAATAA AATTTTGGA AT
588

(2) Informaatio SEQ ID Nro:4:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 146 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: proteiini

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:4:

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

(2) Informaatio SEQ ID Nro:5:

(i) Sekvenssiominaisuudet:

(A) Pituus: 1072 emäsparia

(B) Tyyppi: nukleiinihappo

(C) Juoste: yksi

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: cDNA

(ix) Piirre:

(A) Nimi/avain: CDS

(B) Sijainti: 36..1001

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:5:

CGTTTTCTTC CATCAAAATT AAAAATTCAT CAAAA ATG AAA TTC GTT TTG GCC
53Met Lys Phe Val Leu Ala
1 5ATT GCC TCT TTG TTG GTA TTG AGC ACT GTT TAT GCT CGT CCA GCT TCA
101Ile Ala Ser Leu Leu Val Leu Ser Thr Val Tyr Ala Arg Pro Ala Ser
10 15 20ATC AAA ACT TTT GAA GAA TTC AAA AAA GCC TTC AAC AAA AAC TAT GCC
149Ile Lys Thr Phe Glu Glu Phe Lys Lys Ala Phe Asn Lys Asn Tyr Ala
25 30 35ACC GTT GAA GAG GAA GAA GTT GCC CGT AAA AAC TTT TTG GAA TCA TTG
197Thr Val Glu Glu Glu Glu Val Ala Arg Lys Asn Phe Leu Glu Ser Leu
40 45 50AAA TAT GTT GAA GCT AAC AAA GGT GCC ATC AAC CAT TTG TCC GAT TTG
245Lys Tyr Val Glu Ala Asn Lys Gly Ala Ile Asn His Leu Ser Asp Leu
55 60 65 70TCA TTG GAT GAA TTC AAA AAC CGT TAT TTG ATG AGT GCT GAA GCT TTT
293Ser Leu Asp Glu Phe Lys Asn Arg Tyr Leu Met Ser Ala Glu Ala Phe
75 80 85GAA CAA CTC AAA ACT CAA TTC GAT TTG AAT GCC GAA ACA AGC GCT TGC
341Glu Gln Leu Lys Thr Gln Phe Asp Leu Asn Ala Glu Thr Ser Ala Cys
90 95 100CGT ATC AAT TCG GTT AAC GTT CCA TCG GAA TTG GAT TTA CGA TCA CTG
389Arg Ile Asn Ser Val Asn Val Pro Ser Glu Leu Asp Leu Arg Ser Leu
105 110 115CGA ACT GTC ACT CCA ATC CGT ATG CAA GGA GGC TGT GGT TCA TGT TGG
437Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp
120 125 130GCT TTC TCT GGT GTT GCC GCA ACT GAA TCA GCT TAT TTG GCC TAC CGT
485Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg
135 140 145 150AAC ACG TCT TTG GAT CTT TCT GAA CAG GAA CTC GTC GAT TGC GCA TCT
533Asn Thr Ser Leu Asp Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser
155 160 165

CAA CAC GGA TGT CAC GGC GAT ACA ATA CCA AGA GGC ATC GAA TAC ATC
 581
 Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile
 170 175 180

CAA CAA AAT GGT GTC GTT GAA GAA AGA AGC TAT CCA TAC GTT GCA CGA
 629
 Gln Gln Asn Gly Val Val Glu Glu Arg Ser Tyr Pro Tyr Val Ala Arg
 185 190 195

GAA CAA CGA TGC CGA CGA CCA AAT TCG CAA CAT TAC GGT ATC TCA AAC
 677
 Glu Gln Arg Cys Arg Arg Pro Asn Ser Gln His Tyr Gly Ile Ser Asn
 200 205 210

TAC TGC CAA ATT TAT CCA CCA GAT GTG AAA CAA ATC CGT GAA GCT TTG
 725
 Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asp Val Lys Gln Ile Arg Glu Ala Leu
 215 220 225 230

ACT CAA ACA CAC ACA GCT ATT GCC GTC ATT ATT GGC ATC AAA GAT TTG
 773
 Thr Gln Thr His Thr Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu
 235 240 245

AGA GCT TTC CAA CAT TAT GAT GGA CGA ACA ATC ATT CAA CAT GAC AAT
 821
 Arg Ala Phe Gln His Tyr Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln His Asp Asn
 250 255 260

GGT TAT CAA CCA AAC TAT CAT GCC GTC AAC ATT GTC GGT TAC GGA AGT
 869
 Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Gly Ser
 265 270 275

ACA CAA GGC GAC GAT TAT TGG ATC GTA CGA AAC AGT TGG GAT ACT ACC
 917
 Thr Gln Gly Asp Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Thr
 280 285 290

TGG GGA GAT AGC GGA TAC GGA TAT TTC CAA GCC GGA AAC AAC CTC ATG
 965
 Trp Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Gln Ala Gly Asn Asn Leu Met
 295 300 305 310

ATG ATC GAA CAA TAT CCA TAT GTT GTA ATC ATG TGAACATTTG AAATTGAATA
 1018
 Met Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Ile Met
 315 320

TATTTATTTG TTTTCAAAAT AAAAACAAC ACTCTTGCGA GTATTTTTTA CTCG
 1072

(2) Ionformaatio SEQ ID Nro:6:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 321 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: proteiini

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:6:

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

[illegible]

(2) Informaatio SEQ ID Nro:7:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 491 emäsparia
(B) Tyyppi: nukleiinihappo
(C) Juoste: yksi
(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: cDNA

(ix) Piirre:

- (A) Nimi/avain: CDS
(B) Sijainti: 1..390

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:7:

GAT 48	CAA	GTC	GAT	GTT	AAA	GAT	TGT	GCC	AAC	AAT	GAA	ATC	AAA	AAA	GTA
Asp 1	Gln	Val	Asp	Val 5	Lys	Asp	Cys	Ala	Asn 10	Asn	Glu	Ile	Lys	Lys 15	Val
ATG 96	GTC	GAT	GGT	TGC	CAT	GGT	TCT	GAT	CCA	TGC	ATA	ATC	CAT	CGT	GGT
Met	Val	Asp	Gly 20	Cys	His	Gly	Ser	Asp 25	Pro	Cys	Ile	Ile	His 30	Arg	Gly
AAA 144	CCA	TTC	ACT	TTG	GAA	GCC	TTA	TTC	GAT	GCC	AAC	CAA	AAC	ACT	AAA
Lys	Pro	Phe 35	Thr	Leu	Glu	Ala	Leu 40	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln 45	Asn	Thr	Lys
ACC 192	GCT	AAA	ACT	GAA	ATC	AAA	GCC	AGC	CTC	GAT	GGT	CTT	GAA	ATT	GAT
Thr	Ala 50	Lys	Thr	Glu	Ile	Lys 55	Ala	Ser	Leu	Asp	Gly 60	Leu	Glu	Ile	Asp
GTT 240	CCC	GGT	ATT	GAT	ACC	AAT	GCT	TGC	CAT	TTT	ATG	AAA	TGT	CCA	TTG

Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Cys His Phe Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

GTT AAA GGT CAA CAA TAT GAT GCC AAA TAT ACA TGG AAT GTG CCC AAA
288

Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ala Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

ATT GCA CCA AAA TCT GAA AAC GTT GTC GTT ACA GTC AAA CTT GTT GGT
336

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

GAT AAT GGT GTT TTG GCT TGC GCT ATT GCT ACC CAC GCT AAA ATC CGT
384

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
115 120 125

GAT TAAAAAAAAA AAATAAATAT GAAAATTTTC ACCAACATCG AACAAAATTC
437

Asp
130

AATAACCAAA ATTTGAATCA AAAACGGAAT TCCAAGCTGA GCGCCGGTCG CTAC
491

(2) Ionformaatio SEQ ID Nro:8:

(i) Sekvenssiominaisuudet:

- (A) Pituus: 129 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: proteiini

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:8:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn Asn Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Met Val Asp Gly Cys His Gly Ser Asp Pro Cys Ile Ile His Arg Gly
20 25 30

Lys Pro Phe Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp Ala Asn Gln Asn Thr Lys
35 40 45

Thr Ala Lys Thr Glu Ile Lys Ala Ser Leu Asp Gly Leu Glu Ile Asp
50 55 60

Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Cys His Phe Met Lys Cys Pro Leu
65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ala Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys
85 90 95

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

Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg
 115 120 125

Asp

(2) Informaatio SEQ ID Nro:9:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 20 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:9:

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Arg
 20

(2) Informaatio SEQ ID Nro:10:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 27 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:10:

Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln
 1 5 10 15

Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly
 20 25

(2) Informaatio SEQ ID Nro:11:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:11:

Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln	Gly	Gly	Cys	Gly	Ser	Cys	Trp	Ala
1				5					10					15	
Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ala			
			20					25							

(2) Informaatio SEQ ID Nro:12:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 21 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:12:

Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ala	His	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu
1				5					10					15	
Asp	Leu	Ala	Glu	Gln											
			20												

(2) Informaatio SEQ ID Nro:13:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 22 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:13:

His	Arg	Asn	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Cys
1				5					10					15	
Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys										
			20												

Informaatio SEQ ID Nro:14:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 21 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:14:

Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile
1 5 10 15

Pro Arg Gly Ile Glu
20

Informaatio SEQ ID Nro:15:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 28 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:15:

Gly Asp Thr Ile Pro Arg Gly Ile Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val
1 5 10 15

Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:16:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 20 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:16:

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
1 5 10 15

Val Ala Arg Glu
20

Informaatio SEQ ID Nro:17:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:17:

His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr Val Ala Arg Glu
1 5 10 15

Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:18:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 19 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:18:

Gln Ser Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr
1 5 10 15

Cys Gln Ile

Informaatio SEQ ID Nro:19:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 22 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:19:

Arg Phe Gly Ile Ser Asn Tyr Cys Gln Ile Tyr Pro Pro Asn Ala Asn
1 5 10 15

Lys Ile Arg Glu Ala Leu
20

Informaatio SEQ ID Nro:20:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 24 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:20:

Tyr Pro Pro Asn Ala Asn Lys Ile Arg Glu Ala Leu Ala Gln Thr His
 1 5 10 15

Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly
 20

Informaatio SEQ ID Nro:21:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:21:

Ala Gln Thr His Ser Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu
 1 5 10 15

Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg Thr
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:22:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:22:

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

Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:23:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 23 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylytyyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:23:

Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn
1 5 10 15

Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala
20

Informaatio SEQ ID Nro:24:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 22 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylytyyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:24:

His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr
1 5 10 15

Trp Ile Val Arg Asn Ser
20

Informaatio SEQ ID Nro:25:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 24 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylytyyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:25:

Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp
 1 5 10 15

Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe
 20

Informaatio SEQ ID Nro:26:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:26:

Gly Asp Asn Gly Tyr Gly Tyr Phe Ala Ala Asn Ile Asp Leu Met Met
 1 5 10 15

Ile Glu Glu Tyr Pro Tyr Val Val Ile Leu
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:27:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 28 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:27:

Thr Asn Ala Cys Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu
 1 5 10 15

Arg Gln Met Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:28:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 24 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:28:

Ser Ile Asn Gly Asn Ala Pro Ala Glu Ile Asp Leu Arg Gln Met Arg
1 5 10 15
Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln
20

Informaatio SEQ ID Nro:29:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:29:

Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg
1 5 10 15
Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:30:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:30:

Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg Asn Gln Ser Leu
1 5 10 15
Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:31:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

- (ii) Molekyyllityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:31:

Ala Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg
 1 5 10 15

Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:32:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyyllityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:32:

Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg Asn Gln Ser Leu
 1 5 10 15

Asp Leu Ala Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:33:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 28 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyyllityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:33:

Glu Tyr Ile Gln His Asn Gly Val Val Gln Glu Ser Tyr Tyr Arg Tyr
 1 5 10 15

Val Ala Arg Glu Gln Cys Arg Arg Pro Asn Ala Gln
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:34:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:34:

Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	His	Asn	Gly	Val	Val
1				5					10					15	
Gln	Glu	Ser	Tyr	Tyr	Arg	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Ser			
			20						25						

Informaatio SEQ ID Nro:35:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:35:

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

Informaatio SEQ ID Nro:36:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 22 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:36:

Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Ala	Gln
1				5					10					15	

Thr His Ser Ala Ile Ala
20

Informaatio SEQ ID Nro:37:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:37:

Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu Asp Ala Phe Arg His Tyr Asp Gly Arg
1 5 10 15

Thr Ile Ile Gln Arg Asp Asn Gly Tyr Gln
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:38:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:38:

Arg Asp Asn Gly Tyr Gln Phe Asn Tyr His Ala Val Asn Ile Val Gly
1 5 10 15

Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:39:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:39:

Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val
1 5 10 15

Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn Trp Gly Asp Asn Gly Tyr
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:40:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 23 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:40:

Asn Ile Val Gly Tyr Ser Asn Ala Gln Gly Val Asp Tyr Trp Ile Val
1 5 10 15

Arg Asn Ser Trp Asp Thr Asn
20

Informaatio SEQ ID Nro:41:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 20 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:41:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly
20

Informaatio SEQ ID Nro:42:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyylylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:42:

His	Glu	Ile	Lys	Lys	Val	Leu	Val	Pro	Gly	Cys	His	Gly	Ser	Glu	Pro
1				5					10					15	
Cys	Ile	Ile	His	Arg	Gly	Lys	Pro	Phe							
			20					25							

Informaatio SEQ ID Nro:43:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 29 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:43:

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

Informaatio SEQ ID Nro:44:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:44:

Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys
1				5					10					15	
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	Ile	Asp	Gly							
			20					25							

Informaatio SEQ ID Nro:45:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 27 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:45:

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

Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met Lys
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:46:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:46:

Leu Glu Val Asp Val Pro Gly Ile Asp Pro Asn Ala Cys His Tyr Met
1 5 10 15

Lys Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:47:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 27 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:47:

Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn
1 5 10 15

Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:48:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

- (ii) Molekyyylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:48:

Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu
1 5 10 15

Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:49:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 25 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyyylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:49:

Val Val Thr Val Lys Val Met Gly Asp Asp Gly Val Leu Ala Cys Ala
1 5 10 15

Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:50:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen
- (ii) Molekyyylityyppi: peptidi
- (v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen
- (xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:50:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:51:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:51:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Glu Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:52:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:52:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Cys His Gly Ser Glu Pro
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:53:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:53:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Glu His Gly Ser Glu Pro
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:54:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 26 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:54:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Ser His Gly Ser Glu Pro
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:55:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:55:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Glu Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Glu His Gly Ser Glu Pro
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:56:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 26 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:56:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Ser His Gly Ser Glu Pro
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:57:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
(A) Pituus: 20 aminohappoa
(B) Tyyppi: aminohappo
(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:57:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Glu Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly
20

Informaatio SEQ ID Nro:58:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
(A) Pituus: 20 aminohappoa
(B) Tyyppi: aminohappo
(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:58:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Ser Ala Asn His Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Leu Val Pro Gly
20

Informaatio SEQ ID Nro:59:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
(A) Pituus: 16 aminohappoa
(B) Tyyppi: aminohappo
(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:59:

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

Informaatio SEQ ID Nro:60:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
(A) Pituus: 16 aminohappoa

- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:60:

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

Informaatio SEQ ID Nro:61:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 16 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:61:

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

Informaatio SEQ ID Nro:62:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 28 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:62:

Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Glu	Ala	Val	Phe	Glu	Ala	Asn	Gln	Asn	Thr	Lys
1				5					10					15	

Thr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Ser	Thr	Asp	Gly
			20					25			

Informaatio SEQ ID Nro:63:

- (i) Sekvenssin ominaisuudet:
 - (A) Pituus: 28 aminohappoa
 - (B) Tyyppi: aminohappo
 - (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:63:

Gln Leu Glu Ala Val Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Thr Ala Lys
1 5 10 15

Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val
 20 25

Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala
1 5 10 15

Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp Val Pro Gly
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:64:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 27 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylyyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:64:

Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys
1 5 10 15

Ala Ser Ile Asp Gly Leu Glu Val Asp Val Pro Gly
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:65:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 23 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:65:

Gln Asn Thr Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Ile Asp Gly
1 5 10 15

Leu Glu Val Asp Val Pro Gly
20

Informaatio SEQ ID Nro:66:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 26 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:66:

Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Trp Asn Val
1 5 10 15

Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:67:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 26 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:67:

Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ile Lys Tyr Thr Tyr Asn Val
1 5 10 15

Pro Lys Ile Ala Pro Lys Ser Glu Asn Val
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:68:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 13 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:68:

Lys Ser Glu Asn Val Val Val Thr Val Lys Val Met Gly
1 5 10

Informaatio SEQ ID Nro:69:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 23 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:69:

Thr	Val	Lys	Val	Met	Gly	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Ala	Cys	Ala	Ile	Ala
1				5					10					15	

Thr	His	Ala	Lys	Ile	Arg	Asp
				20		

Informaatio SEQ ID Nro:70:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 23 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:70:

Thr	Val	Lys	Val	Met	Gly	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala
1				5					10					15	

Thr	His	Ala	Lys	Ile	Arg	Asp
				20		

Informaatio SEQ ID Nro:71:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 23 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:71:

Thr Val Lys Val Leu Gly Asp Asp Gly Val Leu Ala Ser Ala Ile Ala
1 5 10 15

Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
20

Informaatio SEQ ID Nro:72:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 21 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:72:

Thr Ser Ala Cys Arg Ile Asn Ser Val Asn Val Pro Ser Glu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg
20

Informaatio SEQ ID Nro:73:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 27 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:73:

Glu Leu Asp Leu Arg Ser Leu Arg Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln
1 5 10 15

Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Gly
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:74:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:74

Thr Val Thr Pro Ile Arg Met Gln Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala
1 5 10 15

Phe Ser Gly Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:75:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 21 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:75

Val Ala Ala Thr Glu Ser Ala Tyr Leu Ala Tyr Arg Asn Thr Ser Leu
1 5 10 15

Asp Leu Ser Glu Gln
20

Informaatio SEQ ID Nro:76:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 22 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:76

Tyr Arg Asn Thr Ser Leu Asp Leu Ser Glu Gln Glu Leu Val Asp Cys
1 5 10 15

Ala Ser Gln His Gly Cys

20

Informaatio SEQ ID Nro:77:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 21 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:77

Glu	Leu	Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln	His	Gly	Cys	His	Gly	Asp	Thr	Ile
1				5					10					15	

Pro Arg Gly Ile Glu

20

Informaatio SEQ ID Nro:78:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 28 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:78

Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	Gln	Asn	Gly	Val
1				5					10					15	

Val Glu Glu Arg Ser Tyr Pro Tyr Val Ala Arg Glu
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:79:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 25 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:79

Gln Asn Gly Val Val Glu Glu Arg Ser Tyr Pro Tyr Val Ala Arg Glu
1 5 10 15

Gln Arg Cys Arg Arg Pro Asn Ser Gln
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:80:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 19 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:80

Gln	Arg	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ser	Gln	His	Tyr	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr
1				5				10						15	
Cys Gln Ile															

Informaatio SEQ ID Nro:81:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 22 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:81

His	Tyr	Gly	Ile	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asp	Val	Lys
1				5				10						15	
Gln Ile Arg Glu Ala Leu															
20															

Informaatio SEQ ID Nro:82:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 24 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:82

Tyr Pro Pro Asp Val Lys Gln Ile Arg Glu Ala Leu Phe Gln Thr His
1 5 10 15
Thr Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly
 20

Informaatio SEQ ID Nro:83:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:83

Thr Gln Thr His Thr Ala Ile Ala Val Ile Ile Gly Ile Lys Asp Leu
1 5 10 15
Arg Ala Phe Gln His Tyr Asp Gly Arg Thr
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:84:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:84

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

Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:85:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 15 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:85

Asp Gly Arg Thr Ile Ile Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn
1 5 10 15

Informaatio SEQ ID Nro:86:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 23 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:86

Ile Ile Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln Pro Asn Tyr His Ala Val Asn
1 5 10 15

Ile Val Gly Tyr Gly Ser Thr
20

Informaatio SEQ ID Nro:87:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 22 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:87

His Ala Val Asn Ile Val Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Gly Asp Asp Tyr
1 5 10 15

Trp Ile Val Arg Asn Ser
20

Informaatio SEQ ID Nro:88:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 24 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:88

Gln Gly Asp Asp Tyr Trp Ile Val Arg Asn Ser Trp Asp Thr Thr Trp
1 5 10 15

Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe
20

Informaatio SEQ ID Nro:89:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 26 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:89:

Gly Asp Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Gln Ala Gly Asn Asn Leu Met Met
1 5 10 15

Ile Glu Gln Tyr Pro Tyr Val Val Ile Met
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:90:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 29 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:90:

Thr	Ser	Ala	Cys	Arg	Ile	Asn	Ser	Val	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Leu	Asp
1				5					10					15	

Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln
			20					25				

Informaatio SEQ ID Nro:91:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 25 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:91:

Arg	Ile	Asn	Ser	Val	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Leu	Asp	Leu	Arg	Ser	Leu
1				5					10					15	

Arg	Thr	Val	Thr	Pro	Ile	Arg	Met	Gln
			20					25

Informaatio SEQ ID Nro:92:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:92:

Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg
1				5					10					15	

Asn	Thr	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp
			20					25				

Informaatio SEQ ID Nro:93:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 25 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:93:

Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Leu
1				5					10					15	

Asp	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp
			20					25

Informaatio SEQ ID Nro:94:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:94:

Val	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Leu
1				5				10						15	

Asp	Leu	Ser	Glu	Gln	Glu	Leu	Val	Asp	Cys	Ala	Ser	Gln
			20					25				

Informaatio SEQ ID Nro:95:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:95:

Glu	Tyr	Ile	Gln	Gln	Asn	Gly	Val	Val	Glu	Glu	Arg	Ser	Tyr	Pro	Tyr
1				5				10						15	

Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Arg	Cys	Arg	Arg	Pro	Asn	Ser	Gln
			20					25				

Informaatio SEQ ID Nro:96:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:96:

Asp	Thr	Ile	Pro	Arg	Gly	Ile	Glu	Tyr	Ile	Gln	Gln	Asn	Gly	Val	Val
1				5					10					15	

Glu	Glu	Arg	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Val	Ala	Arg	Glu	Gln	Arg
			20						25			

Informaatio SEQ ID Nro:97:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:97:

Gln	Ile	Tyr	Pro	Pro	Asp	Val	Lys	Gln	Ile	Arg	Glu	Ala	Leu	Thr	Gln
1				5					10					15	

Thr	His	Thr	Ala	Ile	Ala	Val	Ile	Ile	Gly	Ile	Lys	Asp
			20						25			

Informaatio SEQ ID Nro:98:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 22 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:98:

Gln Ile Tyr Pro Pro Asp Val Lys Gln Ile Arg Glu Ala Leu Thr Gln
1 5 10 15

Thr His Thr Ala Ile Ala
20

Informaatio SEQ ID Nro:99:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:99:

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

Thr Ile Ile Gln His Asp Asn Gly Tyr Gln
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:100:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 25 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:100:

His	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gln	Pro	Asn	Tyr	His	Ala	Val	Asn	Ile	Val	Gly
1				5				10						15	

Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Gly	Asp	Asp	Tyr
			20					25

Informaatio SEQ ID Nro:101:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 29 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:101:

Asn	Ile	Val	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Gly	Asp	Asp	Tyr	Trp	Ile	Val
1				5				10						15	

Arg	Asn	Ser	Trp	Asp	Thr	Thr	Trp	Gly	Asp	Ser	Gly	Tyr
			20					25				

Informaatio SEQ ID Nro:102:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 23 aminohappoa

- (B) Tyyppi: aminohappo
(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:102:

Asn Ile Val Gly Tyr Gly Ser Thr Gln Gly Asp Asp Tyr Trp Ile Val
1 5 10 15

Arg Asn Ser Trp Asp Thr Thr
20

Informaatio SEQ ID Nro:103:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 20 aminohappoa
(B) Tyyppi: aminohappo
(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:103:

Asp Gln Val Asp Val Lys Asp Cys Ala Asn Asn Glu Ile Lys Lys Val
1 5 10 15

Met Val Asp Gly
20

Informaatio SEQ ID Nro:104:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 25 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:104:

Asn	Glu	Ile	Lys	Lys	Val	Met	Val	Asp	Gly	Cys	His	Gly	Ser	Asp	Pro
1				5					10					15	

Cys	Ile	Ile	His	Arg	Gly	Lys	Pro	Phe
			20					25

Informaatio SEQ ID Nro:105:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 29 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:109:

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

Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln	Asn	Thr	Lys	Thr	Ala
				20					25			

Informaatio SEQ ID Nro:106:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 19 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:106:

His	Arg	Gly	Lys	Pro	Phe	Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln
1				5					10					15	

Asn Thr Lys

Informaatio SEQ ID Nro:107:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 25 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:107:

Thr	Leu	Glu	Ala	Leu	Phe	Asp	Ala	Asn	Gln	Asn	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys
1				5					10					15	

Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu Asp Gly
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:108:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:108:

Gln Asn Thr Lys Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu Asp Gly
 1 5 10 15

Leu Glu Ile Asp Val Pro Gly Ile Asp Thr
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:109:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 27 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:109:

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

Gly Ile Asp Thr Asn Ala Cys His Phe Met Lys
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:110:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 26 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:110:

Leu Glu Ile Asp Val Pro Gly Ile Asp Thr Asn Ala Cys His Phe Met
 1 5 10 15

Lys Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr
 20 25

Informaatio SEQ ID Nro:111:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 27 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:111:

Cys Pro Leu Val Lys Gly Gln Gln Tyr Asp Ala Lys Tyr Thr Trp Asn
 1 5 10 15

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

Val Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala Ile Ala Thr His Ala Lys
20 25 30

Ile Arg Asp
35

Informaatio SEQ ID Nro:114:

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 25 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:114:

Val Val Thr Val Lys Leu Val Gly Asp Asn Gly Val Leu Ala Cys Ala
1 5 10 15

Ile Ala Thr His Ala Lys Ile Arg Asp
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:115

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

(A) Pituus: 28 aminohappoa

(B) Tyyppi: aminohappo

(D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:115:

Lys Pro Phe Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp Ala Asn Gln Asn Thr Lys
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu Asp Gly
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:116

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 28 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:116:

Thr Leu Glu Ala Leu Phe Asp Ala Asn Gln Asn Thr Lys Thr Ala Lys
1 5 10 15

Ile Glu Ile Lys Ala Ser Leu Asp Gly Leu Glu Ile
20 25

Informaatio SEQ ID Nro:117

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 22 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyyllityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:117:

His Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln Asp Leu Val Asp Cys
1 5 10 15

Ala Ser Gln His Gly Cys
20

Informaatio SEQ ID Nro:118

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 21 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:118:

Asp Leu Val Asp Cys Ala Ser Gln His Gly Cys His Gly Asp Thr Ile
1 5 10 15

Pro Arg Gly Ile Glu
20

Informaatio SEQ ID Nro:119

(i) Sekvenssin ominaisuudet:

- (A) Pituus: 29 aminohappoa
- (B) Tyyppi: aminohappo
- (D) Topologia: lineaarinen

(ii) Molekyylityyppi: peptidi

(v) Fragmenttityyppi: N-terminaalinen

(xi) Sekvenssin kuvaus: SEQ ID Nro:119:

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

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenin eristetyin peptidin valmistamiseksi, mainitun peptidin käsittäessä ainakin yhden mainitun proteiiniallergeenin T-solu-epitoopin, mainitulla peptidillä ollen positiivisuusindeksi, joka on ainakin noin 150, ja keskimääräinen T-solun stimulaatioindeksi, joka on vähintään noin 4,0, määritettynä mainitulle proteiiniallergeenille herkkien yksilöiden populaatiossa, **tunnettu** siitä, että peptidi valmistetaan synteettisellä menetelmällä tai rekombinantti-DNA-menetelmällä, ja että mainittu peptidi käsittää kaikki tai T-solu-epitoopin sisältävän osan alueesta 1, alueesta 2, alueesta 3, alueesta 4, alueesta 5, alueesta 6a, alueesta 6b, alueesta 7, alueesta 8, alueesta 9, alueesta 10, jolloin alue 1 käsittää Der p I- ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 1-28; alue 2 käsittää Der p I- ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 36-68; alue 3 käsittää Der p I- ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 74-109; alue 4 käsittää Der p I- ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 118-139; alue 5 käsittää Der p I- ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 141-166; alue 6a käsittää Der p I- ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 161-185; alue 6b käsittää Der p I ja Der f I -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 173-201; alue 7 käsittää Der p II- ja Der f II -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 1-26; alue 8 käsittää Der p II- ja Der f II -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 33-67; alue 9 käsittää Der p II- ja Der f II -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 79-104 ja alue 10 käsittää Der p II- ja Der f II -proteiiniallergeenin aminohappotähteet 107-129.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eristetty peptidi valitaan ryhmästä, joka koostuu: DP I-1 (SEQ ID Nro:9); DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27); DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28); DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33); DP I-23.2 (SEQ ID Nro:34); DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36) ja DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37).

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eristetty peptidi valitaan ryhmästä, joka koostuu: DP I-21.2, DP I 23.1, DP I-26.1, DP II-20.6, DP II-22, DP II-25.2 ja DF I-22.2, kuten kuvioissa 3 ja 4 on esitetty.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eristetty peptidi ei sido immunoglobuliini E:tä, joka on spesifinen suvun Dermatophagoides proteiiniallergeenille oleellisena prosenttiosuutena yksilöistä, jotka ovat herkkiä proteiiniallergeenille, tai jos peptidin sitomista mainittuun immunoglobuliini E:hen tapahtuu, sellainen sitominen ei johda välittäjäaineiden vapautumiseen syöttösoluista tai basofiileistä oleellisena prosenttiosuutena yksilöistä, jotka ovat herkkiä proteiiniallergeenille.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eristetty peptidi sitoo immunoglobuliini E:tä oleellisesti pienemmässä määrin kuin proteiiniallergeeni, josta peptidi on johdettu, sitoo mainittua immunoglobuliini E:tä.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yksilöiden populaatio on vähintään 9 yksilöä.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yksilöiden populaatio on vähintään 30 yksilöä.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eristetty peptidi käsittää ainakin kaksi T-soluepitooppia.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että eristetty peptidi annettuna yksilölle, joka on herkkä pölypunkille, indusoi T-soluvastustuskyvyttömyyden yksilössä tai modifioi T-solujen lymfokiinieritysprofiilia yksilössä.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu eristetty peptidi valitaan ryhmästä, joka koostuu:

- 5 a) DP I-1 (SEQ ID Nro:9);
- b) DP I-2 (SEQ ID Nro:10);
- c) DP I-3 (SEQ ID Nro:11);
- d) DP I-4 (SEQ ID Nro:12);
- e) DP I-11.1 (SEQ ID Nro:13);
- 10 f) DP I-12.1 (SEQ ID Nro:14);
- g) DP I-5 (SEQ ID Nro:15);
- h) DP I-13 (SEQ ID Nro:17);
- i) DP I-14 (SEQ ID Nro:18);
- j) DP I-15 (SEQ ID Nro:19);
- 15 k) DP I-6.1 (SEQ ID Nro:20);
- l) DP I-7.1 (SEQ ID Nro:21);
- m) DP I-8 (SEQ ID Nro:22);
- n) DP I-9 (SEQ ID Nro:23);
- o) DP I-16 (SEQ ID Nro:24);
- 20 p) DP I-10 (SEQ ID Nro:25);
- q) DP I-17 (SEQ ID Nro:26);
- r) DP I-21.1 (SEQ ID Nro:27);
- s) DP I-21.2 (SEQ ID Nro:28);
- t) DP I-22.1 (SEQ ID Nro:29);
- 25 u) DP I-22.2 (SEQ ID Nro:30);
- v) DP I-22.3 (SEQ ID Nro:31);
- w) DP I-22.4 (SEQ ID Nro:32);
- x) DP I-23.1 (SEQ ID Nro:33);
- y) DP I-23.2 (SEQ ID Nro:34);
- 30 z) DP I-25.1 (SEQ ID Nro:35);
- a') DP I-25.2 (SEQ ID Nro:36);
- b') DP I-26.1 (SEQ ID Nro:37);
- c') DP I-27.1 (SEQ ID Nro:38);
- d') DP I-28.1 (SEQ ID Nro:39);
- 35 e') DP I-28.2 (SEQ ID Nro:40),
- f') DP I-5.1 (SEQ ID Nro:16),
- g') DF I-1 (SEQ ID Nro:72);
- h') DF I-2.1 (SEQ ID Nro:73);

i') DF I-3 (SEQ ID Nro:74);
 j') DF I-4 (SEQ ID Nro:75);
 k') DF I-11 (SEQ ID Nro:76);
 l') DF I-12 (SEQ ID Nro:77);
 5 m') DF I-5 (SEQ ID Nro:78);
 n') DF I-13 (SEQ ID Nro:79);
 o') DF I-14 (SEQ ID Nro:80);
 p') DF I-15 (SEQ ID Nro:81);
 q') DF I-6 (SEQ ID Nro:82);
 10 r') DF I-7 (SEQ ID Nro:83);
 s') DF I-8.1 (SEQ ID Nro:84);
 t') DF I-8 (SEQ ID Nro:85);
 u') DF I-9 (SEQ ID Nro:86);
 v') DF I-16 (SEQ ID Nro:87);
 15 w') DF I-10 (SEQ ID Nro:88);
 x') DF I-17 (SEQ ID Nro:89);
 y') DF I-21.1 (SEQ ID Nro:90);
 z') DF I-21.2 (SEQ ID Nro:91);
 aa) DF I-22.1 (SEQ ID Nro:92);
 20 bb) DF I-22.2 (SEQ ID Nro:93);
 cc) DF I-22.4 (SEQ ID Nro:94);
 dd) DF I-23.1 (SEQ ID Nro:95);
 ee) DF I-23.2 (SEQ ID Nro:96);
 ff) DF I-25.1 (SEQ ID Nro:97);
 25 gg) DF I-25.2 (SEQ ID Nro:98);
 hh) DF I-26.1 (SEQ ID Nro:99);
 ii) DF I-27.1 (SEQ ID Nro:100);
 jj) DF I-28.1 (SEQ ID Nro:101);
 kk) DF I-28.2 (SEQ ID Nro:102);
 30 ll) DP II-20 (SEQ ID Nro:50);
 mm) DP II-20.1 (SEQ ID Nro:51);
 nn) DP II-20.2 (SEQ ID Nro:52);
 oo) DP II-20.3 (SEQ ID Nro:53);
 pp) DP II-20.4 (SEQ ID Nro:54);
 35 qq) DP II-20.5 (SEQ ID Nro:55);
 rr) DP II-20.6 (SEQ ID Nro:56);
 ss) DP II-1 (SEQ ID Nro:41);
 tt) DP II-2 (SEQ ID Nro:42);

uu) DP II-3.1 (SEQ ID Nro:43);
 vv) DP II-4 (SEQ ID Nro:44);
 ww) DP II-5 (SEQ ID Nro:45);
 xx) DP II-6 (SEQ ID Nro:46);
 5 yy) DP II-7 (SEQ ID Nro:47);
 zz) DP II-8 (SEQ ID Nro:48);
 b'') DP II-9 (SEQ ID Nro:49);
 c'') DP II-1.1 (SEQ ID Nro:57);
 d'') DP II-1.2 (SEQ ID Nro:58);
 10 e'') DP II-2.1 (SEQ ID Nro:59);
 f'') DP II-2.2 (SEQ ID Nro:60);
 g'') DP II-2.3 (SEQ ID Nro:61);
 h'') DP II-21 (SEQ ID Nro:62);
 i'') DP II-22 (SEQ ID Nro:63);
 15 j'') DP II-26 (SEQ ID Nro:64);
 k'') DP II-26.1 (SEQ ID Nro:65);
 l'') DP II-23 (SEQ ID Nro:66);
 m'') DP II-23.1 (SEQ ID Nro:67);
 n'') DP II-24 (SEQ ID Nro:68);
 20 o'') DP II-25 (SEQ ID Nro:69);
 p'') DP II-25.1 (SEQ ID Nro:70);
 q'') DP II-25.2 (SEQ ID Nro:71);
 r'') DF II-1 (SEQ ID Nro:103);
 s'') DF II-2 (SEQ ID Nro:104);
 25 t'') DF II-13.1 (SEQ ID Nro:105);
 u'') DF II-3.1 (SEQ ID Nro:106);
 v'') DF II-4.5 (SEQ ID Nro:107);
 w'') DF II-4.3 (SEQ ID Nro:108);
 x'') DF II-15 (SEQ ID Nro:109);
 30 y'') DF II-16 (SEQ ID Nro:110);
 z'') DF II-17 (SEQ ID Nro:111);
 a'') DF II-18 (SEQ ID Nro:112);
 aaa) DF II-19 (SEQ ID Nro:113);
 bbb) DF II-19.1 (SEQ ID Nro:114);
 35 ccc) DF II-21 (SEQ ID Nro:115); ja
 ddd) DF II-22 (SEQ ID Nro:116).

11. Eristetty nukleiinihappo, **tunnettu** siitä, että sen sekvenssi koodaa patenttivaatimuksessa 1 määriteltyä peptidiä.

12. Menetelmä pölypunkkiherkkyyden määrittämiseksi yksilössä,
5 **tunnettu** siitä, että yhdistetään verinäyte, joka on saatu yksilöltä, ainakin yhden patenttivaatimuksessa 1 määritellyn peptidin kanssa, olosuhteissa, jotka ovat sopivat sitomaan verikomponentteja peptidin kanssa ja määritetään laajuus, millä sellainen sitominen tapahtuu osoittaen yksilön pölypunkkiherkkyyden.
10

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että laajuus, millä sitominen tapahtuu, määritetään arvioimalla T-solutoiminta, T-solun lisääntyminen tai niiden yhdistelmä.
15

14. Menetelmä terapeutin koostumuksen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että yhdistetään ainakin yksi patenttivaatimuksessa 1 määritelty, eristetty peptidi farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen kanssa.
20

15. Menetelmä terapeutin koostumuksen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että yhdistetään ainakin kaksi patenttivaatimuksessa 1 määriteltyä peptidiä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai laimentimen kanssa, jotka peptidit on johdettu suvun Dermatophagoides samasta tai eri proteiiniallergeenista.
25

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en isolerad peptid av en proteinallergen hos släktet Dermatophagoides varvid nämna peptid innefattar åtminstone en T-cellepitop av nämnda proteinallergen, varvid nämnda peptid har ett positivitetsindex som är åtminstone ca 150, och ett T-cellsstimuleringsindexmedeltal som är åtminstone ca 4,0, bestämt i en individpopulation känsliga för nämnda proteinallergen, **kännetecknat** av
30
35

att peptiden framställs enligt ett syntetiskt förfarande eller ett rekombinant-DNA-förfarande, och att nämnda peptid innefattar allt av eller en T-cellepitopinnehållande del av region 1, region 2, region 3, region 4, region 5, region 6a, region 6b, region 7, region 8, region 9, region 10, varvid region 1 innefattar aminosyraresterna 1-28 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 2 innefattar aminosyraresterna 36-68 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 3 innefattar aminosyraresterna 74-109 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 4 innefattar aminosyraresterna 118-139 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 5 innefattar aminosyraresterna 141-166 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 6a innefattar aminosyraresterna 161-185 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 6b innefattar aminosyraresterna 173-201 från proteinallergenerna Der p I och Der f I, region 7 innefattar aminosyraresterna 1-26 från proteinallergenerna Der p II och Der f II, region 8 innefattar aminosyraresterna 33-67 från proteinallergenerna Der p II och Der f II, region 9 innefattar aminosyraresterna 79-104 från proteinallergenerna Der p II och Der f II och region 10 innefattar aminosyraresterna 107-129 från proteinallergenerna Der p II och Der f II.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den isolerade peptiden väljs ur en grupp som består av: DP I-1 (SEQ ID Nr:9); DP I-21.1 (SEQ ID Nr:27); DP I-21.2 (SEQ ID Nr:28); DP I-23.1 (SEQ ID Nr:33); DP I-23.2 (SEQ ID Nr:34); DP I-25.2 (SEQ ID Nr:36) och DP I-26.1 (SEQ ID Nr:37).

3. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den isolerade peptiden väljs ur en grupp som består av: DP I-21.2, DP I 23.1, DP I-26.1, DP II-20.6, DP II-22, DP II-25.2 och DF I-22.2, såsom presenteras i figurerna 3 och 4.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den isolerade peptiden inte binder immunoglobulin E, som är specifik för en proteinallergen av släktet Dermatophagoides hos ett betydelsefullt procentandel individer känsliga för proteinallergenet, eller om peptidens bindning till nämnda immuno-

globulin E uppträder, resulterar inte en sådan bindning i frigörandet av mediatorer från mastceller eller basofiler hos ett betydelsefullt procentandel individer känsliga för proteinallergenet.

- 5 5. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den isolerade peptiden binder immunoglobulin E i väsentligen mindre utsträckning än vad det proteinallergen från vilket peptiden är härledd, binder nämnda immunoglobulin E.
- 10 6. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att individpopulationen utgörs av åtminstone 9 individer.
7. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att individpopulationen utgörs av åtminstone 30 individer.
8. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den isolerade peptiden innefattar åtminstone två T-cellepitoper.
- 15 9. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den isolerade peptiden, när den administreras till en individ som är känslig för dammkvalster, inducerar T-cellsanergi hos individen eller modifierar den lymfokina sekrektionsprofilen i T-celler hos individen.
- 20 10. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att nämnda isolerade peptid väljs ur en grupp som består av:
- 25 a) DP I-1 (SEQ ID Nr:9);
b) DP I-2 (SEQ ID Nr:10);
c) DP I-3 (SEQ ID Nr:11);
25 d) DP I-4 (SEQ ID Nr:12);
e) DP I-11.1 (SEQ ID Nr:13);
f) DP I-12.1 (SEQ ID Nr:14);
g) DP I-5 (SEQ ID Nr:15);
h) DP I-13 (SEQ ID Nr:17);
30 i) DP I-14 (SEQ ID Nr:18);
j) DP I-15 (SEQ ID Nr:19);
k) DP I-6.1 (SEQ ID Nr:20);
l) DP I-7.1 (SEQ ID Nr:21);

- m) DP I-8 (SEQ ID Nr:22);
 n) DP I-9 (SEQ ID Nr:23);
 o) DP I-16 (SEQ ID Nr:24);
 p) DP I-10 (SEQ ID Nr:25);
 5 q) DP I-17 (SEQ ID Nr:26);
 r) DP I-21.1 (SEQ ID Nr:27);
 s) DP I-21.2 (SEQ ID Nr:28);
 t) DP I-22.1 (SEQ ID Nr:29);
 u) DP I-22.2 (SEQ ID Nr:30);
 10 v) DP I-22.3 (SEQ ID Nr:31);
 w) DP I-22.4 (SEQ ID Nr:32);
 x) DP I-23.1 (SEQ ID Nr:33);
 y) DP I-23.2 (SEQ ID Nr:34);
 z) DP I-25.1 (SEQ ID Nr:35);
 15 a') DP I-25.2 (SEQ ID Nr:36);
 b') DP I-26.1 (SEQ ID Nr:37);
 c') DP I-27.1 (SEQ ID Nr:38);
 d') DP I-28.1 (SEQ ID Nr:39);
 e') DP I-28.2 (SEQ ID Nr:40);
 20 f') DP I-5.1 (SEQ ID Nr:16);
 g') DF I-1 (SEQ ID Nr:72);
 h') DF I-2.1 (SEQ ID Nr:73);
 i') DF I-3 (SEQ ID Nr:74);
 j') DF I-4 (SEQ ID Nr:75);
 25 k') DF I-11 (SEQ ID Nr:76);
 l') DF I-12 (SEQ ID Nr:77);
 m') DF I-5 (SEQ ID Nr:78);
 n') DF I-13 (SEQ ID Nr:79);
 o') DF I-14 (SEQ ID Nr:80);
 30 p') DF I-15 (SEQ ID Nr:81);
 q') DF I-6 (SEQ ID Nr:82);
 r') DF I-7 (SEQ ID Nr:83);
 s') DF I-8.1 (SEQ ID Nr:84);
 t') DF I-8 (SEQ ID Nr:85);
 35 u') DF I-9 (SEQ ID Nr:86);
 v') DF I-16 (SEQ ID Nr:87);
 w') DF I-10 (SEQ ID Nr:88);
 x') DF I-17 (SEQ ID Nr:89);

	y')	DF I-21.1 (SEQ ID Nr:90);
	z')	DF I-21.2 (SEQ ID Nr:91);
	aa)	DF I-22.1 (SEQ ID Nr:92);
	bb)	DF I-22.2 (SEQ ID Nr:93);
5	cc)	DF I-22.4 (SEQ ID Nr:94);
	dd)	DF I-23.1 (SEQ ID Nr:95);
	ee)	DF I-23.2 (SEQ ID Nr:96);
	ff)	DF I-25.1 (SEQ ID Nr:97);
	gg)	DF I-25.2 (SEQ ID Nr:98);
10	hh)	DF I-26.1 (SEQ ID Nr:99);
	ii)	DF I-27.1 (SEQ ID Nr:100);
	jj)	DF I-28.1 (SEQ ID Nr:101);
	kk)	DF I-28.2 (SEQ ID Nr:102);
	ll)	DP II-20 (SEQ ID Nr:50);
15	mm)	DP II-20.1 (SEQ ID Nr:51);
	nn)	DP II-20.2 (SEQ ID Nr:52);
	oo)	DP II-20.3 (SEQ ID Nr:53);
	pp)	DP II-20.4 (SEQ ID Nr:54);
	qq)	DP II-20.5 (SEQ ID Nr:55);
20	rr)	DP II-20.6 (SEQ ID Nr:56);
	ss)	DP II-1 (SEQ ID Nr:41);
	tt)	DP II-2 (SEQ ID Nr:42);
	uu)	DP II-3.1 (SEQ ID Nr:43);
	vv)	DP II-4 (SEQ ID Nr:44);
25	ww)	DP II-5 (SEQ ID Nr:45);
	xx)	DP II-6 (SEQ ID Nr:46);
	yy)	DP II-7 (SEQ ID Nr:47);
	zz)	DP II-8 (SEQ ID Nr:48);
	b'')	DP II-9 (SEQ ID Nr:49);
30	c'')	DP II-1.1 (SEQ ID Nr:57);
	d'')	DP II-1.2 (SEQ ID Nr:58);
	e'')	DP II-2.1 (SEQ ID Nr:59);
	f'')	DP II-2.2 (SEQ ID Nr:60);
	g'')	DP II-2.3 (SEQ ID Nr:61);
35	h'')	DP II-21 (SEQ ID Nr:62);
	i'')	DP II-22 (SEQ ID Nr:63);
	j'')	DP II-26 (SEQ ID Nr:64);
	k'')	DP II-26.1 (SEQ ID Nr:65);

l'') DP II-23 (SEQ ID Nr:66);
 m'') DP II-23.1 (SEQ ID Nr:67);
 n'') DP II-24 (SEQ ID Nr:68);
 o'') DP II-25 (SEQ ID Nr:69);
 5 p'') DP II-25.1 (SEQ ID Nr:70);
 q'') DP II-25.2 (SEQ ID Nr:71);
 r'') DF II-1 (SEQ ID Nr:103);
 s'') DF II-2 (SEQ ID Nr:104);
 t'') DF II-13.1 (SEQ ID Nr:105);
 10 u'') DF II-3.1 (SEQ ID Nr:106);
 v'') DF II-4.5 (SEQ ID Nr:107);
 w'') DF II-4.3 (SEQ ID Nr:108);
 x'') DF II-15 (SEQ ID Nr:109);
 y'') DF II-16 (SEQ ID Nr:110);
 15 z'') DF II-17 (SEQ ID Nr:111);
 a''') DF II-18 (SEQ ID Nr:112);
 aaa) DF II-19 (SEQ ID Nr:113);
 bbb) DF II-19.1 (SEQ ID Nr:114);
 ccc) DF II-21 (SEQ ID Nr:115); och
 20 ddd) DF II-22 (SEQ ID Nr:116).

11. Isolerad nukleinsyra, **kännetecknad** av att den har en sekvens som kodar den i patentkrav 1 definierade peptiden.

12. Förfarande för bestämmande av dammkvalsterkänslighet hos en individ, **kännetecknat** av att man kombinerar ett blodprov, som tagits från individen, med åtminstone en i patentkrav 1 definierad peptid, vid betingelser vilka är lämpliga för att binda blodkomponenter till peptiden och definierar omfattningen av denna bindning såsom indikator på individens dammkvalsterkänslighet.

13. Förfarande enligt patentkrav 12, **kännetecknat** av att den omfattning i vilken bindningen sker, bestäms genom att bedöma T-cellsaktiviteten, T-cellens proliferering eller en kombination av dessa.

14. Förfarande för framställning av en terapeutisk sammansättning, **kännetecknat** av att man kombinerar åtminstone en i

patentkrav 1 definierad, isolerad peptid med en farmaceutiskt acceptabel bärare eller diluent.

- 5 15. Förfarande för framställning av en terapeutisk sammansättning, **kännetecknat** av att man kombinerar åtminstone två i patentkrav 1 definierade peptider med en farmaceutiskt acceptabel bärare eller diluent, vilka peptider är härledda ur samma eller olika proteinallergener hos släktet Dermatophagoides.



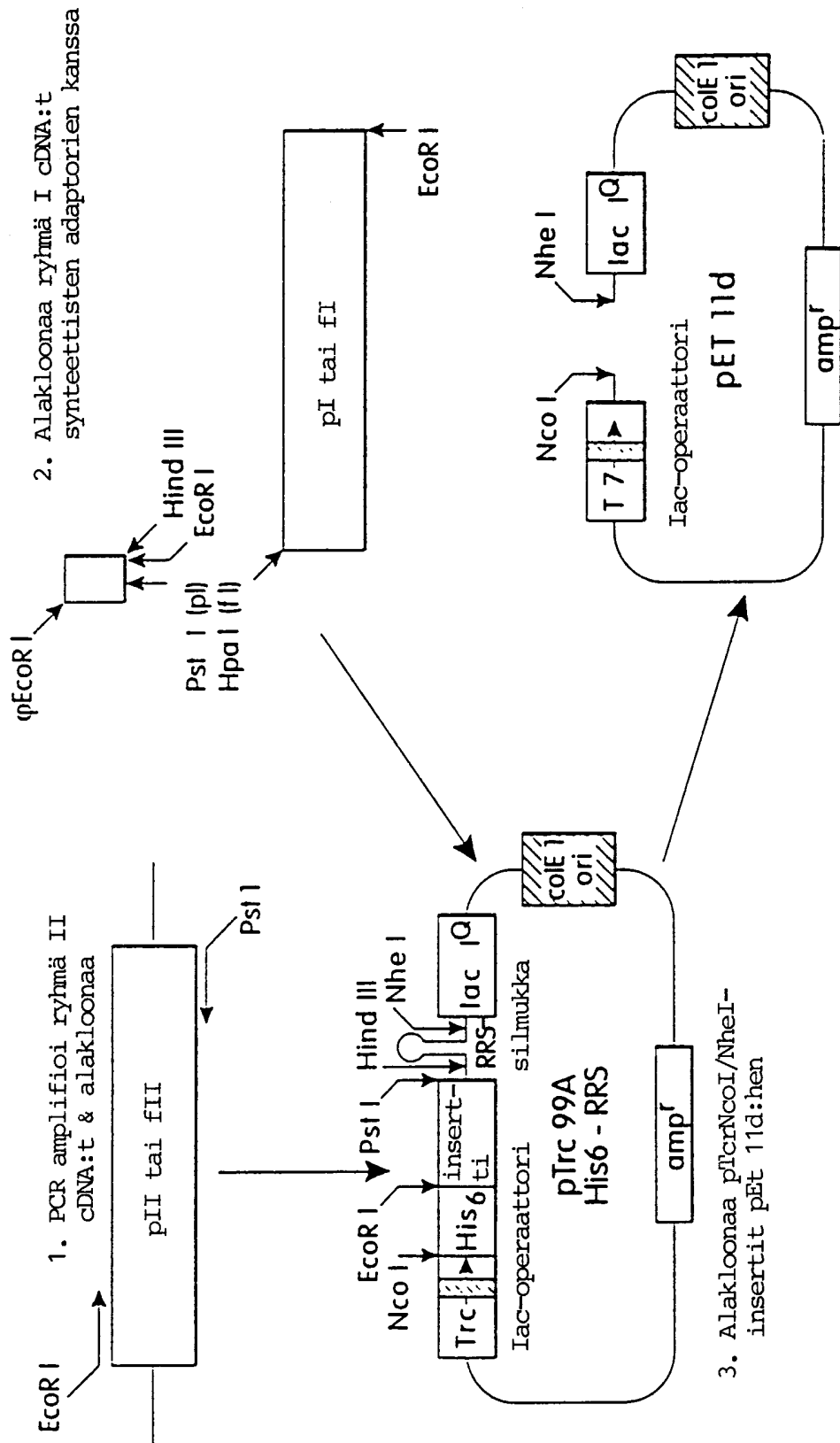


Fig. 1

Der fI adaptori
 5' -AATTACCTCTGCTTGCCGTATCAACTCTGTAAACGGGAATTCA-3'Hind III
 pEcor I 3' -ATGGAGACGAACGGCATAGTTGAGACAATTGCGCCTTAAGTTCGA-5'
 Hpa I Ecor I

Der pI adaptori
 5' -AATTACCAACGCCCTGCAGGCGGAAGAAATTCA-3'Hind III
 pEcor I 3' -ATGGTTGCGGACGTCGCCCTTCTTAAGTTCGA-5'
 Pst I Ecor I

Fig. 2a

5' Der fII/pII aluke
 5' -GGGAATTCGATCAAGTCGATGTCAA-3'
 3' fII/pII aluke
 5' -GGCTGCAGTTATATTAAATCGCGGATTT-3'
 Der fII mutagenesi-aluke
 5' -AATTGAAATCAAAGCCA-3'

Fig. 2b

Peptidi nimi

DPI-1(1-20)
 DPI-2(13-39)
 DPI-3(21-49)
 DPI-4(40-60)
 DPI-11.1(50-71)
 DPI-12.1(61-81)
 DPI-5(73-100)
 DPI-5.1(81-100)
 DPI-13(85-109)
 DPI-14(101-119)
 DPI-15(110-131)
 DPI-6.1(120-143)
 DPI-7.1(132-157)
 DPI-8(144-169)
 DPI-9(158-180)
 DPI-16(170-191)
 DPI-10(181-204)
 DPI-17(197-222)
 DPI-21.1(1-28)
 DPI-21.2(5-28)
 DPI-22.1(36-64)
 DPI-22.2(40-64)
 DPI-22.3(36-60)
 DPI-22.4(40-68)
 DPI-23.1(81-109)
 DPI-23.2(74-102)
 DPI-25.1(118-146)

TNAC SING* NAPA EIDL RQMR
 EIDL RQMR TVTP I RMQG GSCWAFSG
 TVTP I RMQG GSCWAFSGVAATESAYLA
 VAATESAYLAHRNQSLDLAEQ
 HRNQSLDLAEQELVDCASQHG
 ELVDCASQHGCHGDTIPRGIE
 GDTIPRGIEYIQHNGVVQESYRYVARE
 EYIQHNGVVQESYRYVARE
 HNGVVQESYRYVAREQSCRRPNAQ
 QSCRRPNAQRFGISNYCQI
 RFGISNYCQIYPPNANKIREAL
 YPPNANKIREALAQTHSAIAVIG
 AQTHSAIAVIGIKDLDAFRHYDGR
 IKDLDAFRHYDGRITIIQRDNGYQPNY
 IQRDNGYQPNYHNAVNI VGSNA
 HAVNI VGSNAQGV DWI VRNS
 QGV DWI VRNSWD TNWGDNGYGYF
 GDNGYGYFAANIDLMMIEEYPYVIL
 TNAC SING* NAPA EIDL RQMR TVTP I RMQ
 SING* NAPA EIDL RQMR TVTP I RMQ
 AFSGVAATESAYLAHRNQSLDLAEQELVD
 VAATESAYLAHRNQSLDLAEQELVD
 AFSGVAATESAYLAHRNQSLDLAEQ
 VAATESAYLAHRNQSLDLAEQELVD
 EYIQHNGVVQESYRYVAREQSCRRPNAQ
 DTIPRGIEYIQHNGVVQESYRYVAREQS
 QIYPPNANKIREALAQTHSAIAVIGIKD

Fig. 3

001004 04100

DPI-25.2(118-139)
DPI-26.1(141-166)
DPI-27.1(161-185)
DPI-28.1(173-201)
DPI-28.2(173-195)
DPII-1(1-20)
DPII-2(11-35)
DPII-3.1(22-50)
DPII-4(36-60)
DPII-5(51-77)
DPII-6(61-86)
DPII-7(78-104)
DPII-8(87-112)
DPII-9(105-129)
DPII-20(1-26)
DPII-20.1(1-26)E8
DPII-20.2(1-26)S8
DPII-20.3(1-26)E21
DPII-20.4(1-26)S21
DPII-20.5(1-26)E8E21
DPII-20.6(1-26)S8S21

QIYPPNANKIREALAQTHSAIA
IIGIKDLDAFRHYDGRTHIQRDNNGYQ
RDNGYQPNYHAVNIVGYSNAQGVDDY
NIVGYSNAQGVDDYWIVRNSWDTNWGDNGY
NIVGYSNAQGVDDYWIVRNSWDTN
DQVDVKDCANHEIKKVLVPG
HEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGKPF
HGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNTKTA
QLEAVFEANQNTKTAKEIKASIDG
KIEIKASIDGLEVDVPGIDPNACHYMK
LEVDPGIDPNACHYMKCPLVKGQQY
CPLVKGQQYDIKYTNVNPKEAPKSENV
DIKYTNVNPKEAPKSENVVTVKVMG
VTVKVMGDDGVLACAIATHAKIRD
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGSHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGSHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGSHGSE
DQVDVKDCANHEIKKVLVPGSHGSE

Fig. 3 (jatk.)

DP11-1.1(1-20)E8	DQVDVKDEANHEIKKVLVPG
DP11-1.2(1-20)S8	DQVDVKDSANHEIKKVLVPG
DP11-2.1(11-26)	HEIKKVLVPGCHGSEP
DP11-2.2(11-26)E21	HEIKKVLVPGCHGSEP
DP11-2.3(11-26)S21	HEIKKVLVPGSHGSEP
DP11-21(33-60)	KPFQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDG
DP11-22(36-63)	QLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEV
DP11-26(41-67)	FEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPG
DP11-26.1(45-67)	QNTKTAKIEIKASIDGLEVDVPG
DP11-23(79-104)	PLVKGQQYDIKYTNVNPKIAPKSENV
DP11-23.1(79-104)Y92	PLVKGQQYDIKYTYNVNPKIAPKSENV
DP11-24(100-112)	KSENVVTVKVMG
DP11-25(107-129)	TVKVMGDDGVLA CAIATHAKIRD
DP11-25.1(107-129)E119	TVKVMGDDGVLA EAIATHAKIRD
DP11-25.2(107-129)L111S119	TVKVLGDDGVLA SAIATHAKIRD

Fig. 3 (jat.k.)

Peptidi nimi

DFI-1(1-20)	TSACRINSVNPSELDLRLSLR
DFI-2.1(13-39)	ELDLRLSLRTVTPIRMQGGCGSCWAFSG
DFI-3(21-49)	TVTPIRMQGGCGSCWAFSGVAATESAYLA
DFI-4(40-60)	VAAATESAYLAYRNTSLDLSEQ
DFI-11(50-71)	YRNTSLDLSEQELVDCASQHGC
DFI-12(61-81)	ELVDCASQHCHGDTIPRGIE
DFI-5(73-100)	GDTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVARE
DFI-13(85-109)	QNGVVEERSYPYVAREQRCRRPNSQ
DFI-14(101-119)	QRCRRPNSQHYGISNYCQI
DFI-15(110-131)	HYGISNYCQIYPPDVVKQIREAL
DFI-6(120-143)	YPPDVVKQIREALTQHTAIAVIIIG
DFI-7(132-157)	TQHTAIAVIIIGIKDLRAFRHYDGRT
DFI-8.1(144-169)	IKDLRAFRHYDGRTIIQHDNGYQPNY
DFI-8(154-168)	DGRTIIQHDNGYQPN
DFI-9(158-180)	IIQHDNGYQPNYHAVNIVGYGST
DFI-16(170-191)	HAVNIVGYGSTQGDDYWI VRNS
DFI-10(181-204)	QGDDYWI VRNSWDTTWGDSGYGYF
DFI-17(197-222)	GDSGYGYFQAGNNLMMIEQYPYVIM
DFI-21.1(1-28)	TSACRINSVNPSELDLRLSLRTVTPIRMQ
DFI-21.2(5-28)	RINSVNPSELDLRLSLRTVTPIRMQ
DFI-22.1(36-64)	AFSGVAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVD
DFI-22.2(40-64)	VAAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVD
DFI-22.4(40-68)	VAAATESAYLAYRNTSLDLSEQELVDCASQ
DFI-23.1(81-109)	EYIQQNGVVEERSYPYVAREQRCRRPNSQ
DFI-23.2(74-102)	DTIPRGIEYIQQNGVVEERSYPYVAREQR
DFI-25.1(118-146)	QIYPPDVVKQIREALTQHTAIAVIIIGIKD
DFI-25.2(118-139)	QIYPPDVVKQIREALTQHTAIA
DFI-26.1(141-166)	IIGIKDLRAFRHYDGRTIIQHDNGYQ

Fig. 4

20.00.00 00.00.00

DFI-27.1(161-185)	HDNGYQPNYHAVNIVGYGSTQGDDY
DFI-28.1(173-201)	NIVGYSTQGDDYWIVRNSWDTTWGDSGY
DFI-28.2(173-195)	NIVGYSTQGDDYWIVRNSWDTT
DFII-1(1-20)	DQVDVKDCANNEIKKVMVDG
DFII-2(11-35)	NEIKKVMVDGCHGSDPCIIHRGKPF
DFII-13.1(22-50)	HGSDPCIIHRGKPFLEALFDANQNTKTA
DFII-3.1(30-48)	HRGKPFLEALFDANQNTK
DFII-4.5(36-60)	TLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDG
DFII-4.3(45-70)	QNTKTAKIEIKASLDGLEIDVPGIDT
DFII-15(51-77)	KIEIKASLDGLEIDVPGIDTNACHFMK
DFII-16(61-86)	LEIDVPGIDTNACHFMKCPVLKGQQY
DFII-17(78-104)	CPLVKGQQYDAKYTWNVPKIAPKSENV
DFII-18(87-112)	DAKYTWNVPKIAPKSENVVTVKLVG
DFII-19(95-129)	PKIAPKSENVVTVKLVGDNGVLACAIATHAKIRD
DFII-19.1(105-129)	VVTVKLVGDNGVLACAIATHAKIRD
DFII-21(33-60)	KPFTLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDG
DFII-22(36-63)	TLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDGLEI

Fig. 4 (jatk.)

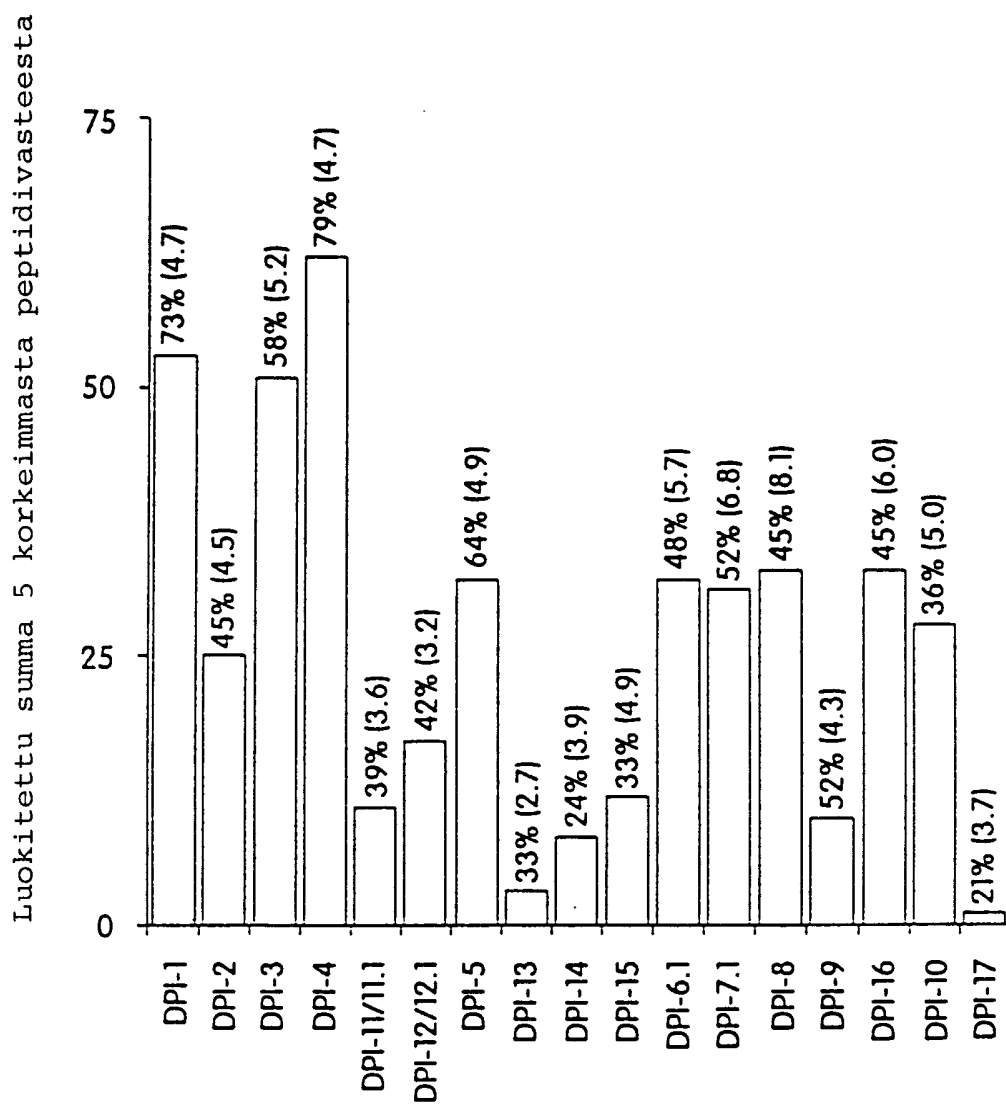


Fig. 5

Luokitettu summa 5 korkeimmasta peptidivasteesta

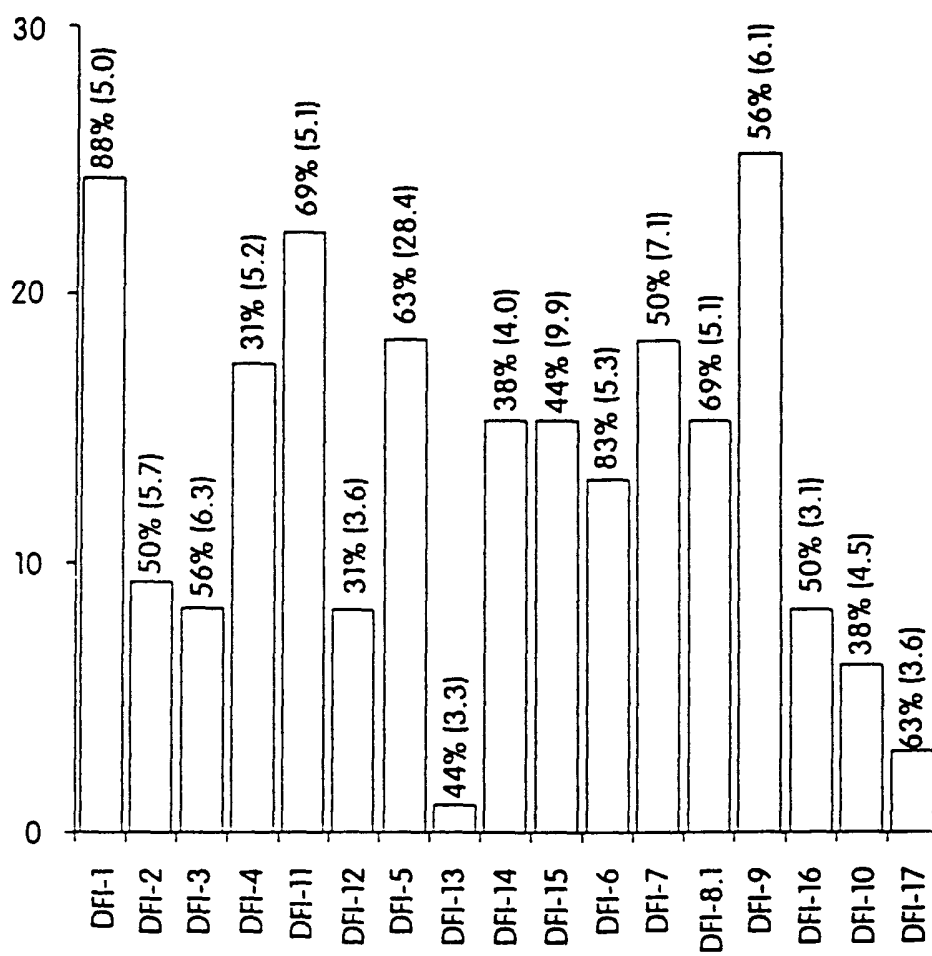
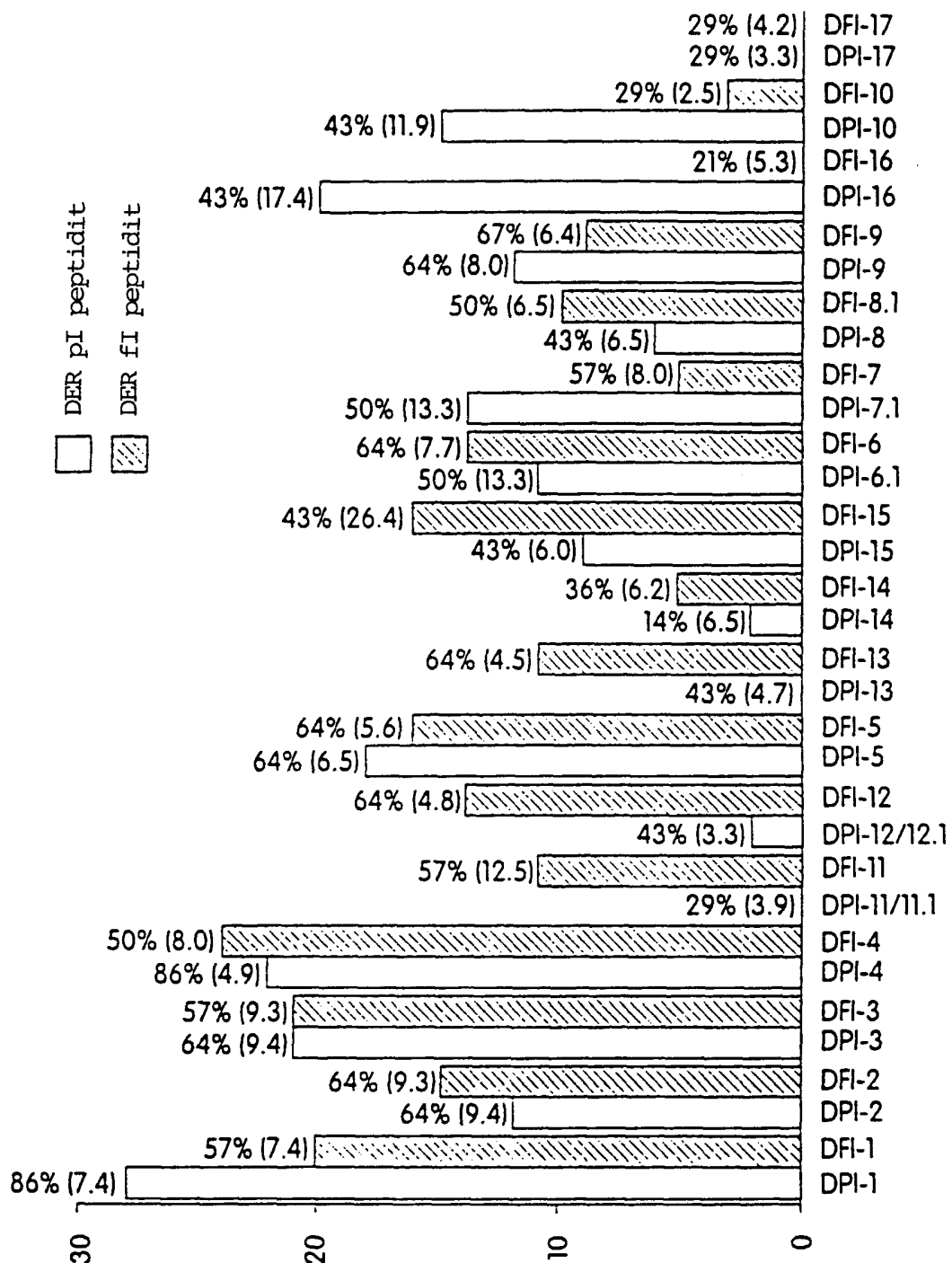


Fig. 6



Luokitettu summa 5 korkeimmasta peptidivasteesta

Fig. 7

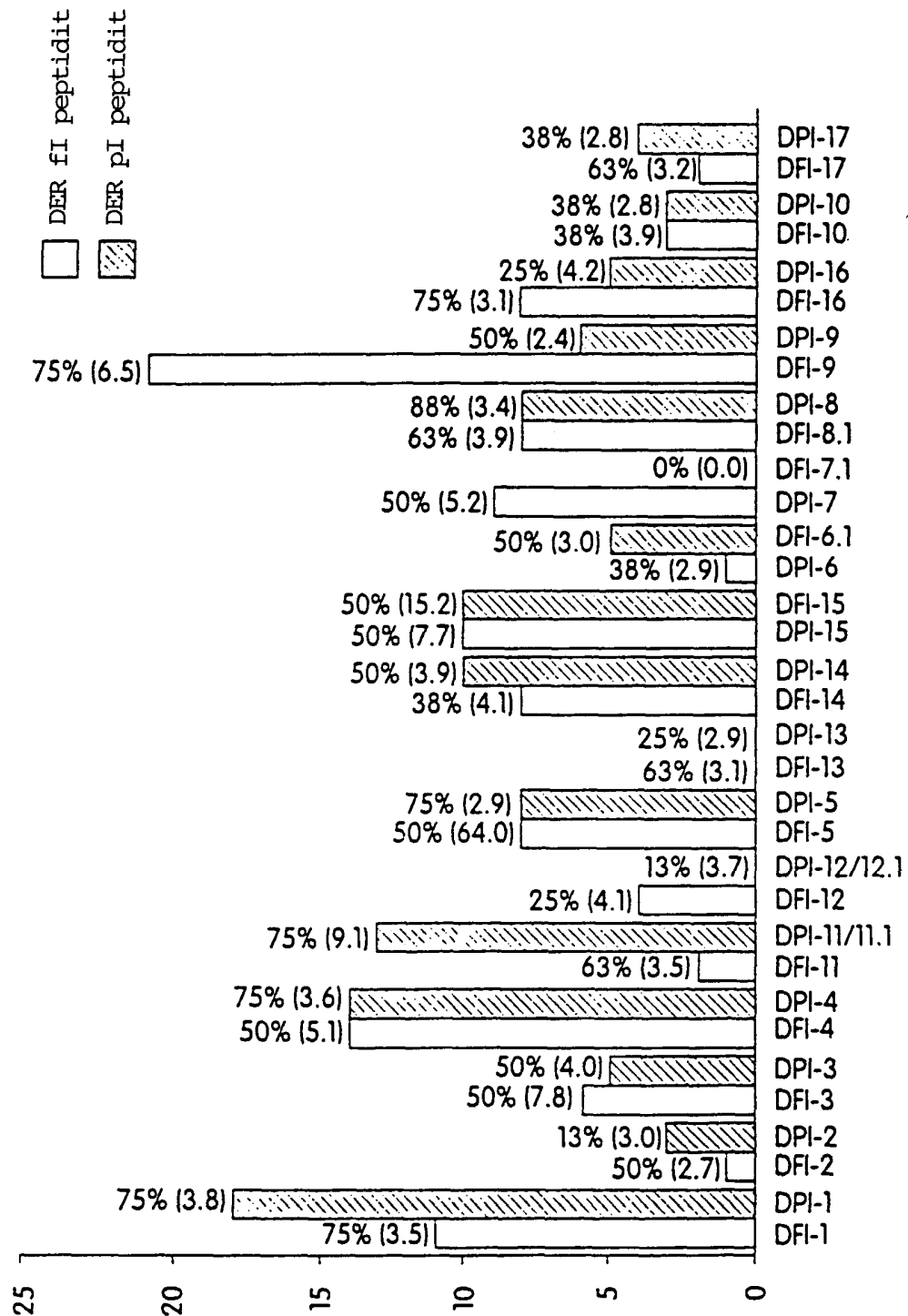


Fig. 8

Luokitettu summa 5 korkeimmasta peptidivasteesta

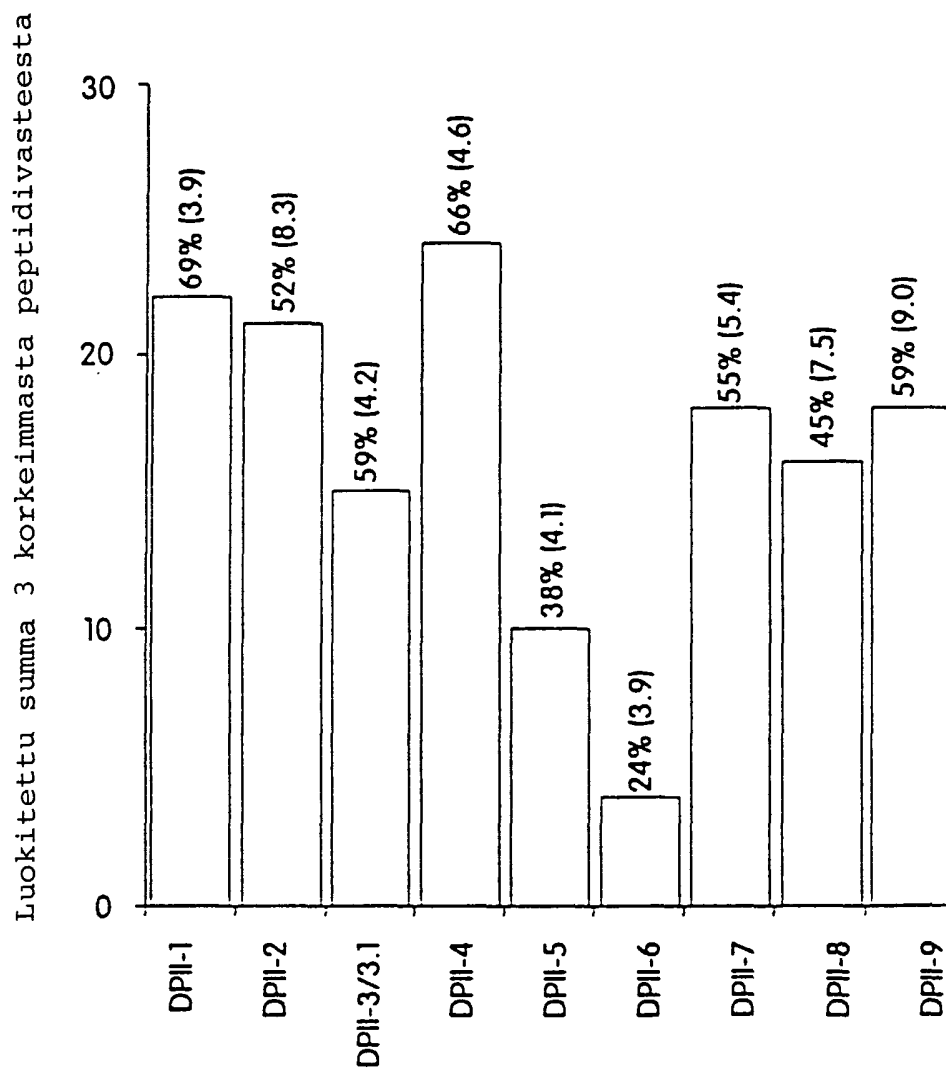


Fig. 9

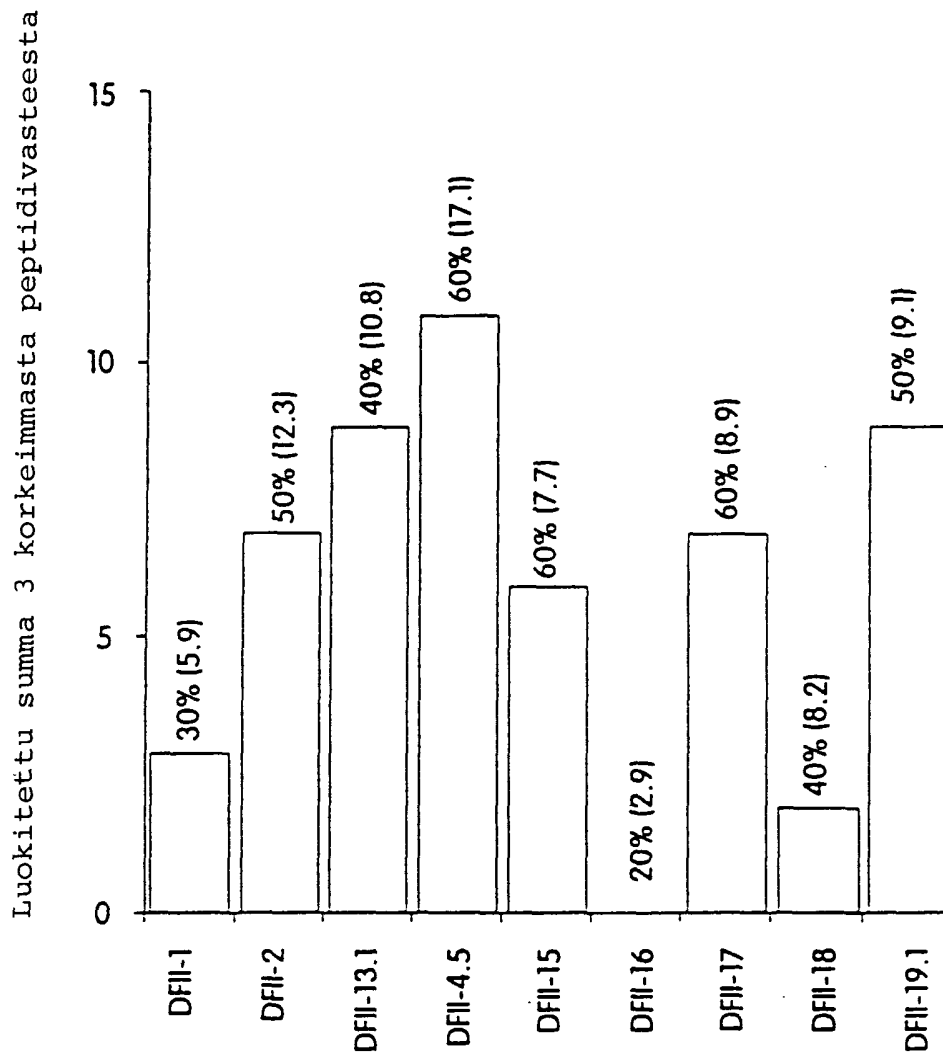


Fig. 10

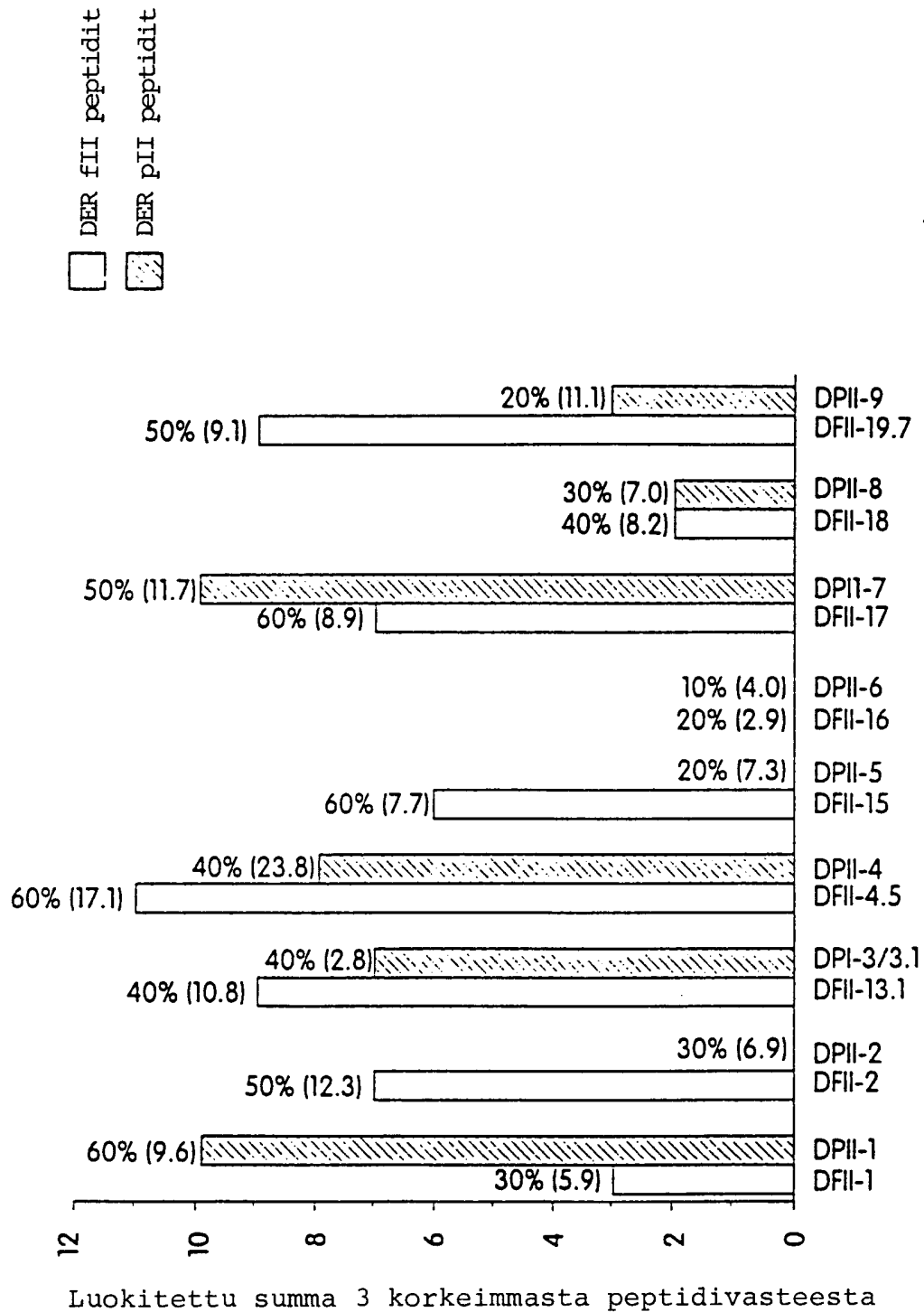


Fig. 11

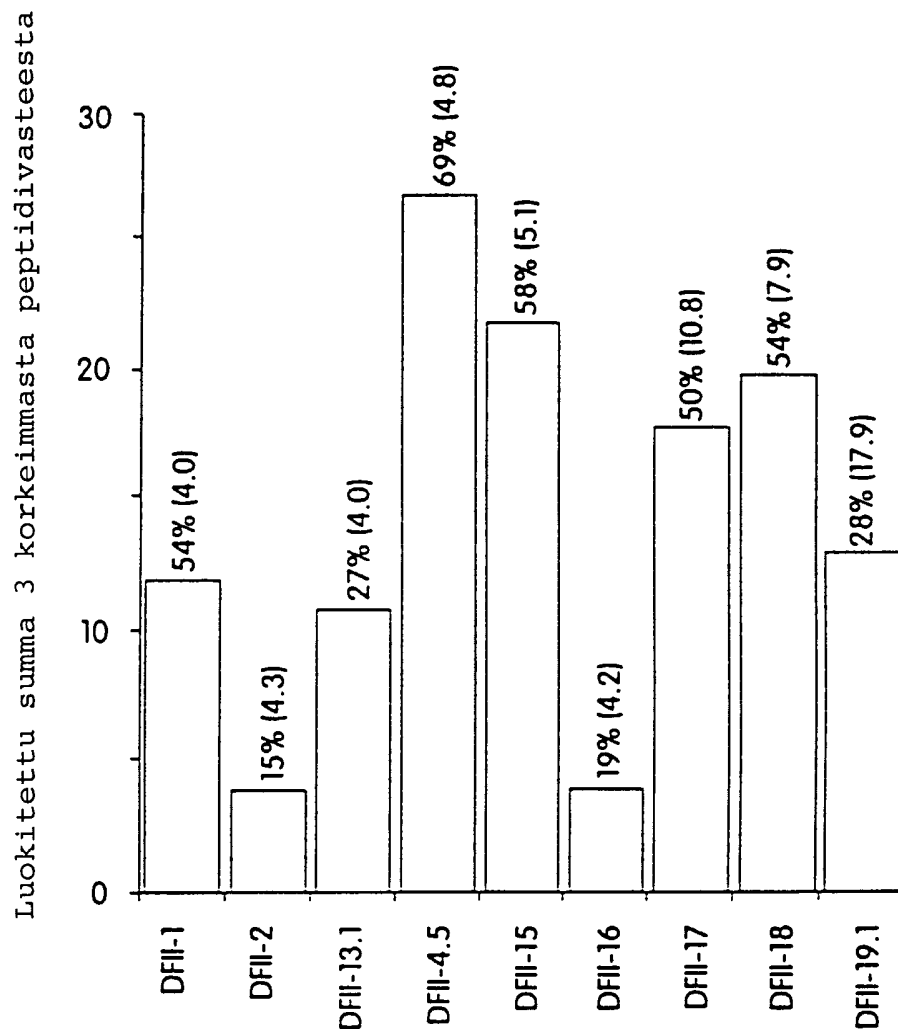


Fig. 12

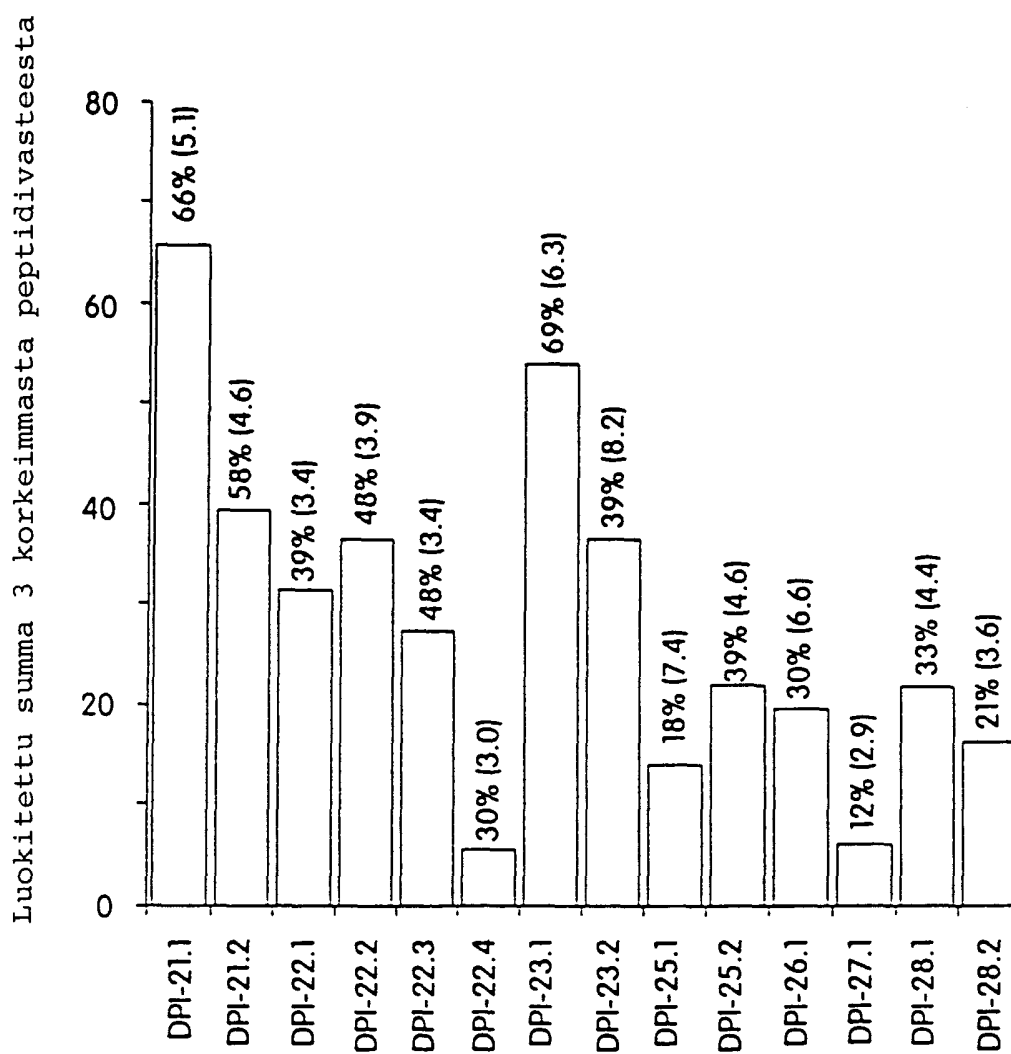


Fig. 13

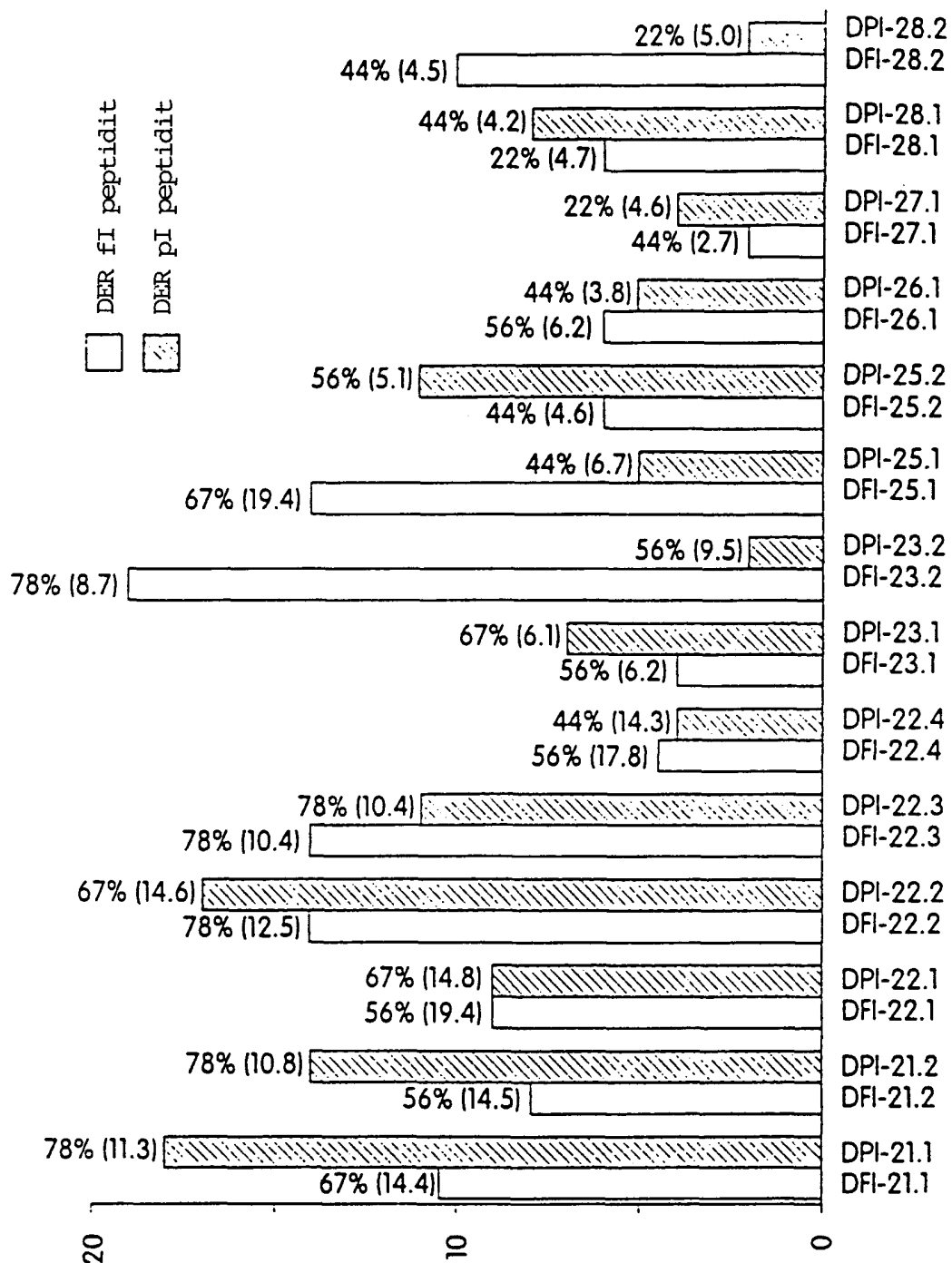


Fig. 14

Luokitettu summa 3 korkeimmasta peptidivasteesta

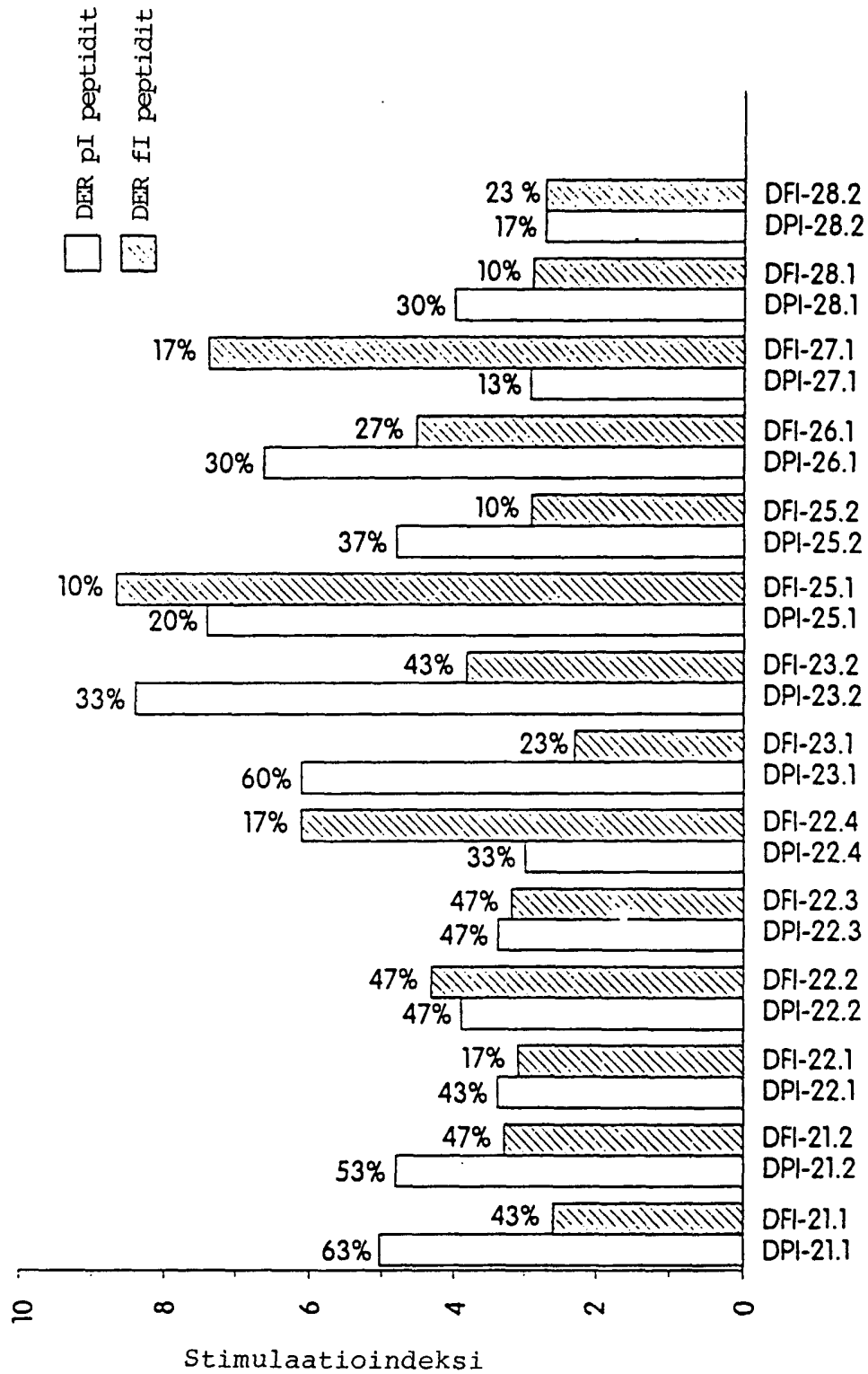


Fig. 15a

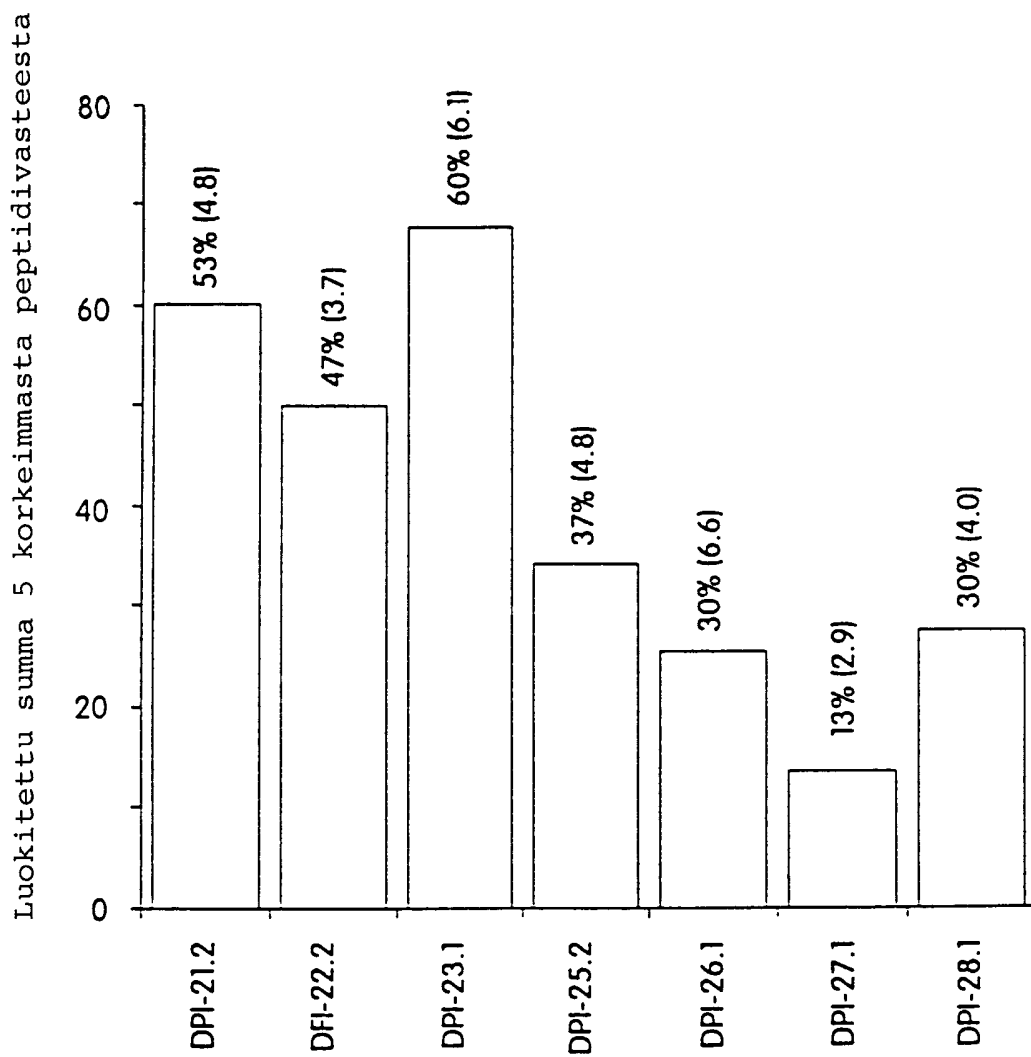


Fig. 15b

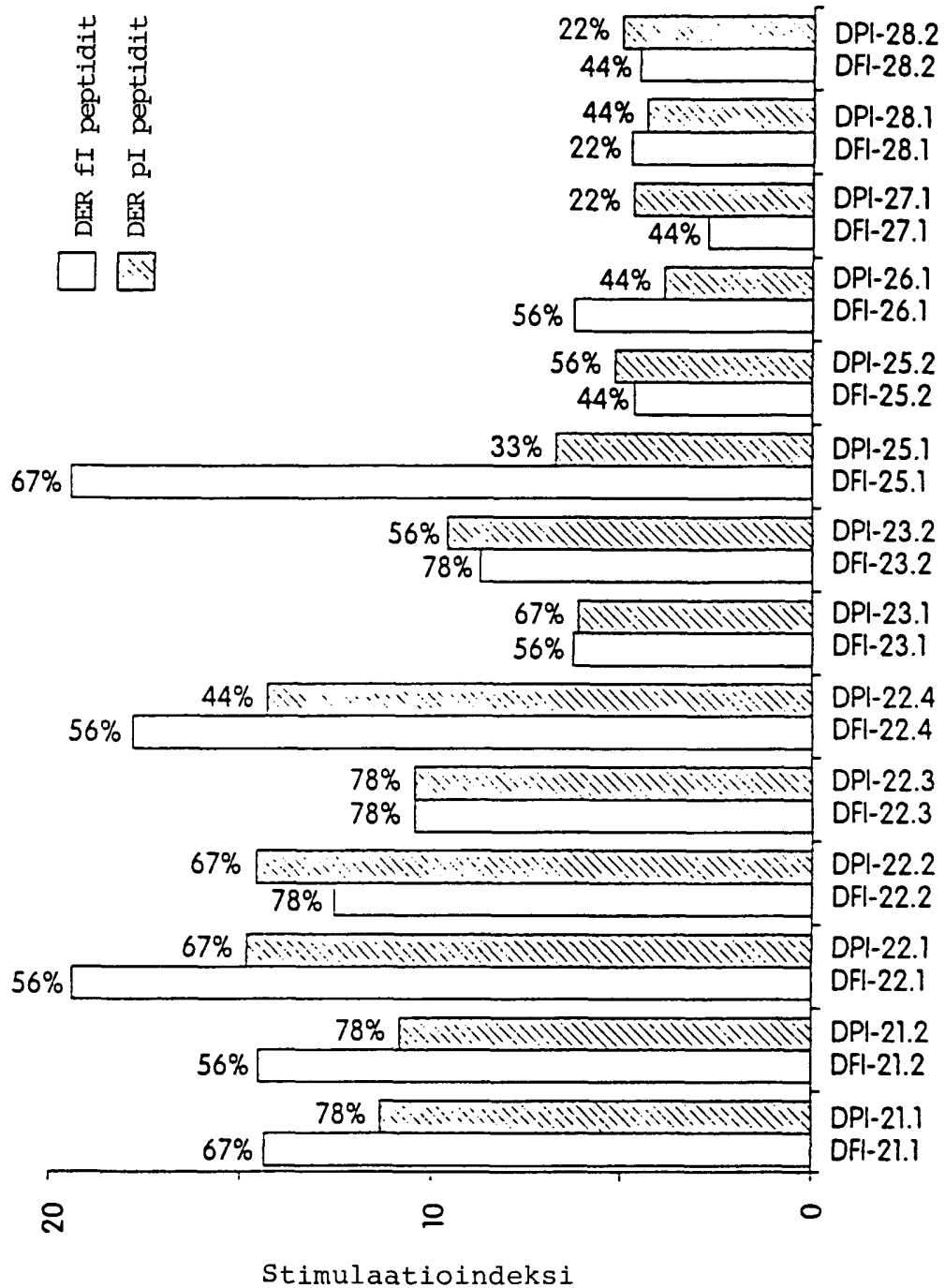


Fig. 16a

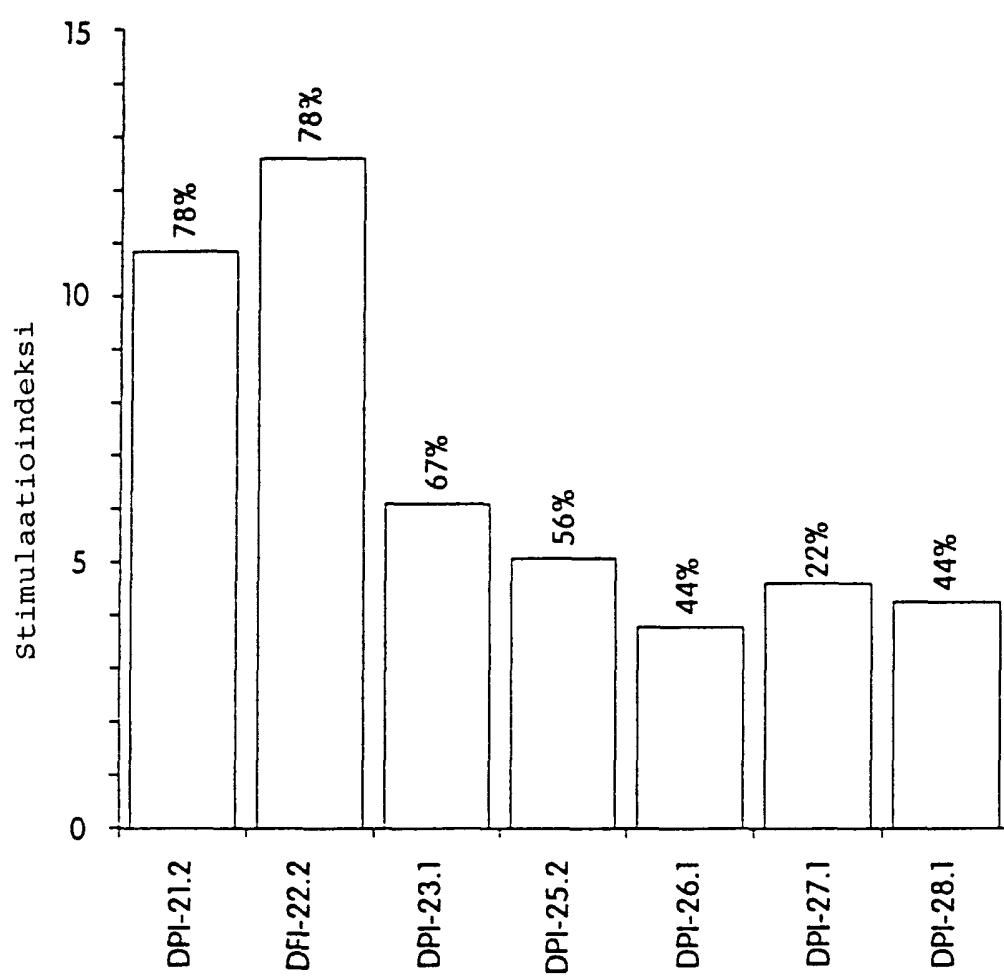


Fig. 16b

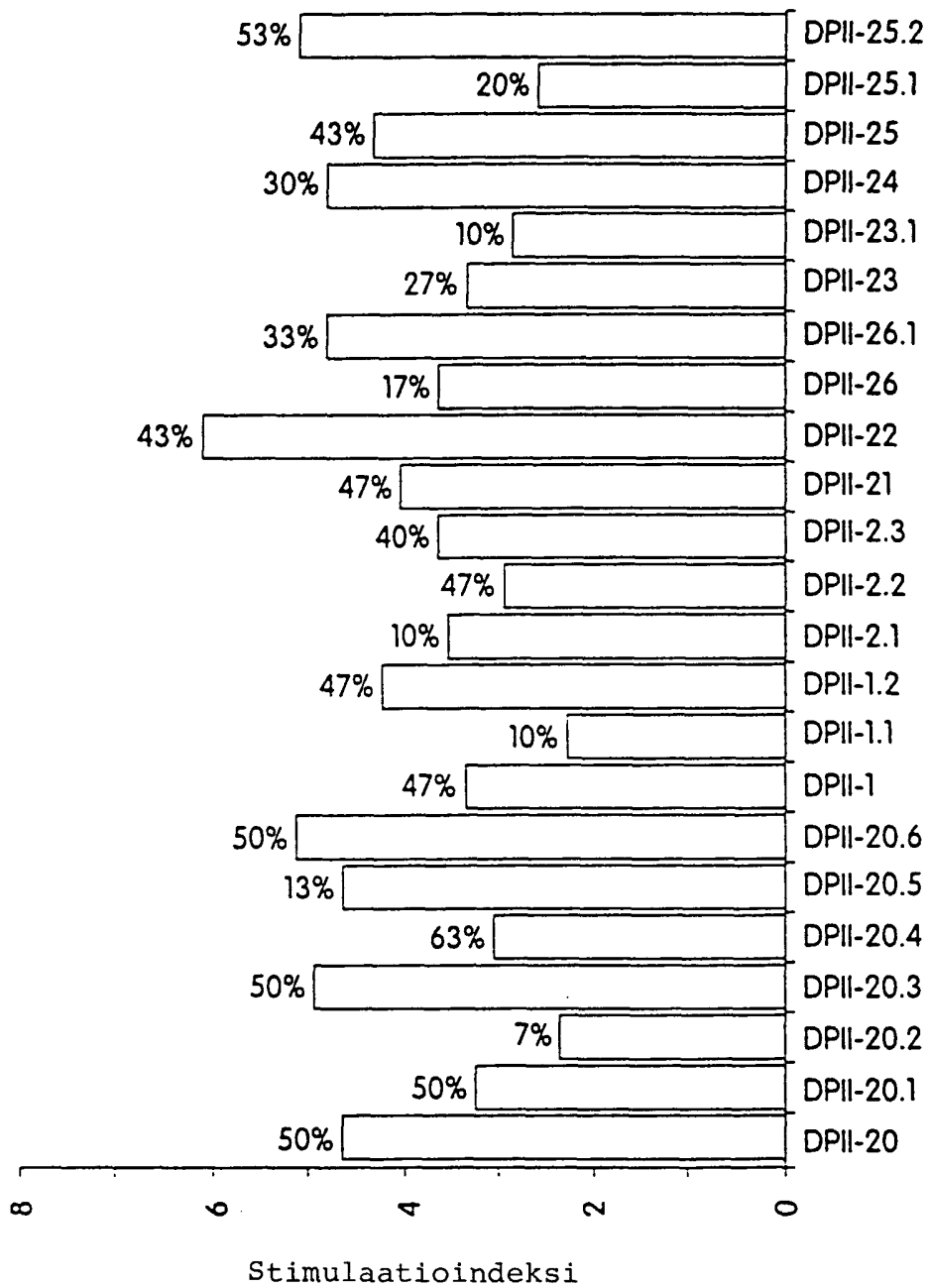


Fig. 17a

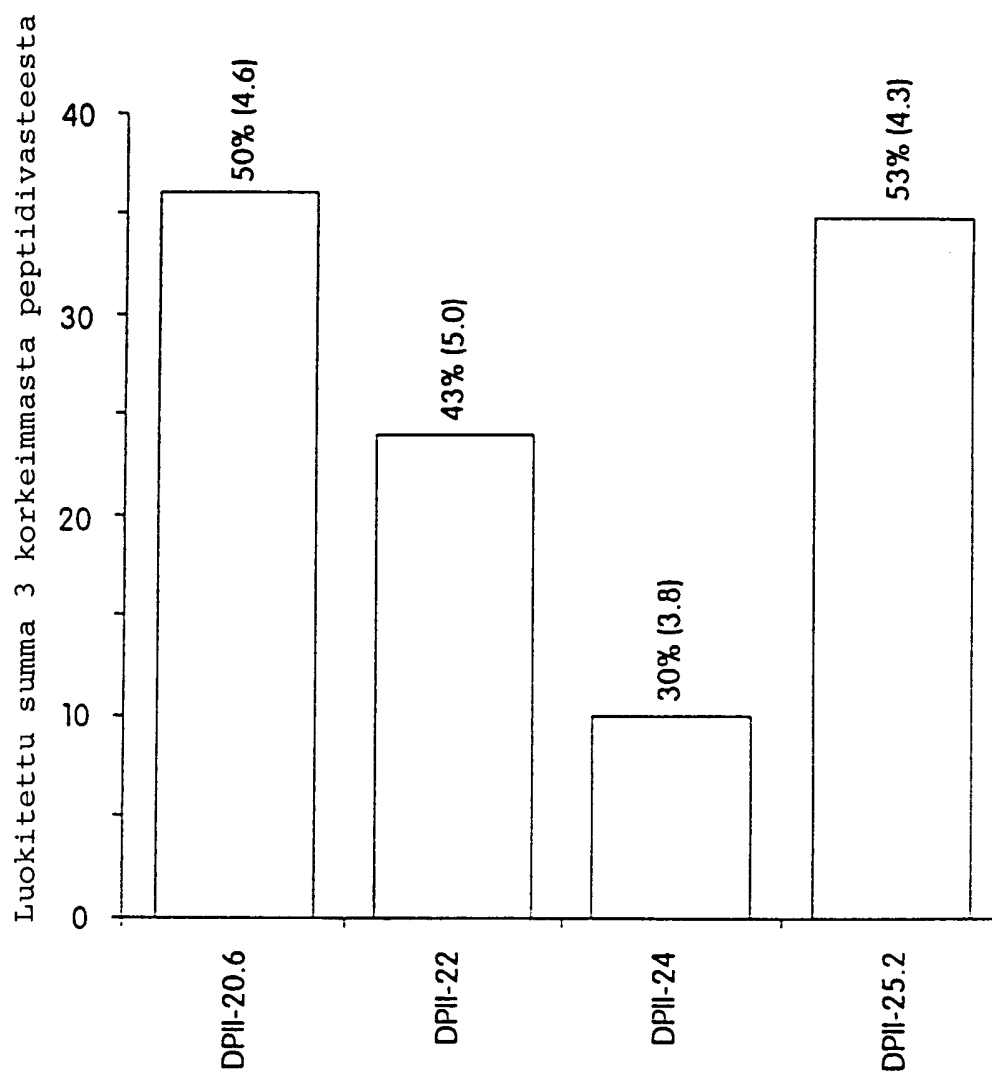


Fig. 17b

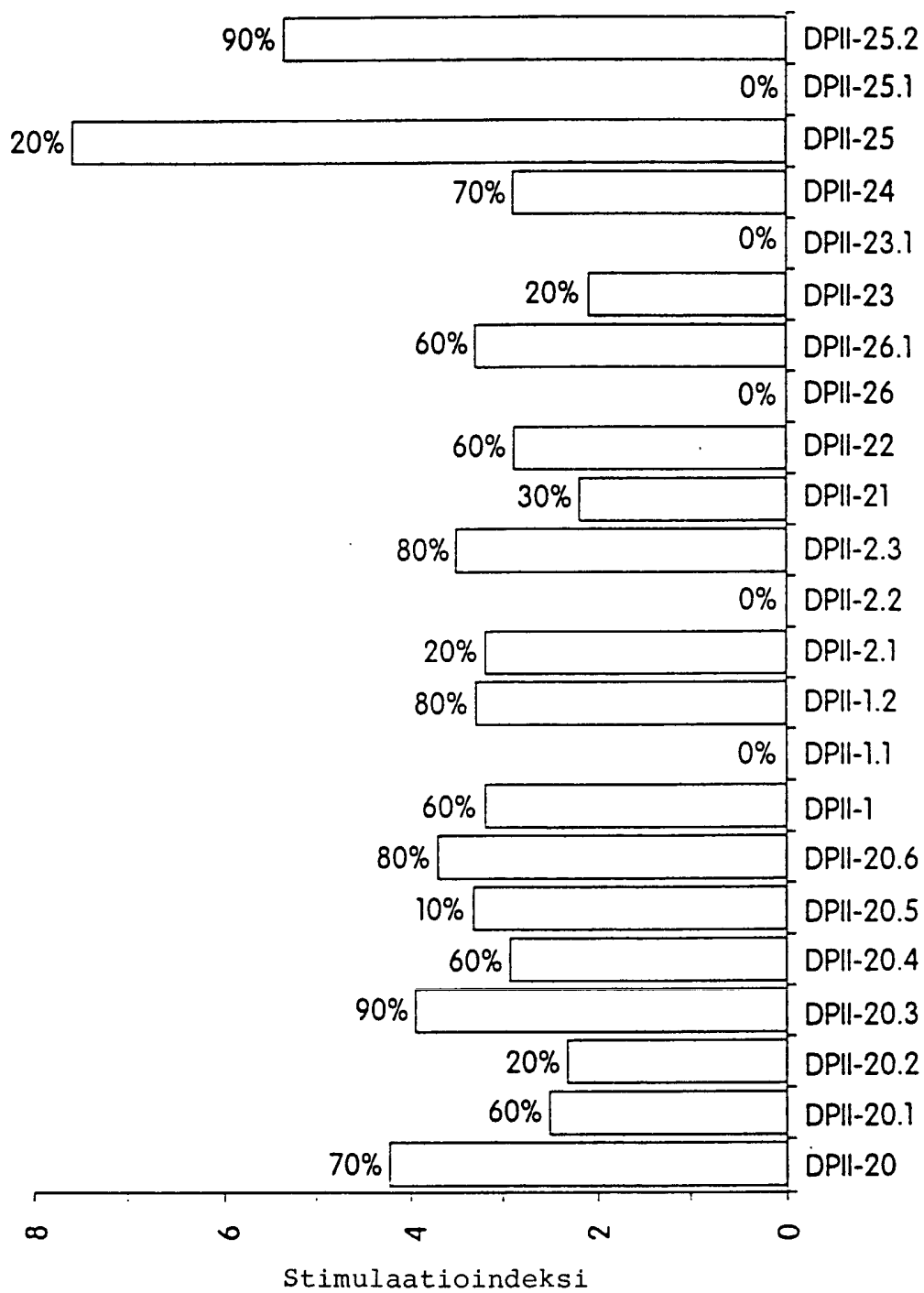


Fig. 18a

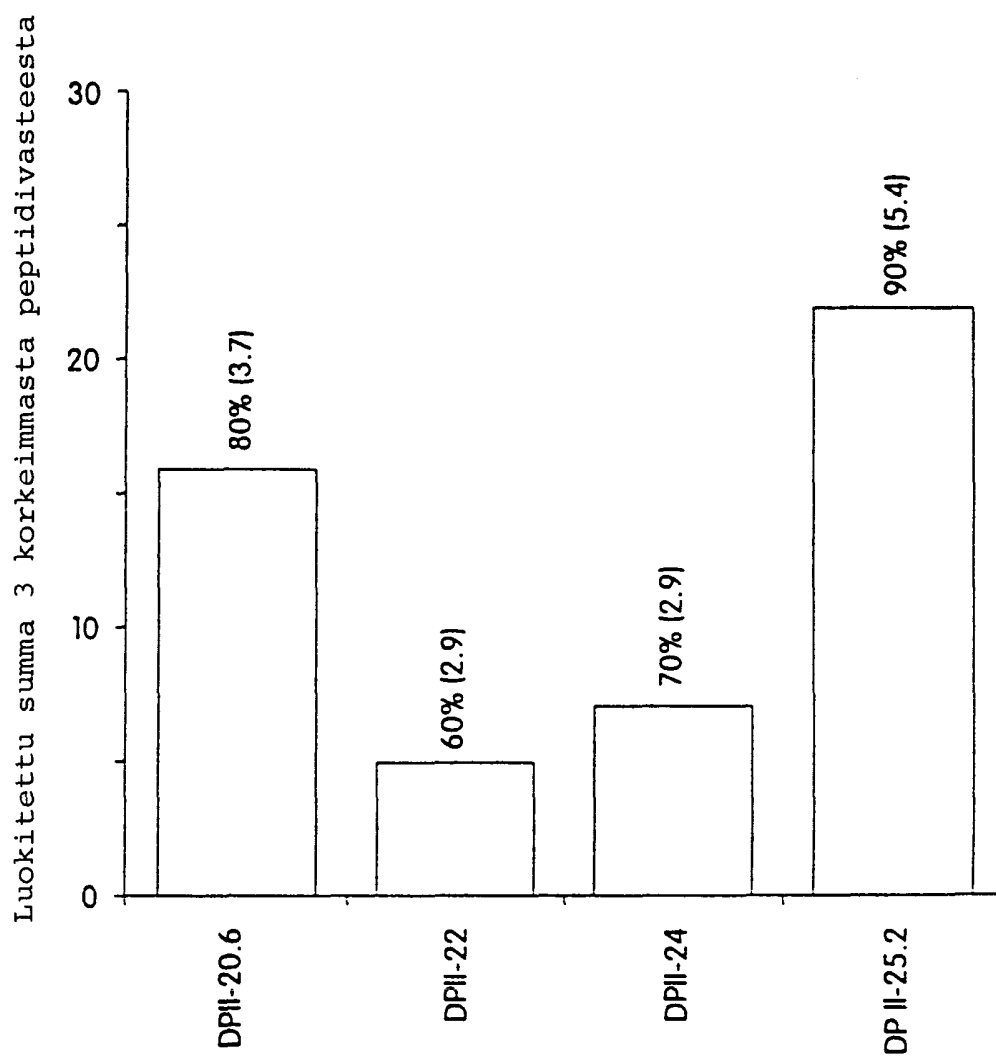


Fig. 18b

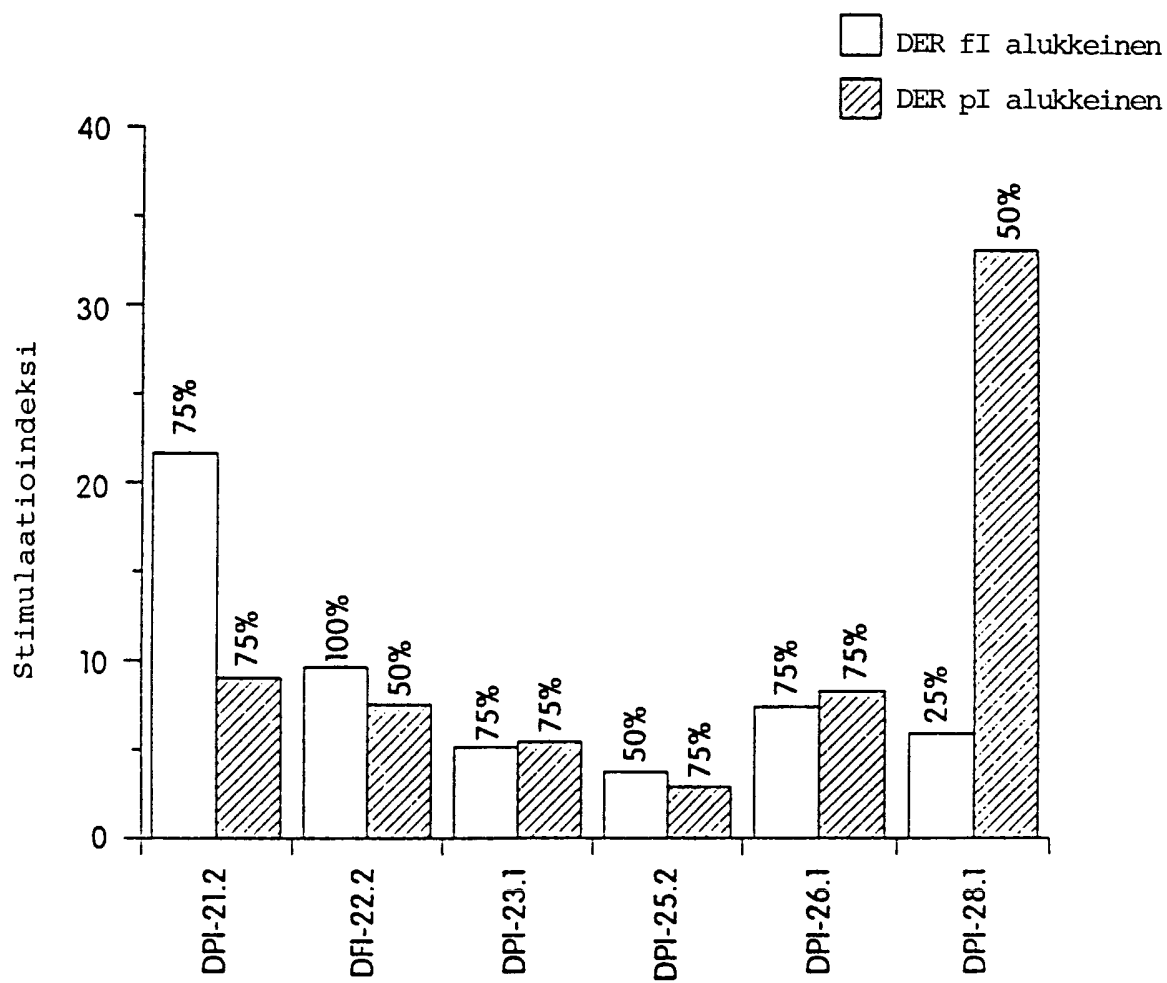


Fig. 18c

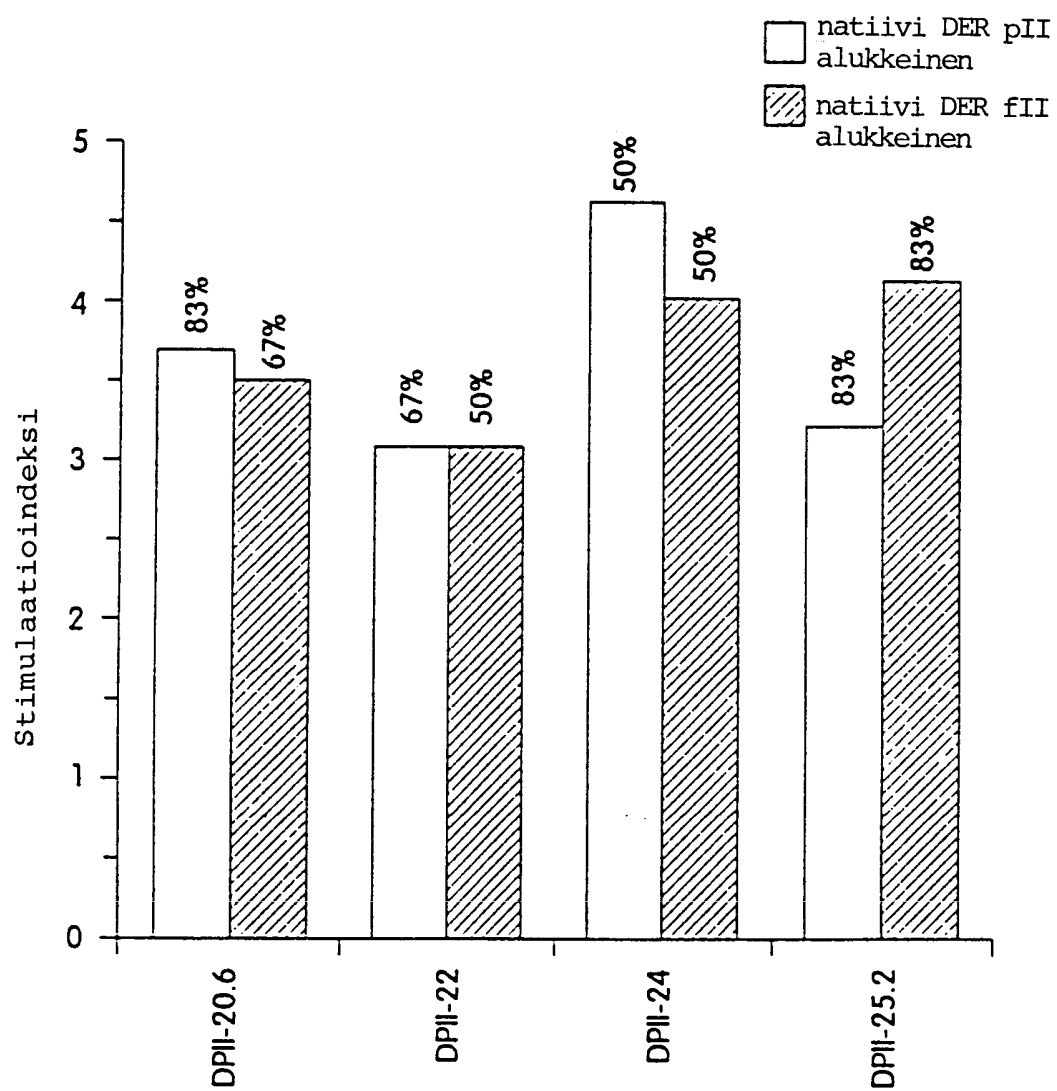


Fig. 18d

2003-04-13

110385

28/49

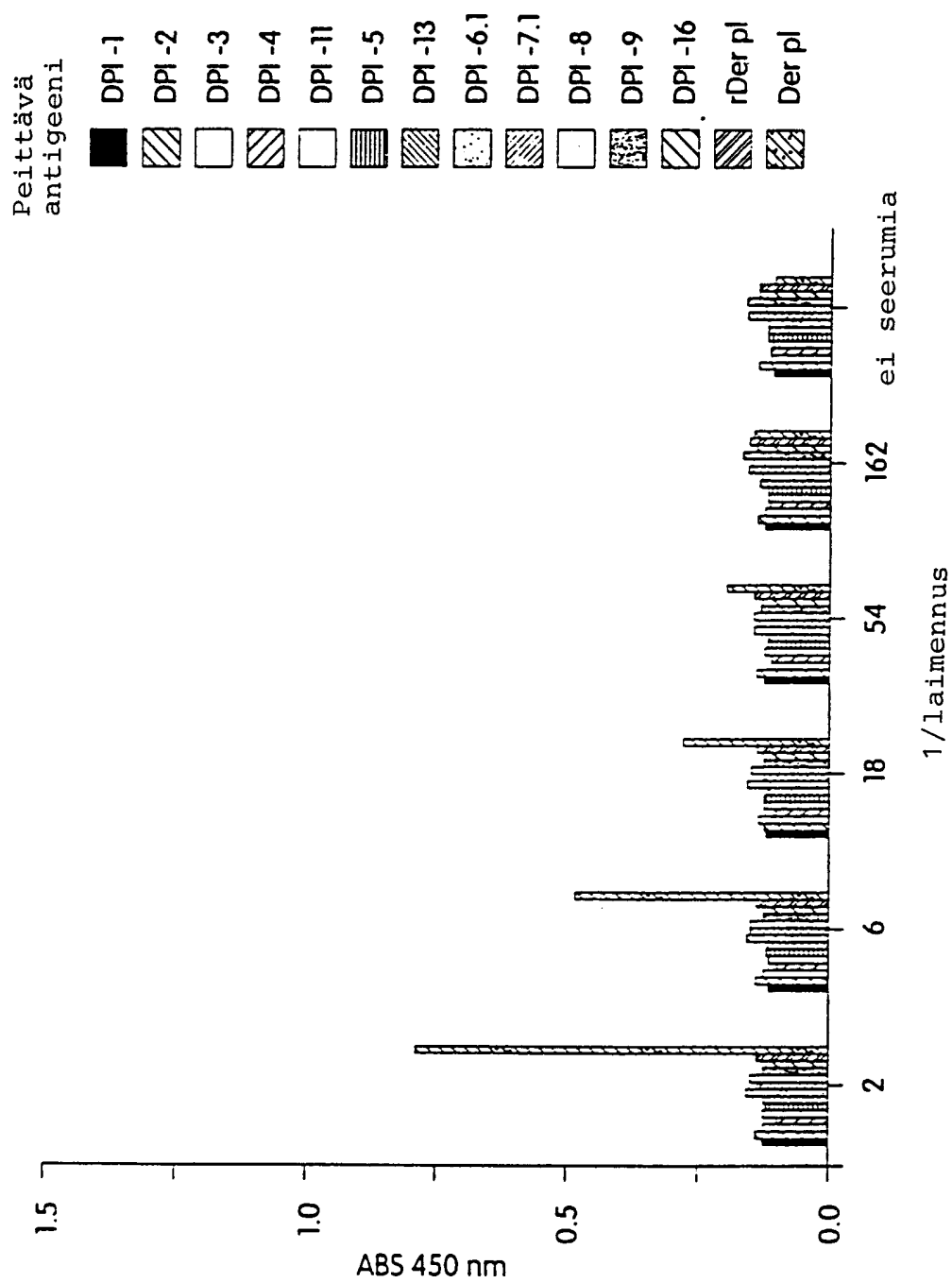


Fig. 19a

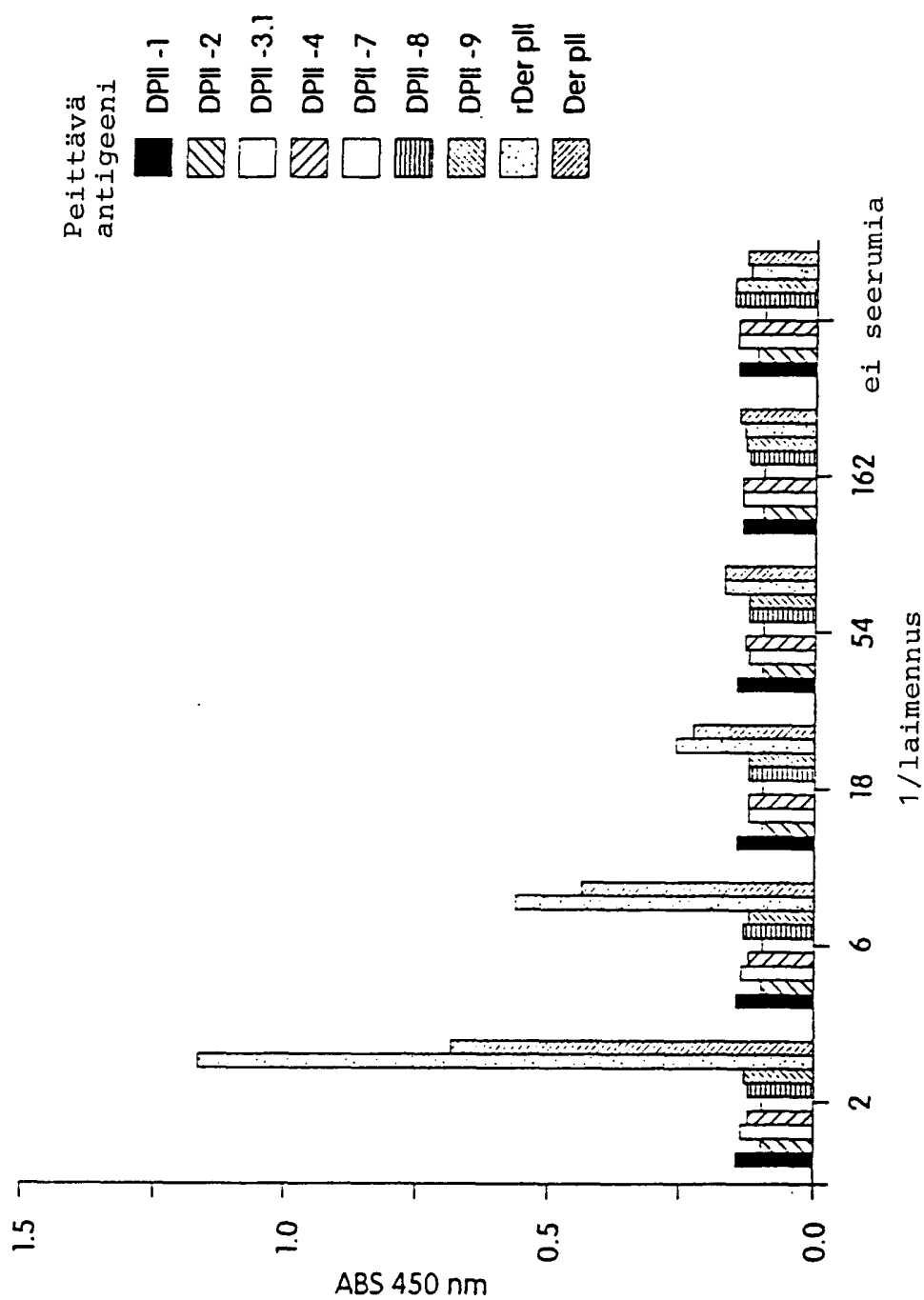


Fig. 19b

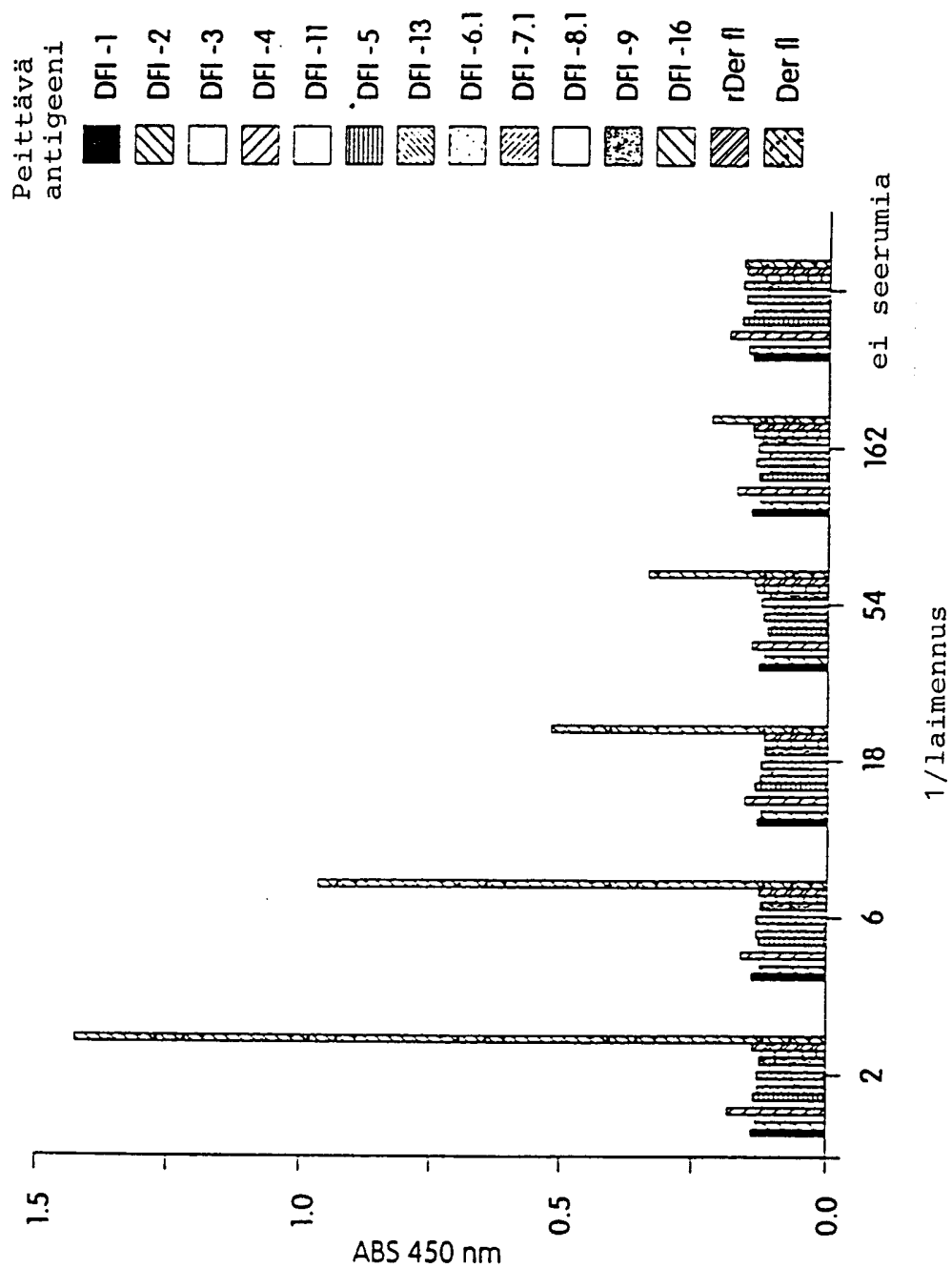


Fig. 20a

201004 94153

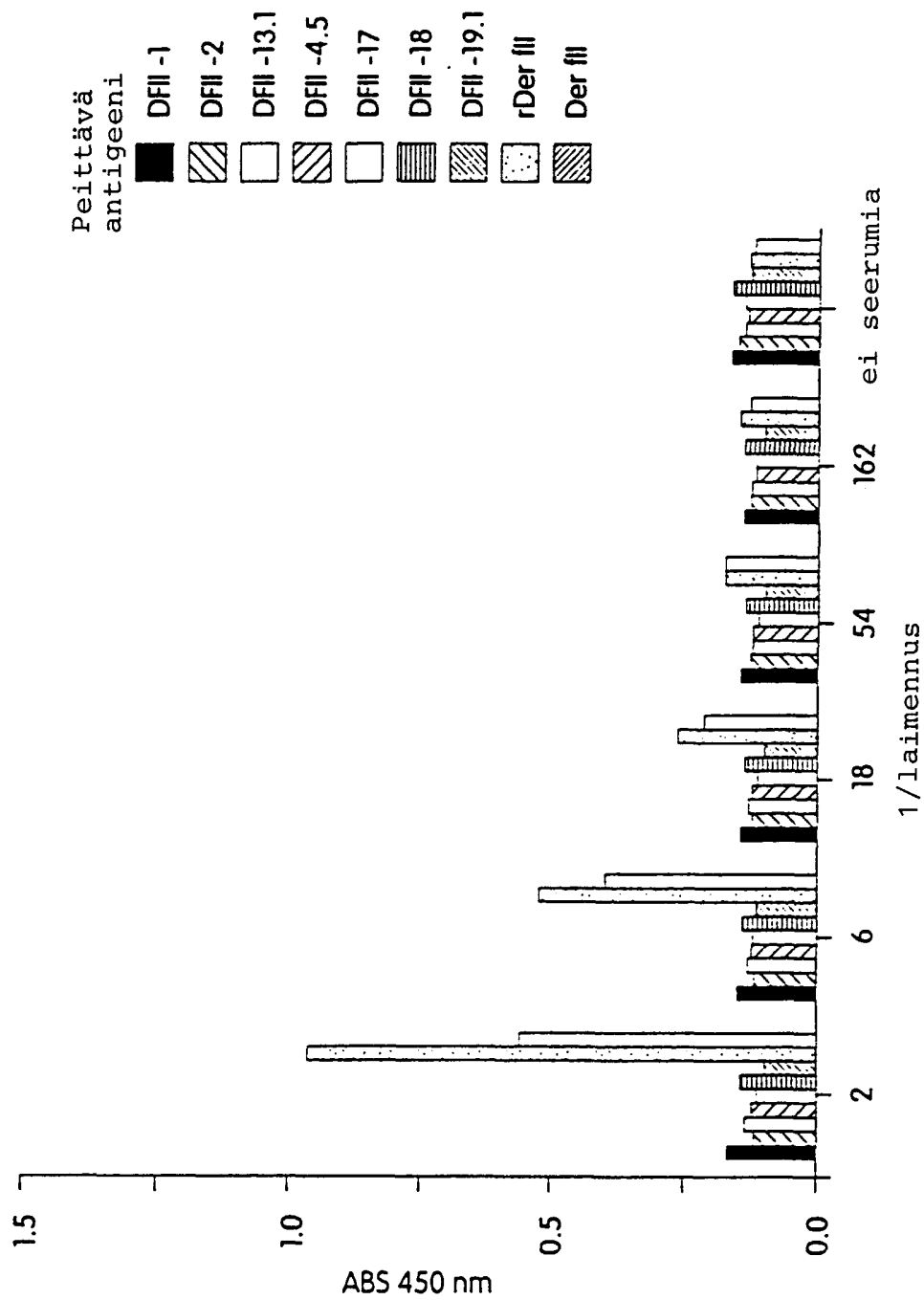


Fig. 20b

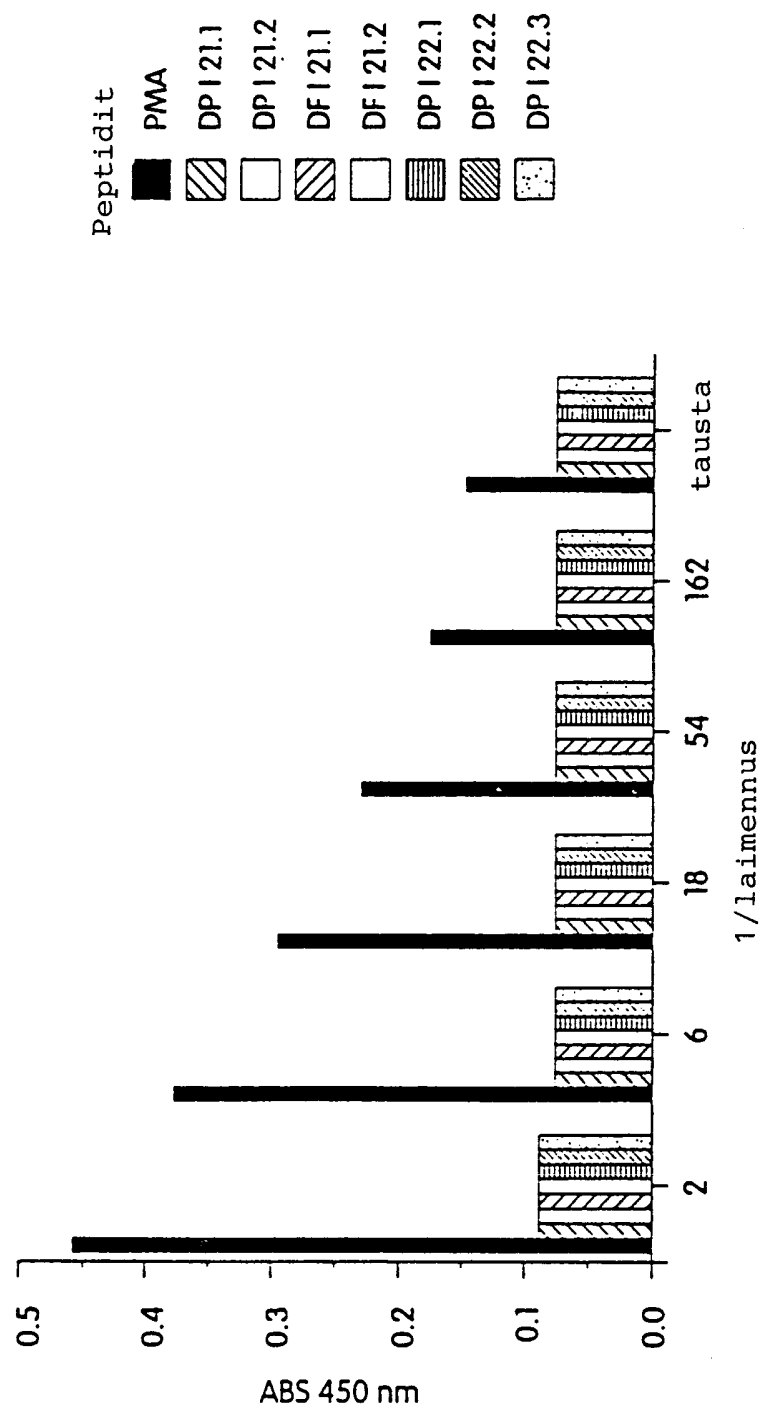


Fig. 21a

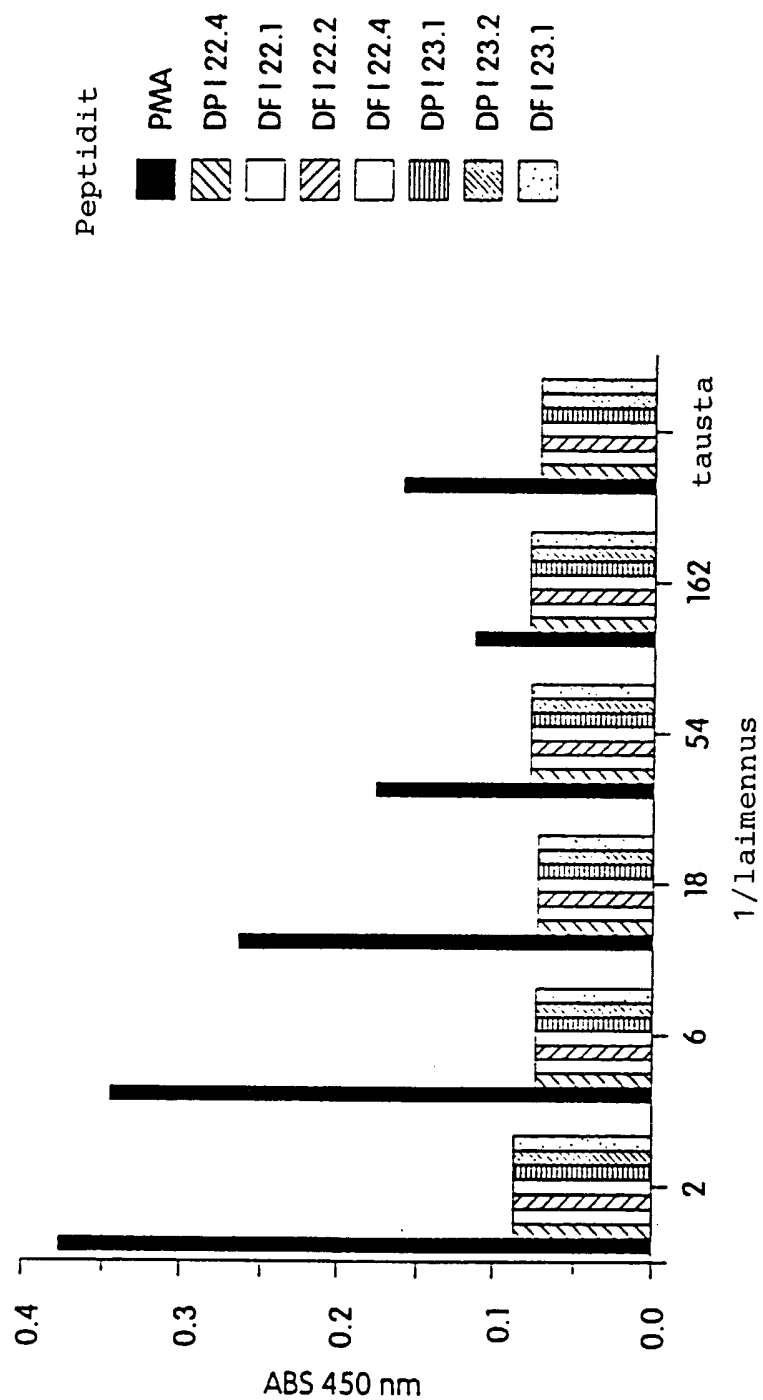


Fig. 21b

201306 04103

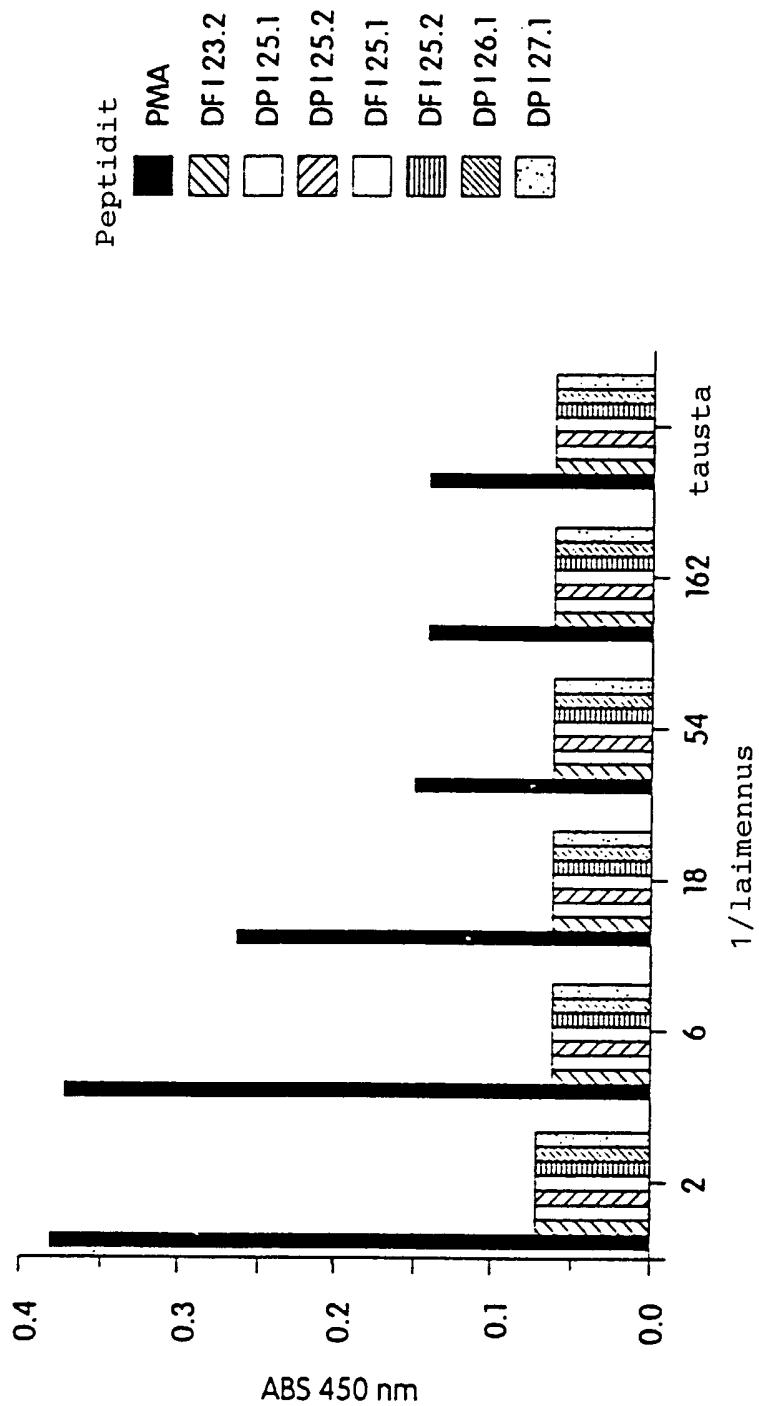


Fig. 21c

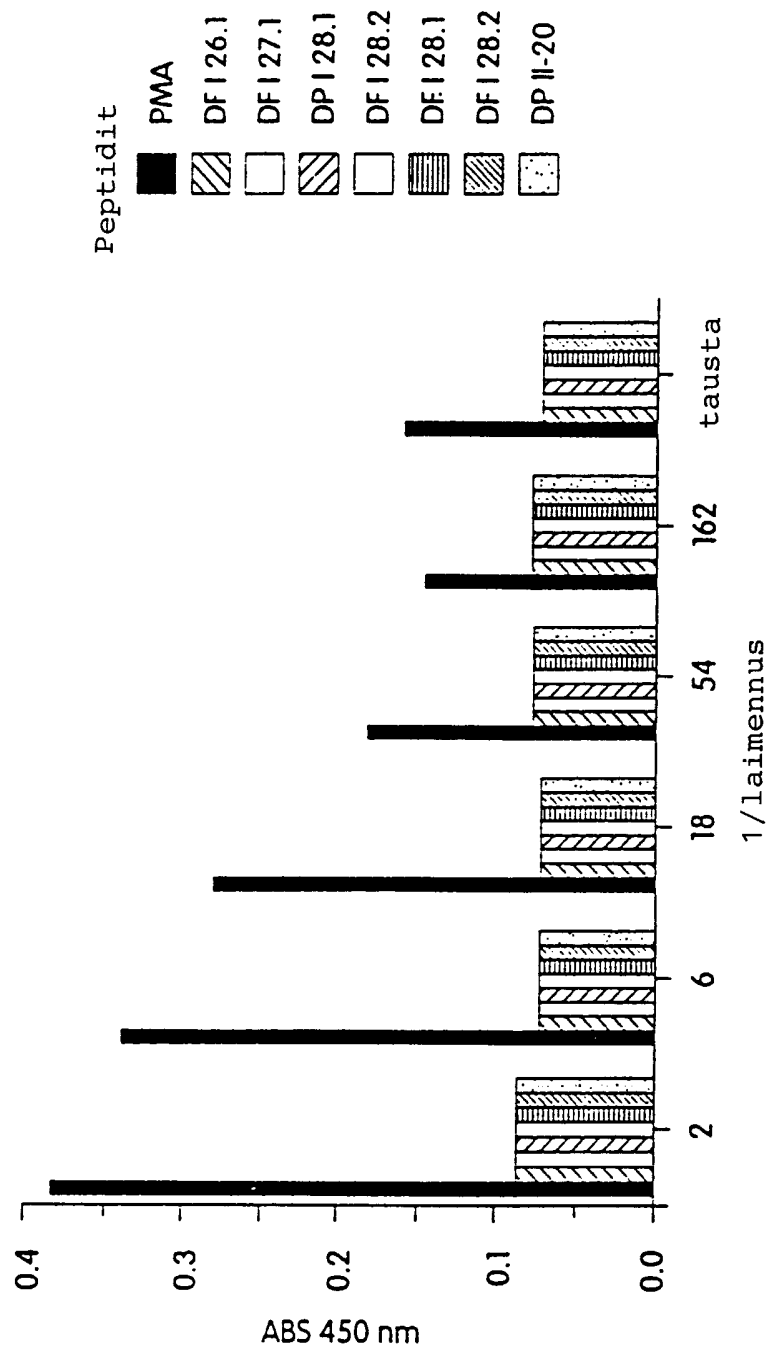


Fig. 21d

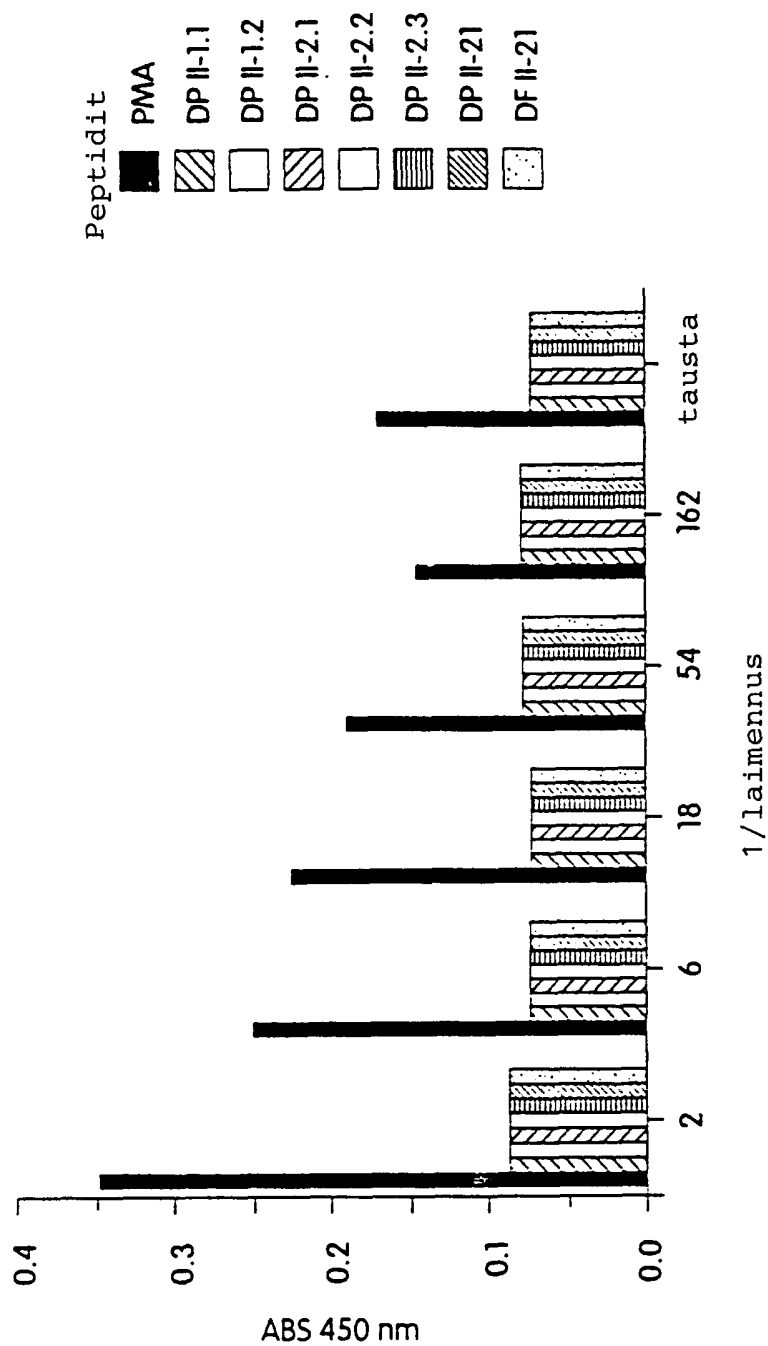


Fig. 21e

2025.04.13 14:13

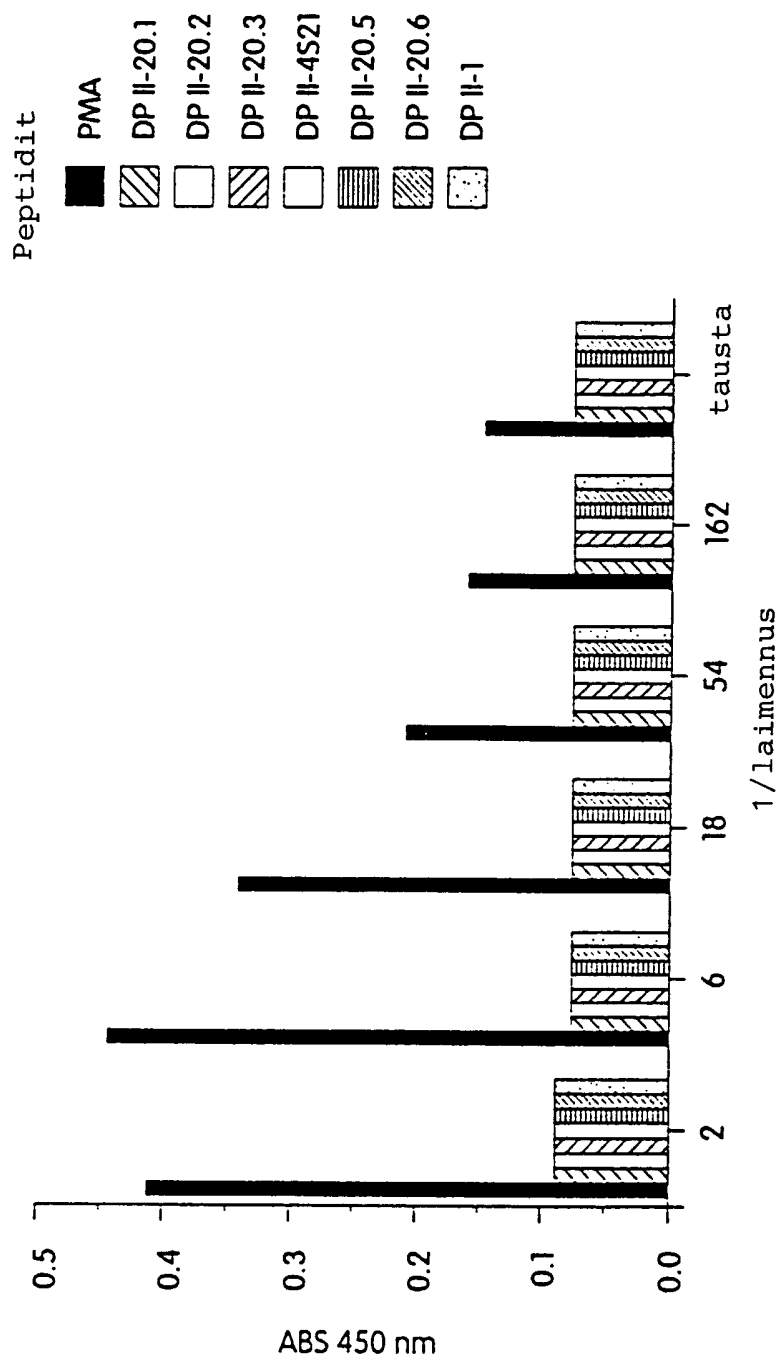


Fig. 21f

2025.08.24 11:03

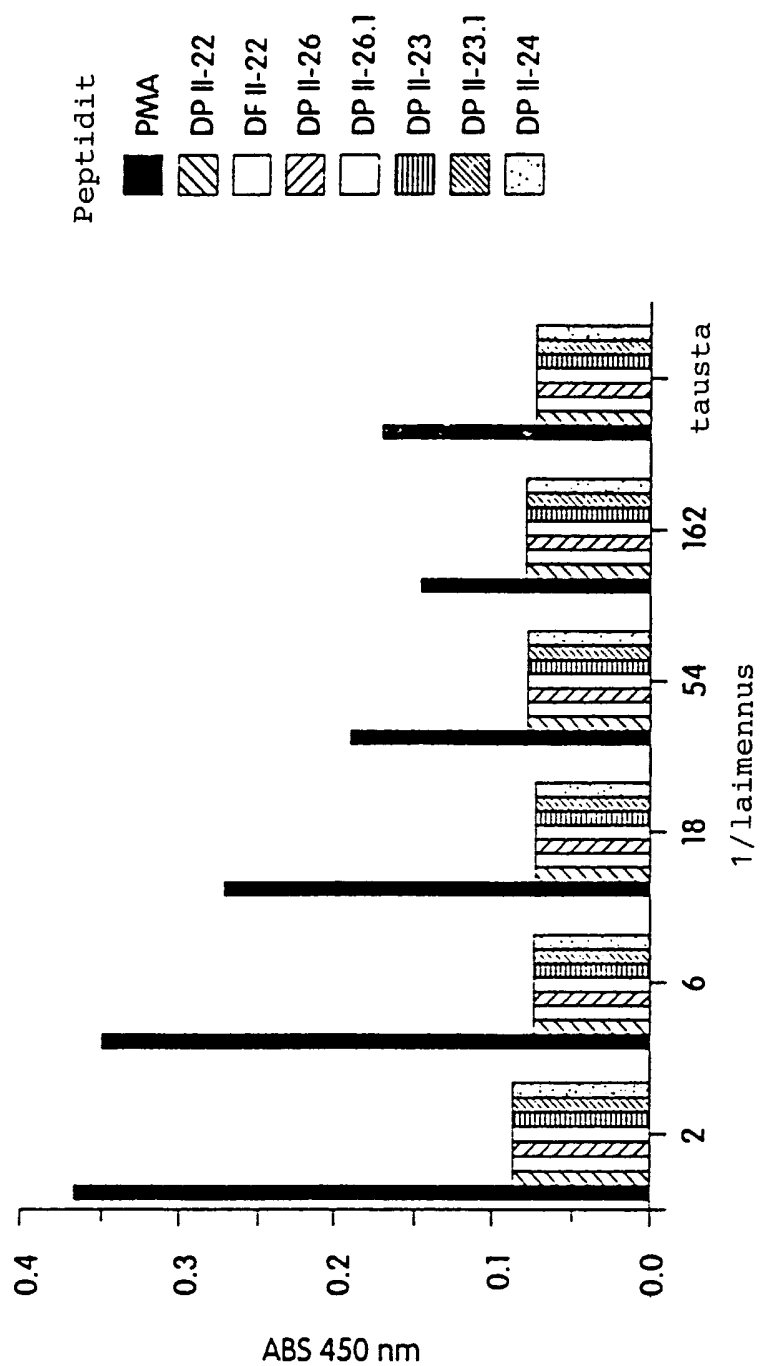


Fig. 21g

2010-04-04 09:11:53

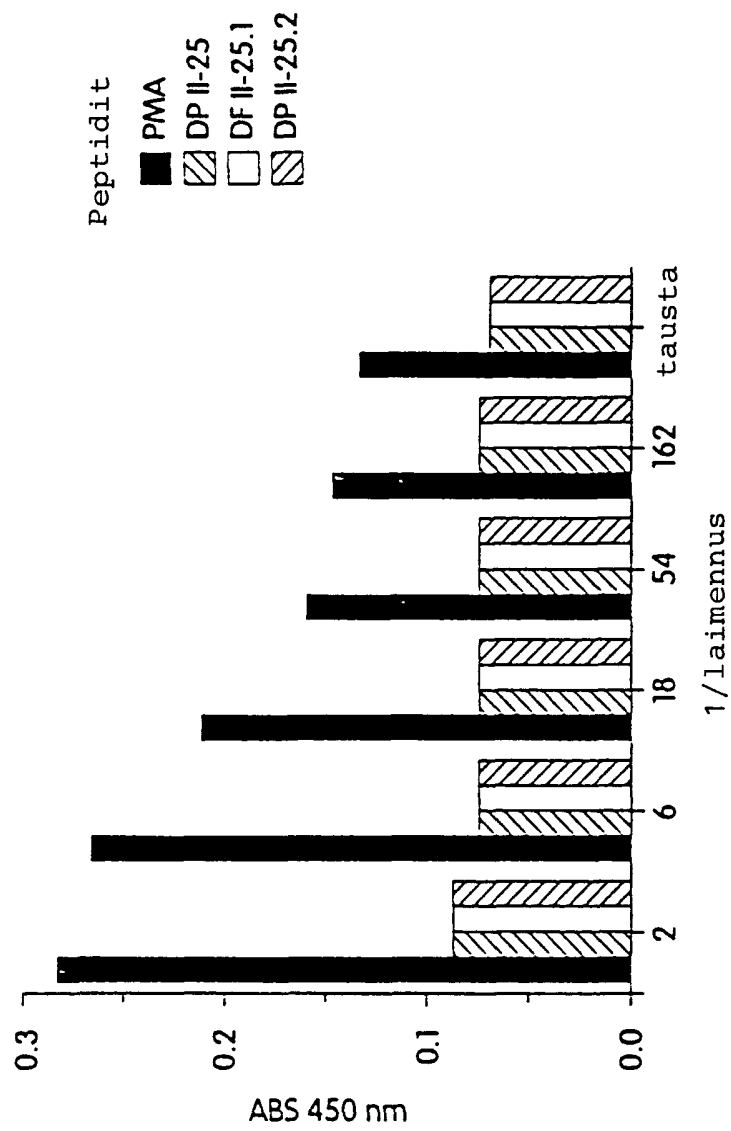


Fig. 21h

r	p	I	(a)	10	20	30	40	50	60
				TNAC	PAEIDL	TVTPIRM	CGSCWAFSGV	AATESAYLAH	RNQSLDLAEQ
r	p	I	(b)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(c)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(d)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(a)	70	80	90	100	110	120
				ELVDCASQHG	CHGDTIPRGI	EYIQHNGVVQ	ESYRYVARE	QSCRRPNAQR	FGISNYCQIY
r	p	I	(b)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(c)	---	---	K	---	---	---
r	p	I	(d)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(a)	130	140	150	160	170	180
				PPNANKIREA	LAQTHSAIAV	IIGIKDLDAF	RHYDGRITIIQ	RDNGYQPNYH	AVNIVGYDNA
r	p	I	(b)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(c)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(d)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(e)	---	---	---	---	---	---
r	p	I	(a)	190	200	210	220	IL	
				QGVDPYWIVRN	SWDTNWDNG	YGYFAANIDL	MMIEEYPYVV	---	
r	p	I	(b)	---	---	---	---	---	
r	p	I	(c)	---	---	---	---	---	
r	p	I	(d)	---	---	---	---	---	
r	p	I	(e)	---	---	---	---	---	

Fig. 22

001001 011113

Der p II (c)	DQVDVKDCANHEIKKVLVPGCHGSEPCIIHRGKPFQLEAVFEANQNTKTAK	10	20	30	40	50
(1)	H.....L.P.....E.....Q...V.E...T....					
(2)	H.....L.P.....E.....Q...V.E...S....					
Der f II	N.....M.D.....D.....T...L.D...T....					

Der p II (c)	IEIKASIDGLEVDVPGIDPNACHYMKCPLVKGGQYDIKYTWNVPKIAPKSE	60	70	80	90	100
(1)	I.....P.....YM.....I.....					
(2)	I.....P.....YM.....I.....					
Der f II	L.....T.....FM.....A.....					
			V		I	

Der p II (c)	NVVTVKVMGDDGVLACAIATHAKIRD	110	120
(1)	VM.DD.....A.....I...		
(2)	VM.ND.....A.....L...		
Der f II	LV.DN.....A.....I...		
	I	G	

Fig. 23

001004 34133

	10	20	30	40	50	60	
pFL1	DQVDVKDCANNEIKKVMVPGCHGSEPCIIHRGKPF	TTLEALFDANQNTKTAKIEIKASLDGLE					
pFL2	N.....	I.....					
MT 3	N.....	I.....					
MT 5	S.....	I.....					
MT18	N.....	I.....					
MT16	N.....	T.....					
	70	80	90	100	110	120	130
pFL1	IDVPGIDTNACHFVKCPLVKGQQYDIKYTWNVPK	IAPKSENVVTVKLLIGDNGVLACAIATHAKIRD					
pFL2	M.....	A.....			V.....		
MT 3	M.....	A.....			V.....		
MT 5	M.....	I.....					
MT18	M.....						

Fig. 24

3' - ATTATGGCATCAAGATTAGACGCATTCCGTCATTATGATGGCCGAACAATCATTCAA
 I I G I K D L D A F R H Y D G R T I I Q
 70 80 90 100 110 120
 CGGATAATGGTTACCAAACTGTTAAAGTTCTGGGTGATGATGGTGTGTTGGCCCTCTGCT
 R D N G Y Q T V K V L G D D G V L A S A
 130 140 150 160 170 180
 ATTGCTACTCATGCTAAATCCGCGATGTTGCCGCAACTGAATCAGCTTATTGGCCTAC
 I A T H A K I R D V A A T E S A Y L A Y
 190 200 210 220 230 240
 CGTAACACGTCCTTTGGATCTTTCTGAACAGGAACTCGTCGATCAATTGGAAGCCGTTTTC
 R N T S L D L S E Q E L V D Q L E A V F
 250 260 270 280 290 300
 GAAGCCAACCAAAACACAAAACCGCTAAATTTGAAATCAAGCCCTCAATCGATGGTTTA
 E A N Q N T K T A K I E I K A S I D G L

Fig. 25

310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
 GAAGTTGAATACATCCAAACATAATGGTGTCTGCTCCAAAGAAAGCTACTATCGATACGTTGCA
 E V E Y I Q H N G V V Q E S Y Y R Y V A
 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
 CGAGAACAATCATGCGGACGACCAAAATGCACAAAGATCAAGTCGATGTCAAAGATTCTGCC
 R E Q S C R R P N A Q D Q V D V K D S A
 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
 AATCATGAAATCAAAAAGTTTGGTACCAGGATCGCATGGTTCAGAACCAAGTATCAAT
 N H E I K K V L V P G S H G S E P S I N
 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
 GGAAATGCTCCAGCTGAAATCGATTGCGACAAATGCGAACTGTCACTCCCATTCGTATG
 G N A P A E I D L R Q M R T V T P I R M

CAATAATGA-3'

Q - -

Fig. 25 (jatk.)

10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
 5'-ACTGTTAAAGTTCTGGGTGATGATGGTGTTTTGGCCCTCTGCTATTGCTACTCATGCTAAA

 T V K V L G D D G V L A S A I A T H A K

 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
 ATCCGCGATGTTGCCCGCAACTGAATCAGCTTATTTGGCCCTACCGTAACACGCTCTTTGGAT

 I R D V A A T E S A Y L A Y R N T S L D

 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
 CTTTCTGAACAGGAACCTCGTCGATGAATACATCCAACATAATGGTGTCTCGTCCAAAGAAAGC

 L S E Q E L V D E Y I Q H N G V V Q E S

 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
 TACTATCGATACGTTGCACGAGAACAAATCATGCCGACGACCAAAATGCACAACAATTGGAA

 Y Y R Y V A R E Q S C R R P N A Q Q L E

 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
 GCCGTTTTCGAAGCCAAACCAAAACACAAAACGGCTAAAATTGAAATCAAAAGCCTCAATC

 A V F E A N Q N T K T A K I E I K A S I

Fig. 26

20.3.34 24.3.34

310		320		330		340		350		360										
GATGGTTAGAAAGTTATTATTGGCATCAAAGATTAGACGCATTCCGGTCATTATGATGGC																				
	D	G	L	E	V	I	I	G	I	K	D	L	D	A	F	R	H	Y	D	G
370		380		390		400		410		420										
CGAACAAATCATTC AACCGGATAATGGTTACCCAAAGTATCAATGGAAATGCTCCAGCTGAA																				
	R	T	I	I	Q	R	D	N	G	Y	Q	S	I	N	G	N	A	P	A	E
430		440		450		460		470		480										
ATCGATTGCGACAAATGCGAACTGTCACTCCCATCCCATTCGTATGCAAGATCAAGTCGATGTC																				
	I	D	L	R	Q	M	R	T	V	T	P	I	R	M	Q	D	Q	V	D	V
490		500		510		520		530		540										
AAAGATTCTGCCCAATCATGAAATCAAAAAAGTTTGTGTACCAGGATCGCATGGTTCAGAA																				
	K	D	S	A	N	H	E	I	K	K	V	L	V	P	G	S	H	G	S	E

CCATAATGA-5'

P - -

Fig. 26 (jatk.)

10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
5'-ACTGTTAAAGTTTGGGTGATGGTGTTTTGGCCCTCAGCTATTGCTACTCATGCTAAA
T V K V L G D D G V L A S A I A T H A K
70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
ATCCGCGATAGTATCAATGGAAATGCTCCAGCTGAAATCGATTTCGACAAAATGCCGAAC
I R D S I N G N A P A E I D L R Q M R T
130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
GTCACTCCCATTCGTATGCAAGAATAACATCCAAACATAATGGTGTCTCGTCCAAAGAAAGCTAC
V T P I R M Q E Y I Q H N G V V Q E S Y
190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
TATCGATACGTTGCACGAGAACAAATCATGCCCACGACCAAAATGCACAAATTATTGGCATC
Y R Y V A R E Q S C R R P N A Q I I G I
250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
AAAGATTAGACGCATTCCTCGTCATTATGATGGCCGGAACAATCATTCACGCCGATAATGGT
K D L D A F R H Y D G R T I I Q R D N G

Fig. 27

001094 961757

310		320		330		340		350		360									
TACCAACAATTGGAAGCCGTTTTCGAAGCCAAACCAAAACACAAAACGGCTAAAATTGAA																			
Y	Q	Q	L	E	A	V	F	E	A	N	Q	N	T	K	T	A	K	I	E
370		380		390		400		410		420									
ATCAAAGCCTCAATCGATGGTTTAGAAGTTGATCAAGTCGATGTCAAAGATTCAGCCAAT																			
I	K	A	S	I	D	G	L	E	V	D	Q	V	D	V	K	D	S	A	N
430		440		450		460		470		480									
CATGAAATCAAAAAAGTTTGGTACCAGGATCACAATGGTTCAGAAACCAAGTTGCCGCAACT																			
H	E	I	K	K	V	L	V	P	G	S	H	G	S	E	P	V	A	A	T
490		500		510		520		530		540									
GAATCAGCTTATTGGCCTACCGTAACACGCTCTTTGGATCTTTCTGAACAGGAACTCGTC																			
E	S	A	Y	L	A	Y	R	N	T	S	L	D	L	S	E	Q	E	L	V

GATTAGTAG-5'

D - -

Fig. 27 (jatk.)

201304 04103

DP	I-23.1	EYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQ
DP	I-23.1.1	KKEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQ
DP	I-23.1.2	KEYIQHNGVVQESYYRYVAREQSCRRPNAQ
DP	I-23.1.3	EYIQHNGVVQESYYRYVAREQSSRRPNAQ
DP	I-23.1.4	EYIQHNGVVQESYYRYVAREQSERRRPNAQ

DP	II-22	QLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEV
DP	II-22.1	KKQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEV
DP	II-22.2	KQLEAVFEANQNTKTAKIEIKASIDGLEVK

Fig. 28