



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **321557**

(13) **B1**

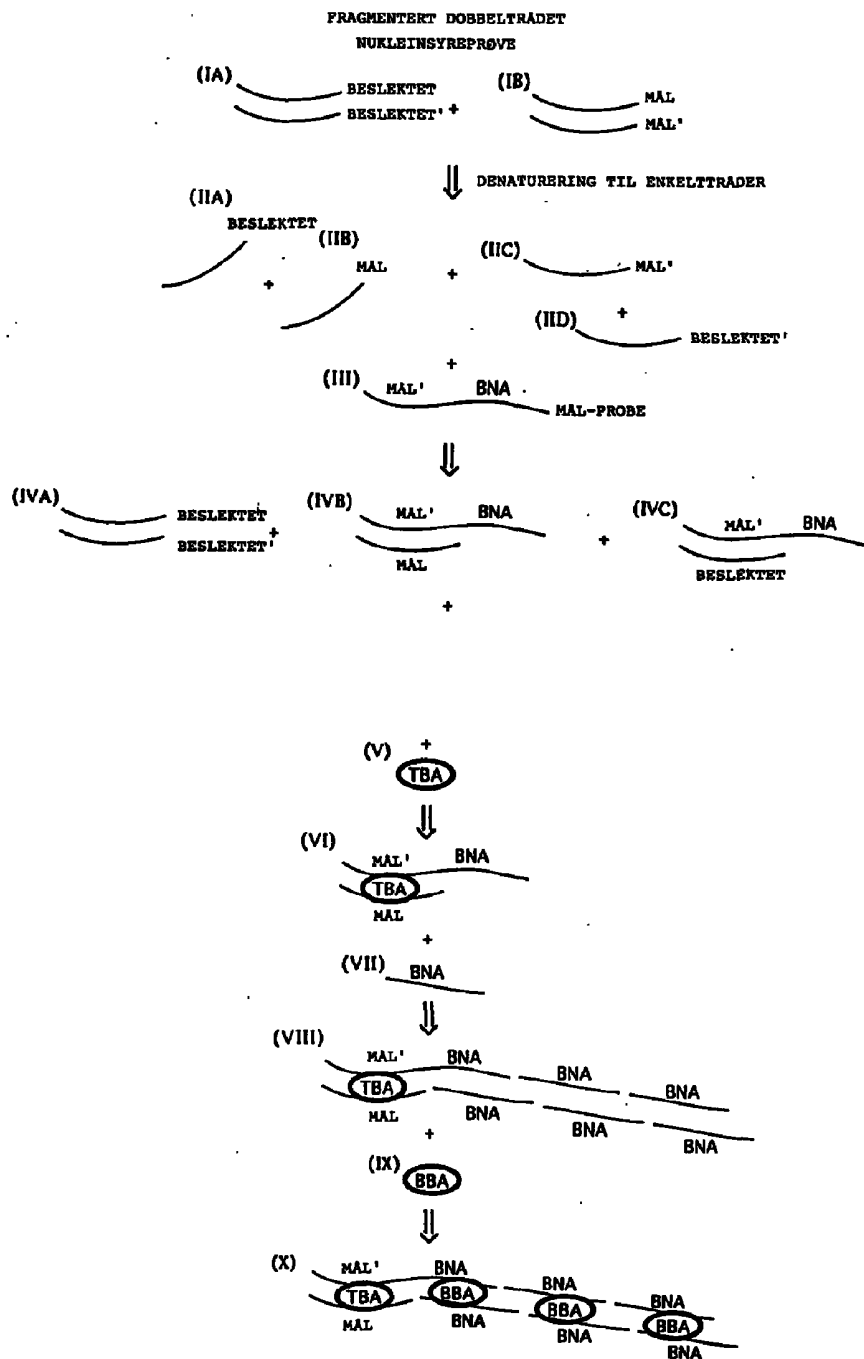
(51) Int Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19972611	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.12.07 PCT/US95/15944
(22)	Inng.dag	1997.06.06	(85)	Videreføringsdag	1997.06.06
(24)	Løpedag	1995.12.07	(30)	Prioritet	1994.12.09, US, 353476
(41)	Alm.tilgj	1997.08.11			
(45)	Meddelt	2006.05.29			
(73)	Innehaver	The Gene Pool Inc, 300 Queen Anne Avenue North, Suite 392, WA98109-4599 SEATTLE, US Susan Weininger, c/o The Gene Pool Inc, 300 Queen Anne Avenue North, Suite 392, WA98109-4599 SEATTLE, US Arthur M Weininger, c/o The Gene Pool Inc, 300 Queen Anne Avenue North, Suite 392, WA98109-4599 SEATTLE, US			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for påvisning av nukleinsyrer med en bestemt sekvenssammensetning			
(56)	Anførte publikasjoner	EP 0 147 665 A1, EP 0 450 594 A2, EP 0 453 301 A2, WO 9300446 A1			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse er en ny fremgangsmåte for påvisning og lokalisering av spesifikke nukleinsyresekvenser i en prøve med høy grad av sensitivitet og spesifisitet. Fremgangsmåten og de nye preparater som benyttes i fremgangsmåten, omfatter anvendelse av probenukleinsyrer, fremstilling av bindingsområder i nukleinsyren og anvendelse av målbindingsansamlinger i nukleinsyren for påvisning og lokalisering av spesifikke målnukleinsyrer. Påvisning og lokalisering av målnukleinsyren oppnås selv i nærvær av nukleinsyrer med lignende sekvenser. Fremgangsmåten tilveiebringer en høy grad av amplifisering av signalet som dannes ved hver spesifikke bindingsbegivenhet. Nærmere bestemt presenteres fremgangsmåter og preparater for påvisning av HIV- og HPV-nukleinsyre i prøver. Disse fremgangsmåter og preparater kan anvendes ved diagnose av sykdom, genetiske undersøkelser, rettsmedisinske formål og analyse av nukleinsyreblandinger. Noen av de nye preparater som benyttes i påvisningsfremgangsmåten, er anvendbare for forebyggelse eller behandling av patogene tilstander.



FIGUR 8B

Oppfinnelsens bakgrunn

1. Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangs-
5 måte for påvisning av spesifikke målnukleinsyresekvenser i en
prøve med fidelitet og nøyaktighet, selv i nærvær av nært
beslektede, men forskjellige nukleinsyrer. Påvisningen kan
omfatte oppsamling og sammensetning av spesifikke molekyler
til målbindingsansamlinger som spesifikt binder målbin-
10 dingsområder som dannes ved hybridisering av probenukleinsyrer
og målnukleinsyresekvenser. Påvisningen omfatter tilveie-
bringelse av én eller flere påvisbare merkingsgrupper,
heriblant radioaktive, lys- eller fluorescensutsendende,
enzymatiske eller andre påvisbare eller signaldannende
15 molekyler, forbundet med probenukleinsyren, målbindings-
ansamlingen, forsterkernukleinsyren, forsterkerbindings-
ansamlingen eller hårnålsnukleinsyren.

Oppfinnelsen gjelder også fremgangsmåte for påvisning
av en målnukleinsyre, kjennetegnet ved at den omfatter å:

- 20 (a) fremskaffe en prøve som inneholder en hybrid som skal bli
påvist, eller en prøve som inneholder en målnukleinsyre og en
probenukleinsyre som hybridiserer slik at et probe-målhybrid
dannes, og
- (b) bringe hybridene i trinn (a) i kontakt med et nukleinsyre-
25 bindende molekyl eller ansamling (TBA), der TBA er i stand til
å binde til og stabilisere hybridene på en sekvensspesifikk
måte, og videre der TBA er i stand til å skille mellom en
hybrid som er dannet av proben og målnukleinsyren, og en
hybrid som har én eller flere feilaktige baseparinger som er
30 dannet mellom proben og en nært beslektet eller ubeslektet
sekvens.

2. Oppfinnelsens bakgrunn og beskrivelse av teknikkens stand

Det er et økende antall tilfeller i hvilke det er
35 viktig å kunne påvise nukleinsyrer som inneholder en spesifikk
sekvens, i det påfølgende betegnet målnukleinsyrer (TNA), i en
prøve. Det er ønskelig å kunne påvise TNA med det laveste an-
tall prosesseringstrinn, med de enkleste bestanddeler og til

utelukkelse av andre, lignende, men forskjellige nukleinsyrer, i det påfølgende kalt beslektede nukleinsyrer (CNA). Det er ønskelig å kunne påvise spesifikke TNA og utelukke alle CNA i analyseprøven uten behov for amplifisering eller annen type
5 post-deteksjonsprosessering.

Det finnes en rekke fremgangsmåter som benytter immobiliserte eller merkede nukleinsyrer som prober for TNA. Ved bruk av kjente fremgangsmåter er det imidlertid vanskelig å skille mellom en TNA bundet til en probenukleinsyre (PNA) og
10 en CNA bundet til PNA. For eksempel kan én eller flere umake baser i PNA og en CNA fortsatt føre til en CNA-PNA-hybridisering som nesten ikke kan atskilles fra en TNA-PNA-hybridisering. Hybridisering alene er således ingen optimal indikator på at en PNA har hybridisert til en unik TNA.

15 Det er mange situasjoner i hvilke en PNA ville benyttes for å prøve å fastslå hvorvidt en TNA foreligger i en prøve som kan inneholde CNA. Hybridisering av PNA til enhver CNA vil i denne situasjon begrense den diagnostiske verdi som PNA kunne ha for påvisning av en TNA uten ytterligere verifisering. Videre er det ønskelig å kunne påvise og lokalisere TNA
20 med lavt kopitall i prøver som kan inneholde mange kopier av CNA, uten å måtte lage ytterligere kopier av denne TNA. Det ville også være ønskelig å kunne bekrefte nærvær av CNA, uavhengig av TNA, uten behov for å atskille CNA og TNA i prøven.

25 Videre ville det være ønskelig å kunne amplifisere signalet fra selv en lite hyppig forekommende TNA-PNA-hybridisering. For dette formål ville en fremgangsmåte for å polymerisere flere kopier av en "merkelapp", i det påfølgende betegnet en forsterkernukleinsyre (BNA) på TNA-PNA-komplekset,
30 være ønskelig.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fremgangsmåter for å oppnå de ovenfor nevnte, ønskede mål. Som vist ved den påfølgende oversikt, har de fremgangsmåter ikke tidligere blitt beskrevet eller foreslått innen faget. En generell og
35 omfattende oversikt over teknikkens stand med hensyn til nukleinsyrepåvisning er gitt i Keller, H., M.M. Manak (1989), DNA Probes, Stockton Press. Se også EP 0 453 301 A2, EP 0 147 665 A1, EP 0 450 594 A2, WO 9300446 A1.

En fremgangsmåte for påvisning av umake basepar ved kjemiske midler for å fastslå hvorvidt en PNA har hybridisert til en CNA snarere enn til en TNA, er beskrevet. I US patentskrift nr. 4 794 075, tildelt Ford et al., diskuteres en fremgangsmåte for å skille mellom DNA-fragmenter som inneholder umake enkeltbaser fra disses perfekt parede homologer. Enkelttrådede områder i et dupleksfragment modifiseres med et karbodiimid som reagerer med uparede guanin- (G) og tymin- (T) rester i DNA. Lineære dupleks-DNA-molekyler reagerer ikke, mens DNA-molekyler med enkelte umake basepar reagerer kvantitativt. Etter reaksjonen med karbodiimid fraksjonerer DNA-molekylene på høyprosentige polyakrylamidgeler slik at modifiserte og ikke-modifiserte fragmenter kan atskilles. Ford et al. benyttet denne teknikk for å lokalisere og rense DNA-sekvensforskjeller ansvarlige for fenotypevariasjon og arvelig sykdom. Selv om denne fremgangsmåte er anvendbar for å følge variasjoner i genetisk materiale, har den et stort antall trinn, den krever kostbare komponenter, og den byr ikke på noen direkte måte for å fastslå hvorvidt en PNA har hybridisert til TNA og ikke til CNA i prøven.

Noen forsøk er blitt gjort på å forsikre at i det minste en del av hybridiseringen mellom PNA og en annen nukleinsyre er komplementær. En fremgangsmåte omfatter å følge dannelsen av transkripsjonsprodukter som fremstilles dersom PNA hybridiserer til en nukleinsyre i tilstrekkelig stor grad til å kunne transkriberes fra et promotersete i proben. US patentskrift nr. 5 215 899, tildelt Dattagupta, beskriver hvordan spesifikke nukleinsyresekvenser amplifiseres ved bruk av en hårnålsprobe som, etter hybridisering med og ligering til en målsekvens, er i stand til å transkriberes. Proben omfatter en enkelttrådet, selvkomplementær sekvens som under hybridiseringsbetingelser danner en hårnålsstruktur med et funksjonelt promoterområde, og som videre omfatter en enkelttrådet probesekvens nær hårnålssekvensens 3' ende. Ved hybridisering med en målsekvens som er komplementær til probesekvensen og ligering av den 3' ende av den hybridiserte målsekvens til hårnålsprobens 5' ende, gjøres målsekvensen transkriberbar i nærvær av en egnet RNA-polymerase og passende ribo-

nukleosidtrifosfater (rNTP). Amplifisering oppnås ved å hybridisere den ønskede TNA-sekvens med proben, ligere TNA til PNA, tilsette RNA-polymerasen og rNTP til de atskilte hybrider og la transkripsjonen forløpe inntil en ønsket mengde RNA-transkripsjonsprodukt har akkumulert. Denne fremgangsmåte
 5 bruker generelt og spesifikt hårnåls-DNA utformet med en enkeltrådet, uparet ende for hybridisering til en målsekvens. Når målsekvensen er bundet, tillates produksjon av RNA-transkripsjonsprodukter. Fremgangsmåten omfatter således på-
 10 visning av sekundære transkripsjonsprodukter snarere enn anvendelse av en nukleinsyrebindende ansamling for direkte immobilisering og/eller lokalisering av en målsekvens. En CNA kunne lett bindes til proben, og manglende komplementaritet ville ikke nødvendigvis forstyrre dannelsen av et CNA-PNA-
 15 hybrid som deretter kunne understøtte produksjon av uønskede transkripsjonsprodukter.

En CNA bundet til PNA, kunne påvises dersom manglende komplementaritet forstyrrer det hybride CNA-PNA-pars evne til å kuttes av en restriksjonsendonuklease. I US patentskrift nr.
 20 5 118 605, tildelt Urdea, og US patentskrift nr. 4 775 619, tildelt Urdea, ble nye fremgangsmåter for analyse av en nukleinsyre tilveiebrakt, som benytter polynukleotider med oligonukleotidsekvenser som i det vesentlige er homologe til en sekvens av interesse i analysematerialet, hvor nærvær eller
 25 fravær av hybridisering ved en på forhånd bestemt stringens, gir frigjøring av en merket gruppe fra støttemidlet. Forskjellige teknikker benyttes for å binde en merket gruppe til et støttemiddel, hvorved en merket gruppe kan frigjøres fra støttemidlet ved kløyving av enten en enkelt- eller dobbelt-
 30 binding, og hvor frigjøring av den merkede gruppe kan påvises som indikativ på nærvær av en gitt polynukleotidsekvens i en prøve. Denne teknikk har imidlertid den ulempe at et CNA-PNA-par kunne kuttes av restriksjonsendonukleasen selv om det foreligger uparede nukleotider, så sant de uparede nukleotider
 35 ligger utenfor endonukleasens gjenkjenningssete. Dette ville føre til at analysen sviktet når det gjelder å identifisere et CNA-PNA-hybrid.

En annen fremgangsmåte benytter en forgrenet DNA-

probe for å påvise nukleinsyrer. US patentskrift nr.

5 124 246, tildelt Urdea et al., beskriver lineære eller for-
grenede oligonukleotidmultimerer som er anvendbare som for-
sterkere i biokjemiske analyser, som omfatter (1) i det minste
5 én første, enkelttrådet oligonukleotidenhet (PNA) som er kom-
plementær til en enkelttrådet oligonukleotidsekvens av inter-
esse (TNA), og (2) et stort antall andre, enkelttrådede oligo-
nukleotidenheter som er komplementære til et enkelttrådet,
merket oligonukleotid. Selv om forsterkede "sandwich"-nuklein-
10 syrehybridiseringer og immunoanalyser som benytter multi-
merene, beskrives, har fremgangsmåten den begrensning at PNA-
CNA-hybridisering kunne forekomme og føre til produksjon av
uønsket signal.

I tillegg til fremgangsmåter for identifisering av
15 TNA har fremgangsmåter blitt beskrevet for amplifisering av
dette DNA. I US patentskrift nr. 5 200 314, tildelt Urdea,
påvises en polynukleotidtråd med en sekvens som skal analys-
eres (TNA) i en prøve som inneholder polynukleotider, ved å
sette polynukleotidet som skal analyseres, i forbindelse med
20 en innfangingsprobe (PNA) under hybridiseringsbetingelser,
hvor innfangingsproben har en første bindingspartner som er
spesifikk for TNA, og en andre bindingssekvens som er spesi-
fikk for en tredje bindingspartner festet til en fast fase.
Den resulterende dupleks immobiliseres så ved spesifikk bin-
25 ding mellom bindingspartnerne, og ubundne polynukleotider
skilles fra de bundne. Polynukleotidet som skal analyseres,
kan, om ønskelig, frigjøres fra den faste fase og deretter
amplifiseres ved PCR. PCR-primerne har begge et polynukleotid-
område som er i stand til å hybridisere til et område i poly-
30 nukleotidet som skal analyseres, og minst én av primerne har i
tillegg nok en bindingspartner som er i stand til å bindes til
en bindingspartner festet til en fast fase. Amplifiseringspro-
duktet skilles så fra reaksjonsblandingen ved spesifikk bin-
ding mellom bindingspartnerne, og det amplifiserte produkt
35 påvises. Selv om det er mulig å bekrefte (ved PCR) at en gitt
nukleinsyre har hybridisert med PNA, er denne bekreftelse dyr
og omfatter flere trinn.

Når det gjelder rapporter som angår interaksjon mel-

lom en dobbelttrådet nukleinsyre og et DNA-bindende protein, er en fremgangsmåte beskrevet hvori en sekvens av immobilisert DNA som inneholder bindings seter for et enkelt protein, benyttes til å rense dette protein. US patentskrift nr. 5 122 600, tildelt Kawaguchi et al., beskriver en DNA-immobilisert mikrokule som inneholder DNA-tråder med basesekvenser som spesifikt binder et gitt protein, og en bærer med partikkelstørrelse ikke større enn 50 µm og ikke mindre enn 0,01 µm som ikke adsorberer protein, hvor bæreren og DNA-trådene bindes til hverandre ved en kjemisk binding, og en fremgangsmåte for rensing av et protein ved bruk av mikrokulen. Da dette er en rensfremgangsmåte for et protein, beskrives ingen fremgangsmåte for påvisning av en TNA, og heller ingen fremgangsmåte ved hvilken mer enn ett protein bindes til en dobbelttrådet nukleinsyre i den hensikt å påvise og lokalisere spesifikke TNA-sekvenser.

I EP 0 453 301 beskrives en fremgangsmåte for påvisning av en mål-polynukleotidsekvens i en prøve hvori sekvenser i en TNA påvises ved hybridisering av en første og en andre PNA til TNA. Både den første og den andre PNA inneholder en på forhånd dannet duplekssekvens, eller en dupleks som er dannet ved kjedeforlengelse, som er i stand til å binde et nukleotidsekvensspesifikt bindingsprotein. En fremgangsmåte for å binde et nukleotidspesifikt bindingsprotein til en dupleks dannet mellom en TNA og en PNA først ved dannelsen av en dupleks mellom PNA og TNA, er hverken beskrevet eller foreslått.

I US patentskrift nr. 4 556 643 beskrives en fremgangsmåte for ikke-radioaktiv påvisning av spesifikke nukleotidsekvenser i en prøve som omfatter hybridisering av en probe som inneholder spesifikke sekvenser for et DNA-bindende protein. Denne beskrivelse hverken lærer eller antyder en fremgangsmåte for å binde et nukleotidspesifikt bindingsprotein til en dupleks dannet mellom TNA og PNA, kun etter dannelsen av en dupleks mellom sekvenser som foreligger i PNA og sekvenser som foreligger i TNA.

Kort oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse beskriver fremgangsmåter ved

hvilke spesifikke målnukleinsyresekvenser (TNA) påvises ved benyttelse av probenukleinsyrer (PNA) som ved hybridisering med TNA er i stand til å binde målbindingsansamlinger (TBA). Hver TBA bindes til minst ett spesifikt område i PNA-TNA-hybridparet, målbindingsområdet (TBR). TBA består av ett eller flere molekyler av hvilke ett eller flere kan bindes til TBR-sekvenser på en spesifikk og sekvens- eller konformasjonsavhengig måte. TBA kan bestå av én eller flere styresekvenser, betegnet "piloter" eller "asymmetrisekvenser", som ansamler og begrenser de nukleotidbindende bestanddeler i TBA til spesifikke geometrier. Pilotene virker ved å ansamle spesifikke nukleinsyregjenkjenningssenheter eller andre piloter, til hvilke spesifikke nukleinsyregjenkjenningssenheter er koblet, inn i TBA på en på forhånd bestemt måte. TBA kan også inneholde ett eller flere molekyler som forankrer eller lokaliserer TBA. Nye TBA med enestående sonderingsegenskaper som overraskende nok gjør TBA anvendbar ikke bare som diagnostisk verktøy, men også som profylaktiske eller terapeutiske forbindelser, beskrives også. Videre beskrives fremgangsmåter og preparater for anvendelse av PNA, TBR, TBA og TBA-piloter, heriblant deres anvendelse som bestanddeler i analysesett for diagnose og rettsmedisinsk anvendelse, og anvendelse av de nye TBA som profylaktiske og terapeutiske midler.

PNA kan i tillegg til TNA-spesifikke sekvenser også inneholde én eller flere sekvenser, 1/2 BBR, i stand til å hybridisere med komplementære 1/2 BBR i forsterkernukleinsyrer (BNA). Ved hybridisering av tilsatte BNA til de opprinnelige 1/2 BBR som foreligger i PNA, lages forlengelser i PNA i form av PNA-BNA- og deretter BNA-BNA-hybrider. Disse forlengelser kan inneholde ett eller flere forsterkerbindingsområder (BBR). Hvert BBR er i stand til å binde en forsterkerbindingsansamling (BBA). BBA består av molekyler av hvilke ett eller flere kan bindes til et BBR på en spesifikk og sekvens- eller konformasjonsavhengig måte. BBA kan inneholde én eller flere styringssekvenser, betegnet "piloter" eller "asymmetrisekvenser" som ansamler og avgrenser de nukleotidbindende bestanddeler i TBA til spesifikke geometrier. Pilotene virker ved å ansamle spesifikke nukleinsyregjenkjenningssenheter

eller andre piloter, til hvilke spesifikke nukleinsyregjenkjenningsenheter er tilkoblet, inn i BBA på en på forhånd bestemt måte. BBA kan inneholde molekyler som forankrer eller lokaliserer BBA, eller som tillater påvisning av de bundne BBA og derved av TBA-TNA-PNA-kompleksene til hvilke de er bundet. Videre beskrives fremgangsmåter og preparater for anvendelse av 1/2 BBR, BNA, BBR, BBA og BBA-piloter, heriblant deres anvendelse som bestanddeler i analysesett for diagnostisk og rettsmedisinsk anvendelse.

Fremgangsmåter og preparater beskrives for anvendelse av hårnålsnukleinsyrer (HNA) som termineringsstrukturer. HNA inneholder et selvhybridiserende område og et enkelttrådet 1/2 BBR som under hybridiseringsbetingelser kan hybridisere direkte til 1/2 BBR i PNA eller 1/2 BBR i BNA allerede bundet til PNA, slik at videre binding av BNA til PNA eller til andre BNA termineres.

Fremgangsmåter og preparater beskrives for analysefremgangsmåter og fremstilling av et analysesett som inneholder PNA, TBA, TBR, BNA, BBR, BBA og HNA for påvisning av, lokalisering av og differensiering mellom spesifikke nukleinsyresekvenser, heriblant nukleinsyresekvenser som foreligger i humane celler, i det humane immunodefisiensvirus (HIV), humant papillomavirus (HPV) og i andre nukleinsyreholdige systemer, heriblant virus og bakterier.

Følgelig er det et formål å tilveiebringe fremgangsmåter og preparater for anvendelse ved binding, påvisning og signalamplifisering av spesifikke målnukleinsyrer i en prøve med fidelitet og nøyaktighet, selv i nærvær av nært beslektede, men forskjellige nukleinsyresekvenser.

Følgelig er det et formål å tilveiebringe fremgangsmåter og preparater for dannelselse av målbindingsansamlinger som spesifikt bindes til målbindingsområder som dannes ved hybridisering mellom probenukleinsyrer og målnukleinsyresekvenser.

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte og preparater for dannelselse av forsterkerbindingsansamlinger som spesifikt bindes til forsterkerbindingsområder dannet ved hybridisering av forsterkernukleinsyresekvenser til probe-

nukleinsyrer, forsterkernukleinsyrer og hårnålsnukleinsyrer.

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte og preparater som inneholder hårnålsnukleinsyrer som tillater kontroll av størrelsen av spesifikt eller uspesifikt for-
 5 lengede forsterkernukleinsyrer og forsterkerbindingsansamlinger som benyttes i amplifisering av PNA-TNA-hybridiseringsbegivenheter.

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte og preparater for anvendelse ved seleksjon, ansamling og/eller
 10 styring av spesifikke molekyler, alle med nukleinsyrebindingsdiskriminerende egenskaper, inn i mål- og forsterkerbindingsansamlinger.

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte og preparater for anvendelse ved amplifisering av deteksjonen
 15 av målbindingsansamlinger bundet til målbindingsområder ved bruk av forsterkerbindingsansamlinger og forsterkernukleinsyrer.

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte og preparater som tillater anvendelse av én eller flere
 20 påvisbare, merkede grupper, heriblant, men ikke begrenset til, radioaktiv merking, lysutsendende molekyler, fluorescerende molekyler, enzymatiske molekyler eller andre signaldannende molekyler. Disse merkede grupper benyttes sammen med probe-nukleinsyrer, målbindingsansamlinger, forsterkerbindingsansamlinger, forsterkernukleinsyrer eller hårnålsnukleinsyrer.
 25

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte for isolering av nukleinsyrefragmenter som har TBA-komponentbindings seter fra en organisme, for å danne probenukleinsyrer og TBA som er unike for dette fragment eller denne organisme.

30

Kort beskrivelse av figurene

Følgende illustrasjoner finnes i figur 1: figur 1-I er en PNA som inneholder en 1/2 TBR som er en enkelttrådet sekvens som er komplementær til en TNA, og en 1/2 BBR-sekvens.
 35 Figur 1-IIa er en TNA til hvilken bestanddelene i figur 1-I er tilsatt, og som under hybridiseringsbetingelser binder PNA slik at bestanddelene i figur 1-IIIa dannes, et PNA-TNA-hybrid som inneholder minst ett TBR. Figur 1-IVa er en BNA som til-

settes til bestanddelene i figur 1-IIIa, og som under hybridiseringsbetingelser bindes til 1/2 BBR i figur 1-IIIa slik at et PNA-BNA-hybrid med et BBR dannes, som vist i figur 1-Va.

Figur 1-IIb er en BNA til hvilken bestanddelene i figur 1-I er tilsatt, og som under hybridiseringsbetingelser binder PNA slik at bestanddelene i figur 1-IIIb dannes, et PNA-TNA-hybrid som inneholder et BBR. Figur 1-IVb er en TNA til hvilken bestanddelene i figur 1-IIIb er tilsatt, og som under hybridiseringsbetingelser binder det foreliggende 1/2 TBR i figur 1-IIIb slik at et PNA-BNA-hybrid som inneholder et TBR, dannes, som vist i figur 1-Vb.

Figur 1-IIc er en HNA som tilsettes til bestanddelene i figur 1-I, og som under hybridiseringsbetingelser binder PNA slik at bestanddelene i figur 1-IIIc dannes, et PNA-HNA-hybrid som inneholder et BBR. Figur 1-IVc er et TNA som tilsettes til bestanddelene i figur 1-IIIc, og som under hybridiseringsbetingelser bindes til det 1/2 TBR som foreligger i figur 1-IIIc slik at PNA-BNA-hybrid som inneholder et BBR, dannes, som vist i figur 1-Vc.

Hybridene som danner TBR og BBR, er anvendbare i foreliggende oppfinnelse. PNA og BNA kan, som antydnet i figur 1, mangle tilkoblet støttemiddel og/eller indikator (OSA), eller de kan inneholde tilkoblet støttemiddel eller andre lokaliseringsmidler, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer.

Figur 2a er et diagram over strategier for polymerisering av BNA på PNA og terminering av HNA.

Figur 2b er et diagram over ytterligere strategier for amplifisering av PNA-TNA-signaler ved polymerisering av BNA og terminering med HNA.

Figur 3 er et diagram som viser anvendelse av BNA som inneholder flere 1/2 BBR pr. BNA.

Figur 4a er et diagram som viser binding av TBA og BBA til TBR og BBR, og evnen til TBA til å skille mellom TNA og CNA. Ifølge denne utførelse vil, dersom TBA er immobilisert, enten på en kule, en mikrotiterplateoverflate eller enhver annen overflate, kun komplekser som kompleks X tilbake-

holdes og påvises, mens komplekser som kompleks XI ikke vil tilbakeholdes og påvises.

Figur 4b er et diagram som viser eksempler på hendelser som tilsvarer dem vist i figur 4a, men i en noe forskjellig rekkefølge.

Figur 5 er et diagram som viser eksempler på PNA som inneholder mellom ett 1/2 TBR og ingen 1/2 BBR til PNA som inneholder opp til fem 1/2 TBR og ett 1/2 BBR. (a)- og (b)-medlemmene under hvert romertall (I, II, III, IV, V) danner et sett som ved hybridiseringsbetingelser til et TNA, tilveiebringer TBR enten med ((a)-medlemmer) eller uten ((b)-medlemmer) et tilgjengelig 1/2 BBR for amplifisering ved hybridisering til BNA med komplementære 1/2 BBR.

Figur 6a er et diagram som viser eksempler på en gitt TNA med to 1/2 TBR som ved binding av et passende PNA danner to tett sammenbundne TBR som er i stand til å binde to TBA. Et 1/2 BBR for amplifisering foreligger også.

Figur 6b er et diagram som viser de samme begivenheter som i figur 6a, bortsett fra at her benyttes en dobbelt TBA slik at diskrimineringen mellom enkle TBR som foreligger i normale, cellulære prøver, kan atskilles fra unormale, doble TBR.

Figur 6c er et diagram som viser de samme begivenheter som i figur 6a, bortsett fra at her foreligger fem TBR i TNA. Hvert TBR kan bindes til en tilsvarende eller ulik TBA, og hver TBA kan være merket på forskjellig måte, noe som tillater bekreftelse av at alle fem seter foreligger i TNA.

Figur 6d er et diagram over de samme begivenheter som i figur 6c, bortsett fra at her er en dobbel TBA vist, slik at hva som er vist i figur 6b, utvides til benyttelse av den doble TBA. Et eksempel på den TNA vist i del II i figurene 6a, 6b, 6c og 6c, er enkelttrådet DNA eller RNA fra HIV.

Figur 7 viser HIV-LTR som en TNA, og to PNA, og en strategi for påvisning av TNA ved bruk av disse PNA.

Figur 8 er en skjematisk fremstilling av én utførelse av foreliggende oppfinnelse, hvori en målbindingsansamling benyttes til å binde et TNA-PNA-hybrid, og forsterkerbindingsansamlinger benyttes for binding av polymeriserte BNA.

Figur 9 er en skjematisk fremstilling av en modulær TBA i hvilken ansamlingssekvenser, koblingssekvenser og asymmetrisekvenser benyttes til å føre ønskede nukleinsyregjenkjenningssenheter sammen slik at en TBA dannes.

5 Figur 10 viser modulære TBA som er anvendbare for påvisning av HIV-spesifikke sekvenser.

Figur 11 viser modulære TBA anvendbare for påvisning av sekvenser fra humant papillomavirus. Hver E2-enhet er faktisk en dimer av den DNA-bindende del av E2.

10 Figur 12a er en skjematisk fremstilling av TNA-fraksjonering og mobilitetsskift grunnet binding av en TBA.

Figur 12b er en skjematisk fremstilling av TNA-fraksjonering og forsterket mobilitetsskift grunnet binding av BBA i tillegg til TBA.

15 Figur 13 viser en deteksjonsstrategi for delesjonssekvenser; et eksempel på anvendelse av denne strategi er i en integrasjonsanalyse for humant papillomavirus.

Figur 14 viser ansamling av høyere ordens TBA ved benyttelse av nukleinsyregjenkjenningssenheter, koblingssekvenser, ansamlingssekvenser og asymmetrisekvenser slik at forskjellige målbindingsansamlinger spesifikke for bindingssteder i HIV-LTR, dannes.

20 Figur 15 viser ansamling av høyere ordens TBA ved benyttelse av DNA-gjenkjenningssenheter, koblingssekvenser, ansamlingssekvenser og asymmetrisekvenser slik at forskjellige målbindingsansamlinger spesifikke for bindingssteder i HPV-genomet, dannes.

Figur 16 viser diskrimineringen som oppnås ved å benytte en kompleks TBA og evnen til endogene, konkurrerende målbindingsmolekyler til å eliminere binding av TBA til en beslektet nukleinsyre, men ikke til TNA som inneholder den passende orientering av mer enn ett sete som gjenkjennes av TBA.

35 Figur 17 viser evnen til en TBA til spesifikt å rettes mot binding til seter med umake sekvenser, og til fortrinnsvis å binde disse seter fremfor beslektede seter som ikke inneholder alle de umake basepar som TBA er rettet mot.

Kort beskrivelse av sekvensene

SEKV.ID NR. 1 tilsvarende figur 5-Ia-1 og viser NF-kB-bindingssetet i klasse I MHC.

SEKV.ID NR. 2 tilsvarende figur 5 (Ia) og viser NF-kB-bindingssetet i B2-mikroglobulin.

SEKV.ID NR. 3 tilsvarende figur 5 (Ia) og viser NF-kB-bindingssetet i kappa-immunoglobulin.

SEKV.ID NR. 4 tilsvarende figur 5 (Ia) og viser ett av NF-kB-bindingssetene i HIV.

SEKV.ID NR. 5 tilsvarende figur 5 (Ia) og viser ett av NF-kB-bindingssetene i HIV.

SEKV.ID NR. 6 tilsvarende figur 5 (Ia) og viser NF-kB-bindingssetet i c-myc.

SEKV.ID NR. 7 tilsvarende figur 5 (IIa) og viser et dobbelt NF-kB-bindingssete i HIV.

SEKV.ID NR. 8 tilsvarende figur 5 (IIa) og viser et dobbelt NF-kB-bindingssete i HIV.

SEKV.ID NR. 9-16 tilsvarende figur 5 (IIa) og viser et dobbelt bindingssete hvor ett sete er et NF-kB-bindingssete i HIV, og det andre sete et SP1-bindingssete i HIV.

SEKV.ID NR. 17-18 tilsvarende figur 5 (IIa) og viser et dobbelt SP1-bindingssete i HIV.

SEKV.ID NR. 19-31 tilsvarende figur 5 (IIIa) og viser et dobbelt NF-kB-bindingssete i HIV og et SP1-bindingssete i HIV.

SEKV.ID NR. 32-33 tilsvarende figur 5 (IVa) og viser et firedobbelt bindingssete hvor to seter er NF-kB-bindingsseter i HIV og to seter er SP1-bindingsseter i HIV.

SEKV.ID NR. 34 tilsvarende figur 5 (VIa) og viser et femdobbel bindingssete hvor to seter er NF-kB-bindingsseter i HIV og tre seter er SP1-bindingsseter i HIV.

SEKV.ID NR. 35 er et eksempel på et 1/2 BBR, i dette tilfellet OL1-, OL2- og OL3-elementet fra bakteriofag lambdas venstre operator, innbefattet mellomliggende sekvenser.

SEKV.ID NR. 36 er et eksempel på et 1/2 BBR, i dette tilfellet OR3-, OR2- og OR1-elementet fra bakteriofag lambdas høyre operator, innbefattet mellomliggende sekvenser.

SEKV.ID NR. 37 er HIV-LTR.

SEKV.ID NR. 38 er en PNA som er komplementær til PNA i HIV-LTR.

SEKV.ID NR. 39 er en PNA som er komplementær til en annen PNA i HIV-LTR enn SEKV.ID NR. 38.

5 SEKV.ID NR. 40 er en PNA som er komplementær til en del av HIV-LTR, og som også inneholder et 1/2 BBR og en overhengende sekvens for polymerisering av BNA til PNA.

SEKV.ID NR. 41 er en BNA som er komplementær til 1/2 BBR i SEKV.ID NR. 40.

10 SEKV.ID NR. 42 er en BNA som vil polymerisere til BNA fra SEKV.ID NR. 41, og som sammen med SEKV.ID NR. 40 og 41 danner et *PstI*-gjenkjenningssete.

SEKV.ID NR. 43 er en BNA som er komplementær til BNA fra SEKV.ID NR. 42 og som fullstendiggjør et *BamHI*-gjenkjenningssete.

SEKV.ID NR. 44 er en HNA som har et *BamHI*-gjenkjenningssete som vil hybridisere med *BamHI*-gjenkjenningssetet dannet av SEKV.ID NR. 42 og 43 til den voksende polymer.

SEKV.ID NR. 45 er en annen PNA som, i likhet med
20 SEKV.ID NR. 40, er komplementær til en del av HIV-LTR, men ikke til samme sekvens som SEKV.ID NR. 40. SEKV.ID NR. 45 koder også for et 1/2 BBR og et overheng som vil tillate polymerisering av BNA som starter med et *SphI*-gjenkjenningssete.

SEKV.ID NR. 46-62 er PNA spesifikke for humant papillomavirus (HPV) som ved hybridiseringsbetingelser til HPV-sekvenser danner TBR som binder DNA-bindende proteiner fra HPV.

SEKV.ID NR. 63-71 er NF-kB-DNA-gjenkjenningssenheter for inkorporering i TBA.

SEKV.ID NR. 72 er en kjernelokaliseringssekvens.

30 SEKV.ID NR. 73 er en SP1-sekvensgjenkjenningssenheter.

SEKV.ID NR. 74 er en gjenkjenningssenheter for TATA-bindende protein.

SEKV.ID NR. 75-84 er gjenkjenningssenheter for papillomavirus E2-DNA.

35 SEKV.ID NR. 85-92 er asymmetrisekvenser.

SEKV.ID NR. 93 er en gjenkjenningssenheter for TATA-bindende protein for arabidopsis.

SEKV.ID NR. 94 er en gjenkjenningssenheter for HPV-16-

E2-1-DNA-bindende protein.

SEKV.ID NR. 95 er en gjenkjenningssenhetsenhet for HPV-16-E2-2-DNA-bindende protein.

SEKV.ID NR. 96 er en gjenkjenningssenhetsenhet for HPV-18-E2-DNA-bindende protein.

SEKV.ID NR. 97 er en gjenkjenningssenhetsenhet for HPV-33-E2-DNA-bindende protein.

SEKV.ID NR. 98 er en gjenkjenningssenhetsenhet for E2-DNA-bindende protein fra bovin papillomavirus.

SEKV.ID NR. 99-102 er eksempler på koblingssekvenser.

SEKV.ID NR. 103 er et eksempel på en kjernelokaliseringssignalsekvens (NLS).

SEKV.ID NR. 104-108 er eksempler på styresekvenser.

SEKV.ID NR. 109-116 er eksempler på ansamlede TBA-sekvenser.

SEKV.ID NR. 117 er et konsensus NF-kB-bindingssete.

SEKV.ID NR. 118 er en Tat-aminosyresekvens fra HIV.

Forkortelser

20

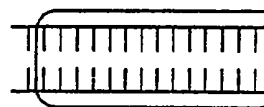


enkelttrådet nukleinsyre



dobbeltrådet nukleinsyre

25



bindingsområde på nukleinsyre

30



ingen støtte eller indikatorer, eller fast støttemiddel, eller andre lokaliseringssmidler, heriblant, men ikke begrenset til, kobling til kuler, polymerer og overflater, eller indikatorer = OSA

BBAforsterkerbindingsansamling

BBRforsterkerbindingsområde

BNAforsterkernukleinsyre

CNAbeslektet nukleinsyre

1/2 BBRenkelttrådet område som ved hybridisering til den

komplementære sekvens i en HNA eller en
 BNA, kan binde en BBA
 1/2 TBRenkelittrådet område i PNA som ved hybridisering til den
 komplementære sekvens i en TNA, kan binde
 5 en TBA
 OSAvalgfritt støttemiddel eller tilkobling, innrammet sirkel
 PNAprobenukleinsyre
 TBAmålbindingsansamling
 TBRmålbindingsområde
 10 TNAmålnukleinsyre
 HNAhårnålsnukleinsyre

Definisjoner

Det bør også forstås fra beskrivelsen som følger, at
 15 når begreper som målbindingsansamlinger (TBA), forsterkerbin-
 dingsansamlinger (BBA), DNA-bindende proteiner, nukleinsyre-
 bindende proteiner og RNA-bindende proteiner nevnes, menes
 sammensetninger som omfatter molekyler som bindes til DNA-
 eller RNA-målnukleinsyresekvenser (TNA), uavhengig av spesifi-
 20 siteten til den kategori bindingsmolekyler fra hvilke de er
 avledet. Således kan f.eks. en TBA tilpasset binding til sek-
 venser fra humant immunodefisiensvirus, ligne mest på en NF-
 KB-transkripsjonsfaktor som typisk binder DNA-sekvenser. Som
 benyttet heri, vil det imidlertid forstås at TBA kan tilpasses
 25 optimal anvendelse for binding til RNA-sekvenser med en gitt
 sekvenssammensetning eller konformasjon.

Fideliteten av deteksjonsfremgangsmåten som beskrives
 her, avhenger i stor grad av den selektive binding av TBA og
 BBA til gitte nukleinsyremotiver. Det bør forstås i hele denne
 30 beskrivelse at grunnlaget for TBA- og BBA-diskriminering mel-
 lom TNA og beslektede sekvenser (slektningsnukleinsyrer eller
 CNA) kan være dannelsen av nøyaktige probenukleinsyre- (PNA)
 målnukleinsyre- (TNA) hybridsegmenter (PNA-TNA-hybrider).
 Grunnlaget for diskrimineringen kan imidlertid like gjerne
 35 være dannelsen av en gitt konformasjon og krever ikke nødven-
 digvis fullstendig fravær av umake basepar i TNA-PNA-hybridet.
 Følgelig bør grunnlaget for virkningen av TBA eller BBA gjen-
 nomgående forstås å avhenge av diskriminering mellom enhver

egenskap som er enestående for TNA-PNA-hybridet og egenskaper som fremvises av ethvert PNA-CNA-hybrid som kan dannes i en analyseprøve som settes i kontakt med en gitt PNA.

5 Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for spesifikk identifisering av en målnukleinsyre (TNA) i en prøve ved bruk av målbindingsansamlinger (TBA) som innfører spesifikke, nukleinsyrebindende proteiner. Ved å benytte
10 probenukleinsyrer (PNA) som er spesifikke for en gitt TNA-sekvens og en TBA som er spesifikk for det dobbelttrådede målbindingsområde (TBR) som oppstår ved dannelsen av hybride TNA-PNA-sekvenser, dannes et stabilt TBA-TNA-PNA-kompleks. Ved i tillegg å tilveiebringe spesifikke, amplifiserbare sekvenser i
15 PNA, i tillegg til sekvenser som spesifikt bidrar til dannelsen av TBR som gjenkjennes av TBA, påvises binding av PNA til TNA, og signalet forsterkes. For dette formål kan en rekke nukleinsyreamplifiseringssystemer, heriblant polymerasekjedereaksjonen, eller anvendelse av forgrenet DNA hvor hver gren inneholder en påvisbar gruppe, benyttes. I særdeleshet beskrives
20 heri en ny fremgangsmåte for amplifisering, hvor den amplifiserbare del av DNA inneholder sekvenser til hvilke forsterker-nukleinsyrer (BNA) kan polymeriseres. For hvert BNA-PNA-hybrid som dannes, oppstår et forsterkerbindingsområde (BBR) til
25 hvilket en forsterkerbindingsansamling (BBA) bindes spesifikt. Dersom de er merket på påviselig måte, tilveiebringer BBA eller BNA i det vesentlige ubegrenset amplifisering av den opprinnelige TNA-PNA-bindingsbegivenhet.

Ifølge foreliggende oppfinnelse vil TNA forstås å
30 omfatte spesifikke nukleinsyresekvenser. TBA vil forstås å være enhver molekylær ansamling som kan bindes spesifikt og tett til et dannet TNA-PNA-hybrid. TBA vil inneholde ett eller flere molekyler hvis sekvenser er tilstrekkelige til å bindes til TBR. Nukleinsyrebindende domener som er kjent, kan enten
35 benyttes direkte som bestanddeler i TBA, eller modifiseres ifølge foreliggende oppfinnelses lære. De lettest tilgjengelige molekyler med slike sekvenser er de DNA-bindende domener i DNA-bindende proteiner. Nærmere bestemt er mange DNA- eller

RNA-bindende proteiner kjente, som enten kan benyttes direkte som det kjente, umodifiserte protein, eller TBA kan være et nukleinsyrebindende protein modifisert ifølge foreliggende oppfinnelses lære. I dette tilfellet kan spesifikke modifikasjoner som er ønskelige, omfatte optimalisering av bindingsaffiniteter, fjerning av uønskede aktiviteter (f.eks. nukleaseaktivitet og reorganisering av TBA i nærvær av andre molekyler med en affinitet for bestanddeler i TBA), optimalisering av selektivitet overfor en målsekvens fremfor nært beslektede sekvenser, og optimalisering av stabilitet.

Eksempler på DNA-bindende proteiner som kunne benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse, er de DNA-bindende deler av transkripsjonsfaktoren NF- κ B (p50 og p65), NF-IL6, NF-AT, rel, TBP, E2-protein fra papillomavirus, sp1, repressorene *cro* og *CI* fra bakteriofag lambda, og lignende proteiner som er velkjente proteiner hvis DNA-bindende del er blitt isolert, klonet, sekvensert og karakterisert. I tillegg omfattes ethvert annet DNA-bindende protein eller en del av et protein som er nødvendig og tilstrekkelig for binding til et TBR-hybrid eller et BBR. Dette omfatter proteiner eller deler av villtypeproteiner med endret DNA-bindingsaktivitet, så vel som protein fremstilt med endret DNA-bindingsspesifisitet, f.eks. ved utbytting av en DNA-bindende gjenkjenningsheliks fra ett protein til et annet. I tillegg kunne proteiner som viser nukleinsyrebinding og andre nukleinsyrefunksjoner, f.eks. restriksjonsendonukleaser, benyttes som den nukleinsyrebindende funksjon. Proteiner som bindes til målområder i DNA-RNA-hybrider, så vel som RNA-RNA-hybrider, omfattes. (Se f.eks. Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). Bindingsansamlingene kan konstrueres ved hjelp av et molekyl som styrer deler av bindingsansamlingen slik at spesifikke komponentkombinasjoner og geometrier kan oppnås. Dette molekyl betegnes her som en pilot. Piloter kan bestå av proteiner eller enhver kombinasjon av organiske og uorganiske stoffer som gir den kombinatoriske seleksjon og/eller induserer spesifikke geometrier mellom medlemmer i TBA eller BBA. Et styremolekyl er et stabilt stillas på

hvilket en TBA eller BBA kan konstrueres slik at den korrekte konformasjon av TBA eller BBA tilveiebringes, samtidig som uønskede egenskaper hos et naturlig forekommende, nukleinsyre-bindende protein elimineres. Som et spesifikt eksempel på
 5 denne utførelse, tilveiebringes en modifisert versjon av den pleiotrope transkripsjonsfaktor, NF-kB, som benytter et modifisert *cro*-protein fra bakteriofag lambda som styremolekyl. Hver NF-kB-bindingsdimer bibeholder den pikomolare bindingsaffinitet for NF-kB-bindingssetet, samtidig som bindingsansamlingen viser flere fordelaktige egenskaper når det gjelder
 10 fremstilling, stabilitet og spesifisitet.

I lys av det foregående beskrives de forskjellige sider og utførelser ved foreliggende oppfinnelse i detalj nedenfor.

15

1. Probenukleinsyrene (PNA) og deres fremstilling.

PNA ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter minst tre hoveddeler som er koblet sammen. Med henvisning til figur 1(I) er den første del av PNA én eller flere basesekvenser betegnet
 20 "1/2 TBR". Med henvisning til figur 1(I og IIa) er 1/2 TBR i PNA komplementær til en sekvens av interesse i en prøve, TNA som inneholder et 1/2 TBR. Med henvisning til figur 1(IIIa) danner TNA, ved tilsetning til PNA under hybridiseringsbetingelser, et PNA-TNA-hybrid som inneholder et TBR. Med henvisning til figur 1(I) er den andre del av PNA en basesekvens
 25 betegnet "1/2 BBR". Med henvisning til figur 1(I, IIb, IIc og IVa) er 1/2 BBR komplementær til et 1/2 BBR som inngår i en BNA eller en HNA. Med henvisning til figur 1(IIIb, IIIc og Va) danner BNA eller HNA, ved tilsetning til PNA under hybridiseringsbetingelser, et PNA-BNA-hybrid, hhv. et PNA-HNA-hybrid,
 30 som inneholder et BBR. Med henvisning til figur 1(I) er den tredje del av PNA OSA, vist ved en innrammet sirkel. OSA er intet støttemiddel og/eller en indikator, eller et fast støttemiddel, eller andre lokaliseringsmidler, heriblant, men ikke
 35 begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater og/eller indikatorer som er kovalent koblet til, eller ikke-kovalent, men spesifikt assosiert med PNA. OSA kan være et atom eller molekyl som letter separasjon og/eller lokalisering.

ing, f.eks. en bindingsgruppe for et fast støttemiddel eller en merket gruppe som kan påvises ved forskjellige fysiske midler, heriblant, men ikke begrenset til, adsorpsjon eller synliggjøring av utsendte partikler eller utsendt lys. Fremgangsmåter for tilkobling av indikatorer til oligonukleotider eller for immobilisering av oligonukleotider til faste støttemidler er velkjente innen faget (se Keller og Manak, *supra*, som inkorporeres heri ved referanse).

PNA ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved enhver egnet fremgangsmåte. Slike fremgangsmåter vil generelt omfatte oligonukleotidsyntese og kloning i en replikerbar vektor. Fremgangsmåter for nukleinsyresyntese er velkjente innen faget. Etter kloning eller syntese kan rensing og atskillelse av tråder være nødvendig for å benytte produktet som en ren PNA. Fremgangsmåter for fremstilling av RNA-prober er velkjente (se f.eks. Blais 1993, Blais 1994, som benytter *in vitro* transkripsjon fra en PCR-reaksjon som innfører en T7 RNA-polymerasepromoter).

Fagfolk vil forstå at lengden og den spesifikke sekvens av TNA vil avhenge av lengden og sekvensen som skal påvises i en TNA, og begrensningene for å oppnå tett og spesifikk binding av den gitte TBA som skal benyttes (se diskusjonen angående TBA nedenfor). Generelt vil PNA med sekvenslengder mellom tilnærmet 10 og tilnærmet 300 nukleotider være tilstrekkelig, mens lengder på tilnærmet 15-100 nukleotider er ønskelig for mange av de utførelser som spesifikt beskrives heri.

Det bør også forstås at PNA kan konstrueres slik at den inneholder mer enn ett 1/2 TBR og at mer enn ett TBR fremstilles for én eller flere TBA, like eller forskjellige, så vel som komplekse TBR gjenkjent av nye dobbelttrådede og mangetrådede TBA (se beskrivelse nedenfor når det gjelder disse nye TBA) ved hybridisering mellom PNA og TNA. Figur 5 viser spesifikke PNA som inneholder ett eller flere 1/2 TBR. Spesifikke sekvenser som tilsvarende 1/2 TBR-sekvensene vist i figur 5 (Ia, IIa, IIIa, IVa og Va), er SEKV.ID NR. 1-34 (se beskrivelse av sekvenser ovenfor).

Som vist i figurene 2a og 2b, kan PNA som inneholder

et 1/2 TBR, hybridiseres til én eller flere BNA (se beskrivelse nedenfor), og kjeden av BNA polymeriseres til enhver ønskelig lengde for amplifisering av TNA-PNA-hybridiseringsbegivenheten. Fortrinnsvis vil mellom tilnærmet 0 og tilnærmet 10 1/2 BBR foreligge i PNA.

Som vist i figurene 6a og 6b, kan PNA inneholde flere 1/2 TBR, like eller forskjellige, som kan hybridisere med flere 1/2 TBR i en TNA. Hver gang et 1/2 TBR i PNA tilpasses et 1/2 TBR i en TNA, dannes et målbindingsområde, TBR, som kan binde en TBA. Videre er det ikke nødvendig at alle TBR foreligger på en enkel, kontinuerlig PNA. I én utførelse av oppfinnelsen benyttes således to forskjellige PNA for påvisning av sekvenser i en gitt TNA. For å illustrere denne side ved oppfinnelsen viser figur 7 en fremstilling av den lange enderepetisjon (LTR) i humant immunodefisiensvirus (HIV). Som kjent innen faget, omfatter HIV-LTR to NF-kB-bindings seter og tre SP1-bindings seter som ligger nær hverandre, hvor NF-kB og SP1 er kjente DNA-bindende proteiner. Figur 7 tilveiebringer to PNA, PNA1 (SEKV.ID NR. 38) og PNA2 (SEKV.ID NR. 39), som begge er komplementære til den motsatte tråd vist som en TNA (SEKV.ID NR. 37), som viser de to NF-kB-bindings seter og de tre SP1-bindings seter i HIV-LTR. Ifølge denne side ved oppfinnelsen hybridiserer PNA1 spesifikt med den del av TNA vist i figur 7 som har baser understreket med et "+"-symbol, mens PNA2 spesifikt hybridiserer med den del av TNA vist i figur 7 som er understreket med et "="-symbol. Både PNA1 og PNA2 kan også inneholde sekvenser (vist ved symbolene "#" eller "*") som vil hybridisere med 1/2 BBR-sekvenser i en BNA (se nedenfor). I tillegg kan PNA1 og PNA2 være merket på forskjellig vis med en OSA, f.eks. en fluorescerende gruppe som fluorescein eller rhodamin, som tillater bekreftelse av at begge prober er blitt bundet til TNA. Dersom kun én merket gruppe eller ingen merket gruppe kan påvises, kan det konkluderes med at TNA ikke forelå i prøven som ble analysert.

Ved nok en side ved utførelsen vist i figur 7, vises en fremgangsmåte for å endre spesifisiteten i den foreliggende analysefremgangsmåte. Ved å endre lengden av gapet mellom PNA1 og PNA2 slik at området i TNA som forblir uhybridisert,

endres, er en som utfører foreliggende oppfinnelse, i stand til å endre analysens diskrimineringssevne.

For å kunne gi klarere eksempler på denne side ved oppfinnelsen, er det nødvendig å understreke at TBR kan ha en heliksstruktur. Mens PNA1 danner TBR på én "side" av heliksen, 5 danner således PNA2 et TBR på enten samme eller en annen side av heliksen, avhengig av avstanden mellom midten av hvert TBR (understreket i figur 7). Dersom avstanden mellom midten av hvert bindingssete er produktet av et heltall og 10,5 baser, 10 vil de to TBR foreligge på samme side av heliksen, mens en avstand som tilsvarende produktet av et ikke-heltall og 10,5 baser, vil plassere de to TBR på motsatte sider av heliksen. På denne måte kan eventuell bindingskooperativitet mellom TBA som gjenkjenner PNA1-TBR og TBA som gjenkjenner PNA2-TBR, 15 manipuleres (se Hochschild, A., M. Ptashe [1986], Cell 44:681-687, som viser denne virkning for binding av bakteriofag lambda-repressor til to forskjellige operatorseter lokalisert i forskjellige avstander fra hverandre i en DNA-heliks). Som beskrevet av Perkins et al. ([1993], EMBO J. 12:3551-3558), 20 kreves kooperativitet mellom NF-kB og SP1-setene for å oppnå aktivering av HIV-LTR. For foreliggende oppfinnelles formål kan imidlertid det dobbelte, NF-kB-tredobbelte SP1-bindingssetemotiv i HIV-LTR utnyttes ved å tilveiebringe et enkelt, nytt bindingsprotein som er i stand til å bindes til begge 25 seter samtidig, men bare dersom avstanden mellom setene gjør dette geometrisk mulig. Dette kontrolleres både av strukturen til den valgte TBA og av de benyttede PNA. I utførelsen eksemplifisert i figur 7, kan således de to prober benyttes med et tilstrekkelig stort gjenværende interprobeområde med enkelt- 30 trådet DNA til at det enkelttrådede område mellom probene, selv om NF-kB- og SP1-bindingssetene foreligger på motsatte sider av heliksen, tilveiebringer et tilstrekkelig fleksibelt "hengsel" til at DNA både kan bøyes og vris for å tilpasses geometrien til TBA. Alternativt kan en mer stringent analyse 35 utformes ved å begrense interprobeavstanden slik at DNA kun kan bøyes, men ikke vris. Endelig kan probene ligge så nær hverandre på en enkelt benyttet PNA, at DNA kun kan bøyes, men ikke vris. Denne figur gir således eksempler på og tillater

fremstilling av deteksjonssystemer med enhver ønsket diskrimineringsgrad mellom målnukleinsyrer med lignende sekvenser, men forskjellige avstander mellom disse sekvenser.

Når det gjelder et diagnostisk eller rettsmedisinsk
5 analysesett for HIV, vil fagfolk forstå at de ovenfor nevnte sider ved foreliggende oppfinnelse tillater skreddersying av bestanddelene i det diagnostiske eller rettsmedisinske sett slik at de tilpasses hva som til enhver tid er kjent angående de foreliggende stammer av HIV eller et annet patogen eller
10 sykdomstilstand. Det vil også forstås av fagfolk at selv om påvisning av HIV-infeksjon ikke er det eneste anvendelsesområde for foreliggende oppfinnelse, er slik infeksjon, grunnet HIV-genomets mutabilitet, sannsynligvis et av de mest komplekse analyseområder for et slikt diagnostisk middel. Det er
15 imidlertid nettopp i et slikt muterende miljø at den foreliggende fremgangsmåtes fleksibilitet, koblet med dens evne til å skille mellom svært nært beslektede sekvenser, mest klart kan verdsettes. I mindre muterende miljøer vil det ikke være behov for å utnytte deler at det raffinement som foreliggende opp-
20 finnelse kan tilpasses. I et diagnostisk sett for papillomavirusinfeksjon er således alle diskrimineringsegenskaper til TBA-TBR-interaksjonen tilgjengelige, sammen med evnen til å amplifisere signalet ved å benytte BNA og BBA, men en enkel PNA kan benyttes, f.eks. en av dem vist i SEKV.ID NR. 46-62,
25 som identifiserer unike papillomavirussekvenser, og som man også vet bindes til en TBA, f.eks. E2-protein fra papillomavirus eller forkortede DNA-bindende deler av dette (se Hegde et al. [1992], Nature 359:505-512; Monini et al. [1991], J. Virol. 65:2124-2130).

30 Når foreliggende fremgangsmåte benyttes for påvisning av en gitt TNA i den hensikt å fastslå hvorvidt visse nukleinsyrer foreligger som er forbundet med forløpet av melanomcancer, hepatomcancer, brystcancer, cervixcancer, lungecancer, coloncancer, prostatacancer, pankreascancer eller ovariecan-
35 cer, kan TNA erholdes fra biopsiprøver tatt fra organer og væsker som mistenkes for å inneholde cancercellene. For påvisning av genetiske mangler kan TNA erholdes fra pasientprøver som inneholder de påvirkede celler. For påvisning av fermen-

teringskontaminanter og produkter ved fremstilling av mat, kjemiske produkter eller bioteknologiprodukter, eller ved biologisk rensing av avfall, kan TNA erholdes fra prøver tatt ved forskjellige trinn i fermenteringen eller behandlingsprosessen. For påvisning av patogener eller kontaminanter i mat eller medikamenter, kan TNA-prøven erholdes fra næringsmidlet eller medikamentet, oppsuget væske fra næringsmidler eller overflater i kontakt med næringsmidlet, væsker i kontakt med næringsmidlet, prosessmaterialer, væsker og lignende forbundet med fremstillingen av eller i kontakt med næringsmidlet eller medikamentet, eller biologiske prøver tatt fra dem i kontakt med næringsmidlet eller medikamentet eller lignende.

2. Forsterkernukleinsyrene (BNA), forsterkerbindings-
områder (BBR) og fremstilling av disse. BNA ifølge foreliggende oppfinnelse består av minst ett eller flere 1/2 BBR koblet til en OSA. De foreliggende 1/2 BBR kan hybridisere til komplementære 1/2 BBR som foreligger i PNA, andre BNA eller en HNA.

Med henvisning til figur 1(I, IIb og IIIb) består den enkleste BNA av to deler. Med henvisning til figur 1(IIb) er den første del i det enkleste BNA en basesekvens som er komplementær til sekvensen i PNA som betegnes "1/2 BBR". Med henvisning til figur 1(IIb) er den andre del av det enkleste BNA OSA, vist med en innrammet sirkel. OSA er intet støttemiddel og/eller indikator, eller et fast støttemiddel eller et annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer som er kovalent koblet til, eller ikke-kovalent, men spesifikt, forbundet med BNA.

Med henvisning til figur 2a(II og III) kan BNA inneholde mer enn én 1/2 BBR-sekvens. Den BNA som er vist i figur 3(II), inneholder en sekvens som er komplementær til den PNA som er vist i figur 3(I) og to andre 1/2 BBR-sekvenser. Den BNA som er vist i figur 3(III), inneholder to 1/2 BBR-sekvenser som er komplementære til to av 1/2 BBR-sekvensene i den BNA som er vist i figur 3(II), pluss opp til "n" ytterligere 1/2 BBR for polymerisering av ytterligere BNA.

Når den BNA som er vist i figur 3(II) kombineres med den PNA som er vist i figur 3(I) under hybridiseringsbetingelser, dannes PNA-BNA-hybridet som er vist i figur 3(IVa) som inneholder et BBR og en ikke-hybridisert forlengelse med ytterligere to 1/2 BBR-sekvenser eller "forsterker"-sekvenser. De BBR som dannes ved denne hybridisering, kan være identiske, lignende hverandre eller ulike i sekvens. De BBR som dannes ved denne hybridisering, kan binde identiske, lignende eller ulike BBA (se nedenfor). Disse BNA kan være fremstilt på tilsvarende måte som PNA.

Når BNA-BNA-hybridet som er vist i figur 3(IVb) kombineres med den PNA som er vist i figur 3(Vb) under hybridiseringsbetingelser, dannes PNA-BNA-hybridet som er vist i figur 3(VI) som inneholder et BBR, ytterligere to BNA-BNA-hybrider som inneholder BBR, og en ikke-hybridisert forlengelse med ytterligere en 1/2 BBR-sekvens, en "forsterker"-sekvens. De BBR som dannes ved denne hybridisering, kan være identiske, lignende hverandre eller forskjellige i sekvens. De BBR som dannes ved denne hybridisering, kan binde identiske, lignende hverandre eller ulike BBA (se nedenfor). Disse BNA kan fremstilles på en måte som tilsvarer fremstillingen av PNA.

3. Målnukleinsyrene (TNA) og fremstilling av disse.

Første trinn i påvisning og amplifisering av signaler dannet ved påvisning av en gitt TNA ifølge foreliggende oppfinnelse, er hybridisering av en slik målnukleinsyre med PNA i en egnet blanding. Slik hybridisering oppnås under egnede betingelser velkjente innen faget.

Prøven som mistenkes for eller vites å inneholde det gitte TNA, kan erholdes fra en rekke kilder. Det kan være en biologisk prøve, et næringsstoff eller en jordbruksprøve, en miljøprøve osv. Ved anvendelse av foreliggende fremgangsmåte for påvisning av en gitt TNA innen medisinsk diagnose eller rettsmedisin kan TNA erholdes fra en biopsiprøve, en kroppsvæske eller utsondring som urin, blod, melk, cerebrospinalvæske, spytt, avføring, lungeaspirater, oppsuget væske fra hals eller genitalier og lignende. I tillegg kan deteksjonen foregå *in situ* (se f.eks. Embretson 1993; Patterson 1993;

Adams 1994).

Følgelig kan man forestille seg, og anvende ifølge foreliggende fremgangsmåte, PNA som er spesifikke for vertebrater (heriblant pattedyr, også mennesker) eller for enhver av de påfølgende mikroorganismer:

Corynebakterier

Corynebacterium diphtheria

Bacillus

Bacillus thuringiensis

10 Pneumococci

Diplococcus pneumoniae

Streptococci

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

15 Staphylococcus

Staphylococcus aureus

Staphylococcus albus

Pseudomonas

Pseudomonas stutzeri

20 Neisseria

Neisseria meningitidis

Neisseria gonorrhoea

Enterobacteriaceae

Escherichia coli

25 Aerobacteria aerogenes

Klebsiella pneumoniae

De koliforme bakterier

Salmonella typhosa

Salmonella choleraesuis

Salmonellae

Salmonella typhimurium

30 Shigellae dysenteriae

Shigellae schmitzii

Shigellae arabinotarda

Shigellae flexneri

Shigellae

Shigellae boydii

35 Shigella sonnei

Andre tarmbakterier

Proteus vulgaris

Proteus mirabilis

Proteus-arter

Proteus morgani
Pseudomonas aeruginosa
Alcaligenes faecalis
Vibrio cholerae

5 Hemophilus-Bordetella-gruppe

Hemophilus influenza, H. ducryi
Hemophilus hemophilus
Hemophilus aegypticus
Hemophilus parainfluenzae
 10 *Bordetella pertussis*

Pasteurellae

Pasteurella pestis
Pasteurella tularensis

Brucellae

15 *Brucella melitensis*
Brucella abortus
Brucella suis

Aerobe, sporedannende Bacilli

Bacillus anthracis
 20 *Bacillus subtilis*
Bacillus megaterium
Bacillus cereus

Anaerobe, sporedannende Bacilli

Clostridium botulinum
 25 *Clostridium tetani*
Clostridium perfringens
Clostridium novyi
Clostridium septicum
Clostridium histolyticum
 30 *Clostridium tertium*
Clostridium bifermentans
Clostridium sporogenes

Mykobakterier

Mycobacterium tuberculosis hominis
 35 *Mycobacterium bovis*
Mycobacterium avium
Mycobacterium leprae
Mycobacterium paratuberculosis

Actinomycetes (sopplignende bakterier)*Actinomyces israeli**Actinomyces bovis**Actinomyces naeslundii*5 *Nocardia asteroides**Nocardia brasiliensis*Spiroketer*Treponema pallidum**Treponema pertenue*10 *Treponema carateum**Spirillum minus**Streptobacillus moniliformis**Borrelia recurrent**Leptospira icterohemorrhagiae*15 *Leptospira canicola*TrypanosomerMykoplasma*Mycoplasma pneumoniae*Andre patogener20 *Listeria monocytogenes**Erysipelothrix rhusiopathiae**Streptobacillus moniliformis**Donovania granulomatis**Bartonella bacilliformis*25 Rickettsiae (bakterielignende parasitter)*Rickettsia prowazekii**Rickettsia mooseri**Rickettsia rickettsii**Rickettsia conori*30 *Rickettsia australis**Rickettsia sibiricus**Rickettsia akari**Rickettsia tsutsugamushi**Rickettsia burnetti*35 *Rickettsia quintana*Chlamydia (ikke klassifiserte parasitter, bakterielle/virale)

Chlamydia-arter (usikker navngiving)

Sopp

- Cryptococcus neoformans*
Blastomyces dermatidis
Histoplasma capsulatum
5 *Coccidioides immitis*
Paracoccidioides brasiliensis
Candida albicans
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifera (*Absidia corymbifera*)
10 *Rhizopus oryzae*
Rhizopus arrhizus Phycomycetes
Rhizopus nigricans
Sporotrichum schenkii
Fonsecaea pedrosoi
15 *Fonsecaea dermatidis*
Cladosporium carrioni
Phialophora verrucosa
Aspergillus nidulans
Madurella mycetomi
20 *Madurella grisea*
Allescheria boydii
Phialophora jeanselmei
Microsporum gypsum
Trichophyton mentagrophytes
25 *Keratinomyces ajelloi*
Microsporum canis
Trichophyton rubrum
Microsporum adouini

Virus

- 30 Adenovirus

Herpesvirus

- Herpes simplex*
Varicella (vannkopper)
Herpes zoster (helvetesild)
35 Virus B
Cytomegalovirus

Koppevirus

- Variola (kopper)

Vaccinia
 Poxvirus bovis
 Paravaccinia
Molluscum contagiosum

5 Picornavirus

Poliovirus
 Coxsackievirus
 Echovirus
 Rhinovirus

10 Myxovirus

Influenza (A, B og C)
 Parainfluenza (1-4)
 Kusmavirus
 "Newcastle-sykdom"-virus
 15 Meslingvirus
 Kvegpestvirus
 "Canine distemper"-virus
 Respiratorisk syncytialvirus
 Rubellavirus

20 Arbovirus

Eastern hesteencefalittvirus
 Western hesteencefalittvirus
 Sindbisvirus
 Chikugunyavirus
 25 "Semliki forest"-virus
 Mayoravirus
 St. Louis encefalittvirus
 California encefalittvirus
 Colorado flåttfebervirus
 30 Gulfebervirus
 Denguevirus

Reovirus

Reovirus typene 1-3

Retrovirus

35 Humant immunodefisiensvirus (HIV)
 Humant T-cellelymfotrofisk virus I & II (HTLV)

Hepatitt

Hepatitt A-virus

Hepatitt B-virus

Hepatitt nonA-nonB-virus

Hepatitt, C, D, E

Tumorvirus

5 Rauscher leukemivirus

Grossvirus

Maloney leukemivirus

Humant papillomavirus

10 Fagfolk vil forstå at det generelt er nødvendig å
behandle prøver som mistenkes for å inneholde en gitt TNA på
en slik måte at det dannes fragmenter som lett kan hybridisere
med PNA. Det kan være nødvendig å behandle analyseprøven for å
oppnå frigjøring av eller å ekstrahere TNA for hybridisering,
15 f.eks. ved å utsette blod eller andre celler for et hypotont
miljø, eller på annen måte bryte opp prøven med kraftigere
midler. Dersom TNA antas å foreligge i dobbelttrådet tilstand,
vil det naturligvis være ønskelig å atskille trådene slik at
TNA gjøres hybridiserbart i enkelttrådet form ved fremgangs-
20 måter velkjente innen faget, heriblant, men ikke begrenset
til, oppvarming eller korttidsbehandling ved alkaliske betin-
gelser, som kan nøytraliseres ved tilsetning av enkelttrådet
PNA slik at hybridisering kan skje. Fremgangsmåter for frem-
stilling RNA-målsekvenser er velkjente (se Waterhouse 1993,
25 Mitchell 1992).

Fragmentering av nukleinsyreprøver som inneholder
TNA, er vanligvis nødvendig for å redusere prøvens viskositet
og øke tilgjengeligheten av TNA for PNA. Slik fragmentering
kan oppnås ved tilfeldige eller spesifikke midler kjent innen
30 faget. Således kan f.eks. spesifikke nukleaser som vites å
kutte med en gitt frekvens i genomet som analyseres, benyttes
for å fremstille fragmenter med kjent, gjennomsnittlig mole-
kylstørrelse. I tillegg er andre nukleaser, fosfodiesteraser,
eksonukleaser og endonukleaser, fysiske skjærkrefter og ultra-
35 lydbehandling, alle fremgangsmåter som er anvendbare for dette
formål. Disse prosesser er velkjente innen faget. Anvendelse
av restriksjonsenzymer for å oppnå DNA-fragmentering fore-
trekkes generelt. DNA kan imidlertid også fragmenteres ved en

rekke kjemiske midler, f.eks. anvendelse av følgende reagens-typer: EDTA-Fe(II) (ifølge Stroebel et al. [1988], J. Am. Chem. Soc. 110:7927; Dervan [1986], Science 232:464); Cu(II)-fenantrolin (ifølge Chen og Sigman [1987], Science 237:1197),
 5 klasse IIS-restriksjonsenzym (ifølge Kim et al. [1988], Science 240:504), hybrid-DNAse (ifølge Corey et al. [1989], Biochem. 28:8277), bleomycin (ifølge Umezawa et al. [1986], J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A, 19:200); neocarzinostatin (Goldberg et al. [1981], Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer
 10 Research, Academic Press, New York, s. 163) og metidiumpropyl-EDTA-Fe(II) (ifølge Hertzberg et al. [1982], J. Am. Chem. Soc. 104:313). Fjerning av proteiner, f.eks. ved proteasebehandling, er også generelt ønskelig, og fremgangsmåter for å oppnå fjerning av protein fra nukleinsyreprøver uten vesentlig tap
 15 av nukleinsyre er velkjente innen faget.

TNA ifølge foreliggende oppfinnelse bør være tilstrekkelig lang til at en tilstrekkelig mengde dobbelttrådet hybrid flankerer TBR slik at en TBA kan bindes uforstyrret til de ikke-ligerte fragmentender. Typisk anvendes fragmenter i
 20 området fra tilnærmet 10 nukleotider til tilnærmet 100 000 nukleotider, og fortrinnsvis i området fra tilnærmet 20 nukleotider til tilnærmet 1 000 nukleotider, som gjennomsnittsstørrelse for TNA-fragmenter. Eksempler på spesifikke TNA-sekvenser som kan påvises, er sekvenser komplementære til
 25 PNA-sekvensene beskrevet heri for påvisning av normale cellulære, unormale cellulære (som i aktiverte onkogener, integrerte, fremmede gener, genetisk defektive gener) og patogen-spesifikke nukleinsyresekvenser, for hvilke spesifikke, nukleinsyrebindende proteiner er kjente eller kan fremstilles
 30 ifølge fremgangsmåter beskrevet i denne beskrivelse. Med henvisning til figur 7 er en spesifikk, HIV-relatert TNA vist som SEKV.ID NR. 37.

4. Forlengelse av PNA med BNA, fremstilling av disse
 35 og signalforsterking. Under hybridiseringsbetingelser kan BNA som hybridiserer til PNA, PNA-BNA-hybrider, BNA og/eller BNA-BNA-hybrider, tilsettes. Tilsetningene nevnt ovenfor, kan gjøres på ikke-vektoriell, polymer måte eller på vektoriell

måte med kjent rekkefølge av BNA.

Med henvisning til figur 2a vises en enkel forsterker. En forsterkerpolymer fremstilles ved å tilsette to BNA, vist i figur 2a(Ib og Ic), som når de kombineres med PNA under hybridiseringsbetingelser, danner PNA-BNA-BNA-hybrider som består av PNA og "forsterker"-forlengelser, vist i figur 2a(IIa, IIb, IIc og IId) med minst én uparet 1/2 BBR-sekvens. Hver uparede 1/2 BBR-sekvens vist i figur 2a (IIa, IIb, IIc, IId), kan hybridisere med ytterligere BNA slik at ytterligere "forsterker"-forlengelser dannes. Hver uparet 1/2 BBR-sekvens, vist i figur 2a(IIa, IIb, IIc og IId), kan hybridisere med tilsatte HNA, vist i figur 2a(IIIa og IIIb). Hybridisering av HNA som ikke kan hybridisere med ytterligere BNA, vil "terminere" tilkobling av BNA til PNA, som vist i figur 2a(IVa, IVb, IVc og IVd).

Med henvisning til figur 2b er det mulig å kontrollere og spesifisere rekkefølgen og komponentene i forlengelser til PNA. Dersom et enkelt BBR kreves, tilsettes en HNA som inneholder den komplementære sekvens til 1/2 BBR i PNA til PNA slik at det dannes et enkelt BBR og at eventuelle "forsterker"-forlengelser i PNA termineres. Dersom ytterligere BBR skal adderes til PNA, kan en kontrollert forlengelse av PNA oppnås.

Med henvisning til figur 2b vises en enkel forsterker. Vektoriell polymerforlengelse oppnås ved å tilsette en BNA som er spesifikk for PNA, som vist i figur 2b(Ia og IIa), som når den kombineres med PNA under hybridiseringsbetingelser, danner PNA-BNA-BNA-hybrider som består av PNA og "forsterker"-forlengelser. Disse forlengelser tilveiebringer, dersom de er merket med en OSA, en fremgangsmåte for omfattende amplifisering av ethvert signal som dannes ved binding av en PNA til en TNA i prøven. Videre oppnås ytterligere forsterkning ved å binde merkede BBA til BBR i polymeren.

En rekke fremgangsmåter kan benyttes for fremstilling av BNA, heriblant f.eks. syntese ved hjelp av kjent kjemi eller ved fremstillingsfremgangsmåter som omfatter rekombinant DNA. I det siste tilfellet kan et praktisk talt ubegrenset antall BNA fremstilles enkelt og billig, f.eks. ved fremstil-

ling i prokaryoter (f.eks. *E. coli*) et av plasmid-DNA med flere repetisjoner av de spesifikke BNA-sekvenser flankert av restriksjonsseter som gir overhengende ender. På denne måte kan f.eks. venstre eller høyre operatorsete fra bakteriofag

5 lambda, eller enhver annen DNA- eller annen nukleinsyresekvens som vites å bindes spesifikt og tett til en gitt BBA, f.eks. et DNA- eller RNA-bindende protein, fremstilles i et praktisk talt ubegrenset antall kopier, hvor hver kopi er flankert av et *EcoRI*-sete, *PstI*-sete, *BamHI*-sete eller ethvert av et stort

10 antall andre restriksjonsnukleaseseter. Alternativt kan en polymer med repeterte seter utkuttet via unike restriksjonsseter som ikke foreligger i polymeren. Store mengder av pBR322-plasmid, pUC-plasmid eller andre plasmider med mange kopier av disse sekvenser kan fremstilles ved fremgangsmåter

15 velkjente innen faget, plasmidet kan kuttes med restriksjonsenzymet som flankerer det polymeriserte sete, og de frigjorte, multiple kopier av operatorene isoleres enten ved kromatografi eller ved ethvert annet, egnet middel kjent innen faget. Før bruk atskilles så BNA-trådene slik at de er klare for polymer-

20 isering til en PNA som koder for en enkelttrådet, komplementær kopi av operatoren som et 1/2 BBR. BNA kan polymeriseres vektorielt på PNA ved å benytte forskjellige restriksjonsenzymer til å flankere hver repetisjon av polymeren i det plasmid som er benyttet til å fremstille multiple kopier av BNA. Alterna-

25 tivt kan BNA-polymeren hybridiseres til PNA via overheng i den ene eller begge ender av BNA-polymeren, uten behov for å atskille tråder og hybridisere hvert BNA-segment. Eksempler på spesifikke BNA-sekvenser tilveiebringes ovenfor i seksjonen betegnet Beskrivelse av sekvenser, som SEKV.ID NR. 35-36. For

30 å stabilisere BNA-polymeren kan DNA-ligase benyttes for kovalent sammenkobling av de hybridiserte BNA.

5. Hårnålsnukleinsyrene (HNA) og fremstilling av disse. HNA ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter minst to

35 hoveddeler som er koblet sammen: En enkelttrådet sekvens som er komplementær til et 1/2 BBR, og et dobbelttrådet nukleinsyreområde som er dannet under hybridiseringsbetingelser ved selvassosiering av selvkomplementære sekvenser i HNA. Med hen-

visning til figur 1(IIc) kan det 1/2 BBR som foreligger i HNA, konstrueres slik at det er komplementært til 1/2 BBR-sekvensen i PNA. Med henvisning til figur 1(I, IIc og IIIc) danner det tidligere nevnte HNA ved tilsetning til PNA under hybridiseringsbetingelser, et PNA-HNA-hybrid som inneholder et BBR. Med henvisning til figur 1(IIIc, IVc og Vc) kan et PNA-HNA-hybrid ved tilsetning av TNA under hybridiseringsbetingelser, danne et TNA-PNA-HNA-hybrid som inneholder et TBR og et BBR.

Med henvisning til figur 2a og 2b kan HNA benyttes for å terminere addering av BNA-forlengelser til PNA. De to BNA i figur 2a(Ib og Ic) kan gå sammen slik at hybridet vist i figur 3(IVb) dannes, eller de kan hybridisere direkte og enkeltvis til PNA som vist i figur 2a(Ia-c, IIa-d). De to HNA (vist i figur 2a(IIIa og IIIb)) kan terminere hybridiseringen av BNA til andre BNA som stikker ut fra PNA, som vist i figur 2a(IVa-d). HNA i figur 2a(IIIa) kan terminere PNA-BNA-hybridene vist i figur 2a(IIb og IId) og ethvert annet PNA-BNA-hybrid med et enkelttrådet 1/2 BBR som er komplementært til det 1/2 BBR som foreligger i HNA som vist i figur 2a(IIIa). På tilsvarende måte kan HNA i figur 2a(IIIb) terminere PNA-BNA-hybridene vist i figur 2a(IIa og IIc) og ethvert annet PNA-BNA-hybrid med to enkelttrådede 1/2 BBR som er komplementære til de 1/2 BBR som foreligger i HNA, som vist i figur 2a(IIIb).

Det konstrueres HNA som vil terminere PNA-BNA-hybrider som er dannet ved sekvensiell tilsetning av BNA til PNA, som vist i figur (2b). De enkelttrådede 1/2 BBR-sekvenser som er vist i figur 2b(Ia, IIIa, Va og VIIa), er spesifikt komplementære til de enkelttrådede 1/2 BBR-sekvenser som er vist i figur 2b(Ib, IIIb, Vb og VIIb) og danner de unike, terminerte PNA-BNA-HNA-hybrider som er vist i figur 2b(Ic, IIIc, Vc og VIIc).

De selvkomplementære sekvenser i HNA og løkkesekvensen som binder de selvkomplementære hårnålssekvenser sammen, kan ha enhver sammensetning og lengde, så lenge de ikke i vesentlig grad svekker eller inhiberer presentasjonen av det enkelttrådede 1/2 BBR som utgjør en del av HNA, av HNA eller selektivt bindes til BBA eller TBA. Løkkesequensene bør utvel-

ges slik at dannelsen av løkken ikke hindrer dannelsen av hårnålen. Et eksempel på en HNA som er anvendbar i denne anvendelse, tilveiebringes som SEKV.ID NR. 44 (se Beskrivelse av sekvenser ovenfor).

5

6. Målbindingsansamlingene (TBA) og fremstilling av disse. En TBA kan være enhver forbindelse som binder et gitt TBR dannet ved hybridisering mellom spesielle TNA og PNA, forutsatt TBA må ha minst de påfølgende egenskaper:

10

(a) TBA må binde TBR(ene) på en måte som er svært spesifikk for de TBR som skal undersøkes. Det vil si at TBA må skille mellom TBR som foreligger i TNA-PNA-hybridet og lignende duplekssekvenser dannet av PNA-CNA-hybrider. TBA må binde PNA-CNA-hybridet med tilstrekkelig lav aviditet til at PNA-CNA-hybridet fjernes uten at PNA-TNA-hybridet fjernes ved vask av TBA-TNA-PNA-komplekset,

15

20

(b) TBA må bindes kraftig til TBR som dannes ved hybridisering av TNA til PNA. Bindingsaffiniteter i området fra 10^{-5} til tilnærmet 10^{-12} eller høyere anses generelt for tilstrekkelig. Som bemerket nedenfor, kan det i visse tilfeller være ønskelig å benytte et TBA som har svært lav aviditet for et gitt TBR, men som har svært mye høyere affinitet når en spesiell konfigurasjon av multiple TBR tilveiebringes, slik at kvadratet av affiniteten av TBA for hvert TBR blir den relevante affinitet for det gitte TBA.

25

30

Eksempler på DNA-bindingskomponentene som er anvendbare ved dannelsen av TBA, omfatter, men er ikke begrenset til, NF-kB, E2-protein fra papillomavirus, transkripsjonsfaktor SP1, inaktive restriksjonsenzymer, antistoffer, etc. Hvert av disse proteiner er kjent innen faget for å inneholde sekvenser som bindes til gitte nukleinsyresekvenser, og affiniteten av disse interaksjoner er kjent. Naturligvis er fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse ikke begrenset til anvendelse av disse kjente DNA-bindende proteiner eller fragmenter av

35

dem. Fra den foreliggende beskrivelse vil det være åpenbart for en gjennomsnittsfagmann at den foreliggende fremgangsmåte lett kan tilpasses anvendelse av nye TBA som viser i det minste de påkrevde egenskaper gitt ovenfor. Således ble f.eks. i WO 92/20698 et sekvensspesifikt, DNA-bindende molekyl som omfatter et oligonukleotidkonjugat, dannet ved kovalent sammenkobling av et DNA-bindende medikament til et tripleksdannende oligonukleotid, beskrevet. Fremgangsmåten i denne beskrivelse kunne benyttes til fremstilling av nye TBA for anvendelse ifølge foreliggende beskrivelse, forutsatt at de således dannede TBA tilfredsstiller kriteriene beskrevet ovenfor. I tillegg kan fremgangsmåtene i US patentskrift nr. 5 096 815, 5 198 346 og WO 88/06601, som alle inkorporeres heri ved referanse, benyttes for fremstilling av nye TBA til anvendelse ifølge fremgangsmåten i foreliggende oppfinnelse. Spesifikke antistoffer eller deler av slike kunne også benyttes (se f.eks. Blais 1994).

Når TBA er et protein eller et proteinkompleks, vil det forstås at en rekke fremgangsmåter som er rutinemessige innen faget, kan benyttes for fremstilling av TBA. TBA kan isoleres fra sitt naturlige miljø i naturen, eller, dersom dette ikke er praktisk mulig, fremstilles ved gjengse molekylærbiologiske teknikker. Ved å benytte de DNA-bindende deler av p50- eller p65-subenheten i NF-kB som et eksempel, kunne således denne bindingsansamling fremstilles ifølge rekombinante fremgangsmåter kjent innen faget (se f.eks. Ghosh [1990], Cell 62:1019-1029, som beskriver kloning av den DNA-bindende subenhet p50 i NF-kB og dette proteins homologi med rel og dorsal).

Mange proteiner som binder DNA og andre nukleinsyrer, er kjente og kan benyttes som eller i TBA ifølge foreliggende oppfinnelse. Når først aminosyresekvensen til et protein som binder DNA, RNA:DNA, RNA eller andre nukleinsyrer er kjent, kan en passende DNA-sekvens som koder for proteinet, fremstilles syntetisk, eller man kan benytte en cDNA-kopi av mRNA som koder for proteinet fra en passende vevskilde. Videre kan genomiske kopier som koder for proteinet, erholdes, og introner spleises ut ifølge fremgangsmåter kjent innen faget. Videre

kan TBA syntetiseres kjemisk.

Når først en passende, kodende sekvens er erholdt, kan setestyrte mutagenese benyttes for å endre aminosyresekvensen som kodes, slik at det dannes muterte, nukleinsyrebindende proteiner som viser mer ønskelige bindingsegenskaper enn de til det opprinnelige nukleinsyrebindende protein. Som et eksempel på denne prosess kan aminosyresekvensen i de DNA-bindende deler av NF-kB endres slik at det dannes et NF-kB'-molekyl som bindes sterkere til NF-kB-bindingssetet (se eksempler nedenfor - "HIV-Detect" og "HIV-Lock").

For å tilveiebringe ytterligere innsyn i denne side ved oppfinnelsen, bør følgende betraktninger bemerkes. Med NF-kB som eksempel kan en TBA fremstilles ved å benytte det naturlige forekommende NF-kB-molekyl. Da dette molekyl foreligger i forsvinnende små mengder i celler, og da subenhetene til dette DNA-bindende protein er klonet, ville det imidlertid være mest fornuftig å fremstille store mengder av komplekset ved fremgangsmåter som omfatter rekombinant DNA, noe som allerede er oppnådd for dette protein (se f.eks. Ghosh [1990], Cell 62:1019-1029). NF-kB er en pleiotrop induert av gener som deltar i immunologiske, inflammatoriske og vekstregulatoriske svar på primære patogener (virale, bakterielle eller stressrelaterte) utfordringer eller sekundære, patogener (inflammatoriske cytokiner) utfordringer. NF-kB er et dimert, DNA-bindende protein som består av en p50- og en p65-subenhet som begge tar kontakt med og bindes til spesifikke DNA-sekvenser. I en inaktiv tilstand foreligger NF-kB i cellens cytoplasma i kompleks med en spesifikk inhibitor, I-kB, slik at en cytoplasmatiske heterotrimer dannes. Ved aktivering fjernes inhibatoren fra komplekset, og p50-p65-dimeren relokaliseres via et spesifikt kjernelokaliseringssignal (NLS) til cellens kjerne, hvor den kan binde DNA og utføre sin rolle som transkripsjonsaktivator for en rekke gener (se Grimm og Baeuerle [1993], Biochem. J. 290:297-308, for en oversikt over teknikkens stand når det gjelder NF-kB).

p50-p65-dimeren bindes med pikomolar affinitet til sekvenser som stemmer med konsensussekvensen GGGAMTNYCC (SEKV.ID NR. 117), med noe varierende affinitet avhengig av

den eksakte sekvens. Det er verdt å bemerke at homodimerer av p50 og p65 også forekommer. Disse homodimerer viser forskjellige biokjemiske egenskaper så vel som noe forskjellige affiniteter overfor bindingssekvenser som stemmer med eller ligner den ovenfor beskrevne konsensussekvens. Avhengig av de ønskede bindingsegenskaper til TBA, kan således en p50-p65-heterodimer, en p50-p50-homodimer eller en p65-p65-homodimer, eller fragmenter av dimerene nevnt ovenfor, benyttes.

En måte forskjellige nye TBA kan fremstilles for anvendelse på, er vist skjematisk i figur 9.

Nukleinsyregjenkjenningsenhetene i TBA kan ansamles og assosieres med lignende eller ulike TBA-nukleinsyregjenkjenningsenheter via en "leder". "Lederen" er en struktur på hvilken de forskjellige TBA-gjenkjenningsselementer bygges, og som gir ønskelige egenskaper til nukleinsyregjenkjenningsenhetene. Lederen består av enhver sekvens som tilveiebringer ansamlingssekvenser slik at like eller forskjellige nukleinsyregjenkjenningsenheter bringes i nær og stabil forbindelse med hverandre. Når det gjelder en TBA utformet for tett binding av NF-kB-TBR, ansamles således f.eks. en TBA ved at lambda *cro*-sekvenser tilveiebringes som ansamlingssekvenser koblet til de nukleinsyrebindende sekvenser for enten NF-kB p50 eller p65. p50- eller p65-nukleinsyrebindingssekvensene er koblet til *cro*-sekvensene enten i den karboksyterminale eller den aminoternale ende av *cro* og enten den karboksyterminale eller den aminoternale ende av nukleinsyregjenkjenningsenheten i p50 eller p65. Koblingssekvenser tilveiebringes, om ønskelig, for å tillate passende avstand mellom nukleinsyregjenkjenningsenhetene for optimal binding av TBR.

Ansamlingssekvensene, eksemplifisert ovenfor med *cro* og CI-sekvenser (SEKV.ID NR. 104-108), omfatter hvilke som helst stabile oligopeptider som naturlig og sterkt bindes til like sekvenser. Når det gjelder *cro*, er det således velkjent at en *cro*-dimer bindes til bakteriofag lambda-operatorseter (Anderson et al. [1981], Nature 290:754-758; Harrison og Aggarwal [1990], Ann. Rev. Biochem. 59:933-969). De monomere *cro*-enheter assosieres tett og spesifikt med hverandre. Således oppnås tett og nær assosiering ved å koble DNA-gjenkjen-

ningssenhetssekvenser til cro-sekvensene.

De valgfrie koblingssekvenser omfatter enhver aminosyresekvens som ikke interfererer med TBA-ansamling eller nukleinsyrebinding, og som ikke er labil slik at nukleinsyregjenkjenningssenheten frigjøres fra det komplette TBA. Det er ønskelig, men ikke nødvendig, at koblingssekvensene er kovalent koblet til andre bestanddeler i bindingsansamlingen. Sammenbindingen bør være spesifikk slik at den bidrar til ansamling og fremstilling av bindingsansamlingene. Eksempler på slike sekvenser omfatter, men er ikke begrenset til, velkjente sekvenser som kobler forskjellige domener i strukturelle proteiner sammen. I f.eks. lambda-repressorproteinet er det således en koblingssekvens mellom det DNA-bindende domene og dimeriseringsdomenet, som er anvendbar for dette formål. Mange andre slike sekvenser er kjente, og den nøyaktige sekvens er ikke avgjørende for foreliggende oppfinnelse, forutsatt at rutineeksperimenter utføres for å sikre stabilitet og fravær av interferens med målnukleinsyrebinding. Eksempler på slike sekvenser tilveiebringes heri som Met Ser og SEKV.ID NR. 99-102. Innføring av spesifikke, kjente proteolyseseter i disse koblingssekvenser er også en integrert del av foreliggende oppfinnelse. Forekomst av slike seter i koblingssekvensene vil tilveiebringe fordeler ved fremstillingen da de tillater forskjellige molekyler å ansamles på lederstillaset.

I tillegg til nukleinsyregjenkjenningssenhetene, valgfrie koblingssekvenser og ansamlingssekvenser har de nye TBA ifølge foreliggende oppfinnelse, om ønskelig, asymmetriske sekvenser eller pilot-TNA-sekvenser og én eller flere OSA-enheter. Asymmetriske sekvensene tilveiebringes for å fremme eller forhindre visse ønskelige eller uønskede assosiasjoner. Dersom det f.eks. er ønskelig med en TBA med homodimere p50-DNA-gjenkjenningssenheter, tilveiebringes asymmetriske sekvensene for å forstyrre den naturlige sterkere assosiasjon mellom NF-kB-p50-subenheter og -p65-subenheter uten at ansamlingssekvensene hindres i å bringe sammen p50-subenheter. Eksempler på slike sekvenser tilveiebringes heri som SEKV.ID NR. 85-92 og SEKV.ID NR. 105 og 106.

I en annen konfigurasjon bringes NF-kB-p50-subenhets-

sekvenser i nær forbindelse med DNA-gjenkjenningssenhetssekvenser fra transkripsjonsfaktor SP1. Dette er ønskelig dersom et NF-kB/SP1-bindingsmotiv er av betydning, som i HIV-LTR hvor et motiv med minst seks gjenkjenningsseter for DNA-bindende protein, to NF-kB-seter, tre SP1-seter og ett TATA-sete, vites
 5 å foreligge. Da det også vites at det andre NF-kB-sete og det første SP1-sete er av betydning for regulering av HIV-transkripsjon (Perkins et al. [1993], Embo J. 12:3551-3558), er denne spesielle konfigurasjon av TBA anvendbar, ikke bare
 10 ved påvisning av HIV, men også som et terapeutisk eller profylaktisk middel mot HIV-infeksjon (se nedenfor). På tilsvarende måte kan den lange kontrollregion (LCR) i humant papillomavirus anvendes som et nøkkelkontrollområde for analyse ifølge denne fremgangsmåte.

15 I lys av de forskjellige elementer som kan forbindes på "kassett"-måte, ifølge denne fremgangsmåte for TBA-dannelse, kan en praktisk talt ubegrenset variasjon av TBA fremstilles. I figur 10 gis eksempler på en serie forskjellige molekyler, betegnet "HIV-detect I-IV" hvori "CHAP" viser til
 20 ledermolekylet, "nfkb" viser til NF-kB-subenheter, "sp1" viser til nukleinsyregjenkjenningssenheten fra transkripsjonsfaktor SP1, og "TATA" viser til en dimer av DNA-gjenkjenningssenheten fra et TATA-sekvens-DNA-bindende protein (TBP), også kjent som et TATA-bindende protein, eller TBP. Disse konfigurasjoner er
 25 videre eksemplifisert nedenfor og er alle integrerte deler av foreliggende oppfinnelse.

I nok en annen konfigurasjon er den modulære struktur vist i figur 9, tilpasset påvisning og/eller behandling eller profylakse av et fullstendig forskjellig patogen. I figur 11
 30 fremstilles, på tilsvarende måte som de ovenfor beskrevne "HIV-detect I-IV"-molekyler, en serie med "HPV-Detect I-IV"-molekyler. I denne utførelse benyttes de DNA-bindende egenskaper til E2-proteinet fra humant papillomavirus (HPV). I tillegg benyttes rollene til SP1 og TBP ved at det tilveie-
 35 bringes spesifikke DNA-gjenkjenningssenheter som er tilpasset binding til disse sekvenser i HPV-genomet. Ved dannelsen av de E2-spesifikke TBA for anvendelse ved påvisning av HPV-infeksjon, kan det være ønskelig å benytte enhver av SEKV.ID NR.

75-84 eller 93-98 som E2-DNA-gjenkjenningseenhetene. En TBA som inneholder en E2-dimer fra storfe og en dimer av humant E2-DNA-bindingsdomene, kan være spesielt anvendbar.

De forskjellige sekvenser beskrevet ovenfor, kan enten være sammenkoblet kjemisk ved å benytte rene oligopeptider som utgangsmaterialer, eller de kan være sammenkoblet ved å benytte rekombinante nukleinsyrer som koder for de forskjellige subelementer via den velkjente, genetiske kode. Når det gjelder rekombinant fremstilling, er kobling av *cro*-kodende sekvenser til sekvenser for nukleinsyregjenkjenningseenheter slik at TBA dannes, fordelaktig, da *cro* ikke bare virker som ansamlingssekvenser i lederen, men også styrer korrekt folding av nukleinsyregjenkjenningselementene. Eksempler på ledersekvenser tilveiebringes heri som SEKV.ID NR. 104-108. Videre tillater, dersom høyere ordens strukturer som omfatter flere bindingssteder, er ønskelig, f.eks. i en pentamer NF-kB/NF-kB/SP1/SP1/SP1 TBA, passende utforming av asymmetrisekvensene slike strukturer å dannes.

Som beskrevet ovenfor, fremstilles TBA som bindes til sine korrekte bindingssteder med høy affinitet. For eksempel forventes NF-kB-DNA-bindingskomponentene i TBA ifølge figur 10 å bindes til HIV-LTR med en affinitet på mellom tilnærmet 10^{-8} og 10^{-12} molar. Sekvenser som er anvendbare som DNA-gjenkjenningseenheter, tilveiebringes som SEKV.ID NR. 63-71, 73-84, 93-98 og 104-108, og eksemplifiseres videre nedenfor.

I lys av beskrivelsen ovenfor når det gjelder styrt ansamling av nukleinsyrebindende proteiner ved hjelp av ansamlingssekvenser og asymmetri(eller leder-)sekvenser, vil fagfolk forstå at en generelt anvendbar fremgangsmåte for ansamling av proteinstrukturer tilveiebringes av foreliggende oppfinnelse. Denne fremgangsmåtes generalitet vises videre ved å betrakte, som et annet eksempel, anvendelse av en antistoff-epitopinteraksjon for ansamling av ønskede strukturer. Ved hjelp av spesifisitet kan en DNA-bindende proteinstruktur ansamles ved å koble en NF-kB-p50-subenhet til et antigen, f.eks. et sirkularisert (via disulfidbindinger), melanocytstimulerende hormon (MSH). Dette pro-MSH-molekyl kan så bindes av et anti-MSH-antistoff for tilveiebringelse av en ny

nukleinsyrebindende ansamling hvor antigenet og antistoffet virker som ansamlingssekvenser.

Den modulære struktur tilveiebrakt i figur 9, viser at et stort antall forskjellige TBA kan ansamles ved å benytte
 5 forskjellige kombinasjoner av komponenter. Således tilveiebringes representative utførelser av denne generelle struktur som SEKV.ID NR. 109-116.

7. Forsterkerbindingsansamlingene (BBA) og fremstilling av disse. En BBA kan være enhver substans som binder et
 10 gitt BBR dannet ved hybridisering mellom gitte PNA og BNA, heriblant når flere BNA (opp til og innbefattet "n" BNA, dvs. BNA_n , hvori "n" teoretisk ligger mellom 0 og ∞ , men praktisk talt ligger mellom 0 og 100) polymeriseres på PNA for signal-
 15 amplifisering, forutsatt at BBA må ha i det minste de følgende egenskaper:

(a) BBA må binde BBR på en måte som er svært spesifikk for det foreliggende BBR. Det vil si at BBA må
 20 skille mellom BBR som foreligger i PNA-BNA-hybridet og lignende duplekssekvenser i BNA-CNA-hybrider eller andre CNA. Således må, selv når kun et enkelt umake basepar eller konformasjonsforskjeller med eller uten umake basepar foreligger ved dannelsen av PNA- BNA_n - eller PNA-
 25 BNA_n -HNA-hybridet, BBA binde hybridet med tilstrekkelig lav aviditet til at BBA fjernes fra CNA-sekvensene, men ikke fra BBR-sekvensene, ved vask av TBA-TNA-PNA- BNA_n -komplekset.

(b) BBA må bindes sterkt til BBR. Bindingsaffiniteter
 30 i området fra 10^{-5} til tilnærmet 10^{-9} eller høyere anses generelt for tilstrekkelig.

Eksempler på BBA omfatter, men er ikke begrenset til, cro og bakteriofag lambda-repressorproteinet, CI. I tillegg, se US patentskrift nr. 4 556 643, som inkorporeres heri ved
 35 referanse, som foreslår andre DNA-sekvenser og spesifikke bindingsproteiner som repressorer, histoner, DNA-modifiserende enzymer og katabolittgen-aktivatorprotein. Se også EP 0 453 301 som inkorporeres heri ved referanse, som foreslår

et stort antall nukleotidsekvensspesifikke bindingsproteiner (NSSBP), f.eks. tetrasyklinrepressoren, lac-repressoren og tryptofanrepressoren. Hver av disse BBA er kjent innen faget for å bindes til gitte, kjente nukleinsyresekvenser, og affiniteten for disse interaksjoner er kjent. Naturligvis er fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse ikke begrenset til anvendelse av disse kjente BBA. Fra den foreliggende beskrivelse kan en gjennomsnittsfagmann lett tilpasse anvendelse av nye BBA som viser i det minste de påkrevde egenskaper bemerket ovenfor, til den foreliggende fremgangsmåte.

Eksempler på nye BBA som er anvendbare ifølge denne side ved foreliggende oppfinnelse, omfatter nye proteiner basert på motivet i et kjent DNA- eller RNA- eller DNA:RNA-bindende protein, f.eks. cro eller λ CI-repressorprotein. Fortrinnsvis utføres slike modifikasjoner for å lette håndteringen av disse bestanddeler i oppfinnelsen. Det kan således være ønskelig å tilsette en høy konsentrasjon av cro til en analyse. En av de negative egenskaper til cro er at binding av cro til sitt DNA-mål ved høye konsentrasjoner vil konkurrere med cro-cro-interaksjoner. Således kan f.eks. et ledet eller mutert cro fremstilles som ikke har denne begrensning. Eksempler på slike endrede ledere er SEKV.ID NR. 105-106 og 108. Fremgangsmåter kjent innen faget, f.eks. fremstilling av nye, målbindende proteiner ved å benytte randomiserte populasjoner av nukleinsyrer og seleksjon av bakteriofagbinding til gitte, på forhånd valgte målsekvenser (dvs. såkalt fag-display-teknologi, se diskusjon ovenfor for fremstilling av nye TBA) kan benyttes for å fremstille slike nye BBA, så vel som de ovenfor nevnte, nye TBA.

Dersom BBA er et protein eller et proteinkompleks, vil det forstås at en rekke fremgangsmåter som er gjengs innen faget, kan benyttes til fremstilling av BBA. BBA kan isoleres fra sitt naturlig forekommende miljø i naturen, eller dersom dette ikke er praktisk mulig, fremstilles ved vanlige, molekylærbiologiske teknikker. Således er f.eks. sekvensen av cro-proteinet kjent, og enhver molekylær klon av bakteriofag lambda kan benyttes for å fremskaffe passende nukleinsyrer som koder for cro for rekombinant fremstilling av dette. I tillegg

kan de TBA som beskrives heri, benyttes som BBA, forutsatt at forskjellige TBA benyttes for binding av TBR og BBR.

8. Anvendelse av BBA og BBR for lokalisering og
 5 amplifisering av lokaliseringen av PNA-TNA-TBA-kompleksene (se figur 8). I én utførelse av foreliggende oppfinnelse benyttes den svært spesifikke og ekstremt tette binding som tilveiebringes av TBA som består av nukleinsyrebindende bestanddeler for å fremstille en amplifiserbar nukleinsyre-"sandwich"-ana-
 10 lyse. Ifølge én side ved denne utførelse belegges et fast støttemiddel med en første TBA slik at en immobilisert TBA dannes. En PNA og TNA bringes sammen i løsning under hybridiseringsbetingelser og settes så i forbindelse med den immobiliserte TBA. Kun de PNA-TNA-interaksjoner som danner det spesi-
 15 fikke TBR som gjenkjennes av den immobiliserte TBA, vil holdes tilbake ved vask av den faste overflate som binder TBA-TBR-komplekset.

Påvisning av det bundne TBR oppnås ved binding av forsterkernukleinsyrer, BNA, til de 1/2 BBR som foreligger i
 20 PNA under hybridiseringsbetingelser. På denne måte kan et kraftig, amplifisert signal fremstilles selv om kun et eneste TBA-TBR-kompleks bindes til den immobiliserte TBA, ved polymerisering av flere BNA til den immobiliserte TNA. Hver BNA som bindes til TNA, danner et BBR som kan bindes av BBA som i
 25 likhet med de TBA som er immobilisert på den faste overflate, kan utvelges for tett og spesifikk binding av gitte nukleinsyrestrukturer. Således kan ifølge denne utførelse den immobiliserte TBA inneholde den DNA-bindende del av NF-kB som bindes svært spesifikt og tett til NF-kB-bindings seter dannet ved
 30 hybridisering av TNA og PNA.

Da det er velkjent at det foreligger NF-kB-bindings seter både i det normale, humane genom og i de lange, terminale repetisjoner i humant immunodefisiensvirus (HIV), tilveiebringer foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å skille
 35 mellom de "normale", humane seter og setene som foreligger i celler grunnet HIV-infeksjon. I en analyse utformet for å fastslå nærvær eller fravær av HIV-DNA i en prøve med humant DNA, kan således HIV-NF-kB-bindings setene betraktes som TNA,

og de normale, humane NF-kB-bindingssteder som CNA. Ifølge fremgangsmåten i foreliggende oppfinnelse kan diskriminering mellom disse TNA og CNA oppnås ved å utnytte det faktum at det i HIV-LTR foreligger to NF-kB-bindingssteder fulgt av tre SPI-
 5 seter (se f.eks. Koken et al. [1992], Virology 191:968-976), mens cellulære NF-kB-bindingssteder med de samme sekvenser ikke finnes i tandem.

I de tilfeller hvor TNA inneholder mer enn ett 1/2 TBR og det er ønskelig å utnytte de terapeutiske og pro-
 10 fylaktiske anvendelser av TBA, kan det være ønskelig å benytte mer enn én TBA med evne til å binde et TBR i TNA-PNA-komplekset. I dette tilfellet kan det være fordelaktig å velge som bestanddeler i TBA, DNA-bindende eller RNA-bindende domener med lavere affinitet for sitt TBR enn villtypen av det DNA-
 15 bindende eller RNA-bindende domene. Da de TBA som inngår i bindingen til de mange TBR enten kan ansamles før binding til TBR eller etter binding til TBR, vil de enkelte TBA ikke blok- kere de tilsvarende TBR i andre genomer enn målgenomet, med mindre de foreliggende TBR romlig sett er i stand til å binde
 20 det ansamlede TBA-kompleks. En egenskap ved den multimeren an- samling av TBA som spesifikt inngår som en del av foreliggende oppfinnelse, er at en slik multimer ansamling vil forventes å ha en svært redusert affinitet for et enkelt sete i TNA. Da bindingen imidlertid er dramatisk forsterket sammenlignet med
 25 hver enkelt TBA, vil TBA-komplekset forventes å ikke konkur- rere med de tilsvarende native proteiner *in situ* om binding til et gitt TBR, men bindes tett til sekvenser i PNA-TNA- hybridet som inneholder TBR for hver av de nukleinsyrebindende bestanddeler som er ansamlet i TBA. TBA-komplekset bør ansam-
 30 les og koblingssekvenser justeres i de enkelte TBA slik at de nukleinsyrebindende områder som inngår i TBA-komplekset, til- lates samtidig å nå og binde til sine mål.

Når først TNA-PNA-hybridene er dannet og satt i kon- takt med den immobiliserte TBA, vaskes ubundet nukleinsyre
 35 bort fra den immobiliserte overflate, og de immobiliserte hybrider påvises. Dette kan oppnås på mange måter. Ved én side av foreliggende oppfinnelse er PNA merket med en OSA, f.eks. et radioaktivt atom, fargede kuler eller et PNA merket med en

OSA, f.eks. et radioaktivt atom, fargede kuler eller et enzym som kan danne et farget reaksjonsprodukt. Videre kan PNA i tillegg til å ha ett eller flere 1/2 TBR, også inneholde minst ett 1/2 BBR. 1/2 BBR-sekvensene er valgt slik at de er komplementære til unike 1/2 BBR-sekvenser i BNA. Når det gjelder utførelsen beskrevet ovenfor hvor TBA er NF-kB og det TBR som dannes ved TNA-PNA-hybridisering er ett eller flere NF-kB-bindingsseter, kan de foreliggende 1/2 BBR tilveiebringe hybridiserbare (dvs. enkelttrådede, komplementære) sekvenser fra venstre eller høyre bakteriofag lambda-operator (se f.eks. Ptashne [1982], Scientific American 247:128-140, og referanser sitert i denne for sekvensene til disse operatorer). Disse kan polymeriseres til 1/2 BBR i PNA på vektoriell måte (se figurene 2 og 3) slik at opp til "n" BBR tilveiebringes hvor hvert BBR danner et cro-bindingssete. Enzymatisk, radioaktivt eller på annen måte merket cro settes i forbindelse med TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-komplekset. På denne måte dannes et svært selektivt og amplifisert signal. Signal produsert med en PNA med et enkelt 1/2 TBR, viser at analysen har lyktes i å oppnå TBA-TBR-binding og polymerisering av BNA for produksjon av signal fra cellulære seter (dvs. fra CNA). Fravær av signal når en dimerisert TBA benyttes, viser at ingen HIV-LTR forelå i TNA, da ingen dobbelte NF-kB-bindingsseter forelå. På den annen side viser forekomst av signal ved bruk av NF-kB-dimer HIV-infeksjon. Som et spesifikt eksempel på beskrivelsen ovenfor av denne utførelse av oppfinnelsen, se eksempel 6 som beskriver et HIV-analysesett.

Fagfolk vil naturligvis forstå at beskrivelsen ovenfor kan modifiseres på mange måter når det gjelder valg av PNA, TNA, TBA, BNA og BBA. Når det gjelder andre systemer enn HIV, vil fagfolk videre forstå at den generelle fremgangsmåte som er beskrevet ovenfor, kan benyttes også her. Disse andre anvendelser kan imidlertid være enklere enn fremgangsmåten beskrevet ovenfor, da de benyttede TBA ikke nødvendigvis gjenkjenner normale, cellulære seter, slik at bruk av dimerisering eller andre fremgangsmåter for å skille mellom TNA og CNA, er mindre avgjørende. Ved utforming av prober og bindingssansamlinger for disse andre systemer vil fagmannen kunne ledes av

følgende prinsipper og betraktninger.

I utførelsen beskrevet ovenfor, er fordelene ved å benytte de DNA-bindende deler av NF-kB-proteinet som TBA og NF-kB-gjenkjenningsbindingselementer som TBR, at disse elementer danner et viktig "kontrollpunkt" for replikasjon av HIV. Det vil si at det er kjent at HIV må benytte NF-kB som en avgjørende komponent i sin replikative livssyklus. Tilsvarende kontrollpunkter for andre patogener kan utvelges og benyttes som basis for påvisning ifølge fremgangsmåtene beskrevet heri.

Fra beskrivelsen ovenfor av generelle egenskaper ved foreliggende oppfinnelse og dens virkningsmåte vil fagfolk forstå at det er et stort antall spesifikke måter som foreliggende oppfinnelse kan utføres på. For eksempel kan fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse tilpasses en fremgangsmåte og utstyr som benytter kromatografiske analysesett beskrevet i US patentskrift nr. 4 690 691 og 5 310 650 (691- og 650-patentene). I disse patenter ble et porøst medium benyttet for immobilisering av enten en TNA eller en innfangingsprobe, og et løsemiddel ble benyttet for å transportere en mobil fase som inneholdt enten et merket PNA, dersom TNA var immobilisert, eller TNA, dersom en innfangingsprobe var immobilisert, inn i "innfangingssonen". Etter binding av TNA i innfangingssonen, enten ved direkte immobilisering eller ved innfangning, ble en merket PNA kromatografert gjennom innfangingssonen, og bundet merking ble påvist.

Tilpasning av foreliggende oppfinnelse til et slikt system gir fordelene ved å benytte en målbindingsansamling i innfangingssonen, og således innfangning av kun perfekt tilpassede TBR-sekvenser eller andre TBR som representerer nukleinsyrekonformasjoner som bindes spesifikt av TBA i TNA-PNA-dupleksene grunnet den tidligere beskrevne, sensitive diskriminering av TBA mellom TNA og CNA.

Etter binding av TNA-PNA-hybridene til den immobiliserte TBA amplifiseres signalet ved å tilsette BNA eller å kromatografere BNA gjennom innfangingssonen. Endelig kan signalet forsterkes ytterligere ved å tilsette BBA eller å kromatografere merket BBA gjennom innfangingssonen. På denne måte forenkles analysetrinnene beskrevet i 691- og 650-patentene ved

at det tilveiebringes evnen til å øke spesifisiteten og, ved
amplifisering, sensitiviteten til fremgangsmåten beskrevet i
disse patenter. Beskrivelsen i 691- og 650-patentene inkor-
poreres heri ved referanse med det formål å vise detaljene i
5 fremgangsmåten og læren gitt i disse angående spesifikke reak-
sjonsbetingelser, til hvilke preparatene og fremgangsmåtene
ifølge foreliggende oppfinnelse kan tilpasses.

Fagfolk vil også forstå at fremgangsmåten ifølge
foreliggende oppfinnelse kan tilpasses mikrotiterplater eller
10 automatisering. Anvendelse av instrumenter som benytter frem-
gangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse, faller derfor
naturlig innenfor den foreliggende beskrivelses område og de
vedlagte patentkrav. Således kan f.eks. foreliggende oppfin-
nelse tilpasses anvendelse i instrumenter som IMx bordmodell-
15 analysator fra Abbott Laboratories (Abbott Park, IL). IMx er
for tiden utformet for å kjøre både fluorescenspolariserings-
immunoanalyser (FPZa, se Kier [1983], KCLA 3:13-15) og mikro-
partikkel-enzymimmunoanalyse (MEZA, se Laboratory Medicine,
bind 20, nr. 1, januar 1989, s. 47-49). MEZA-fremgangsmåten
20 kan lett overføres til en nukleinsyrepåvisningsfremgangsmåte
ved anvendelse av foreliggende oppfinnelse, ved å benytte en
TBA som et innfangingsmolekyl koblet til en mikropartikkel av
submikrometerstørrelse ($<0,5 \mu\text{m}$ i gjennomsnitt) suspendert i
løsning. Mikropartiklene belagt med TBA, pipetteres i en reak-
25 sjonsbrønn. IMx-instrumentet pipetterer så prøven (hybridisert
PNA-TNA) inn i reaksjonscellen slik at det dannes et kompleks
med TBA. Etter en passende inkuberingstid overføres løsningen
til en ikke-reaktiv glassfibermatriks til hvilken partiklene
har høy affinitet og som mikropartiklene adhererer til. Enten
30 før eller etter filtrering av reaksjonsblandingen gjennom
glassfibermatriksen tilsettes BNA og BBA, og et annet system
for signalamplifisering og deteksjon benyttes som avhenger av
spesifikk dannelselse av TNA-PNA-hybrider. Det immobiliserte
kompleks vaskes, og ubundet materiale flyter gjennom glass-
35 fibermatriksen.

De bundne komplekser påvises ved å benytte BBA merket
med alkalisk fosfatase eller på annet vis (radioaktivt, enzym-
atisk, fluorescens). For alkalisk fosfatasemerkede BBA kan det

fluorescerende substrat 4-metyllumbelliferylfosfat eller et tilsvarende reagens tilsettes. Alternativt kan enzymet unngås ved direkte merking av BBA med dette eller et lignende reagens. I alle tilfeller vil fluorescens eller annet signal være
 5 proporsjonalt med mengden foreliggende PNA-TNA-hybrid.

Fluorescensen påvises på overflaten av matriksen ved hjelp av et overflatefluorometer som beskrevet av produsenten av IMx-instrumentet. Med mindre justeringer som kan utføres ved rutineeksperimentering for å optimalisere et instrument
 10 som IMx for nukleinsyrehybridisering og nukleinsyre-TBA-interaksjoner, er foreliggende oppfinnelse fullstendig tilpasningsdyktig til automatisert analyse av TNA-prøver.

9. Andre diagnostiske anvendelser av foreliggende
 15 oppfinnelse. Mens beskrivelsen ovenfor tillater anvendelse av foreliggende oppfinnelse på en rekke forskjellige måter, kan ytterligere egenskaper ved oppfinnelsen lett verdsettes, f.eks. i et mobilitetsretardasjonssystem.

I denne utførelse av oppfinnelsen oppnås en forbedring i den velkjente, elektroforetiske mobilitetsskiftsanalyse (EMSA) som følger (se figurene 12a og 12b):

En DNA-prøve fragmenteres, enten ved tilfeldig kløyving eller ved behandling med spesifikk restriksjonsendonuklease. DNA i prøven deles så i to like porsjoner, og en
 25 spesifikk TNA tilsettes første porsjon, men ikke den andre. De to porsjoner fraksjonerer så ved elektroforese i en akrylamidgel eller agarosegel, og mønsteret av DNA-bånd (enten visualisert ved etidiumbromidbinding eller ved at de merkes radioaktivt før elektroforesen) sammenlignes så for de to porsjoner.
 30 DNA-fragmenter med bindingssteder for hvilke TBA er spesifikk, vil forsinkes i sin vandring gjennom elektroforesemediet. Ved å benytte en egnet TBA kan ethvert antall DNA-sekvenser eller andre nukleinsyresekvenser følges på denne måte.

I en modifisering av EMSA som beskrevet ovenfor,
 35 hybridiseres fragmentert TNA med en PNA og fraksjonerer i en første dimensjon. Det fraksjonerte DNA får så reagere med en passende TBA, og DNA-fragmentenes endrede mobilitet observeres. Økt retardasjon er mulig ved å tilsette BBA som be-

skrevet ovenfor. (Se f.eks. Vijg og referanser sitert i denne for kjente teknikker vedrørende todimensjonal nukleinsyreelektroforese til hvilken foreliggende fremgangsmåte kan benyttes).

5

10 10. Terapeutiske anvendelser. Grunnet de svært tette og selektive nukleinsyrebindingsegenskaper til de nye TBA beskrevet heri, omfattes terapeutisk anvendelse i tillegg til de diagnostiske egenskaper ved disse forbindelser. Således er en TBA som gir tett og spesifikk binding av HIV-LTR grunnet forekomst av en NF-kB-p50- og en SP1-DNA-gjenkjenningssenheter liggende nær hverandre (se figur 10, "HIV-Detect II"), anvendbar for oppfangning av HIV-LTR, hvorved transkripsjon fra dette nøkkelelement i HIV-genomet forhindres. De enestående egenskaper til ansamlingssekvensene i TBA tillater rekombinante vektorer å innføre DNA som koder for en slik TBA i en celle, og korrekt folding av de uttrykte sekvenser. Inne i cellen vil kjernelokaliseringssignalene i p50-subenheten styre transport av TBA til kjernen hvor den bindes tett til LTR i eventuelt integrert HIV slik at patogenet i praksis skrur av. For profylaktisk anvendelse tilføres en person som er bekymret vedrørende eventuell HIV-eksponering, en tilstrekkelig dose av en TBA eller en rekombinant vektor som kan uttrykke TBA, til at eventuelt HIV som har kommet inn i personen, fanges opp. Ved denne anvendelse er bruk av TBA analog med passiv beskyttelse med et spesifikt immunoglobulin. Ved terapeutisk eller profylaktisk anvendelse benyttes NLS-sekvenser istedenfor OSA som benyttes ved diagnostisk anvendelse. Eksempler på NLS-sekvenser tilveiebringes som SEKV.ID NR. 72 og 103 (se også Heinzinger 1994 og Bukinsky 1993 som beskriver NLS-sekvenser i Vpr-protein, hhv. gag-protein fra HIV). I alle tilfeller tilføres TBA i et farmasøytisk aksepterbart bærerstoff, kjent innen faget, f.eks. en steril saltløsning, eller forbundet med et liposom i form av en rekombinant vektor, fortrinnsvis en som styrer ekspresjon av TBA i en utvalgt celletype, eller ved et system for proteintilførsel.

II. Utførelser av oppfinnelsen

I lys av beskrivelsen ovenfor og eksemplene som følger, vil fagfolk forstå at foreliggende beskrivelse beskriver og tillater en rekke utførelser av foreliggende oppfinnelse, heriblant:

1. En probenukleinsyre (PNA) som omfatter:

- (a) en enkelttrådet sekvens, 1/2 TBR, som under hybridiseringsbetingelser kan danne et hybrid, TBR, med et 1/2 TBR som foreligger i en målnukleinsyre (TNA),
- (b) ingen, én eller flere, fortrinnsvis 1 til 10, enkelttrådede sekvenser, 1/2 BBR, som kan danne et hybrid, BBR, under hybridiseringsbetingelser med et 1/2 BBR som foreligger i en forsterker-nukleinsyre (BNA), og
- (c) en OSA, som enten er intet tilkoblet støttemiddel og/eller indikator, eller et tilkoblet støttemiddel eller annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer,

hvor dette TBR er i stand til å bindes med høy affinitet til en TBA, hvor TBA er en substans som kan skille mellom et paret TBR og et TBR med uparede nukleotider, og videre hvor dette BBR er i stand til å bindes med høy affinitet til en BBA, hvor BBA er en substans som kan skille mellom et paret BBR og et BBR med uparede nukleotider. Denne utførelse omfatter TBR som er nukleinsyrebindende proteingjenkjennings seter, f.eks. HIV-LTR, og andre nukleinsyrebindende proteingjenkjennings seter i andre patogener, av hvilke noen er angitt ovenfor. PNA ifølge denne utførelse av oppfinnelsen kan danne et TBR som er et nukleinsyrebindende proteingjenkjennings sete som foreligger i genomet til et patogen eller er et bindings sete forbundet med en patogen tilstand i det humane genom eller en kontaminant i en fermenteringsprosess.

2. En forsterkernukleinsyre (BNA) som omfatter:

- (a) et 1/2 BBR som har en sekvens som er komplementær til en 1/2 BBR-sekvens i en PNA eller en

annen BNA som allerede er hybridisert til PNA, og som under hybridiseringsbetingelser er i stand til å danne et hybrid, BBR, med PNA,

- (b) et OSA-tilkoblet støttemiddel eller annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer, og
- (c) ytterligere hybridiserings seter, 1/2 BBR, for hybridisering med ytterligere BNA,

hvor BBR er i stand til å bindes med høy affinitet til en BBA, hvor BBA er en forbindelse som kan skille mellom et par BBR og et BBR med uparede nukleotider.

3. En hårnålsnukleinsyre (HNA) som omfatter en enkelttrådet sekvens, 1/2 BBR, som under hybridiseringsbetingelser kan danne en hårnål og samtidig bindes til en BNA slik at det dannes et BBR som er i stand til å binde en BBA, hvor BBR er i stand til å bindes med høy affinitet til en BBA, hvor BBA er en forbindelse i stand til å skille mellom et par BBR og et BBR med uparede nukleotider.

4. En fremgangsmåte for påvisning av en gitt TNA-sekvens som omfatter følgende trinn:

- (a) hybridisering av TNA med en PNA som beskrevet ovenfor,
- (b) hybridisering av PNA med en BNA som inneholder et 1/2 BBR hvis sekvens er komplementær til en 1/2 BBR-sekvens i PNA,
- (c) tilsetning av produktene fra trinnene (a) og (b) som inneholder et TBR og et BBR, til en overflate, en væske eller et annet medium som inneholder en TBA,
- (d) tilsetning av BBA til blandingen i trinn (c), hvor BBA omfatter:
 - (i) et molekyl eller en del av et molekyl som er i stand til selektiv binding til et BBR, og
 - (ii) en påvisbar indikator,

og

- (e) påvisning av signalet dannet av indikatoren kob-

let til BBA. Denne fremgangsmåte omfatter anvendelse av en proteinindikator, heriblant enzymer i stand til å katalysere reaksjoner som fører til dannelse av fargede reaksjonsprodukter. Den omfatter også indikatorer som radioaktive atomer eller fargede kuler.

5. En fremgangsmåte for påvisning av nærvær i en prøve av en gitt målnukleinsyre, TNA, som omfatter:

- (a) å bringe prøven i kontakt med en probenukleinsyre, PNA, som ved hybridisering med TNA dersom denne foreligger i prøven, danner et målbindingsområde, TBR, som er i stand til å binde en målbindingsansamling, TBA, og
- (b) å sette prøven som allerede er brakt i kontakt med PNA, i forbindelse med en TBA som kan bindes til eventuelle TBR som dannes ved hybridisering mellom PNA og TNA i prøven.

6. En fremgangsmåte for å påvise eller lokalisere spesifikke nukleinsyresekvenser med høy grad av sensitivitet og spesifisitet som omfatter:

- (a) å tilsette PNA som inneholder et 1/2 BBR og et 1/2 TBR til en prøve som inneholder, eller mistenkes for å inneholde, TNA som inneholder 1/2 TBR-sekvenser, slik at det dannes et kompleks med målbindingsområder, TBR, dannet ved hybridisering mellom de komplementære 1/2 TBR som foreligger i PNA, hhv. TNA,
- (b) binding av TBR dannet i trinn (a) til en immobilisert TBA, slik at et TBA-TNA-PNA-kompleks dannes,
- (c) tilsetning av forsterkernukleinsyrer, BNA, som inneholder forsterkerbindingsområder, 1/2 BBR, til komplekset dannet i trinn (b), slik at de 1/2 BBR som foreligger i BNA, hybridiserer med 1/2 BBR-sekvensene som foreligger i PNA eller med 1/2 BBR som foreligger i BNA allerede bundet til PNA, slik at det dannes BBR, slik at TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-komplekser dannes,

- (d) tilsetning av hårnålsnukleinsyrer, HNA, som inneholder 1/2 BBR-sekvenser, til komplekset dannet i trinn (c), slik at de 1/2 BBR som foreligger i HNA, hybridiserer med eventuelt tilgjengelige 1/2 BBR-sekvenser som foreligger i BNA i komplekset fra trinn (c), hvorved forlengelsen av BNA til TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-kompleksene fra trinn (c) termineres, slik at det dannes TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA-komplekser,
- (e) tilsetning av forsterkerbindingsansamlinger, BBA, koblet til indikatorrester, til TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA-kompleksene dannet i trinn (d), slik at TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA-komplekser dannes, og
- (f) påvisning av signalene dannet av indikatorrestene koblet til TBA, PNA, BNA, BBA eller HNA i TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA-kompleksene fra trinn (e),

hvor i TNA omfatter:

- (i) én eller flere spesifikke 1/2 TBR-nukleinsyresekvenser hvis nærvær eller fravær i en gitt prøve skal bekreftes,

PNA omfatter:

- (i) en enkelttrådet sekvens, 1/2 TBR, som under hybridiseringsbetingelser er i stand til å danne et hybrid, TBR, med et 1/2 TBR som foreligger i en målnukleinsyre (TNA),
- (ii) en enkelttrådet sekvens, 1/2 BBR, som under hybridiseringsbetingelser er i stand til å danne et hybrid, BBR, med et 1/2 BBR som foreligger i en forsterkernukleinsyre (BNA), og

(iii) en OSA, som enten er intet tilkoblet støttemiddel og/eller indikator, eller et tilkoblet støttemiddel eller annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer,

BNA omfatter:

- (i) et 1/2 BBR, som vist i figur 1(IIb), som har en sekvens som er komplementær til en 1/2 BBR-sekvens i en PNA og som under hybridiseringsbetingelser er i stand til å danne et hybrid, BBR, med PNA,
- (ii) et OSA-tilkoblet støttemiddel eller annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer, og
- (iii) ytterligere hybridiserings seter, 1/2 BBR, for andre BNA, og
- (iv) sekvenser, 1/2 BBR, som kan hybridisere med BNA som allerede er hybridisert til PNA,

BBA omfatter:

- (i) et molekyl eller en del av et molekyl som er i stand til selektiv binding til et BBR, og
- (ii) enten intet tilkoblet støttemiddel og/eller indikator, eller et tilkoblet støttemiddel eller annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer, og

og TBA omfatter:

- (i) et molekyl eller en del av et molekyl som selektivt kan bindes til et TBR, og
- (ii) enten intet tilkoblet støttemiddel og/eller indikator, eller et tilkoblet støttemiddel eller annet lokaliseringsmiddel, heriblant, men ikke begrenset til, tilkobling til kuler, polymerer og overflater, og/eller indikatorer.

7. En forbedret fast fase-hybridiseringsfremgangsmåte for påvisning av nærvær av et mål-polynukleotid som omfatter: immobilisering av et mål-polynukleotid dersom dette foreligger i en analyseprøve, enten direkte eller via en intermediær

innfangingsstruktur, til en fast fase i et innfangingssete, tilkobling av en påvisbar, merket gruppe, før, under eller etter immobiliseringen, til mål-polynukleotidet dersom dette foreligger, og påvisning av den merkede gruppe, om noen, ved
 5 innfangingssettet, hvor forbedringen omfatter:

- (a) anvendelse av en målbindingsansamling, TBA, som et middel for å oppnå immobilisering av mål-polynukleotidet, hvori TBA kun bindes til et perfekt hybrid dannet mellom en spesifikk
 10 probenukleinsyre, PNA, og målnukleinsyren, slik at et perfekt målbindingsområde, TBR, som kan gjenkjennes av TBA, dannes, og
- (b) innføring i PNA av en enkelttrådet sekvens, 1/2 BBR, som kan binde en forsterkernukleinsyre,
 15 BNA, som inneholder en enkelttrådet, komplementær 1/2 BBR som ved hybridisering med 1/2 BBR i PNA danner et BBR som kan binde merkede forsterkerbindingsansamlinger, BBA.

8. En målbindingsansamling, TBA, som omfatter én
 20 eller flere nukleinsyregjenkjenningsenheter, koblingssekvenser, ansamlingssekvenser, asymmetrisekvenser, kjerne-lokaliseringssekvenser (NLS) og OSA. Nukleinsyregjenkjenningsenheten kan være en NF-kB-bindingsenhet, en SP1-bindingsenhet, en TATA-bindingsenhet, en bindingsenhet fra humant
 25 papillomavirus, en HIV-LTR-bindingsenhet eller en bindingsenhet for ethvert annet fragment med spesifikk sekvens hvis påvisning er ønskelig og kan oppnås ved spesifikk assosiering med TBA. Slike gjenkjenningsenheter omfatter, men er ikke begrenset til, de eksemplifisert heri som SEKV.ID NR. 63,
 30 SEKV.ID NR. 64, SEKV.ID NR. 65, SEKV.ID NR. 66, SEKV.ID NR. 67, SEKV.ID NR. 68, SEKV.ID NR. 69, SEKV.ID NR. 70, SEKV.ID NR. 71, SEKV.ID NR. 72 og SEKV.ID NR. 73. Koblingssekvenser, f.eks. oligopeptider, som ikke interfererer med nukleinsyregjenkjenningsfunksjon og som
 35 tilveiebringer stabilitet og kontroll over avstanden mellom nukleinsyregjenkjenningsenheten og resten av TBA. Eksempler på slike koblingssekvenser er velkjente innen faget og omfatter, men er ikke begrenset til, oligopeptidsekvenser fra primær-

sekvensen mellom domener i et strukturelt protein. Ansamlings-
 sekvenser omfatter oligopeptidsekvenser som styrer folding og
 ansamling av nukleinsyregjenkjenningsenheter. Et foretrukket
 eksempel på en slik sekvens er oligopeptider avledet fra cro-
 5 proteinet fra bakteriofag lambda. Asymmetrisekvensen styrer
 ansamling av nukleinsyregjenkjennings- og -ansamlingssekvenser
 i en på forhånd bestemt rekkefølge. Eksempler på slike
 asymmetrisekvenser er sekvenser avledet fra insulin, relaksin,
 gonadotropisk hormon, FSH, HCG, LH, ACTH, heriblant, men ikke
 10 begrenset til, SEKV.ID NR. 85-92. Med henvisning til figurene
 14 og 15 er SEKV.ID NR. 85 en "A"-sekvens og SEKV.ID NR. 86 en
 "B"-sekvens, SEKV.ID NR. 87 er en "A"-sekvens, og SEKV.ID NR.
 88 er en "B"-sekvens, SEKV.ID NR. 89 er en "A"-sekvens fra
 humant relaksin, og SEKV.ID NR. 90 er en "B"-sekvens fra
 15 humant relaksin, SEKV.ID NR. 91 er en "A"-sekvens fra relaksin
 fra røkke, og SEKV.ID NR. 92 er en "B"-sekvens fra relaksin
 fra røkke. I tillegg kan TBA inneholde kjernelokaliserings-
 signalsekvenser, NLS, som styrer migrering og opptak av et
 protein eller kompleks forbundet med NLS til cellekjernen.
 20 Eksempler på slike NLS-sekvenser er tilveiebrakt som SEKV.ID
 NR. 72 og 103. Foretrukne utførelser av TBA omfatter, men er
 ikke begrenset til, "HIV-Detect I-IV" eller "HPV Detect I-IV",
 og SEKV.ID NR. 109-116.

9. Fremgangsmåter for anvendelse av de nye TBA
 25 omfatter, men er ikke begrenset til, en foreliggende
 oppfinnelse for å benytte TBA for binding av en gitt
 nukleinsyresekvens i en målnukleinsyreprøve som omfatter:

- (a) fragmentering av nukleinsyren i målnukleinsyre-
 prøven,
- 30 (b) å sette den fragmenterte nukleinsyre, under
 hybridiseringsbetingelser, i forbindelse med en
 probenukleinsyre som er komplementær til nuk-
 leinsyresekvensen av interesse, hvori probe-
 nukleinsyren ved hybridisering med nukleinsyre-
 35 sekvensen av interesse, danner et målbindingsom-
 råde til hvilket TBA bindes spesifikt.

I denne fremgangsmåte kan probenukleinsyren i
 tillegg til sekvenser som er komplementære til nukleinsyre-

sekvensen som skal analyseres, også inneholde ytterligere sekvenser til hvilke en forsterkernukleinsyre kan bindes slik at det dannes et forsterkerbindingssete til hvilket en merket forsterkerbindingsansamling kan bindes for tilveiebringelse av et signal som viser og amplifiserer bindingen av probenukleinsyren til målnukleinsyresekvensen som skal analyseres.

Nok en side som ikke krever fragmentering av målnukleinsyren, omfatter tilførsel av TBA til en pasient med behov for slik behandling, av en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av TBA, som omfatter tilførsel av TBA, enten i form av et rensset proteinkompleks eller i form av en rekombinant vektor som etter tilførsel til pasienten kan uttrykke TBA slik at TBA bindes til den gitte nukleinsyresekvens, og det ønskede, profylaktiske eller terapeutiske resultat oppnås. Dette kan omfatte tilveiebringelse av en dose som kan fastslås ved rutineeksperimentering til å være tilstrekkelig for å forhindre etablering av en aktiv infeksjon av et patogen. Doser av rensede TBA kan ligge i området fra tilnærmet 0,001 til 100 mg/kg. Ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor som vil styre *in vivo* ekspresjon og folding av TBA, kan dosene av den rekombinante nukleinsyre være vesentlig lavere, særlig dersom de tilføres i form av en ikke-patogen, viral vektor. Fremgangsmåtene for anvendelse av TBA omfatter også å følge mobilitetsskift for nukleinsyrer i målnukleinsyreprøver som en funksjon av størrelsen slik at binding av TBA til et gitt fragment i prøven endrer fragmentets mobilitet. Denne side ved fremgangsmåten tilveiebringer en anvendbar fremgangsmåte for analyse av nukleinsyrefragmenter for spesielle avvik, f.eks. slike som finnes assosiert med metastaser.

10. Diagnostiske eller rettsmedisinske sett som er anvendbare for å påvise nærvær av en infeksjon, sykdomsutsettethet eller opphavet til en gitt nukleinsyreholdig prøve.

11. En fremgangsmåte for ansamling av multimerer TBA *in vivo* som omfatter innføring av nukleinsyrer som koder for TBA-bestanddelene i en celle. TBA-bestanddelene bør alle inneholde en nukleinsyregjenkjenningsenhet, ansamlingssekvenser, asymmetriske sekvenser og kjernelokaliseringssignalsekvenser.

Koblingssekvenser kan, om ønskelig, innføres dersom TBA-"footprinting"-eksperimenter viser behov for slike koblingssekvenser for å oppnå optimal geometri av den multimere TBA. Ved *in vivo* ekspresjon av hver TBA-bestanddel og proksimal binding via nukleinsyregjenkjenningseenheten i hver TBA-bestanddel til nukleinsyresekvenser som forekommer i kjernen eller andre steder i cellen, styres uttrykte TBA-bestanddeler til ansamling via de innbefattede ansamlingssekvenser og asymmetrisekvenser til multimere TBA. Som beskrevet ovenfor, vil slike multimere TBA ha den fordel at de bindes spesifikt med høy affinitet til TBR i en gitt målsekvens, men ikke i det hele tatt eller med svært lav affinitet til beslektede nukleinsyrer.

Beskrivelsen av oppfinnelsen gitt ovenfor, vil forstås av fagfolk å tillate foretrukne utførelser så vel som den beste måte for foreliggende oppfinnelse. Uten å begrense oppfinnelsens område til spesifikke anvendelsesområder gis de påfølgende eksempler for ytterligere å veilede fagfolk vedrørende fremgangsmåter for utførelse av foreliggende oppfinnelse. Gjengse rekombinant-DNA-teknikker som dem beskrevet i Sambrook, Fritsch og Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, og nyere tekster beskrives ikke da disse nå ligger godt innenfor gjennomsnittsfagmannens kunnskapsområde.

Eksempel 1 - Fremstilling av PNA og merking av PNA

Probenukleinsyrer, PNA, kan fremstilles ved fremgangsmåter velkjente innen faget. Således kan enkelttrådede polynukleotid-PNA med definert sekvens fremstilles ved fast fase kjemisk syntese ifølge Merrifield. PNA kan fremstilles ved automatisk syntese ved å benytte kommersielt tilgjengelig teknologi, f.eks. resiner og instrumenter fremstilt eller markedsført av Applied Biosystems, ABI, eller andre produsenter. Alternativt kan gitte DNA-sekvenser syntetiseres *in vivo* ved kjente fremgangsmåter for rekombinant DNA, f.eks. ved å klonere en dupleks-PNA i en vektor som kan replikere i *E. coli*, hvorved store mengder av dupleks-PNA kan fremstilles.

Multimerer av PNA kan klonas i vektoren slik at det for hvert mol vektor frigjøres flere mol PNA ved kutting av vektoren i et restriksjonsfragment som flankerer PNA-sekvensen. Etter syntese eller rekombinant fremstilling renses PNA ved fremgangsmåter velkjente innen faget, f.eks. gelelektroforese eller høytrykksvæskekromatografi (HPLC). Dersom PNA fremstilles som en dupleks, atskilles PNA-trådene før de anvendes i en hybridiseringsanalyse for påvisning av målnukleinsyresekvenser, enten ved oppvarming eller ved andre fremgangsmåter kjent innen faget.

De spesifikke basesekvenser i PNA utvelges ut fra sekvensen som skal påvises i en TNA, med det forbehold at PNA ifølge foreliggende oppfinnelse inneholder en 1/2 TBR-sekvens som ved hybridisering med PNA og TNA danner et TBR. Da det er et praktisk talt ubegrenset antall slike sekvenser kjent innen faget, er valget av PNA-sekvens åpent for seleksjon av den erfarne forsker for enhver gitt anvendelse. Sekvensen av HIV-LTR er én slik sekvens som ved hybridisering med en PNA som koder deler av LTR med TNA som koder HIV-LTR, danner TBR som kan binde de DNA-bindende proteiner NF-kB eller SP1.

I tillegg til sekvenser som vil danne et TBR ved hybridisering, kan PNA også inneholde et 1/2 BBR. Denne sekvens vil ved hybridisering med en forsterkernukleinsyre, BNA, danne et BBR som kan binde en BBA. BBA er fortrinnsvis et DNA-bindende protein med høy affinitet for BBR-sekvensen.

I dette spesielle eksempel utføres hybridisering mellom en PNA med et 1/2 TBR, SEKV.ID NR. 4, og ved den 3' ende av denne sekvens, en 1/2 BBR-sekvens vist som SEKV.ID NR. 35. PNA som inneholder disse sekvenser, benyttes enten uten merking, eller merkes med en radioaktiv isotop som P^{32} , S^{35} eller en tilsvarende isotop, ifølge fremgangsmåter kjent innen faget. Alternativt kobles PNA til en kule med diameter mellom 0,01 og 10 μm , som kan være farget for lett visuell påvisning. Denne merking danner OSA som beskrevet i beskrivelsen. Denne probe hybridiserer med HIV-LTR-sekvenser slik at det dannes et TBR som binder NF-kB. I tillegg hybridiserer PNA med BNA som besitter et komplementært 1/2 BBR slik at det dannes en venstre operator fra bakteriofag lambda som binder enten *cro*

eller lambda-repressorproteiner.

På tilsvarende måte som beskrevet ovenfor, benyttes PNA hvori 1/2 TBR er enhver av SEKV.ID NR. 5 eller SEKV.ID NR. 7-34, og et 1/2 BBR, f.eks. SEKV.ID NR. 35 eller SEKV.ID NR. 36, foreligger enten ved den 3' eller 5' ende av 1/2 TBR.

Eksempel 2 - Fremstilling og merking av BNA

På tilsvarende måte som beskrevet i eksempel 1 for fremstilling og merking av PNA, fremstilles og merkes BNA ifølge fremgangsmåter kjent innen faget. Som beskrevet i US patentskrift nr. 4 556 643, som inkorporeres heri ved referanse (se særlig eksempel 1), kan nukleinsyresekvenser som koder for gitte nukleinsyrebindende sekvenser, masseproduseres ved kloning i en replikerbar vektor. Videre kan, på tilsvarende måte som i nevnte patents beskrivelse, 1/2 TBR- og 1/2 BBR-sekvensene fremstilles kolineært på denne måte, imidlertid med den forskjell at ifølge foreliggende oppfinnelse danner 1/2 TBR-sekvensen selv et gjenkjenningssete for en nukleinsyrebindende bestanddel, og 1/2 BBR i tillegg til å danne et gjenkjenningssete for en nukleinsyrebindende bestanddel, også tilveiebringer et middel for amplifisering av signalet som dannes ved binding av 1/2 TBR til komplementære sekvenser i TNA, ved at polymerisering av BNA til den TNA-bundne PNA tilveiebringes. For å muliggjøre dette tilveiebringes en sekvens, f.eks. SEKV.ID NR. 35, som koder for venstre operator fra bakteriofag lambda, med ytterligere sekvenser slik at en overhengssekvens dannes i én eller begge ender av BNA ved hybridisering med PNA.

Som et spesifikt eksempel tilveiebringes vektoriell polymerisering av BNA til TNA av SEKV.ID NR. 40-43. I dette eksempel koder SEKV.ID NR. 40 for to 1/2 TBR som vil hybridisere med to 1/2 TBR i en TNA slik at to NF-kB-bindingssteder dannes, samtidig som et 1/2 BBR for bakteriofag lambdas venstre operator tilveiebringes, som i tillegg termineres i den 3' ende med gjenkjenningssettet for restriksjonsenzymet *PstI*. Tilsetning av BNA, SEKV.ID NR. 41, med 1/2 BBR komplementært til 1/2 BBR i PNA, SEKV.ID NR. 40, fullstendiggjør BBR samtidig som *PstI*-gjenkjenningssettet kompletteres, og et fire

basers overheng gjenstår for hybridisering med ytterligere BNA. Følgelig tilsettes SEKV.ID NR. 42 som har en fire base-pars sekvens i sin 3' ende som er komplementær til det overheng på fire baser som gjenstår etter hybridisering mellom
 5 SEKV.ID NR. 40 og 41. I tillegg tilveiebringes SEKV.ID NR. 42 med en fem basers sekvens i sin 5' ende som danner del av et BamHI-gjenkjenningssete. Den voksende BNA-polymer utvides videre ved tilsetning av BNA SEKV.ID NR. 43, som er komplementær til SEKV.ID NR. 42, og som fullstendiggjør BBR samtidig
 10 som BamHI-gjenkjenningssetet kompletteres og et fire basers overheng etterlates som kan hybridiseres videre med BNA med komplementære sekvenser. På denne måte kan BNA hybridiseres omfattende slik at signalet fra en enkel PNA-TNA-hybridiseringsbegivenhet forsterkes kraftig.

15 Som for PNA beskrevet i eksempel 1, kan BNA benyttes i umerket form, eller de kan merkes ifølge fremgangsmåter kjent innen faget og beskrevet i eksempel 1. Det vil også forstås at istedenfor å fremstille BNA-polymeren ved sekvensiell tilsetning av BNA til PNA-TNA-komplekset kan BNA-polymeren
 20 dannes på forhånd og tilsettes direkte til PNA-TNA-komplekset. En enkel fremgangsmåte for forhåndsdannelse av en slik BNA-polymer omfatter rekombinant fremstilling av en vektor i hvilken BNA-multimerer tilveiebringes med et unikt restriksjonssete i hver ende av polymeren. Denne BNA-polymer som
 25 inneholder flere BBR, kuttes ut av vektoren og hybridiseres til et enkelttrådet 1/2 BBR som gjenstår i PNA etter hybridisering av PNA og TNA. Dette oppnås ved å tilveiebringe en enkelttrådet sekvens i PNA som er komplementær til et overheng dannet i BNA-polymeren når den kuttes ut fra produksjonsvektoren.
 30

Eksempel 3 - Fremstilling av HNA og anvendelse av disse for å terminere BNA-polymerisering

HNA ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles
 35 ifølge fremgangsmåter kjent innen faget for polynukleotidfremstilling, som beskrevet i eksemplene 1 og 2 for PNA, hhv. BNA. Ved fremstilling av HNA er imidlertid HNA-sekvensen spesifikt utformet slik at en vesentlig del av HNA danner et selvkomple-

mentært palindrom slik at en hårnål dannes, samtidig som tilstrekkelig mange baser forblir i enkelttrådet form til at hybridisering med enkelttrådede sekvenser i den voksende DNA-kjede muliggjøres, som beskrevet i eksempel 2.

5 I dette eksempel tilveiebringes en HNA med SEKV.ID NR. 44 for å terminere forlengelsen av BNA til PNA i eksempel 2 etter tilsetning av BNA, SEKV.ID NR. 43. Dette oppnås da SEKV.ID NR. 44 samtidig som den har en palindromsekvens som danner en stabil hårnål, også har en sekvens i den 5' ende av
10 HNA som fullstendiggjør BamHI-sekvensen som dannes ved hybridisering mellom SEKV.ID NR. 42 og SEKV.ID NR. 43. Naturligvis er terminering av polymeren etter tilsetning av kun 3 BNA kun gjort for å forenkle denne demonstrasjon av oppfinnelsen. Som beskrevet ovenfor, kan denne polymerisering fortsette praktisk
15 talt ubegrenset for amplifisering av signalet fra PNA-TNA-hybridiseringsbegivenheten. Når først HNA hybridiserer til den voksende BNA-kjede, termineres polymeren, og ingen ytterligere forlengelse av polymeren er mulig.

20 Eksempel 4 - Fremstilling av TBA og BBA, merking og immobilisering av disse

TBA og BBA som kan benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter enhver forbindelse som spesifikt kan bindes til TBR og BBR dannet ved hybridisering av PNA, TNA og BNA.
25 Anvendelse av DNA-bindende proteiner er ett eksempel på slike forbindelser.

I dette eksempel er TBA dimeren av den DNA-bindende del av p50, og BBA er cro-proteinet fra lambda. Disse proteiner kan fremstilles ifølge fremgangsmåter kjent innen
30 faget. Genene for begge disse proteiner er klonet. Disse proteiner er følgelig fremstilt ved rekombinante midler og rensset ifølge fremgangsmåter kjent innen faget. Videre er begge proteiner merket, enten med en radioaktiv isotop, f.eks. radioaktivt jod, eller med et enzym, f.eks. beta-galaktosidase eller
35 peroksidase fra pepperrot, eller med et fluorescerende fargestoff, f.eks. fluorescein eller rhodamin, ifølge fremgangsmåter velkjente innen faget. I tillegg kan én eller begge av TBA og BBA være immobilisert til en fast overflate, f.eks.

overflaten i en mikrotiterplate eller overflaten av en kule, f.eks. en farget kule med diameter mellom 0,01 og 10 μm . Merkingen på TBA og BBA kan være lik eller forskjellig.

I dette eksempel merkes TBA som inneholder det dimere
 5 p50-DNA-bindende domene med rhodamin, mens BBA, *cro*, er merket med fluorescein. Etter hybridisering mellom PNA, TNA, BNA og HNA som beskrevet i foreliggende patentbeskrivelse og de foregående og påfølgende eksempler, settes de eventuelt dannede nukleinsyrehybrider i forbindelse med et overskudd av merket
 10 TBA og *cro*. Fluorescensmerkingen måles ifølge kjente fremgangsmåter, og påvisning av begge signaler viser nærvær av 1/2 TBR-sekvenser i TNA. Forskjellen mellom signalet gitt av fluorescensen av NF-kB og av *cro* er et mål på i hvilken grad polymerisering av BNA til PNA-TBA-hybridet har ført til forsterkning av signalet. Amplifisering fra én til over ett tusen
 15 ganger omfattes av fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 5 - Hybridisering av to PNA med en TNA og diskriminering mellom en TNA og en CNA

De anvendte PNA, PNA1, SEKV.ID NR. 40 og PNA2, SEKV.ID NR. 45, benyttes i tilnærmet 10 ganger molart overskudd over konsentrasjonen av TNA i en analyseprøve. I dette eksempel benyttes en isolert dupleks-HIV-LTR, hvori én tråd
 25 har sekvensen SEKV.ID NR. 37, vist i figur 7, og den andre tråd er komplementær til sekvensen vist i figur 7, som TNA. I dette eksempel benyttes også en isolert dupleks-CNA hvor én tråd har samme sekvens som SEKV.ID NR. 37, bortsett fra at det i det første NF-kB-bindingssete vist i figur 7, midt i bindingssetet, posisjon 1 i figur 7, er en "A" istedenfor en "T",
 30 slik at den komplementære tråd til denne vil gi uparede basepar ved hybridisering med SEKV.ID NR. 40-PNA i denne posisjon.

SEKV.ID NR. 40 og SEKV.ID NR. 45 tilsettes til hver sin reaksjon hvor den første inneholder den ovenfor beskrevne
 35 TNA og den andre den ovenfor beskrevne CNA. Prøvene løses i en passende hybridiseringsbuffer, f.eks. 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA. Prøvene oppvarmes til tilnærmet 90 °C i tilnærmet 5 minutter for å atskille trådene i de foreliggende dupleks-TNA og

-CNA, hvorefter prøvene avkjøles slik at tråder fra PNA, TNA og CNA kan hybridisere.

Etter et tidsrom som gir fullstendig hybridisering, og som kan bestemmes ifølge kjente fremgangsmåter, f.eks. ved
5 å beregne $t_{1/2}$ basert på basesammensetning og annealerings-
temperatur ifølge kjente fremgangsmåter, polymeriseres PNA med
SEKV.ID NR. 40 ved tilsetning av BNA som i eksempel 2, og
PNA2-proben med SEKV.ID NR. 45 polymeriseres med BNA med ut-
gangspunkt i overhenget i Sph1-gjenkjenningssettet. Etter til-
10 setning av BNA og en kort hybridiseringsperiode tilsettes
prøvene hver for seg til kuler belagt med kovalent immobilis-
ert NF-kB, og NF-kB tillates å binde til eventuelt dannede TBR
i TNA- og CNA-prøvene. Etter tilnærmet 15 minutters binding
vaskes prøvene to ganger med tilnærmet tre volumer av en egnet
15 vaskebuffer, f.eks. 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, eller en
annen buffer som på forhånd er vist ikke å interferere med
bindingsaktiviteten til NF-kB eller CI-repressorprotein fra
bakteriofag lambda. Etter hver vask får kulene synke til bunns
ved hjelp av tyngdekraften eller ved en kort sentrifugering.
20 Dette fjerner nukleinsyrer som ikke har et perfekt NF-kB-bin-
dingssete dannet ved hybridisering mellom PNA1- og TNA-sekven-
sene.

Etter siste vask tilsettes CI-repressorprotein fra
bakteriofag lambda, merket med en radioaktiv isotop, f.eks.
25 radioaktivt jod, eller med et enzym, f.eks. peroksidase fra
pepperrot, med fargede kuler eller med en fluorescensmerking
til hver prøve. Prøvene vaskes så flere ganger (tilnærmet tre)
med flere volumer (tilnærmet to) av en passende vaskebuffer,
f.eks. 10 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, eller en annen buffer
30 som på forhånd er vist ikke å interferere med bindingsaktivi-
teten til NF-kB eller CI-repressorprotein fra bakteriofag
lambda. Etter hver vask får kulene synke til bunns ved hjelp
av tyngdekraften eller ved en kort sentrifugering. Etter siste
vask kvantiteres bundet merking ved å påvise bundet radioak-
35 tivitet, frigjort farge i en enzymanalyse, farge av bundne
kuler eller fluorescensdeteksjon. Alternativt kan et anti-CI-
antistoff tilsettes, og en vanlig "sandwich" enzymkoblet im-
munoanalyse eller radioimmunoanalyse utføres for å påvise bun-

det repressor. Som negativ kontroll (bakgrunn) utføres i tillegg alle manipulasjonene ovenfor parallelt med en prøve hvor det benyttes kuler som ikke tar immobilisert NF-kB.

Som et resultat av analysen ovenfor, har kontrollprøven og den CNA-holdige prøve lave signaler med tilsvarende styrke, mens den TNA-holdige prøve har et signal som ligger godt over bakgrunnssignalet.

Eksempel 6 - Et analysesett for påvisning av HIV

A. Settets innhold:

1. Mikrotiterplate.
2. En løsning med 1 mg/ml av rekombinant fremstilt NF-kB i tris-bufret saltvann.
3. Rør som inneholder enkelttrådede HIV-PNA (en blanding av oligonukleotider som koder for to 1/2 NF-kB-bindingssteder, dvs. en blanding av SEKV.ID NR. 7 og 8).
4. Rør som inneholder enkelttrådet, humant, genomisk PNA, SEKV.ID NR. 1.
5. Rør med nuklease (*PstI*).
6. Rør med protease.
7. Rør som inneholder prepolymerisert BNA, 100 repeterte enheter med bakteriofag lambda O_R terminert med en HNA, men med frie 1/2 BBR tilgjengelige for binding til PNA-TNA-hybrider.
8. Rør med cro konjugert med peroksidase fra pepperrot (hrp).
9. Rør med farget hrp-substrat.
10. Tris-bufret saltvann, 100 ml.
11. Snepert.
12. Reaksjonsrør A, B og C, som alle inneholder 250 µl destillert vann.
13. Dråpeteller.

B. Analysefremgangsmåte:

- (a) Mikrotiterplaten (gjenstand 1) belegges med løsningen av rekombinant fremstilt NF-kB (gjenstand 2) ved en konsentrasjon på 1 mg/ml i tris-bufret

saltvann over natten ved 4 °C under omvipping.

- (b) Tre bloddråper fra analysepersonen erholdes ved et stikk i fingeren med sneppten (gjenstand 11), og en bloddråpe fordeles i hvert av reaksjonsrørene A, B og C (gjenstand 12).
- (c) Én dråpe proteaseløsning (reagens 6) tilsettes til hvert rør med dråpetelleren (gjenstand 12), røret omristes og inkuberes i 5 minutter.
- (d) Én dråpe nuklease (gjenstand 5) tilsettes til hvert av rørene A-C med dråpetelleren, og rørene omristes og inkuberes i 10 minutter.
- (e) Én dråpe av gjenstand 3 tilsettes til rør A (analyseprøve), én dråpe av gjenstand 4 tilsettes til rør B (positiv kontroll), og én dråpe saltvann (gjenstand 12) tilsettes til rør C som en negativ kontroll. Rørene oppvarmes til 50 °C i varmt vann og får så avkjøles til romtemperatur over et tidsrom på 1 time.
- (f) Mens hybridiseringen foregår i trinn (d) fjernes overskudd av protein fra mikrotiterplatens overflate, fra trinn (a), og platen vaskes med tris-bufret saltvann (rør 10).
- (g) Innholdet i rørene A-C fra trinn (e) overføres til tre brønner i mikrotiterplaten og inkuberes i 1 time på et vippebrett.
- (h) Mikrotiterbrønnene som inneholder materialet fra rørene A-C, vaskes med tris-bufret saltvann og tømmes.
- (i) Én dråpe av gjenstand 7 tilsettes til hver brønn og får hybridisere med eventuelle $1/2$ BBR-seter bundet til platen i 1 time, fulgt av tre gangers vask med tris-bufret saltvann.
- (j) Én dråpe av gjenstand 8 tilsettes til hver brønn, og cro får binde seg til eventuelle bundne BNA i 10 minutter, fulgt av fem gangers vask med 1 ml tris-bufret saltvann.
- (k) Én dråpe hrp-substrat tilsettes hver brønn, og fargeutviklingen får forløpe.

C. Resultater:

Dersom brønn A og B begge viser fargeutvikling, mens brønn C ikke gjør det, er analysen gyldig, og pasienten er HIV-infisert. Dersom kun brønn A viser fargeutvikling eller dersom brønn C viser fargeutvikling, er analysen blitt utført på ukorrekt måte og er ikke gyldig. Dersom brønnene A og C ikke viser fargeutvikling mens brønn B gjør det, er analysen gyldig, og individet er ikke HIV-infisert.

Eksempel 7 - Fremstilling av forskjellige nye TBA

Nye TBA for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse fremstilles som følger:

(a) NFkB/NF-kB (HIV-Detect I). En nukleinsyre som koder for en av sekvensene i SEKV.ID NR. 63-71 eller et tilsvarende NF-kB-DNA-bindende protein, fusjoneres med bibehold av leserammen til en nukleotidsekvens som koder for en ansamlingssekvens, f.eks. *cro*, slik at NF-kB-DNA-gjenkjenningsssekvensen kodes aminoterminalt eller karboksyterminalt for *cro*-sekvensen. Om ønskelig, kan en koblingssekvens plasseres mellom NF-kB-sekvensen og *cro*-sekvensen. I den andre ende av *cro* kan, om ønskelig, en kjernelokaliseringssignalsekvens, f.eks. SEKV.ID NR. 72, plasseres. Videre kan, om ønskelig, asymmetriske sekvenser plasseres ved den ende av *cro* som ikke benyttes av NF-kB-gjenkjenningsssekvensen. Eksempler på komplette TBA er vist nedenfor.

(b) NF-kB/SP1 (HIV-Detect II). På tilsvarende måte som beskrevet i (a) ovenfor, frembringes en rekombinant, kodende sekvens som koder for et NF-kB-gjenkjenningsdomene. I et annet konstrukt inngår, istedenfor SEKV.ID NR. 63-72, den kodende sekvens for den DNA-gjenkjenningende del av SP1. En slik sekvens bør kode for hele SEKV.ID NR. 73 som er den del av transkripsjonsfaktoren SP1 som viser DNA-binding (se Kadonaga et al. [1987], Cell 51:1079-1090), eller en funksjonell del av denne. Den NF-kB-kodende vektor og den SP1-kodende vektor kointransfekteres så inn i et egnet ekspresjonssystem av slike som

er velkjente innen faget. En monomer NF-kB-gjenkjenningssenheter tilsettes for å fullstendiggjøre NF-kB-gjenkjenningssdimeren etter ansamling av SP1- og NF-kB-gjenkjenningssenheterene via ledersekvensen. Asymmetrisekvensene hindrer dannelsen av NF-kB-dimerer og SP1-dimerer og styrer i stedet dannelsen av NFkB-SP1-heterodimerer (dvs. HIV-Detect II) som så isoleres fra ekspresjonssystemet (pattedyrceller eller bakterieceller) ved kjente fremgangsmåter.

(c) SP1/SP1-TBA (HIV-Detect III). Som beskrevet i (b) ovenfor, fremstilles et SP1-kodende TBA-konstrukt. Imidlertid transfekteres kun dette konstrukt inn i ekspresjonssystemet, og asymmetrisekvenser som tillater dannelsen av SP1-SP1-dimerer, inkluderes.

(d) SP1-TATA (HIV-Detect IV). Som beskrevet i (b) ovenfor, fremstilles en SP1-kodende TBA-rekombinant. I tillegg fremstilles en rekombinant som koder for en TBA med bindingssekvensen SEKV.ID NR. 74, eller en tilsvarende sekvens som koder for en TATA-gjenkjenningssenheter, med asymmetrisekvenser som er komplementære til dem som inngår i det SP1-TBA-kodende konstrukt. Disse konstrukter kotransfekteres, og heterodimerene isoleres ved gjengse fremgangsmåter, heriblant affinitetsrensing på en DNA-kolonne med passende SP1-TATA-målbindingssområder.

(e) SP1-E2 (HPV-Detect I). Et SP1-kodende konstrukt fremstilles som i (b) ovenfor. Et E2-TBA-kodende konstrukt fremstilles ved å benytte en sekvens som koder for enhver av sekvensene i SEKV.ID NR. 75-84 og 94-98, som er DNA-gjenkjenningssenheter fra E2 fra papillomavirus (se Hegde et al. [1992], Nature 359:505-512) eller tilsvarende gjenkjenningssenheter, og kotransfekteres eller kotransfekteres sammen med det SP1-TBA-kodende konstrukt. Monomer E2-gjenkjenningssenheter tilsettes til den komplette E2-gjenkjenningssdimer etter ansamling av E2-SP1-gjenkjenningssenheter via ledersekvensen. Heterodimeren HPV-Detect I isoleres ifølge kjente fremgangsmåter.

(f) E2-E2 (HPV-Detect II). Som beskrevet ovenfor i (e), fremstilles et E2-TBA-kodende konstrukt, bortsett fra at asymmetrisekvenser som tillater dannelse av E2-dimerer, inkluderes. De uttrykte dimere isoleres så ved kjente fremgangsmåter, heriblant affinitet for et dimert E2-bindingssete i en DNA-affinitetskolonne.

(g) E2-TATA (HPV-Detect III). Som beskrevet ovenfor i (e) og (d), fremstilles E2- hhv. TATA-bindende TBA, bortsett fra at asymmetrisekvenser som fremmer dannelse av heterodimerer snarere enn homodimerer, inkluderes. Disse konstrukter ko-uttrykkes så, og heterodimerene isoleres.

(h) TATA-TATA (HPV-Detect IV). Som beskrevet ovenfor i (a) og (d), fremstilles et TATA-bindende, TBA-kodende konstrukt som inneholder asymmetrisekvenser som fremmer dannelse av denne homodimer, og homodimeren isoleres.

(i) Andre TBA. Som beskrevet ovenfor for HIV- og HPV-TBA, kan TBA for ethvert gitt patogen eller enhver sykdomstilstand fremstilles ved å identifisere spesifikke DNA-bindende proteiner og utforme et ekspresjonskonstrukt som benytter egnede koblingssekvenser, ansamlingssekvenser og asymmetrisekvenser.

Eksempel 8

På tilsvarende måte som i analysen beskrevet i eksempel 5, fremstilles en mer krevende analyse ved å benytte det dimere NF-kB-SP1-bindende protein fremstilt ifølge eksempel 6. Følgelig kan probene vist i figur 7 og benyttet i eksempel 5, forlenges slik at interprobeavstanden reduseres, hvorved fleksibiliteten til DNA i TNA reduseres.

Eksempel 9 - Fremstilling av "høyere ordens" TBA

Ved passende bruk av asymmetrisekvenser fremstilles TBA som er dimerer, trimerer, tetramerer, pentamerer eller heksamerer av gitte DNA-gjenkjenningenheter. På denne måte

fremstilles en heksamer TBA ved å lage et første dimert NF-kB-p50-TBA ved å benytte asymmetrisekvenser som fremmer dimerdannelse. I tillegg tillater asymmetrisekvensene tetramerisering av p50-dimeren med en SP1-SP1-dimer. Endelig styrer ytterligere asymmetrisekvenser dannelsen av en heksamer med en dimer som inneholder kjernelokaliseringsssekvenser. Dette oppnås ved f.eks. å innføre asymmetrisekvenser fra insulin, som naturlig danner heksamerer. Denne heksamerdannelse styres av sekvensene SEKV.ID NR. 85 (A) og 86 (B), 87 (A) og 88 (B), 89 (A) og 90 (B), og 91 (A) og 92 (B) (se figurene 13 og 14).

Grunnet den ekstremt høye affinitet for HIV-LTR som kan oppnås ved å benytte en multimer TBA, betegnes forbindelsene som har denne struktur og som kan benyttes for dette formål her, som "HIV-Lock".

En optimal "HIV-Lock" defineres ved "footprinting" (ifølge fremgangsmåter velkjente innen faget) av TBA bundet til TBR i HIV-LTR for å bekrefte at bindingsaffiniteten til hvert DNA-bindende protein som deltar i dannelsen av det multimer TBA-kompleks, er redusert relativt til affiniteten for den naturlige målsekvens (dvs. CNA) fra hvilken den DNA-bindende gjenkjenningssenheter i TBA er avledet. Ethvert samtidig tap av bindingsaffinitet for HIV-TBR blir mer enn kompensert for ved dannelse av multimeren som beskrevet nedenfor.

Det kan være konkurranse mellom binding av hver TBA-bestanddel til sitt TBR og ansamling via asymmetrisekvenser for dannelse av multimeren. Denne konkurranse reduseres ved å justere koblingssekvensene mellom leder- og asymmetrisekvensene i hver TBA-bestanddel slik at disse konkurrerende begivenheter ikke lenger er koblet. Den resulterende reduksjon i diffusjonsmuligheter (effektiv konsentrasjonsøkning) for asymmetri- og ansamlingsbestanddelene i TBA fører til effektiv dannelse av det multimer kompleks.

Basert på "footprinting" justeres lengder og sammensetning av koblingssekvensene slik at det oppnås optimal skilleevne mellom mål-HIV-sekvenser og naturlige sekvenser. På denne måte vil det multimer kompleks, selv om hver TBA-bestanddel vil ha lav affinitet for CNA og TBR-sekvenser, ha en ekstremt høy affinitet for det nå utvidede TBR som gjenkjennes

av det multimerе kompleks (kvadratet av affiniteten til hvert TBR som gjenkjennes av hver TBA-bestanddel i det multimerе TBA), samtidig som affiniteten for CNA er lav. På samme måte fremstilles andre multimerе TBA-komplekser enn "HIV-Lock".

TBA som kan dannes på denne måte, omfatter følgende sekvenser som ansamles enten ved sammenkobling av protein-subenheterne eller av nukleinsyresekvensene som koder for disse subenheter, som følger:

Sett	Koblingssekvenser fra gruppene
A	I + II + III
B	IV + V + III
C	IV + III

hvor i gruppene I-V består av sekvenser valgt fra:

Gruppe	Valgt blant sekvensene
I	Enhver av SEKV.ID NR. 85-92.
II	Met Ser, koblet til enhver av SEKV.ID NR. 104-106, som alle er koblet til SEKV.ID NR. 99.
III	SEKV.ID NR. 100 koblet til enhver av SEKV.ID NR. 75-84 eller 94-98, SEKV.ID NR. 101 koblet til enhver av SEKV.ID NR. 74 eller SEKV.ID NR. 93, eller SEKV.ID NR. 102 koblet til enhver av SEKV.ID NR. 74 eller SEKV.ID NR. 93, eller enhver av SEKV.ID NR. 72, 103, 73 eller 63-71.
IV	Enhver av SEKV.ID NR. 104-106.
V	SEKV.ID NR. 99.

Spesifikke eksempler på slike TBA er SEKV.ID NR. 109-116, sammensatt som følger:

Sett	SEKV.ID NR.	Koblede SEKV.ID NR.
A	109	85 + Met Ser + 104 + 99 + 100 + 94
A	110	85 + Met Ser + 104 + 99 + 72
A	111	86 + Met Ser + 105 + 99 + 102 + 74
A	112	86 + Met Ser + 106 + 99 + 73

A	113	89 + Met Ser + 106 + 99 + 63
C	114	106 + 64
C	115	105 + 64
B	116	106 + 99 + 73

5

På denne måte og ved å velge mellom passende asymmetriske sekvenser, ansamlingssekvenser og DNA-gjenkjenningssenheter, kan mange forskjellige TBA utformes. Videre vil sett av disse, f.eks. SEKV.ID NR. 114 og 115, assosiere med hverandre, mens dimerer av SEKV.ID NR. 114 eller 115 ikke vil dannes grunnet ladningsfrastøtning i de muterte ansamlingssekvenser (SEKV.ID NR. 104 er *cro*, SEKV.ID NR. 105 er et nytt, mutert, negativt ladet *cro*, og SEKV.ID NR. 106 er et nytt, mutert, positivt ladet *cro*).

15

Naturligvis kan en gjennomsnittsfagmann med utgangspunkt i aminosyresekvensen til disse TBA fremstille rekombinante nukleinsyrekloner som koder for disse, og slike rekombinante kloner danner naturligvis en integrert del av foreliggende oppfinnelse.

20

Eksempel 10 - HIV-analyse ved å benytte "HIV-Lock"

På tilsvarende måte som den benyttet i eksempel 6, benyttes "HIV-Lock" fremstilt ifølge eksempel 9, som TBA, reagens 2, med tilsvarende resultat.

25

Eksempel 11 - HIV-analyse med "HIV-Lock" ved analyse av donert blod

Når mengden av blod som skal analyseres ikke er begrensende, f.eks. ved analyse for HIV-kontaminering av donerte blodprøver, benyttes analyser som tilsvarende den i eksempel 6, bortsett fra at for hvert av rørene A-C sentrifugeres tilnærmet 5 ml blod i en bordsentrifuge. Mengden av andre reagenser oppskaleres etter behov for å håndtere den større mengde TNA som foreligger i prøven.

35

Eksempel 12 - "HIV-Lock" som et terapeutisk anti-HIV-middel

"HIV-Lock" fremstilt ifølge eksempel 9, utformes som en 1 mg/ml løsning i liposomer og injiseres intravenøst i en

pasient som er analysert og hvor HIV-infeksjon er bekreftet. En dose på tilnærmet 0,1 mg til 100 mg "HIV-Lock"/kg kropps- masse infiseres over et tidsrom på 24 timer, og konsentra- sjonen av HIV-p24 i pasientens serum følges. Behandlingen
5 gjentas etter behov, f.eks. når mengden p24 i serum forhøyes.

Eksempel 13 - Benyttelse av et HIV-TBA-konstrukt som terapeut- isk middel

En rekombinant retroviral eller tilsvarende vektor
10 benyttes for å innføre et konstrukt som koder for en HIV-LTR-
bindende TBA i en infisert pasient. Vektoren koder for en
ledersekvens, f.eks. *cro*, og sekvenser som koder for DNA-bin-
dende deler av p50. Samme vektor koder også for en ledersek-
vens på hvilken en SP1-TBA kan foldes. Asymmetrisekvenser til-
15 veiebringes slik at det ved koekspresjon av p50-TBA og SP1-TBA
i en enkelt HIV-infisert celle *in vivo* skjer en umiddelbar
assosiering mellom disse TBA, samtidig som enhver assosiering
mellom den DNA-bindende del av p50 og endogene p50- eller p65-
monomerer forhindres. NLS-sekvenser tilveiebringes også i TBA
20 slik at TBA ved dimerdannelse umiddelbart forflyttes til cel-
lekjernen og bindes spesifikt til integrerte HIV-sekvenser
slik at transkripsjon fra dette locus forhindres.

For dette formål er det ønskelig å velge sekvenser
som koder for DNA-bindende domener slik at de uttrykte mono-
25 merer ansamles i en TBA som ikke bindes til naturlige, humane
sekvenser. Således er det kun ved binding av TBA-bestanddelene
til deres målsekvenser at assosiering mellom alle TBA-bestand-
deler foregår slik at det dannes et kompleks som bindes tett
og spesifikt til HIV-LTR.

30

Eksempel 14 - Diagnostisk analysesett for humant papilloma- virus

Denne diagnosefremgangsmåte for humant papillomavirus
utnytter den kjente forskjell mellom godartet og karsinogent
35 HPV for tilveiebringelse av en analyse som viser hvor utsatt
en pasient er for malign cellevekst. Papillomavirus er en
gruppe med små DNA-virus forbundet med godartede, skvamøse
epitelcelletumorer hos høyere vertebrater. Minst 27 atskilte,

humane papillomavirustyper (HPV) er funnet, hvorav mange er forbundet med spesifikke, kliniske skader. Fire av disse, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18 og HPV-33, er forbundet med humane genitalialesjoner. Generelt finnes HPV-6- og HPV-11-DNA forbundet med godartede lesjoner i genitalia. HPV-16, HPV-18 og HPV-33 finnes også forbundet med premaligne og maligne lesjoner og transkriberes i de fleste cellelinjer som er etablert fra cervixcarcinomer. HPV-16, HPV-18 og HPV-33 er sannsynligvis bare to medlemmer av et stort sett HPV-DNA som er forbundet med maligne, humane cervixcarcinomer.

Dyremodeller har vist at godartede papillomaviruslesjoner kan utvikles til maligne lesjoner i nærvær av et karcinogen. HPV-DNA er påvist i metastaser fra cervixcarcinomer. I maligne cervixlesjoner er HPV-DNA vanligvis integrert i det humane genom, men ekstrakromosomalt HPV-DNA kan også foreligge. Integrering av HPV for dannelse av proviruset fører vanligvis til oppbrytning av den åpne leseramme (ORF) for det virale E2. Trass i oppbrytning av E2-ORF har undersøkelse av cellelinjer fra flere cervixcarcinomer vist transkripsjonelt aktivt og integrert HPV-16 og HPV-18. Ved undersøkelse av HPV-16-genomer som foreligger i de humane cervixcarcinomcellelinjer SiHa og CaSki, finnes forskjeller i integreringen av HPV-16. I SiHa-linjen foregikk den enkle HPV-16-genomintegrering ved basene 3132 og 3384, slik at E1- og E2-ORF ble oppbrutt med en delesjon på 0,3 kb. Ytterligere en delesjon på 50 basepar i HPV-16-DNA førte til fusjon av ORF for E2 og E4. Den 5' del av HPV-16-DNA som består av den oppbrutte E2-ORF, er ligert til kontinuerlige, humane, høyreflankerende sekvenser. I tillegg kan en enkel, innsatt guaninrest påvises ved nukleotid 1138 midt i E1-ORF. Denne baseparaddering fører til fusjon mellom E1a- og E1b-ORF slik at en enkel E1-ORF dannes.

Det komplette HPV-16-genom er tilgjengelig i GenBank med aksesjonsbetegnelse K02718, det fullstendige HPV-33-genom er tilgjengelig i GenBank med aksesjonsbetegnelse M12732, og det fullstendige HPV-18-genom er tilgjengelig i GenBank med aksesjonsbetegnelse X05015.

I en foreløpig undersøkelse påvises HPV-infeksjon i en gitt cervixbiopsiprøve ved en enkel "ja/nei"-type analyse

ved f.eks. å benytte noen eller alle PNA-sekvensene i SEKV.ID NR. 46-53 og en E2-TBA som beskrevet ovenfor (dvs. fragmentering av DNA, binding av PNA, immobilisering med TBA og påvisning av signal med BNA og BBA).

5 Når en biopsiprøve viser seg å være positiv for HPV, erholdes ytterligere informasjon når det gjelder det maligne potensial til HPV ved å analysere integreringsstatus for viruset i det humane genom.

1. Fragmenter DNA i cervixbiopsiprøven og hybridiser
10 med en blokkerende probe med SEKV.ID NR. 60.
 Denne probe vil bindes til alle DNA-fragmenter hvor fragmentet på 0,3 kb ikke er utspleiset.

2. Tilsett PNA med sekvensen SEKV.ID NR. 61 til DNA i
15 biopsiprøven. Denne probe vil kun bindes til fragmenter hvor fragmentet på 0,3 kb er delert (blokkeringsproben vil forhindre løkkedannelse av de store delesjonssegmenter dersom disse foreligger).

3. En PNA med SEKV.ID NR. 62 hybridiseres med SEKV.ID
20 NR. 41 slik at det dannes et BBR som vil bindes til *cro* eller λ CI-repressor som en BBA, mens en enkelttrådet del forblir tilgjengelig for hybridisering med TATA-setet i SEKV.ID NR. 61. Dette tilsettes slik at det dannes et TBR ved
25 den 5' ende av den store delesjon.

4. TBR immobiliseres med en TBA med en DNA-gjenkjenningsenhet fra TATA-bindende protein.

5. De bundne fragmenter påvises ved tilsetning av BNA og BBA som beskrevet ovenfor.

30 Påvisning av signal i denne analyse viser at det store fragment er delert i HPV som foreligger i TNA. Da denne delesjon er korrelert med ondartethet, gir denne analyse inn-syn i HPV-infeksjonens maligne potensial. Denne konklusjon kan bekreftes ved å utføre en tilsvarende analyse basert på dele-
35 sjon av fragmentet på 52 basepar som også er korrelert med HPV-indusert ondartethet.

TBP-gjenkjenningsenheten som benyttes i TBA for denne analyse, kan f.eks. velges fra en sekvens som SEKV.ID NR. 70

eller SEKV.ID NR. 93.

Eksempel 15 - Rekombinant fremstilling av "HIV-Lock"

Fase én - Fremstilling av DNA for fremstilling av

5 **"HIV-Lock"**. *In vitro* mutagenese av de kodende områder i de naturlig forekommende, klonede bestanddeler i "HIV-Lock" som må modifiseres, utføres med et "MutaGene" fagmidsett. Den modifiserte fremgangsmåte omfatter benyttelse av et Blue-script-plasmid som inneholder hver av de bindende bestanddeler
10 i "HIV-Lock". Disse transformeres inn i kompetente celler, og uracilholdige fagmidder dyrkes. Enkelttrådet DNA ekstraheres og benyttes som templat for den mutageniserte tråd. Oligonukleotider som inneholder de ønskede mutasjoner, heriblant innføring av et nytt restriksjonssete, syntetiseres og behandles
15 med polynukleotidkinase og ATP. De kinasebehandlede oligonukleotider hybridiseres til det enkelttrådede templat, og en mutagenisert tråd syntetiseres og ligeres ifølge "MutaGene"-fremgangsmåten, bortsett fra at "Sequenase" 2.0 benyttes som polymerase. Biblioteker gjennomføres ved å benytte både g-³²P-
20 endemerke nukeotider som inneholder sekvenser som er komplementære til de innførte mutasjoner, og ved å isolere plasmid-DNA og identifisere mutantene ved nærvær av det innførte restriksjonssete. Mutasjonene bekreftes også ved sekvensering med et "Sequenase"-sett. "HIV-Lock"-DNA klones inn i baculo-
25 virusekspresjonssystemet med en polyhedronpromoter.

Fase to - Fremstilling av "HIV-Lock"-proteiner ved

hjelp av baculovirus. Sf-9-celler dyrkes til en på forhånd bestemt tetthet (tilnærmet 1×10^6 celler/ml, logaritmisk vekstfase), infiseres med baculovirus som inneholder "HIV-Lock"-
30 kodende sekvens og høstes for gjenvinning av de rekombinante proteiner som utgjør "HIV-Lock". I den oppskalerte prosess ekspanderes kulturer fra flasker til "spinner"-kulturer og deretter til bioreaktorer. Etter infeksjon høstes cellene etter 12, 24, 36 og 48 timer for proteinet. Cellenes levedyktighet
35 følges gjennom hele prosessen.

Fase tre - Rensing av "HIV-Lock"-proteinene.

De høstede proteiner skilles først fra fast materiale ved gjennomstrømnings-ultrasentrifugering for å lette den påfølgende ren-

sing. Det sentrifugerte produkt sterilfiltreres så. Ekstrakter sentrifugeres så ved 40 000 rpm ved 4 °C i 30 minutter, og porsjoner immunopresipiteres med polyklonalt antistoff fra kanin rettet mot en av bestanddelene i "HIV-Lock". Immuno-
 5 presipiterte proteiner analyseres så på en SDS-10% PAGE-gel.

Fase fire - Analyse av "HIV-Lock"-proteiner mot HIV-DNA. Mobilitetsskiftsanalyser utføres med en oligonukleotid-probe som omfatter deler av den lange, terminale repetisjon fra HIV og fragmenter som inneholder NFkB-bindende DNA forbundet med kappa-lettkjede og mikroglobulinregulering. Oligonukleotidet hybridiseres til sin komplementære tråd og endemerkes med γ -³²P-ATP.

"Footprinting" oppnås ved å kombinere små mengder (10^{-15} M) av radioaktivt merket HIV-LTR-DNA med en noe større
 15 mengde "HIV-Lock" i en buffer ved romtemperatur i 10 minutter. Ditiotreitol tilsettes før tilsetning av protein. Jern(II), EDTA, hydrogenperoksid og natriumaskorbat tilsettes, og reaksjonsblandingen inkuberes. Et middel som stopper reaksjonen, tilsettes, og produktene analyseres ved å benytte denaturerende gelelektroforese. Dette utføres for forskjellige protein-konsentrasjoner. Den resulterende gel synliggjøres ved å benytte en "fosfoimager"-skanner, og den resulterende høyresolusjons-bildefil analyseres for å beregne bindingsaffiniteten av "HIV-Lock" overfor HIV-DNA, sammenlignet med cellulært DNA.

25 Flere runder med utforming og analyse kan benyttes for å forfine bindingen av "HIV-Lock" og andre TBA til HIV og andre organismer. Denne fremgangsmåte gjør det mulig å utforme bindingsansamlinger slik at bindingsansamlingen ikke konkurrerer med villtypeprotein om enkle bindingssteder i genomprøvene. Utvikling av TBA for andre organismer og TNA for sekvenser i disse organismer kan utføres ved å benytte fremgangsmåten beskrevet ovenfor. Denne fremgangsmåte er gyldig ved fremstilling av bindingsansamlinger for alle nukleinsyre-TBR, heriblant DNA-DNA-, DNA-RNA- og RNA-RNA-hybrider og kombinasjoner av disse hybrider.
 35

Eksempel 16 - Fremgangsmåte for identifisering av nukleinsyrebindende molekyler for fremstilling av TBA og BBA ifølge foreliggende oppfinnelse

I fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse ansamles målbindingsansamlinger og forsterkerbindingsansamlinger ved å identifisere nukleinsyrebindende molekyler og sammenkoble de nukleinsyrebindende deler av molekylene på en slik måte at det erholdes TBA som skiller mellom gitte målsekvenser og selv nært beslektede sekvenser. En fremgangsmåte for å identifisere de nukleinsyrebindende molekyler omfatter følgende trinn:

1. Erholdelse av en biologisk prøve som inneholder mål-nukleinsyren. Dette kan f.eks. være en organisme eller en ekstrakt av et vev infisert med et patogen.
- 15 2. Fragmentering av prøven slik at nukleinsyrene eksponeres og størrelseskompleksiteten av nukleinsyrene i prøven reduseres.
3. Å sette et første uttak av de fragmenterte nukleinsyrer i forbindelse med et kontrollbuffermedium, og å
20 sette et annet uttak av de fragmenterte nukleinsyrer i forbindelse med kontrollbuffermediet som inneholder en kjent profil av nukleinsyrebindende molekyler.
4. Analyse av de to porsjoner for å identifisere fragmenter som har endret oppførsel i prøven som er satt
25 i kontakt med de målbindende molekyler, sammenlignet med kontrollprøven. Dette oppnås ved endimensjonal gelelektroforese, todimensjonal gelelektroforese, høytytelsesvæskeskromatografi, papirkromatografi eller ethvert annet middel som avslører forskjellig oppførsel til nukleinsyrefragmentene når de er bundet til
30 et nukleinsyrebindende molekyl, sammenlignet med det ubundne nukleinsyrefragment.
5. Identifisering og isolering av fragmenter som viser endret oppførsel når de er tilsatt det nukleinsyrebindende molekyl, og enten sekvenser av nukleinsyrefragmentet for å fastslå hvorvidt kjente motiver for
35 nukleinsyrebindende molekyler foreligger, eller direkte identifisering av det nukleinsyrebindende

molekyl som bindes til nukleinsyren. Dette kan f.eks. oppnås ved å sette en todimensjonal matrise av nukleinsyrene fraksjonert ved elektroforese, i forbindelse med forskjellig merkede antistoffer som bindes

5

til de forskjellige nukleinsyrebindende molekyler.

I denne fremgangsmåte benyttes fortrinnsvis nukleinsyremotiver for diagnostiske eller terapeutiske formål hvor målnukleinsyren har mer enn ett enkelt, utnyttbart mål for et nukleinsyrebindende molekyl. På denne måte kan en kompleks

10

målbindingsansamling dannes som drar fordel av at motiver for forskjellige nukleinsyrebindende molekyler ligger nær hverandre for å øke spesifisiteten av TBA sammensatt av de forskjellige identifiserte, nukleinsyrebindende bestanddeler. De forskjellige nukleinsyrebindende deler av de nukleinsyrebindende molekyler ansamles så inn i fullstendige TBA som beskrevet ovenfor, f.eks. for "HIV-Lock".

15

Eksempel 17 - Fremgangsmåte for identifisering av spesifikke RNA-sekvenser i en prøve

20

Ifølge fremgangsmåtene og preparatene som beskrives i foreliggende oppfinnelse, kan enhver nukleinsyresekvens identifiseres spesifikt. Identifisering av et mål-HIV-RNA i en prøve oppnås ved å erholde en prøve av blod eller en annen biologisk væske eller en ekstrakt som kan inneholde HIV-RNA

25

fra en pasient, og analyse med hensyn til nærvær av TAR-bindende seter. Tat er en positiv regulator av HIV-replikasjon

som bindes til TAR-området i HIV-RNA. Den minste, naturlig forekommende, fullt aktive form av HIV-Tat er 72 aminosyrer lang, SEKV.ID NR. 118 heri. Tat inneholder minst to funksjon-

30

elle domener og transaktiverer genekspresjon fra den lange, terminale repetisjon i HIV (HIV-LTR). Tat bindes til en RNA-hårnålsstruktur som dannes ved selvhybridisering av sekvenser i TAR som ligger like 5' for HIV-LTR. HIV-TAR-RNA danner en

35

dinukleotidbulk og to hårnålsstrukturer (Rhim et al., 1994, Virology 202, 202-211). Tat (SEKV.ID NR. 118) bindes til denne struktur med lavere aviditet enn Tat-varianter hvori Ala58 er en treoninrest eller hvor His65 er en Asp-rest. (Derse et al., 1993, Virology: 194, 530-536). Utnyttelse av disse kjensgjern-

inger i den foreliggende fremgangsmåte oppnås ved:

1. Fragmentering av en biologisk prøve slik at nukleinsyrene eksponeres og deres størrelseskompleksitet reduseres.

2. Å sette prøven i forbindelse med en TBA som gjenkjenner kombinasjonen av et bindingssete for TAR-bindende protein og en nærliggende sekvens i HIV-genomet. Den TBA som benyttes for dette formål, er ansamlet med *cro* som ledersekvens og ved å benytte Tat som det HIV-RNA-spesifikke bindingsmolekyl. For å oppnå spesifisitet og evne til å skille mellom HIV-TAR-setet og nært beslektede TAR-seter som kan foreligge grunnet andre patogener, f.eks. cytomegalovirus, har TBA også en antistoffbestanddel som gjenkjenner et målbindende område som består av DNA-RNA-hybridet som dannes når en probenukleinsyre bindes til HIV-LTR-RNA.

3. Forhindring av signaldannelse grunnet binding av Tat til kontaminanter (beslektede RNA), f.eks. CMV-TAR-sekvensen, ved å tilsette til reaksjonen et overskudd av Tat-variant (enten Ala58 til Thr- eller His65 til Asp-varianten) som bindes kraftigere. På denne måte vil enkeltbindingsbegivenheter grunnet TBA-binding til et beslektet RNA utkonkurreres i nukleinsyreprøven av Tat-varianten. På den annen side vil TBA ikke forskyves fra samme målsekvenser dersom affiniteten som oppnås ved den doble binding grunnet antistoff og Tat, er valgt på passende måte. Denne fremgangsmåte er illustrert i figur 16. I en annen utførelse av samme fremgangsmåte kan TBA istedenfor Tat inneholde et antistoff som gjenkjenner dette nukleinsyresegment slik at den benyttede TBA er en TBA med to forskjellige antistoffer.

I en alternativ versjon av denne fremgangsmåte kan en probenukleinsyre som hybridiserer med HIV-LTR-RNA, benyttes. Følgelig kan et dobbelttrådet segment av *spl*-setene i LTR dannes som del av det målbindende område. Dette område i HIV-RNA flankerer TAR-området som ligger 5' for LTR, men svært nær

dette. En TBA som inneholder Tat og to Spl-bindingsenheter, ledes slik at det oppnås Tat-binding til TAR og Spl-binding til Spl-bindingssætene. Amplifisering og påvisning utføres så ved å tilsette passende BNA, BBA og HNA. Nok et alternativ er
5 å benytte PNA med SEKV.ID NR. 38 og SEKV.ID NR. 39 (se figur 7). Det benyttes en TBA som inneholder én eller flere Spl-bindingenheter og en antistoffenhet som bindes til DNA-RNA-hybridet som dannes fra RNA i prøven og PNA med SEKV.ID NR. 38. Passende BNA, BBA og HNA tilsettes så for amplifisering av
10 signalet.

Naturligvis vil fagfolk forstå at andre kombinasjoner av TBA og TNA kan benyttes for å optimalisere fremgangsmåtene som eksemplifiseres heri.

Det bør forstås at eksemplene og utførelsene som er
15 beskrevet heri, kun er ment å illustrere oppfinnelsen, og at forskjellige modifikasjoner eller endringer av disse kan utføres av fagfolk og er ment å omfattes innenfor foreliggende oppfinnelles ånd og område, og omfattes av de vedlagte krav. De bør forstås at sekvenser som tilveiebringes heri, kun er
20 ment som eksempler, og at andre, lignende sekvenser antydning av disse, kan benyttes i fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse. Det bør også forstås at selv om en sekvens tilveiebrakt heri kan være betegnet som lineær, kan den benyttes som en sirkulær sekvens eller permutert på en annen måte, og selv
25 om den er angitt ikke å være en antisense-sekvens, kan den benyttes i kodende eller ikke-kodende form, eller for binding av kodende eller ikke-kodende, komplementære sekvenser.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

5 (i) SØKER:

SØKERS NAVN: THE GENE POOL, INC.

GATEADRESSE: 300 Queen Anne Ave. N., Suite 392

BY: Seattle

STAT/PROVINS: Washington

10 LAND: USA

POSTKODE: 98109-4599

TELEFON: (206) 526-8617

TELEFAKS:

15 (ii) OPPFINNELSENS TITTEL: Fremgangsmåte for påvisning av
nukleinsyrer med en bestemt sammensetning

(iii) ANTALL SEKVENSER: 118

20 (v) COMPUTER-LESBAR FORM:

(A) MEDIUMTYPE: diskett

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) OPERATIVSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

25 (D) PROGRAMVARE: PatentIn Release nr. 1.0,
versjon nr. 1.25

(vi) RELEVANTE SØKNADSDATA:

(A) SØKNADSNUMMER: 972611

(B) INNLEVERINGSDATO: 6. juni 1997

30 (C) KLASSIFIKASJON:

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 1:

35 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 13 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

5 (iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 1:
TGGGGATTCC CCA

13

10

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 2:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 13 basepar

15 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

20

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

25 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 2:
AAGGGACTTT CCC

13

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 3:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 13 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

35 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYP: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 3:
AGGGGACTTT CCG

13

5

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 4:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 10 (A) LENGDE: 15 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

15 (ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

20

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 4:
GCTGGGGACT TTCCA

15

25 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 5:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 30 (A) LENGDE: 15 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

35 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 5:
ACAAGGGACT TTCCG

15

5 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 6:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 13 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- 10 (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

15 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 6:
20 CCGGGTTTTTC CCC

13

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 7:

25 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 27 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

35 (iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 7:
AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCA

27

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 8:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 27 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 8:

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG

27

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 9:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 26 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

25 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

30

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 9:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 10:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

5

10

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 10:
GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG

26

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 11:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

25

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

30

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 11:
GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGCC

26

35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 12:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 12:

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG

26

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 13:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 13;

GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG

26

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 14:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 14:

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GCGGTG

26

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 15:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 15:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG

26

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 16:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 26 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

5

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 16:
GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC

26

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 17:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 33 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

25

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

30

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 17:
TTTCCAGGGA GGCGTGGCCT GGGCGGGACT GGG

33

35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 18:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 33 basepar

5

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 18:

CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC

33

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 19:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 45 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

25

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

30

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 19:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT

45

35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 20:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 46 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 20:

CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 21:

20

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 46 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

25 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

30

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 21:

CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 22:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 46 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

5

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 22:

CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT

46

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 23:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 45 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

25

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 23:

35

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCAT

45

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 24:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 44 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 24:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGCGTG GCCT

44

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 25:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 44 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 25:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGGCGC GGCT

44

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 26:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 45 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 26:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGAGAGGCGT GGACT

45

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 27:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 46 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

25 (C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 27:

35

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGCG TGGACT

46

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 28:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 46 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 28:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGGGAG

46

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 29:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 43 basepar

25 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 29:

35

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCTG CCT

43

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 30:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 48 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 30:

CTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGG

48

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 31:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 45 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 31:

TTTCCAGGGA GGCCTGGCCT GGGCGGGACT GGGGAGTGGC GTCCC

45

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 32:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 59 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 32:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA CTGGGG 59

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 33:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 59 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 33:

TTTCCGCTGG GGA CTTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG TGGCGTCCC 59

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 34:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 70 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 34:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60

GTGGCGTCCC 70

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 35:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 61 basepar

25 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 35:

TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTATCAC CGCAGATGGT 60

T 61

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 36:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 64 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 36:

TATCACC GCA AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT 60
GATA 64

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 37:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 70 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 37:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60
GTGGCGTCCC 70

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 38:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 37 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 38:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTC AGGGAGG

37

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 39:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 22 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 39:

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC

22

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 40:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 103 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 40:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG 60

TCAACACCGC CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA 103

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 41:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 62 basepar

25 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 41:

GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA 60

TA 62

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 42:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 71 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 42:

GATCCAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGGCGGTGT TGACATAAAT ACCACTGGCG 60

GTGATACTGC A 71

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 43:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 63 basepar

25 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 43:

GTATCACCGC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG 60

TTG 63

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 44:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 21 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 44:

GATCCGGGGG GATACCCCCC G

21

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 45:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 91 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

25 (C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 45:

35

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGGATAA ATATCTAACA CCGTGCGTGT

60

TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G

91

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 46:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 53 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 46:

CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTGAACCG AAACCGGTTA GTATAAAAGC AGA

53

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 47:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 54 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 47:

AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCCGGACC GAAAACGGTG TATATAAAG ATGT

54

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 48:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 54 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 48:

AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTTCACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA

54

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 49:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 basepar

25 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 49:

35

GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG

24

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 50:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 50:

TGTGCAACCG ATTCGGTTG CCTT

24

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 51:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

25 (C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 51:

35

TATGCAACCG AAATAGGTTG GGCA

24

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 52:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 24 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 52:

TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTG

24

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 53:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 24 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 53:

GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT

24

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 54:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 52 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 54:

GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC

52

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 55:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 53 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅD: dobbelttrådet
- (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 55:

GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AACAGCTAC AGCACACCCC CTC

53

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 56:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 60 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

10

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 56:

GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG

60

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 57:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 68 basepar

25 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 57:

35

CATACCAAAG CCGTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTG TTGCACAGAG

60

ACTCAGTG

68

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 58:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 77 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 58:

TAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTATTCC AGCACCGTGT 60
CCGTGGGCAC CGCAAAG 77

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 59:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 80 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 59:

ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAAC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60
ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 60:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 266 basepar

5 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

10 (ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 60:

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

25

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 61:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 95 basepar

30 (B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅD: dobbelttrådet

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

35

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 61:

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

5

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 62:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 10 (A) LENGDE: 81 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
(C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

15 (ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

20

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 62:

CATGTTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT 60
AATTATCAC CGCAGATGGT T 81

25

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 63:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 30 (A) LENGDE: 322 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

35

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 63:

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

Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Glu Asn
 275 280 285

Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His
 290 295 300

5 Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Val Asn
 305 310 315 320

Ile Thr

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 64:

10

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 325 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

15

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

20

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 64:

25

Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met Phe His
 1 5 10 15

Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val Phe Gln
 20 25 30

30

Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu
 35 40 45

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

35

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

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

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

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

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 65:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- 35 (A) LENGDE: 268 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) **ANTISENSE:** NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 65:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 66:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 263 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 66:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln
 260

15

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 67:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 263 aminosyrer

20 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: linear

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

25 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

30

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 67:

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

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

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

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

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

30 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 68:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 299 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

35 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

5 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 68:

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

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

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

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

10 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 69:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 261 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 69:

Met Asp Phe Leu Thr Asn Leu Arg Phe Thr Glu Gly Ile Ser Glu Pro
1 5 10 15

Tyr Ile Glu Ile Phe Glu Gln Pro Arg Gln Arg Gly Thr Arg Phe Arg
20 25 30

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

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

Gly Lys Val Lys Ile Arg Thr Thr Leu Val Thr Lys Asn Glu Pro Tyr
65 70 75 80

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

Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Pro Glu Arg Gln Val Leu Ser Phe Gln Asn
 100 105 110
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Ile Ser
 115 120 125
 5 Leu Arg Ile Ser Lys Lys Asn Pro Phe Asn Val Pro Glu Glu Gln Leu
 130 135 140
 His Asn Ile Asp Glu Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe Gln
 145 150 155 160
 10 Ala Phe Leu Pro Asp Glu His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro Pro
 165 170 175
 Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala Glu
 180 185 190
 Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly Gly
 195 200 205
 15 Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Glu
 210 215 220
 Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser Gln
 225 230 235 240
 20 Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro Phe
 245 250 255
 Leu Gly Asp Ile Thr
 260

25

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 70:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 262 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

35

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 70:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 71:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 314 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 71:

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

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 72:

25

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 17 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

35

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 72:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 73:

10 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 168 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

15 (ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(111) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) **FRAGMENTTYPE:** intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 73:

25 Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys
1 5 10 15

Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp
20 25 30

His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys
35 40 45

30
Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr
50 55 60

Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg
65 70 75 80

35 Ser Asp His Leu Ser Lys His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly
85 90 95

Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly
100 105 110

Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr
 115 120 125
 Thr Asn Met Val Ala Met Glu Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly Phe
 165

10

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 74:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 181 aminosyrer

15

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

20

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

25

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 74:

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

Glu Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu
 115 120 125
 Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu
 130 135 140
 5 Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg
 145 150 155 160
 Ala Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly
 165 170 175
 10 Phe Arg Lys Thr Thr
 180

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 75:

15 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 85 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

20 (ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

25

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 75:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 76:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 87 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 76:

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

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 77:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35 (A) LENGDE: 84 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 77:

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

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 78:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25 (A) LENGDE: 84 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

35

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 78:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 79:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 84 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

25

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 79:

30

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 80:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 84 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 80:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 81:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 84 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 81:

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

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

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

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

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

20 Leu His Leu Leu

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 82:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25 (A) LENGDE: 80 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 82:

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

15 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 83:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 80 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 20 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

25

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

30 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 83:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 84:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 81 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 84:

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

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

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

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

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

Val

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 85:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 21 aminosyrer

35 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 85:

10 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 86:

15

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 30 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

20

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

25 (iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 86:

30

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

35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 87:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 21 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

15 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 87:

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

20	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn										
				20											

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 88:

25

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 30 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

35 (iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 89:

(D) TOPOLOGI: linear

(1x) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 89:

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 90:

(D) TOPOLOGI: linear

(ii) MOLEKYLTYP: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 90:

10 Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Ile Cys Gly Arg Glu Leu Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Lys Arg Ser
 20 25 30
 Leu

15 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 91:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 24 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

20 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

25

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

30 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 91:

Glu Glu Lys Met Gly Thr Ala Lys Lys Cys Cys Ala Ile Gly Cys Ser
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Phe Arg Met Val Cys
 20
 35

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 92:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 40 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 92:

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

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

Asn Phe Gly Asn Tyr Pro Ile Met
 35 40

25

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 93:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 182 aminosyrer

30 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

35 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 93:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 94:

- 30 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
- (A) LENGDE: 84 aminosyrer
 - (B) TYPE: aminosyre
 - (D) TOPOLOGI: lineær
- 35 (ii) MOLEKYLTTYPE: peptid
- (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI
- (iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 94:

```

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

   Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr
           20              25              30

   Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys
           35              40              45
10
   Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln
           50              55              60

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

```

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 95:

```

20      (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
          (A) LENGDE: 84 aminosyrer
          (B) TYPE: aminosyre
          (D) TOPOLOGI: lineær

```

```

25      (ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

```

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

30

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 95:

```

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

   Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr
           20              25              30

   Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys
           35              40              45

```

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

10

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 96:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 83 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: linear

15

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

20

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

25

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 96:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 97:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 84 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 97:

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

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 98:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35 (A) LENGDE: 89 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 98:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 99:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25 (A) LENGDE: 7 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35 (v) FRAGMENTTYPE: C-terminal

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 99:

Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala
 1 5

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 100:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 4 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 100:

Asn Ser Asn Thr

1

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 101:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25 (A) LENGDE: 4 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 101:

Ser Gly Asn Thr

1

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 102:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 6 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: intern

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 102:

Ser Ser Gly Ser Ser Gly
 1 5

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 103:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25 (A) LENGDE: 15 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35

(v) FRAGMENTTYPE: intern

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 103:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 104:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 66 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 104:

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

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

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

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

Thr Ala
 65

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 105:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 66 aminosyrer

35 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 105:

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

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 106:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

25 (A) LENGDE: 66 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

30

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

35 (v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 106:

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

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

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

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

10 Thr Ala
 65

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 107:

15 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 96 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

20 (ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

25 (v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 107:

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
 30 1 5 10 15

Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
 20 25 30

Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
 35 40 45

35 Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
 50 55 60

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

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 108:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 96 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 108:

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
 1 5 10 15

Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
 20 25 30

Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
 35 40 45

Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
 50 55 60

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

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

30

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 109:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

35 (A) LENGDE: 180 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

5 (v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 109:

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

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 110:

35

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 113 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: peptid

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

5 (iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 110:

10

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

Glu Asn Tyr Cys Asn Met Ser Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp
20 25 30

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

Tyr Gln ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe
50 55 60

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

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

Cys Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Lys
100 105 110

25 Thr

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 111:

30 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 292 aminosyrer.

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: lineær

35 (ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 111:

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

Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly Phe
 275 280 285

5 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 112:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 273 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

10 (D) TOPOLOGI: linear

(ii) MOLEKYLTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

15

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

20 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 112:

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

Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu
 145 150 155 160
 Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys
 165 170 175
 5 Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg Ser Asp His Leu Ser Lys His
 180 185 190
 Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser
 195 200 205
 10 Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly Ala Gly Ser Glu Gly Ser Gly
 210 215 220
 Thr Ala Thr Pro Ser Ala Leu Ile Thr Thr Asn Met Val Ala Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn
 245 250 255
 15 Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly
 260 265 270
 Phe

20

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 113:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 421 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

25

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

30

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

35

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 113:

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

Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg
 275 280 285
 Glu Lys Glu Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met
 290 295 300
 5 Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser
 305 310 315 320
 Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile
 325 330 335
 10 Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met
 340 345 350
 Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu
 355 360 365
 Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu
 370 375 380
 15 Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr
 385 390 395 400
 Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys
 405 410 415
 20 Asp Val Asn Ile Thr
 420

25

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 114:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 391 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

30

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

35

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 114:

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

Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
 305 310 315 320
 5 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
 340 345 350
 10 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
 355 360 365
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390
 15

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 115:

20 (i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:
 (A) LENGDE: 391 aminosyrer
 (B) TYPE: aminosyre
 (D) TOPOLOGI: lineær

25 (ii) MOLEKYLTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

30

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 115:

35 Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
 20 25 30

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

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

5 Thr Ala Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met
65 70 75 80

Phe His Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val
85 90 95

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

Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys
115 120 125

Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn
130 135 140

15 Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala
145 150 155 160

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

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

Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile
195 200 205

Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met
210 215 220

25 Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro
225 230 235 240

Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly
245 250 255

Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
260 265 270

30 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
275 280 285

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

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

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

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

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

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

Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

10 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 116:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 241 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

15 (D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

(iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

20

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

25 (ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 116:

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

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

30

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

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

35

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

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

166

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

20 (2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 117:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

- (A) LENGDE: 10 basepar
(B) TYPE: nukleinsyre
25 (C) TRÅD: dobbelttrådet
(D) TOPOLOGI: lineær

(ii) MOLEKYLTTYPE: cDNA

30 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(ix) SEKVENSBEKRIVELSE: SEKV.ID NR. 117:

35 GGGAMTNYCC

(2) INFORMASJON OM SEKV.ID NR. 118:

(i) SEKVENSKARAKTERISTIKA:

(A) LENGDE: 72 aminosyrer

5 (B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: linear

(ii) MOLEKYLTTYPE: protein

10 (iii) HYPOTETISKE SEKVENSER: NEI

(iv) ANTISENSE: NEI

(v) FRAGMENTTYPE: N-terminal

15

(ix) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV.ID NR. 118:

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

20 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr
 50 55 60

25

His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln
 65 70

30

35

P a n e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for påvisning av en målnukleinsyre,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å:
(a) fremskaffe en prøve som inneholder en hybrid som skal bli påvist, eller en prøve som inneholder en målnukleinsyre og en probenukleinsyre som hybridiserer slik an et probe-målhybrid dannes, og
10 (b) bringe hybridene i trinn (a) i kontakt med et nukleinsyrebindende molekyl eller ansamling (TBA), der TBA er i stand til å binde til og stabilisere hybridene på en sekvensspesifikk måte, og videre der TBA er i stand til å skille mellom en hybrid som er dannet av proben og
15 målnukleinsyren, og en hybrid som har én eller flere feilaktige baseparinger som er dannet mellom proben og en nært beslektet eller ubeslektet sekvens.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å bringe hybridene i trinn (a) eller (b) i kontakt med én eller flere markører som spesifikt binder til nukleinsyren som er bundet av TBA.
- 25 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å bringe hybridene i trinn (a) eller (b) i kontakt med ett eller flere merker som spesifikt binder til TBA.
- 30 4. Fremgangsmåte ifølge krav 2 eller 3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte merke(r) ytterligere omfatter en indikator som er valgt fra gruppen som består av: proteinindikatorer, radionuklider, fluoroforer og fargede kuler.
- 35 5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3 eller 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å:

(a) fragmentere nukleinsyren i målnukleinsyreprøven,
(b) under hybridiseringsbetingelser, bringe den fragmenterte nukleinsyren i kontakt med en probenukleinsyre som er komplementær med den spesielle nukleinsyresekvensen av interesse, der nevnte probenukleinsyre, ved hybridisering med nevnte spesielle nukleinsyresekvens av interesse, danner en målbindende region der TBA bindes spesifikt.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3 eller 4, karakterisert ved at den ytterligere omfatter å fragmentere prøven som inneholder målhybriden som skal bli påvist, og bringe de fragmenterte målhybridene i kontakt med en TBA, der TBA er i stand til å binde til og immobilisere målhybridfragmenter men ikke til andre fragmenter i prøven.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 5 eller 6, karakterisert ved at den ytterligere omfatter trinnet med å overvåke endringen av mobilitet for nukleinsyrer i målnukleinsyreprøven som en funksjon av størrelsen, slik at binding av TBA til et spesielt fragment i prøven modifierer mobiliteten til fragmentet.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7, karakterisert ved at hybridene eller probemålhybriden omfatter ett eller flere nukleinsyrebindende proteingjenkjennings seter som binder minst en TBA.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8, karakterisert ved at nevnte TBA er ett eller flere DNA-bindende proteiner, nukleinsyrebindende proteiner, DNA-RNA-hybridbindende proteiner eller RNA-bindende proteiner.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, karakterisert ved at nevnte ett eller flere DNA-bindende proteiner, nukleinsyrebindende proteiner, DNA-RNA-hybridbindende proteiner eller RNA-bindende proteiner er

valgt fra gruppen som består av: NF-kB-papillomavirus-E2-protein, transkripsjonsfaktor SP1, inaktive restriksjons-
5 enzymer, antistoffer, TATA-bindende proteiner, CI-repres-
sorprotein fra lambdabakteriofag og cro-protein fra lambda-
bakteriofag.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
eller 10,

10 k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere
omfatter å bringe hybridene i kontakt med en forsterker-
nukleinsyre som binder til en del av probenukleinsyren som
ikke er bundet til målnukleinsyren.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
15 10 eller 11,

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte TBA binder til
et nukleinsyregjenkjenningssete som er til stede i genomet til
et patogen, et nukleinsyregjenkjenningssete som er assosiert
med en patogen tilstand i et vertebratgenom, eller et nuklein-
20 syregjenkjenningssete som er til stede i genomet til en
organisme som forurenser en fermenteringsprosess.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 12,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte TBA binder til
et nukleinsyregjenkjenningssete som er til stede i genomet til
et patogen, og der nevnte nukleinsyregjenkjenningssete er HIV-
LTR eller en del derav.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

30 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte probenukleinsyre
ytterligere omfatter en forsterkerbindingsregion.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

35 k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte TBA omfatter et
chaperon i kombinasjon med ett eller flere av de følgende
elementer: én eller flere DNA-gjenkjenningsenheter, linker-
sekvenser, ansamlingssekvenser, assymetri- eller PILOT-TNA-
sekvenser og én eller flere OSA-enheter, der nevnte TBA er i

stand til å skille mellom en paret hybrid og en hybrid som har uparede nukleotider.

5

10

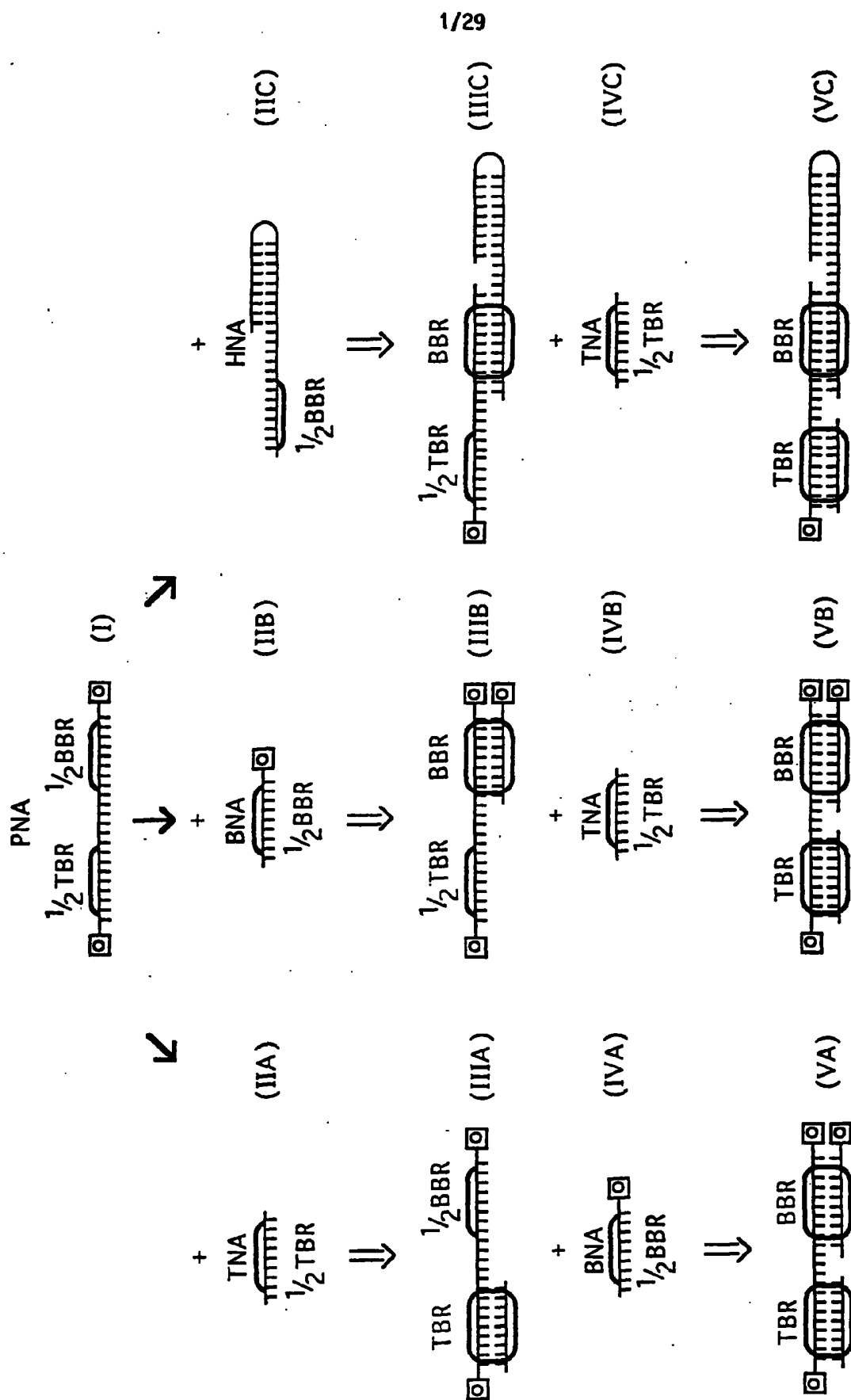
15

20

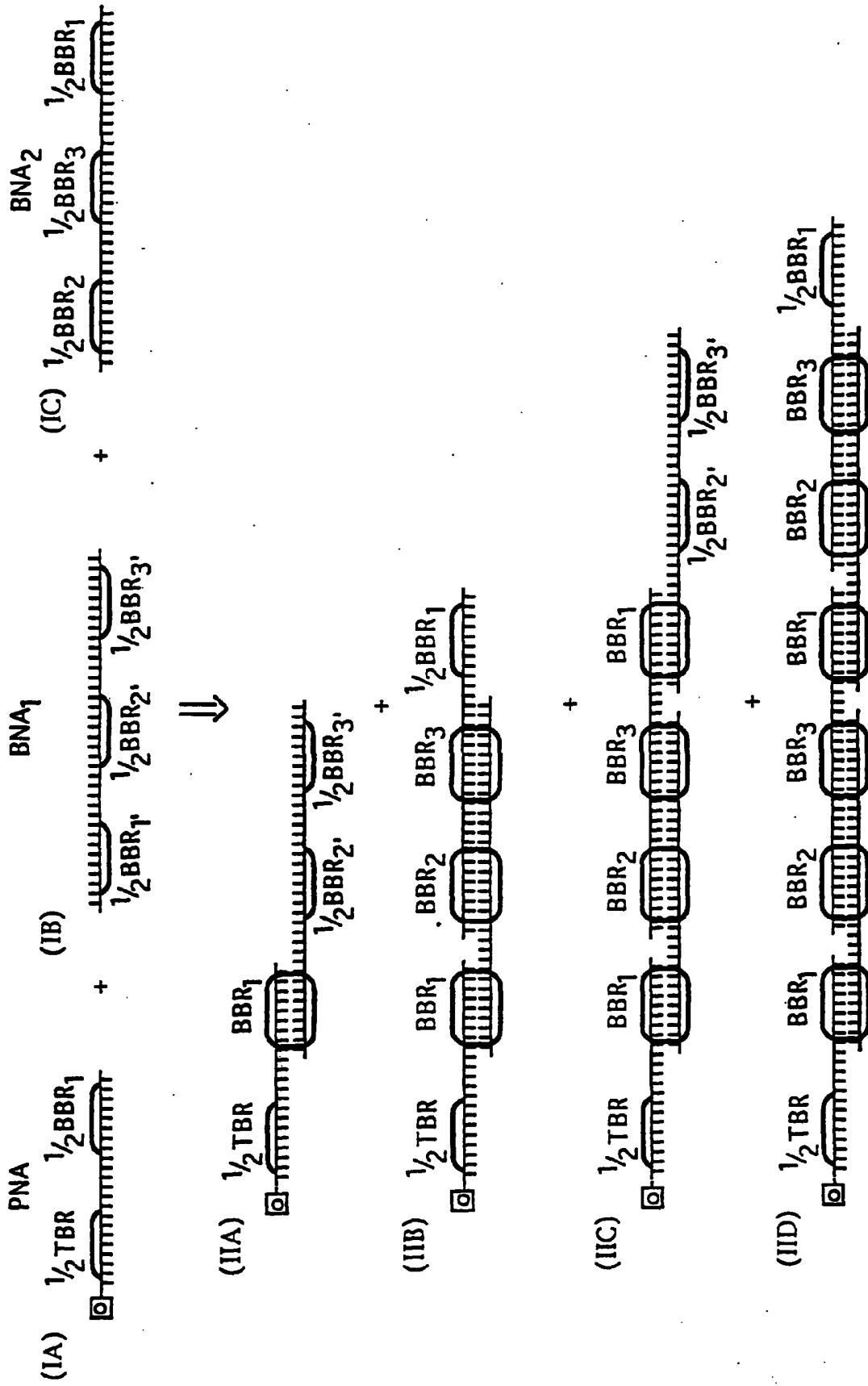
25

30

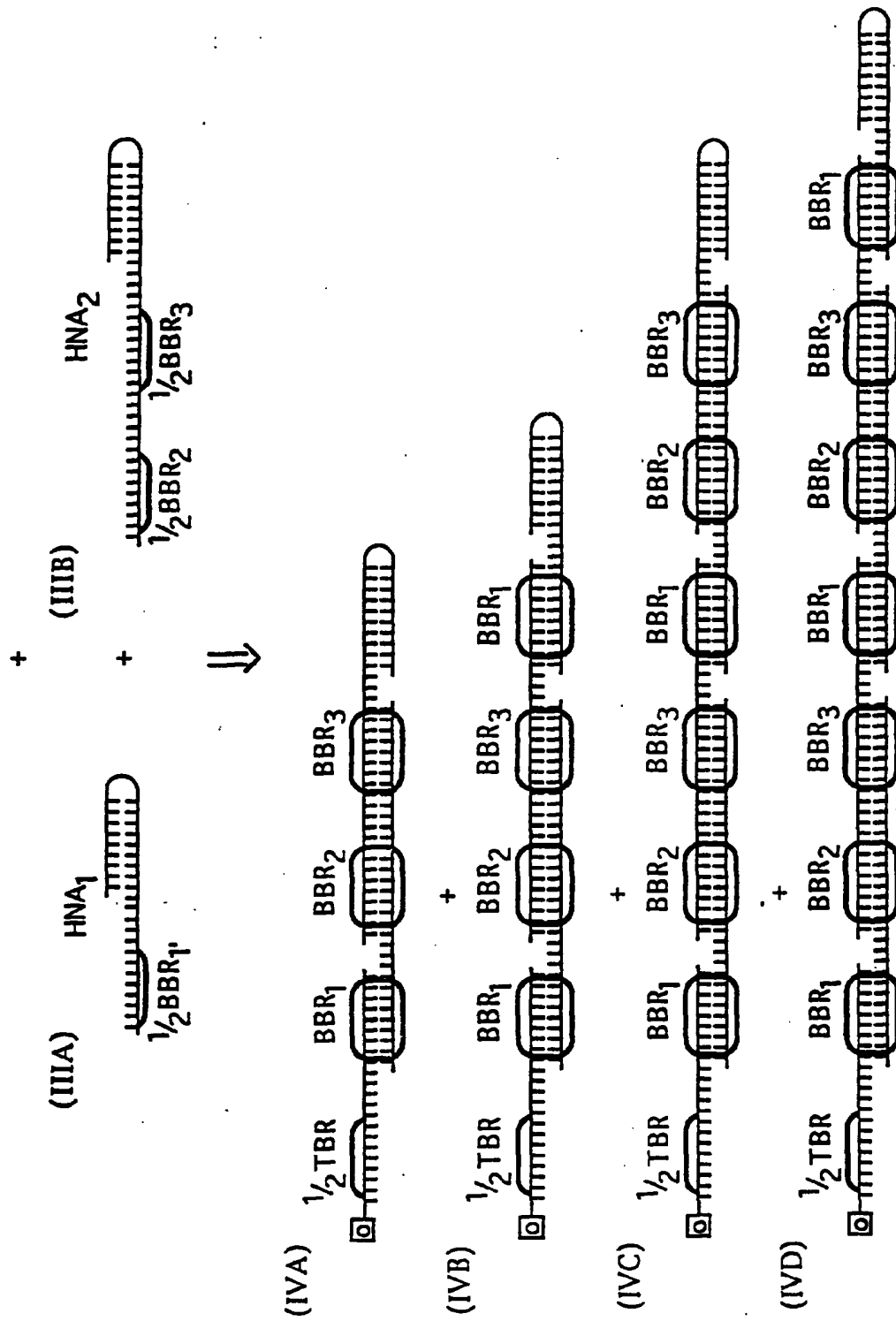
35



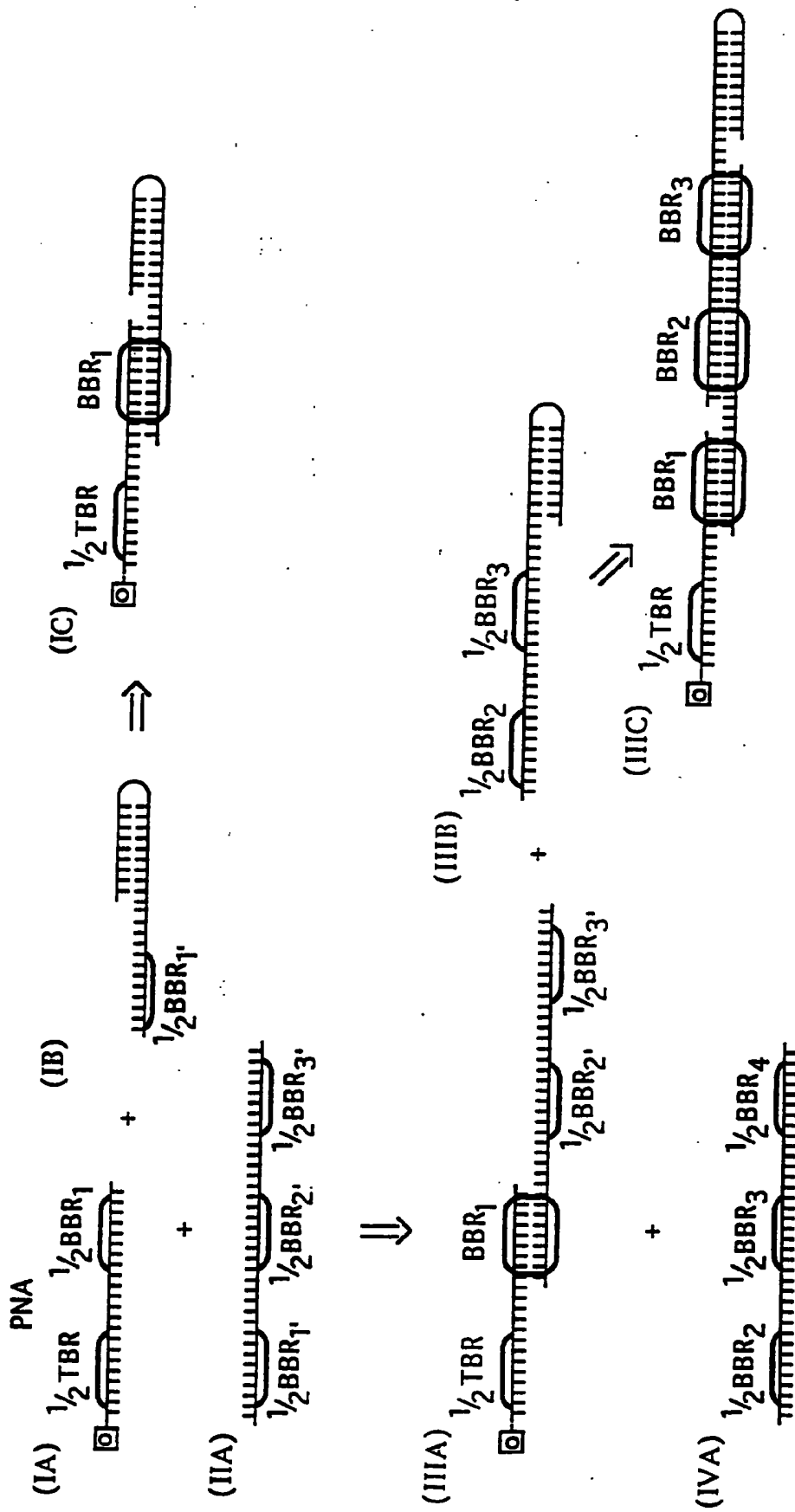
FIGUR 1



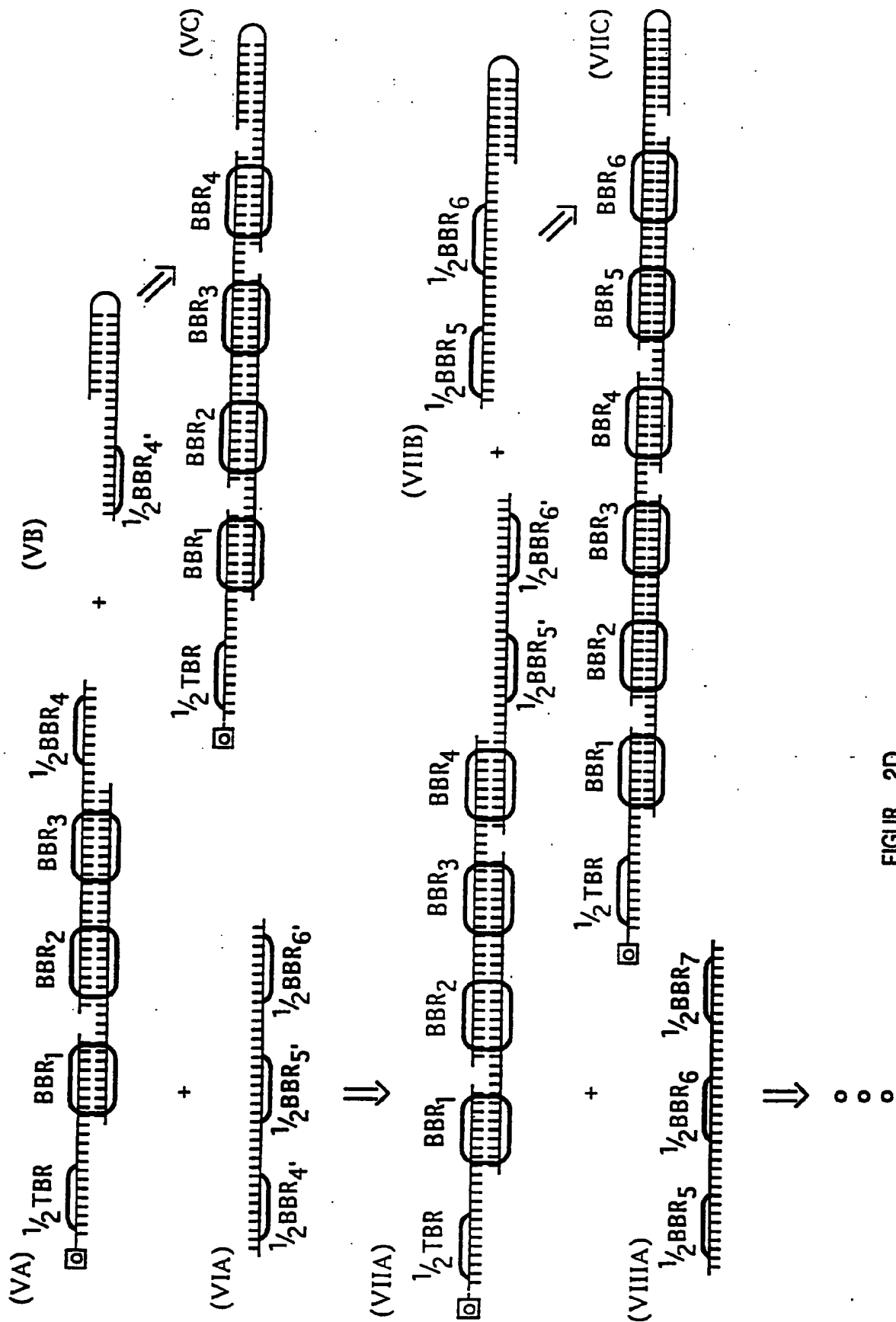
FIGUR 2A

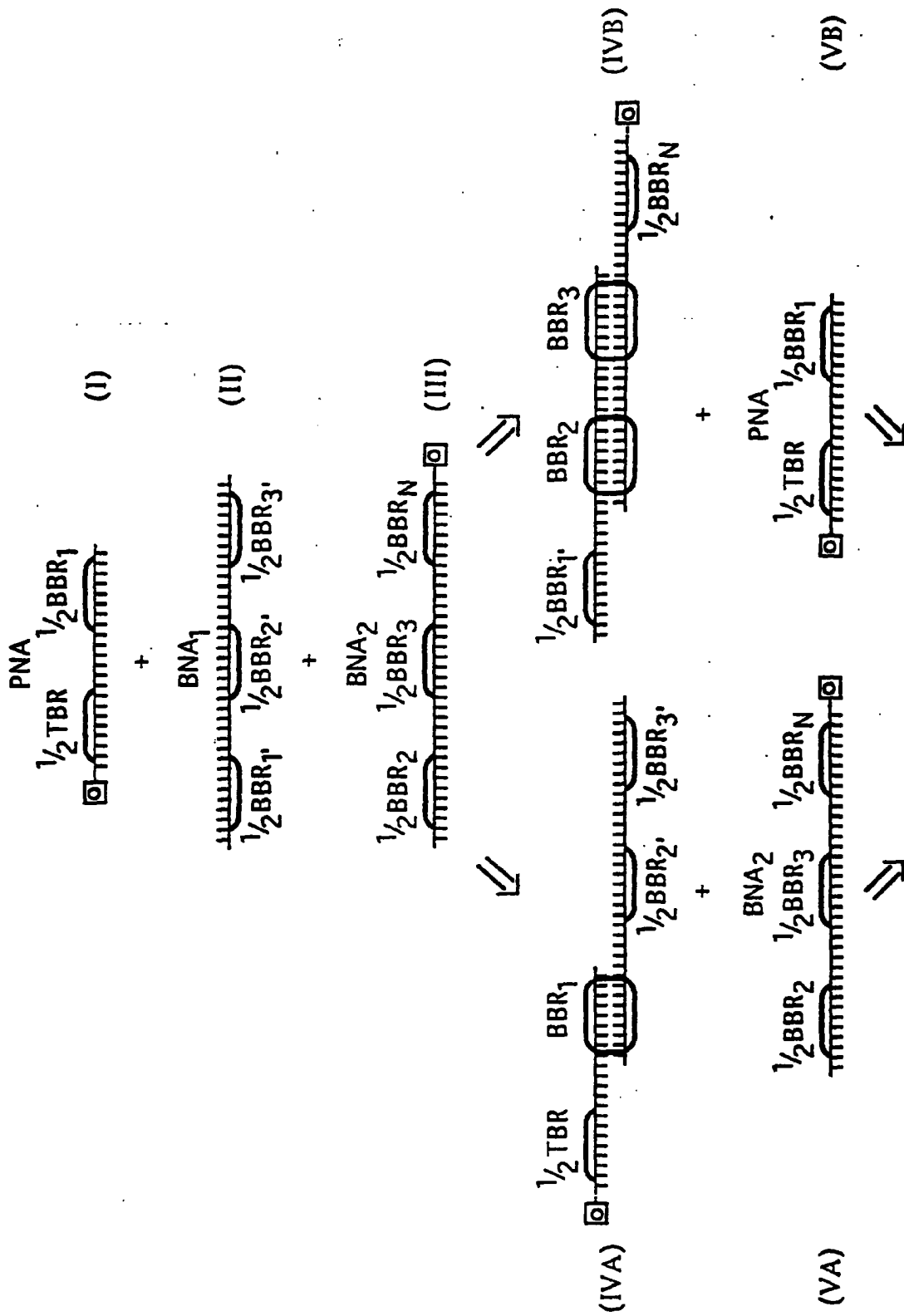


FIGUR 2B

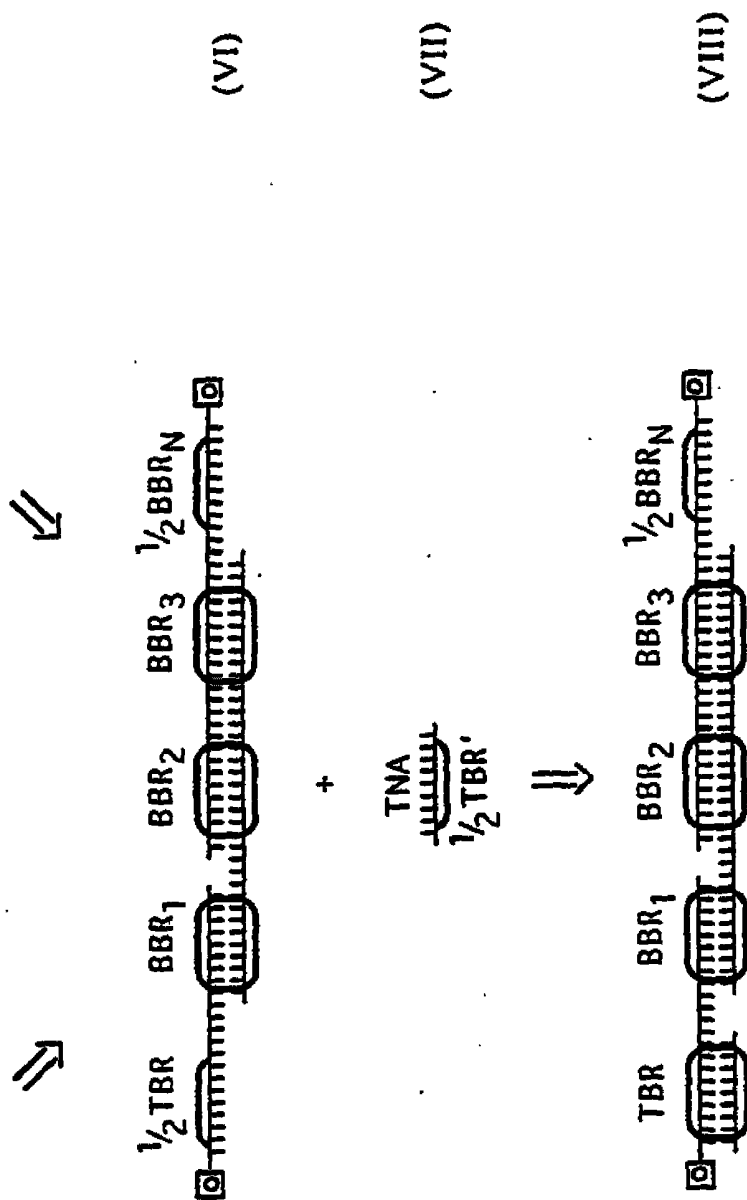


FIGUR 2C



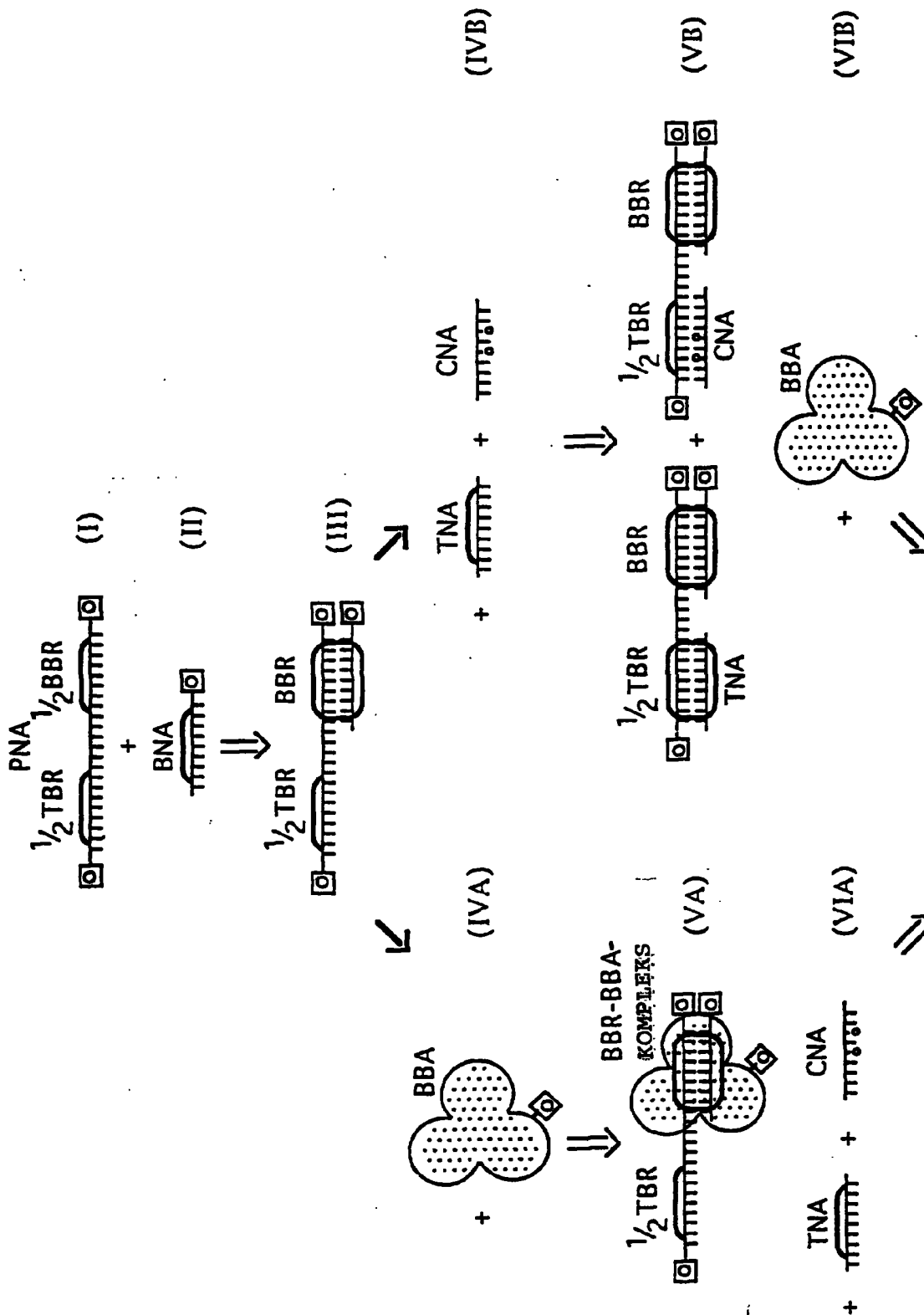


FIGUR 3A

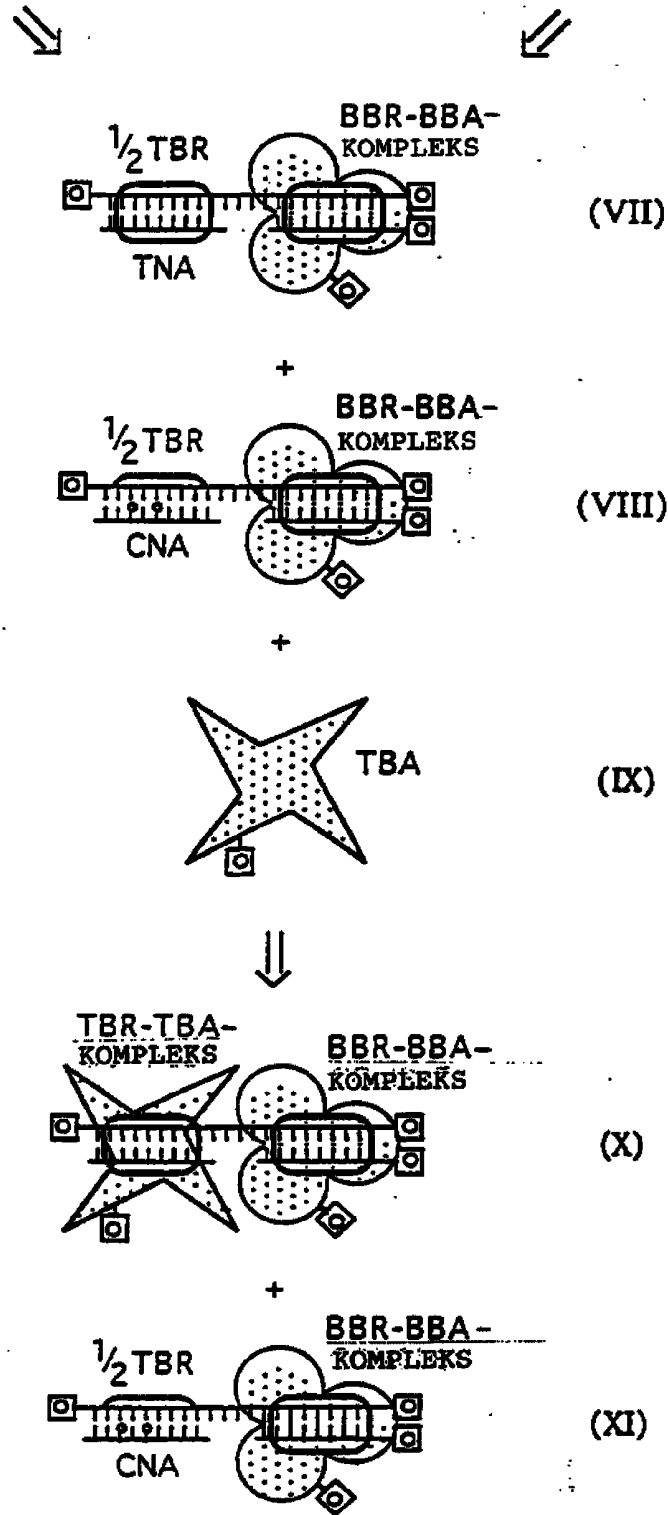


FIGUR 3 B

8/29

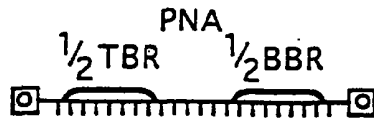


FIGUR 4A



FIGUR 4B

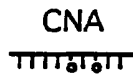
10/29



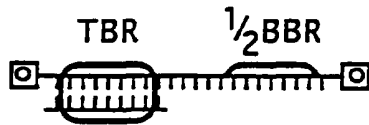
(I)



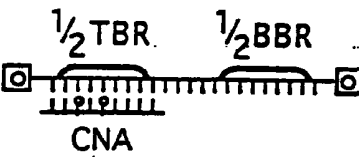
+



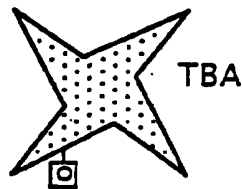
(IIB)



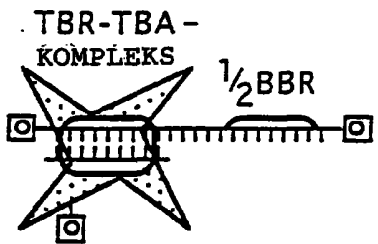
11



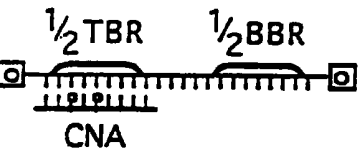
(IIIB)



(IV)



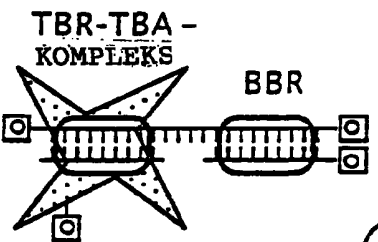
11



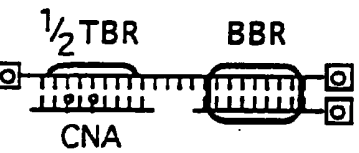
(VB)



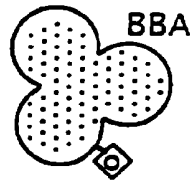
(VI)



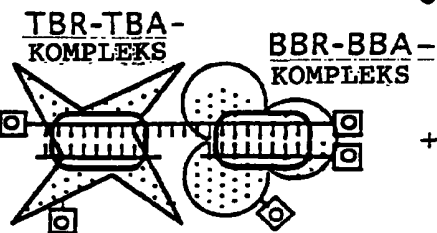
1



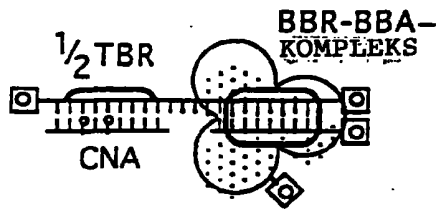
(VIIB)



(VIII)

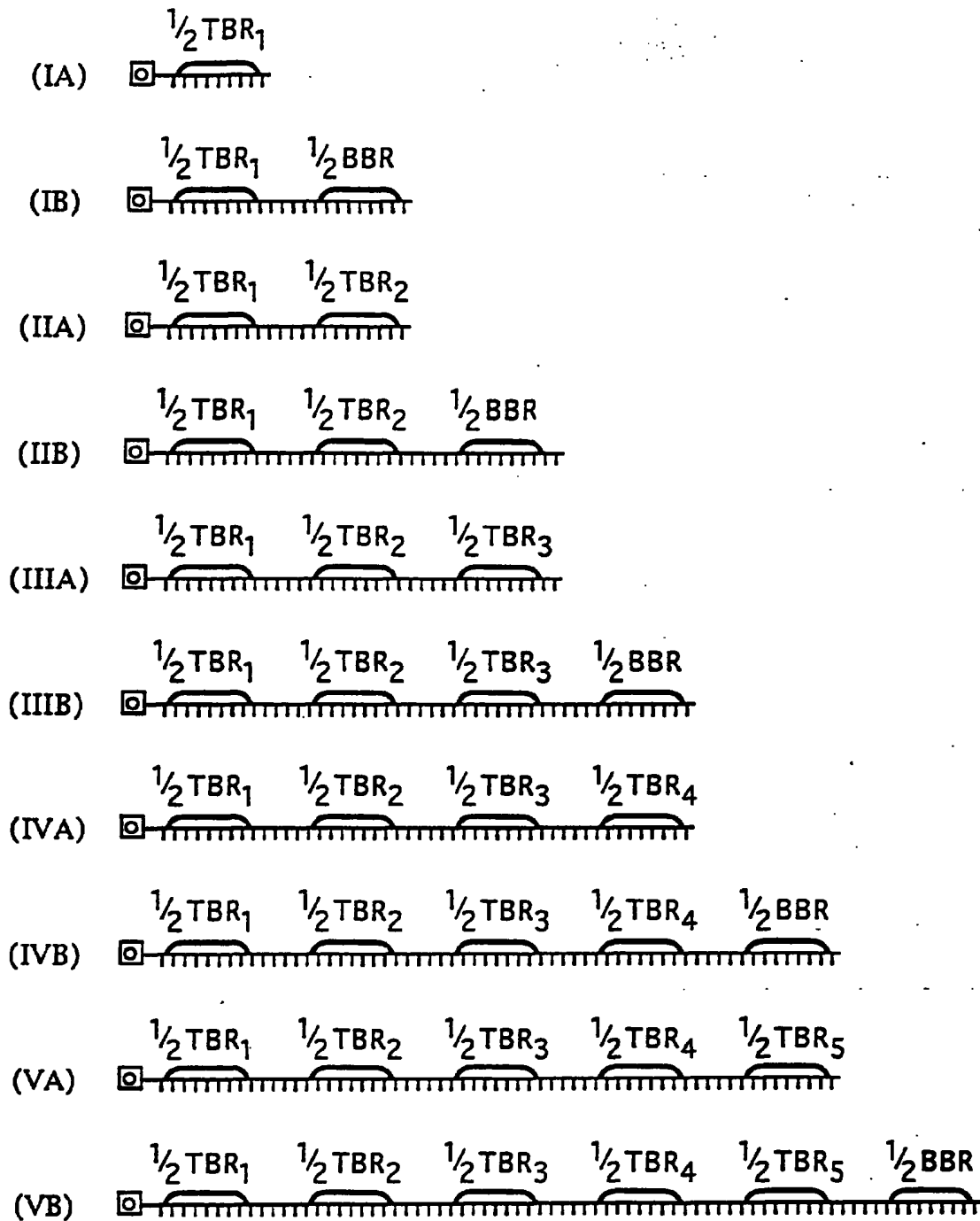


+



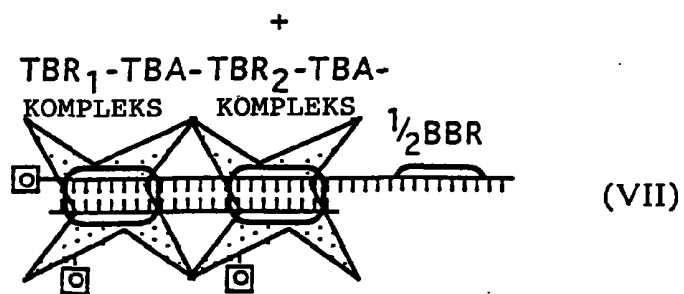
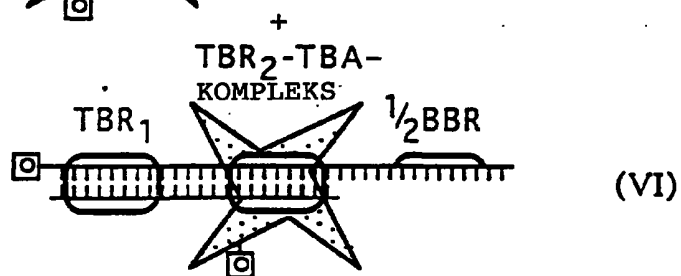
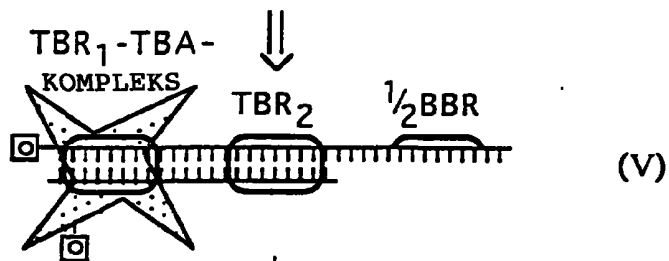
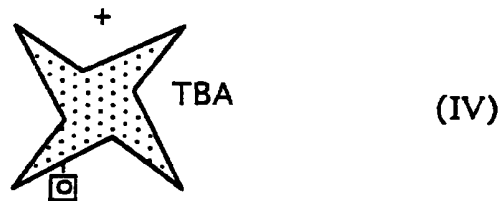
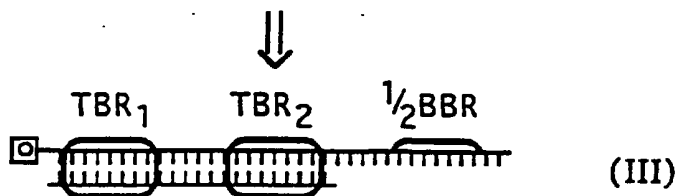
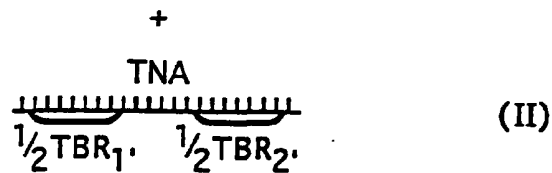
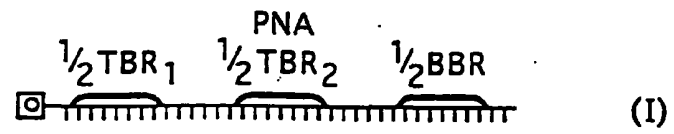
(LXB)

FIGURE 4C



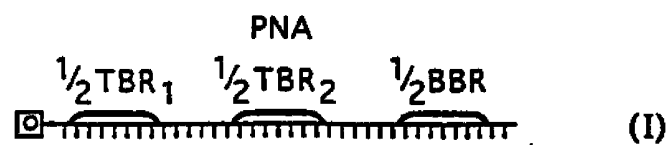
FIGUR 5

12/29

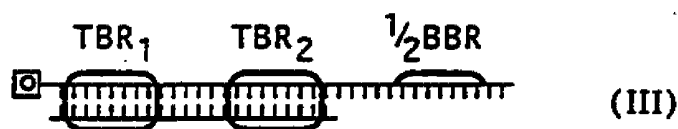
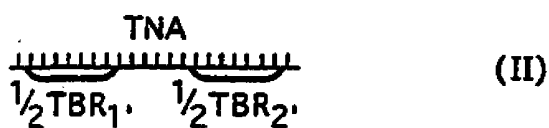


FIGUR 6A

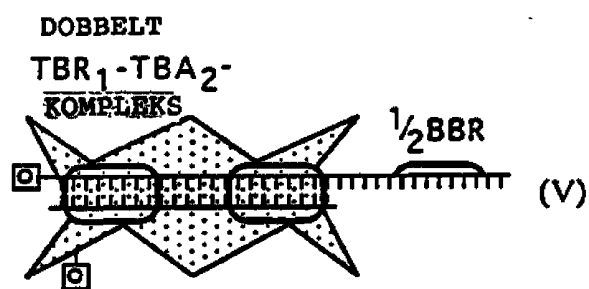
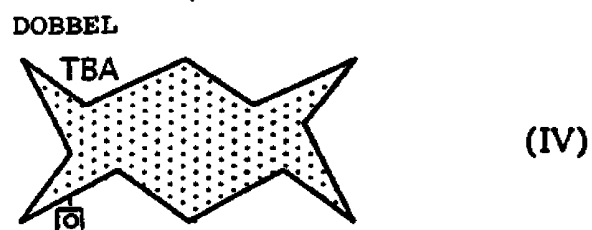
13/29



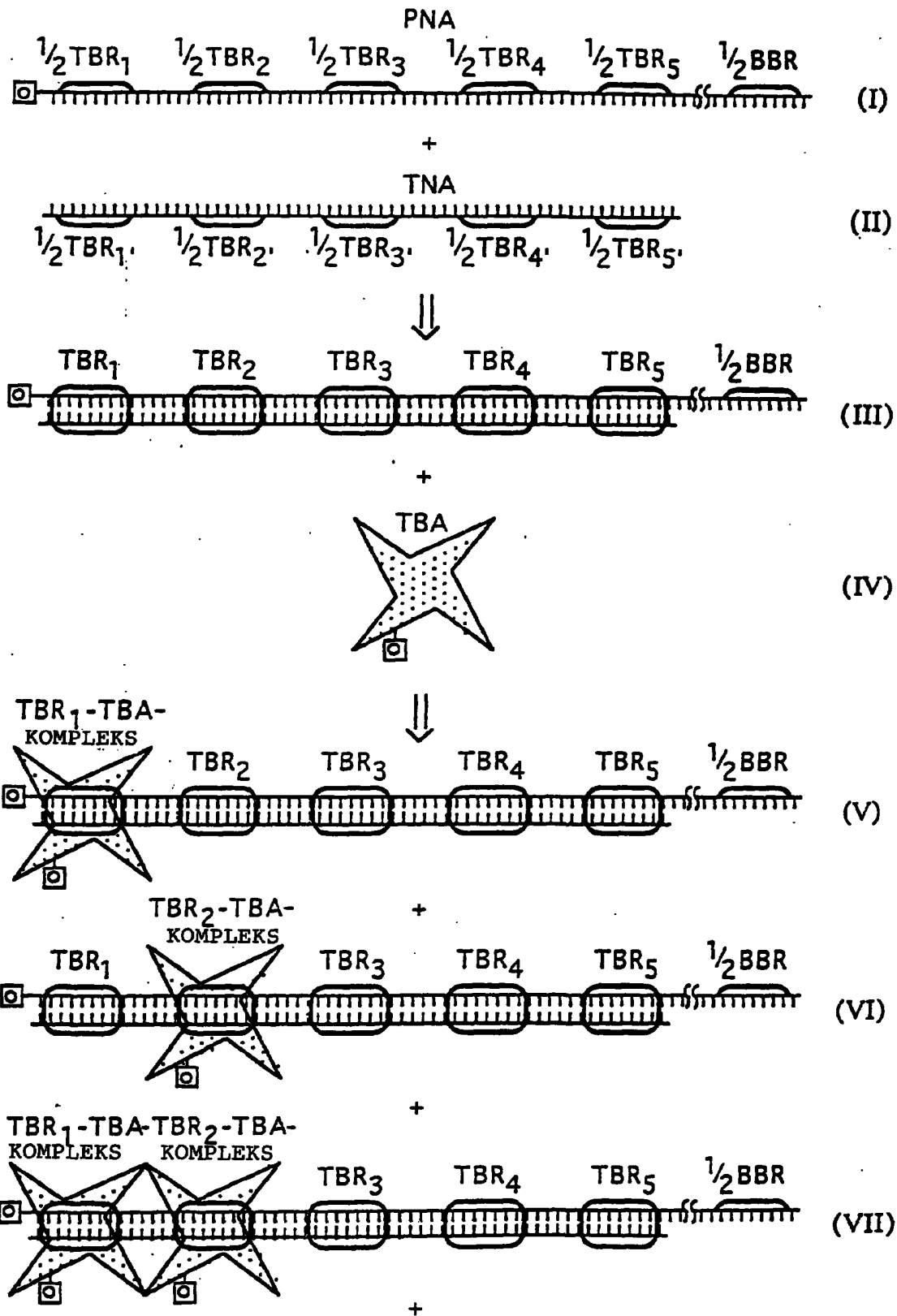
+



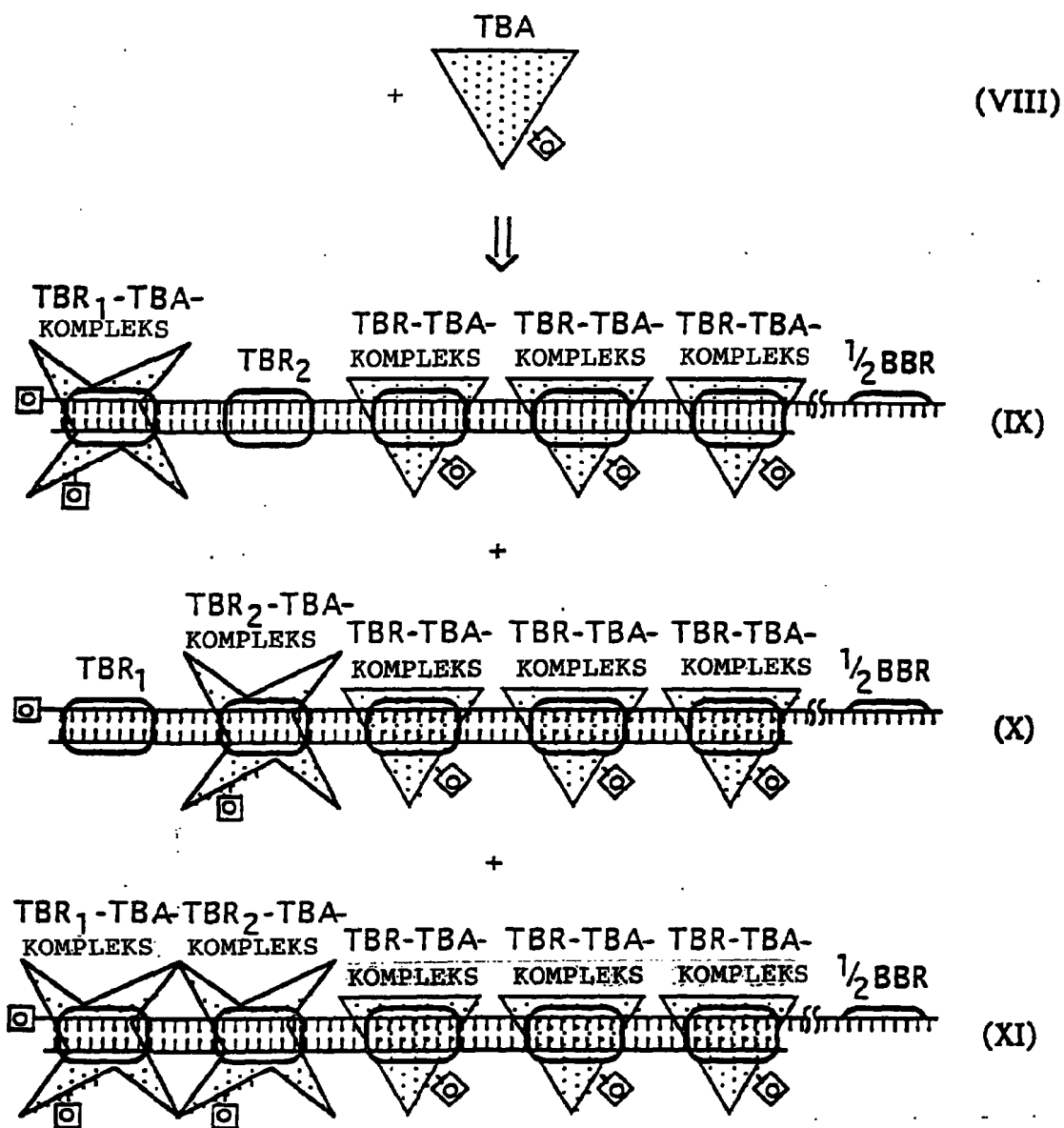
+



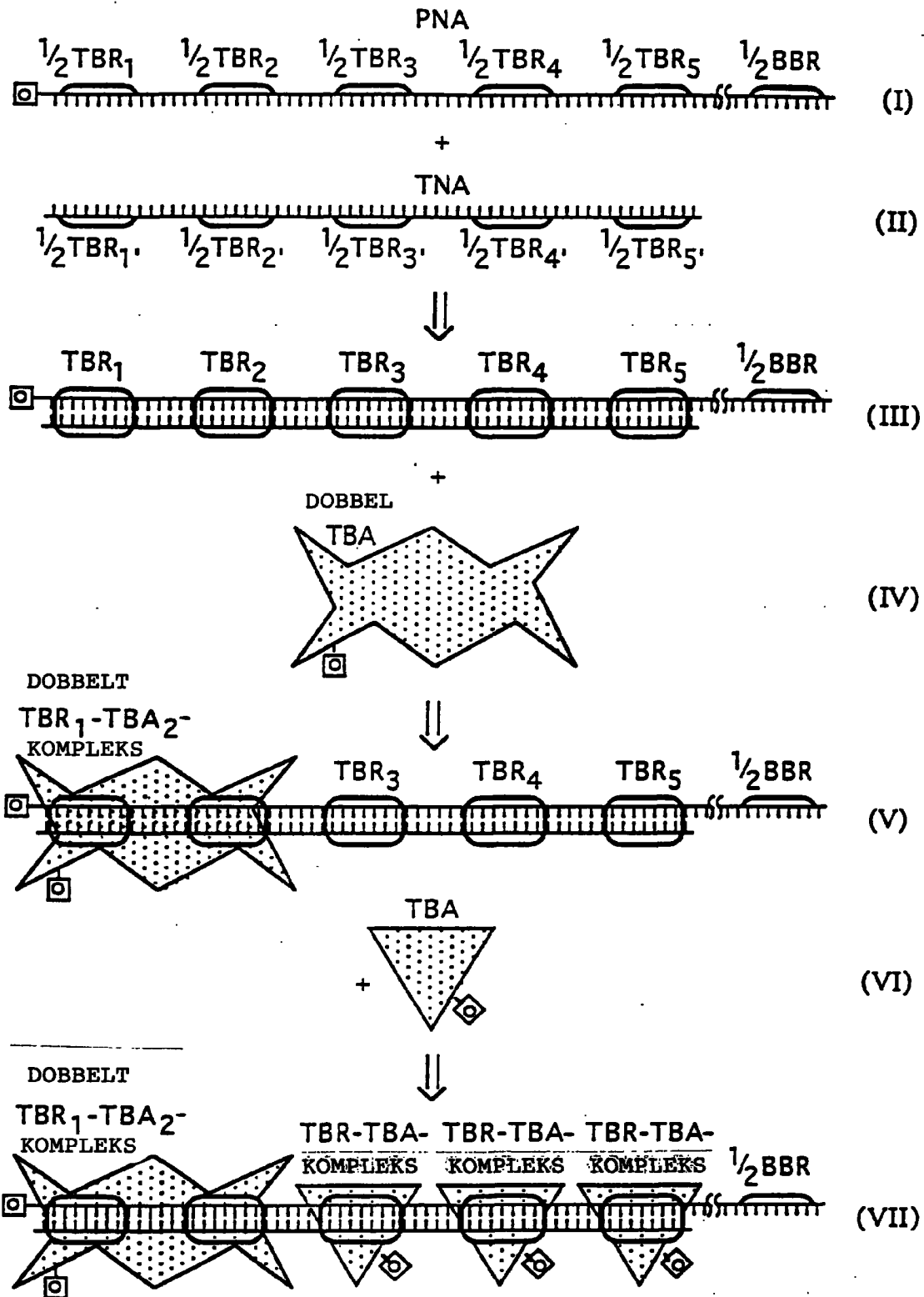
FIGUR 6B



FIGUR 6C



FIGUR 6D



FIGUR 6E

SEKV. ID: 37:

12345678901234567890123456789012345678901234567890
CTACAAGGGACITTCGCTGGGGACITTCACAGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
+++++NF-kB NF-kB SP1 SP1
=====

HIV-analysesett-PNA1 (+++ fra ovenfor), SEKV. ID: 38:

CTACAAGGGACTTTCGCTGGGGACTTTCAGGGAGG

HIV-analysesett-PNA2 (=== fra ovenfor), SEKV. ID: 39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

Den klebrigendeseekvens i PNA2 er komplementær til
en av endene til operator-DNA dannet fra:

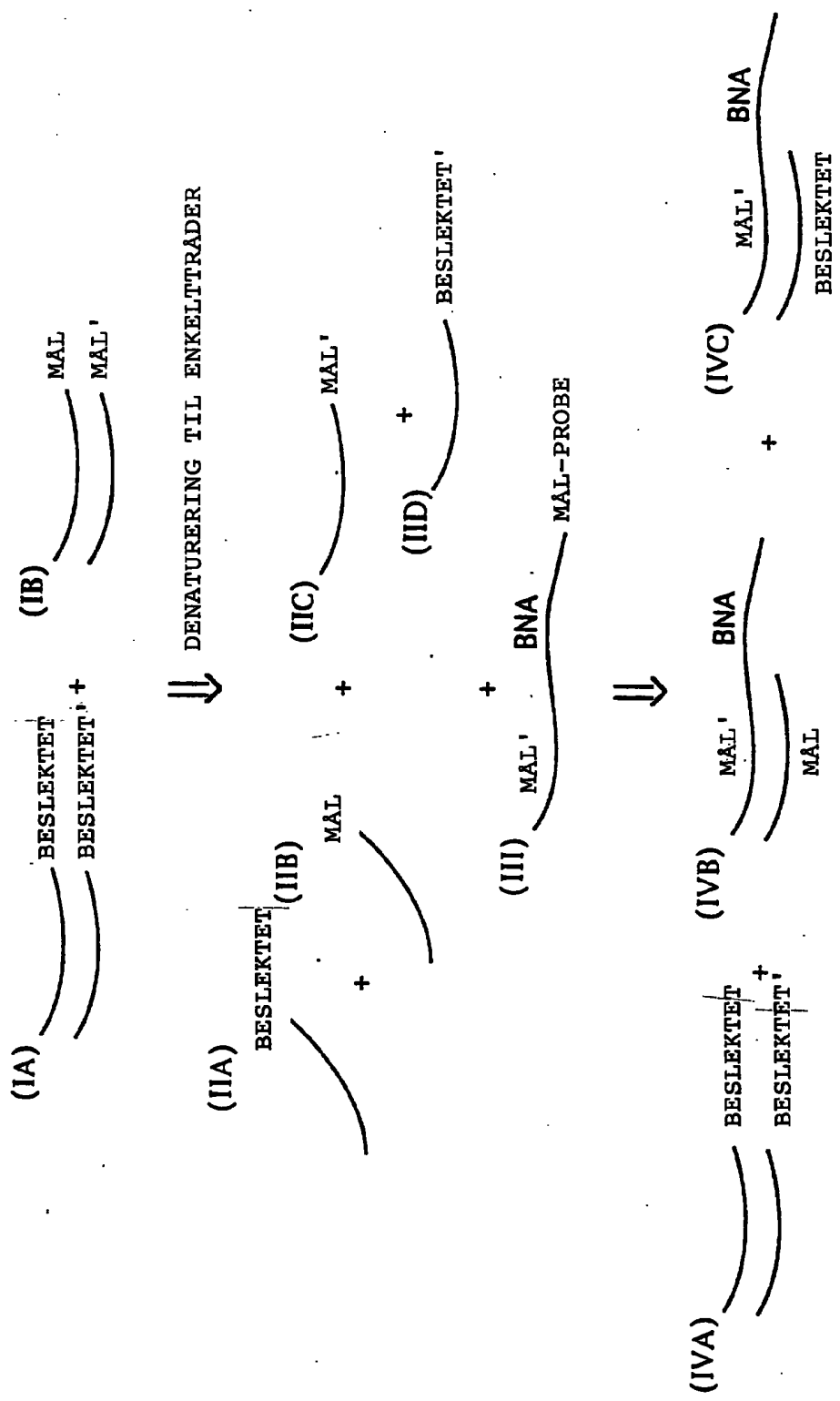
###OL1-OL2-OL3
OL1'-OL2'-OL3'***

eller

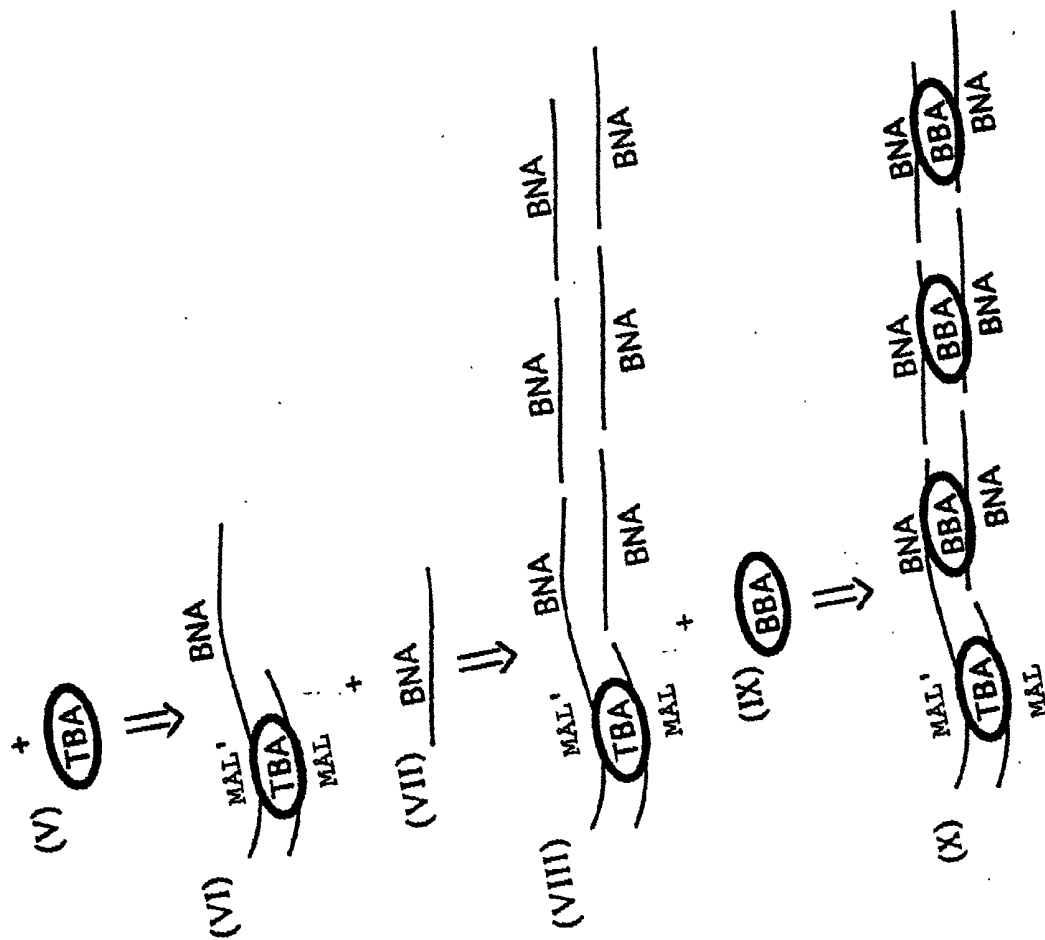
###OR3-OR2-OR1
OR3'-OR2'-OR1'***

FIGUR 7

FRAGMENTERT DOBBELTRÅDET
NUKLEINSYREPRØVE

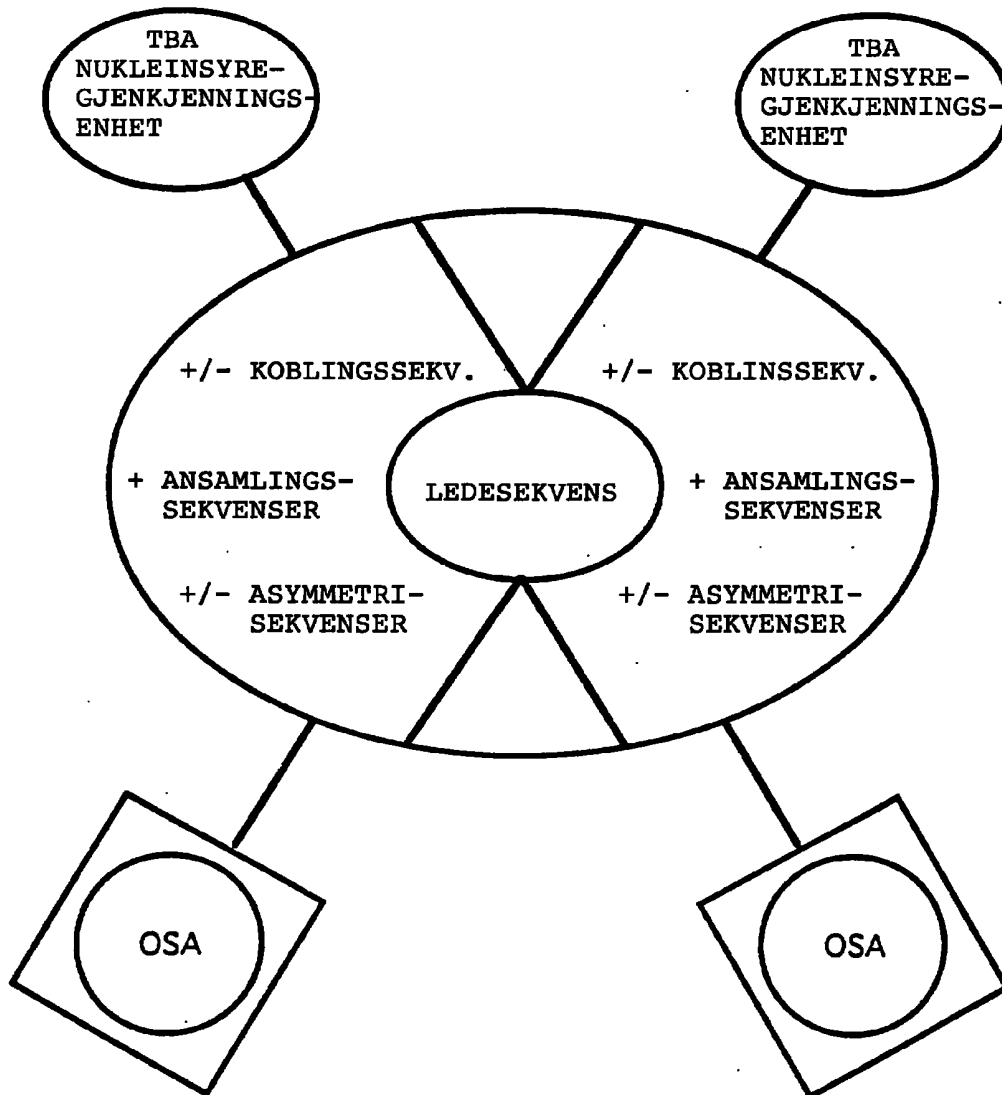


FIGUR 8A

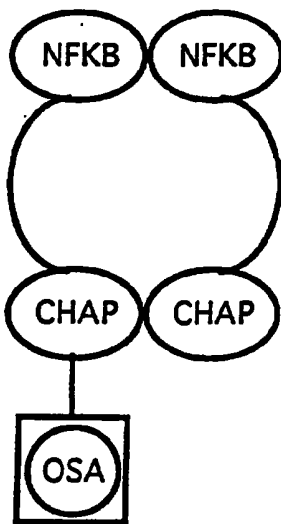


FIGUR 8B

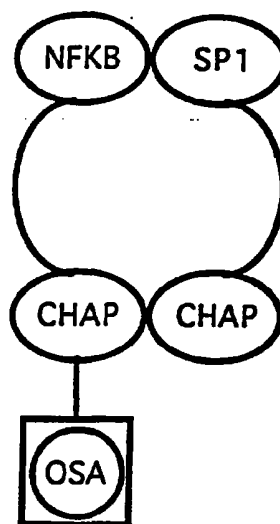
TBA: MÅLBINDINGSANSAMLING



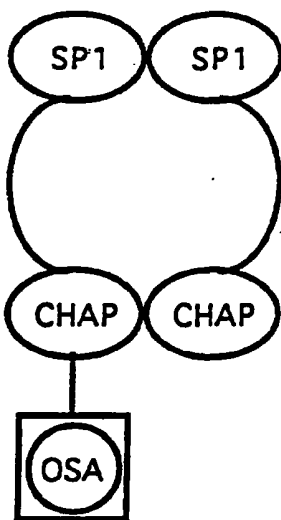
FIGUR 9



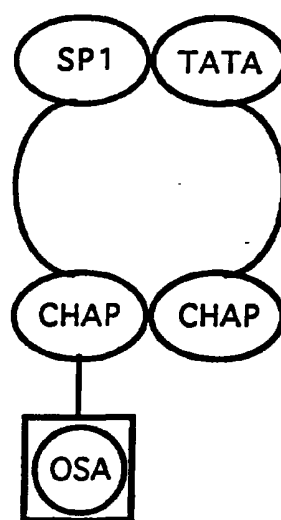
HIV-DETEKT I



HIV-DETEKT II

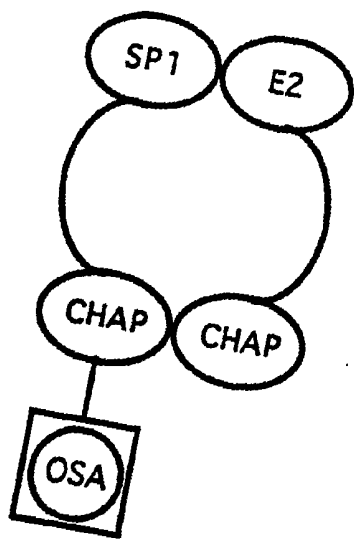


HIV-DETEKT III

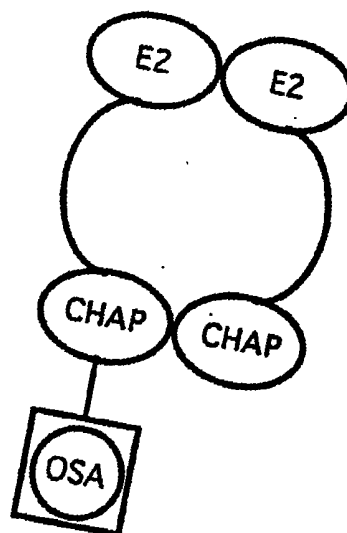


HIV-DETEKT IV

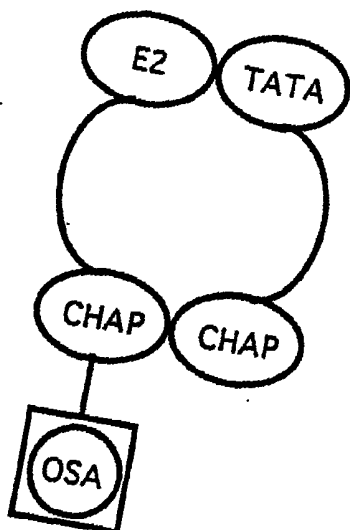
FIGUR 10



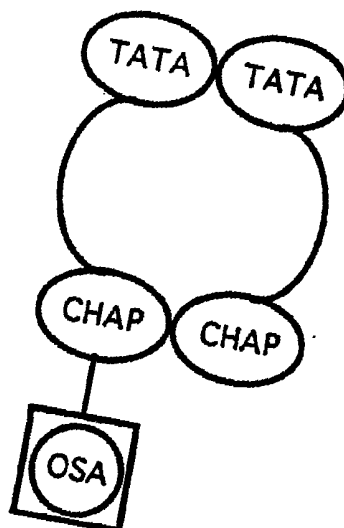
HPV-DETEKT I



HPV-DETEKT II

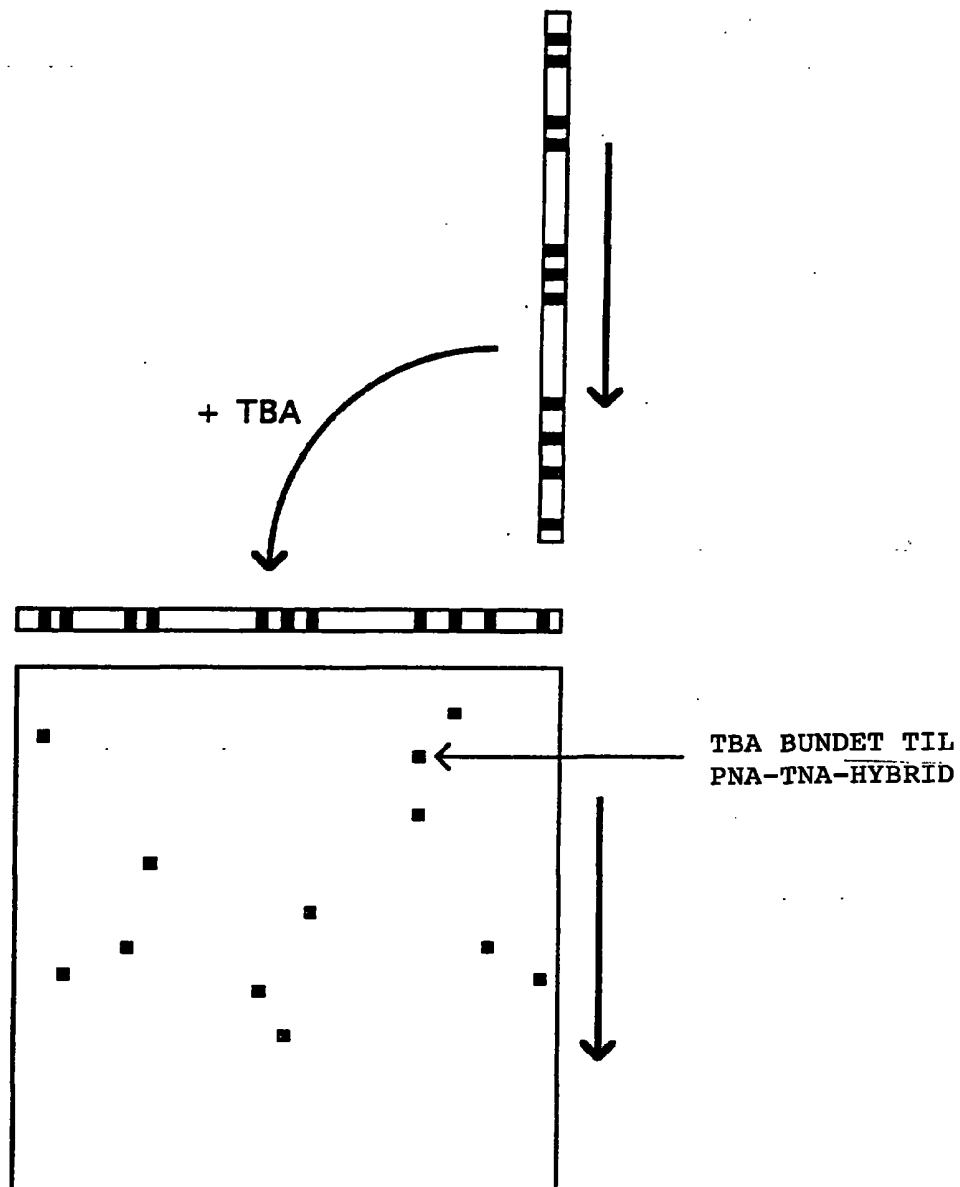


HPV-DETEKT III

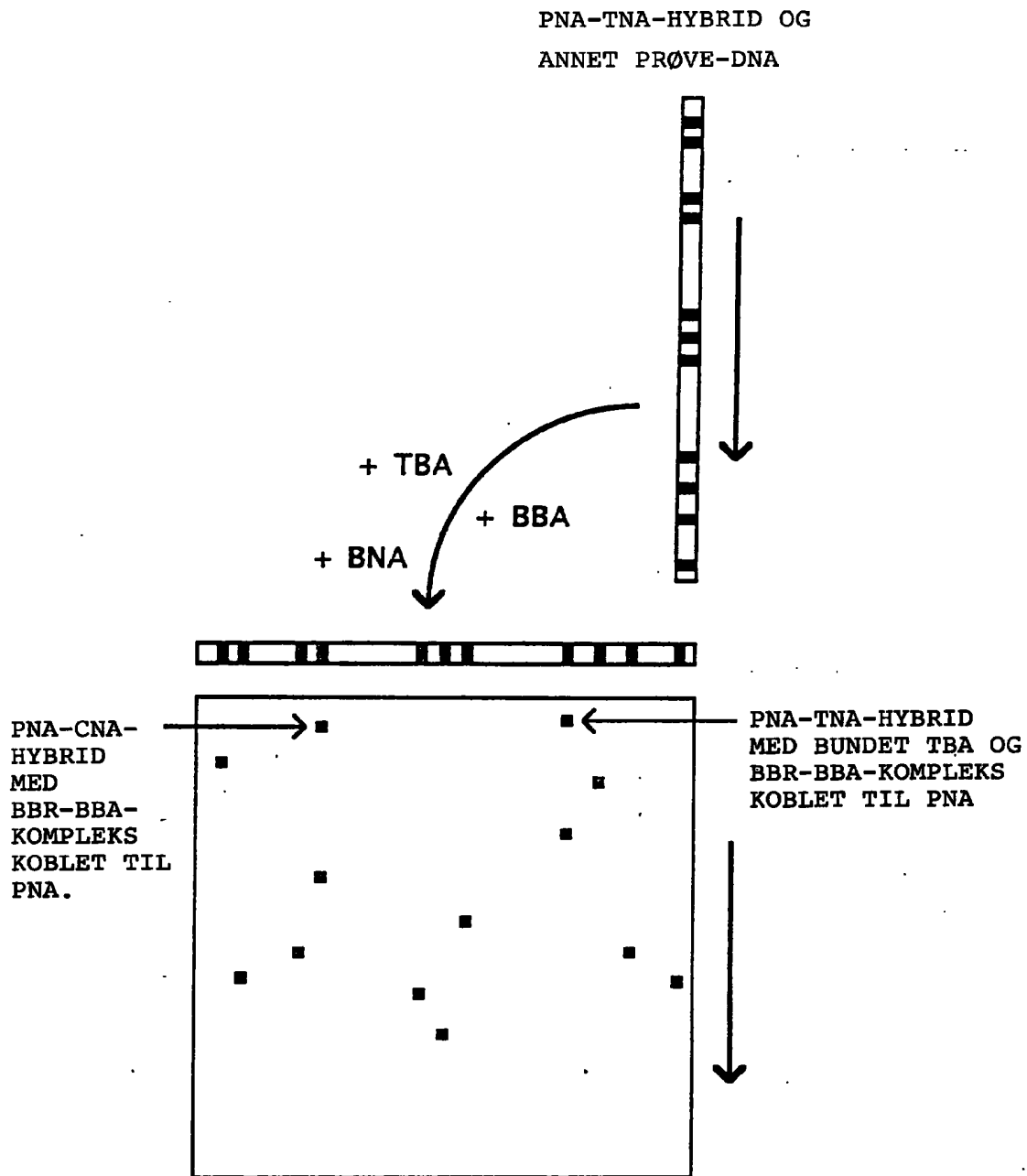


HPV-DETEKT IV

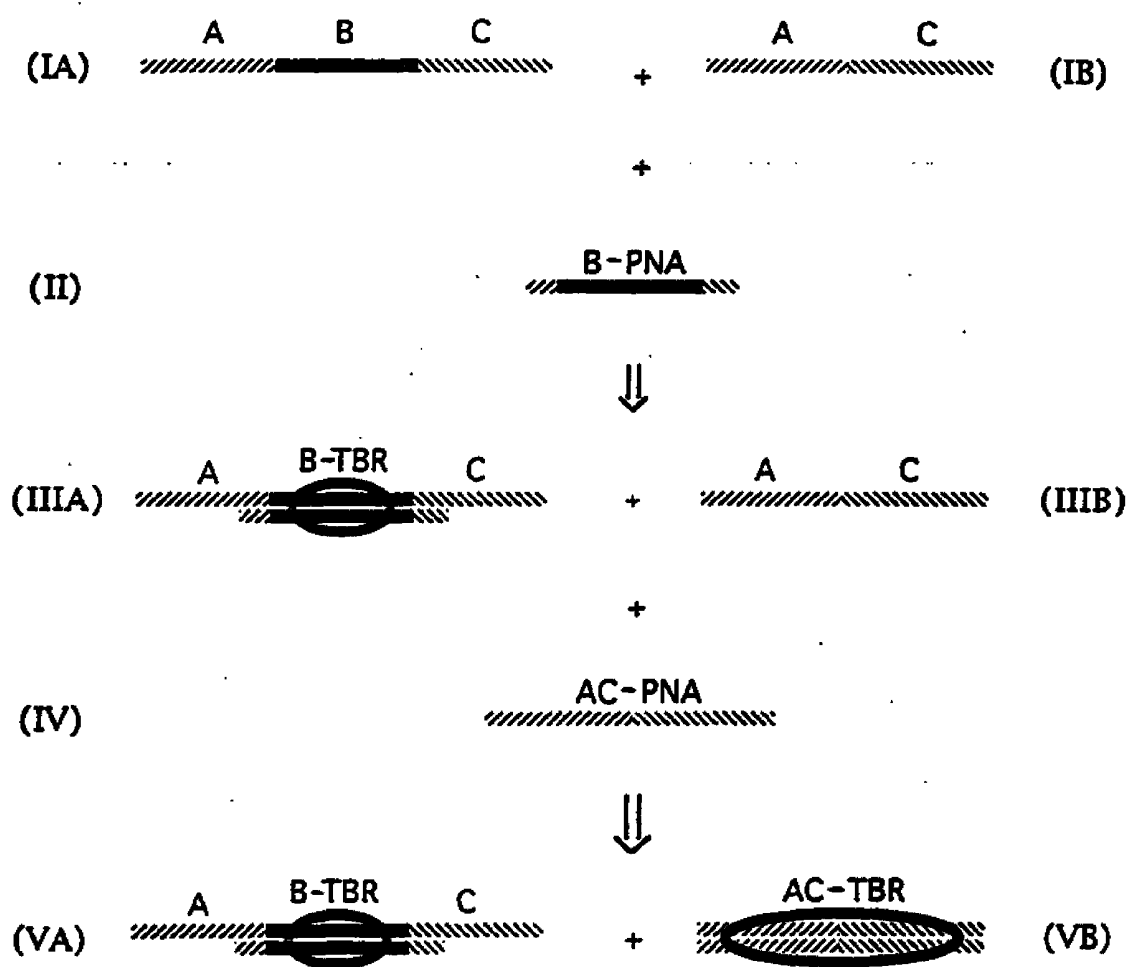
FIGUR 11



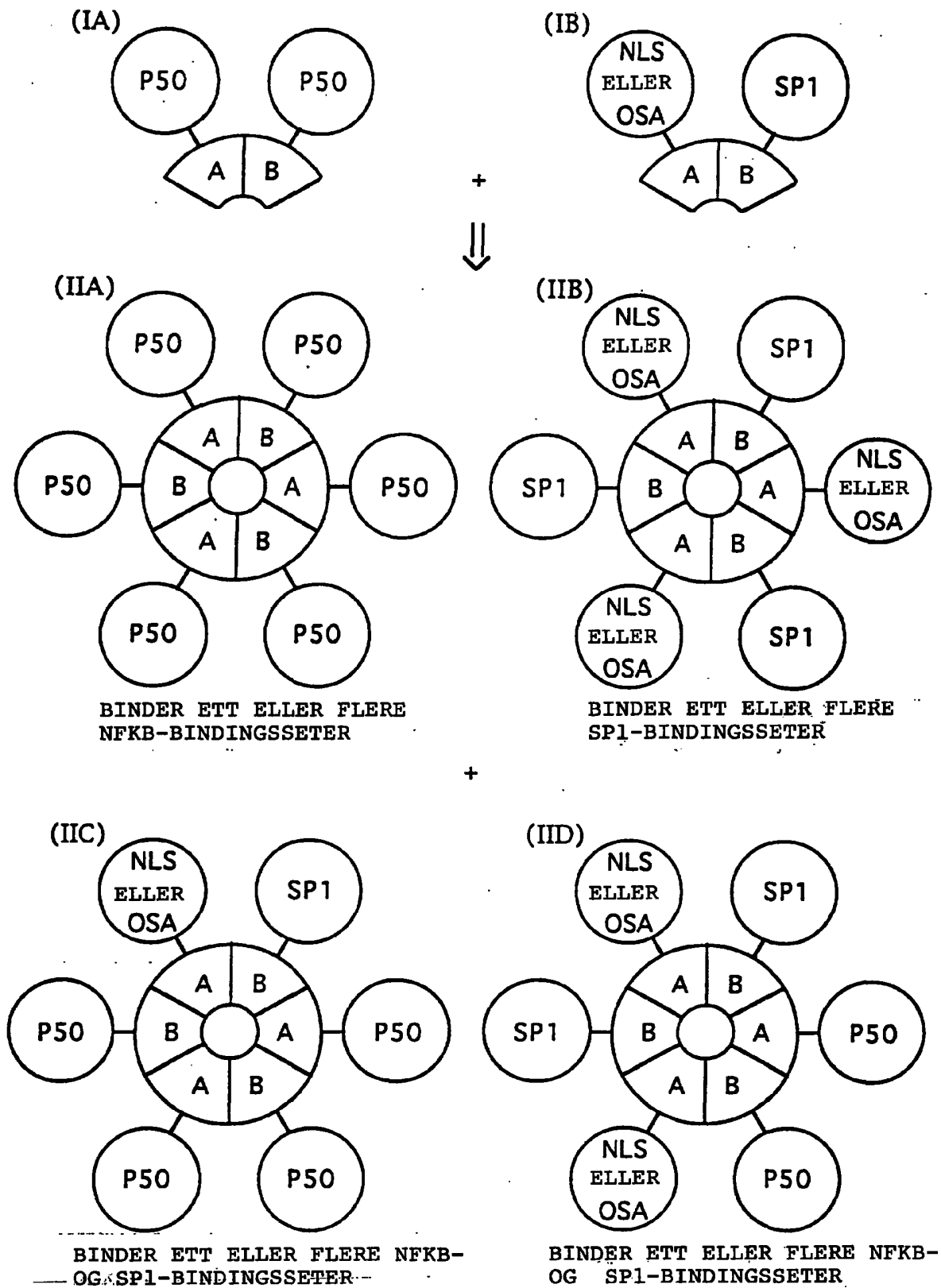
FIGUR 12A



FIGUR 12B

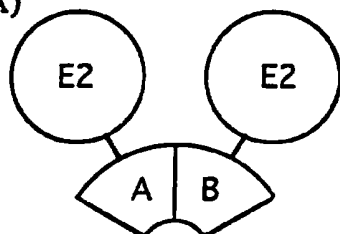


FIGUR 13

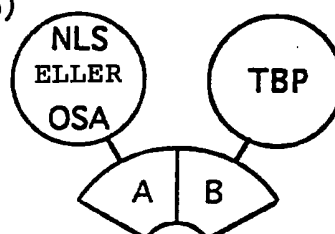


FIGUR 14

(IA)



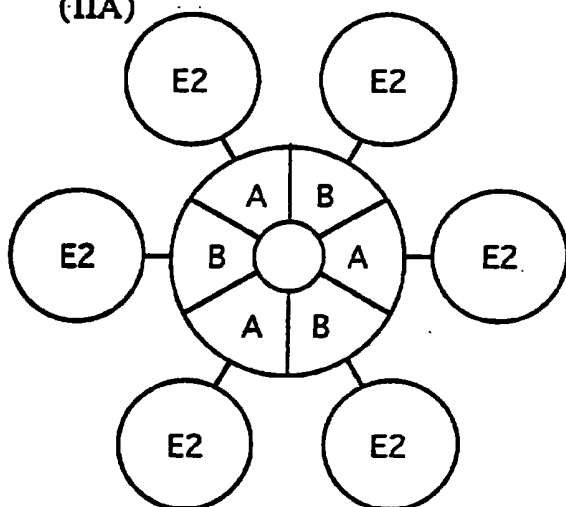
(IB)



+

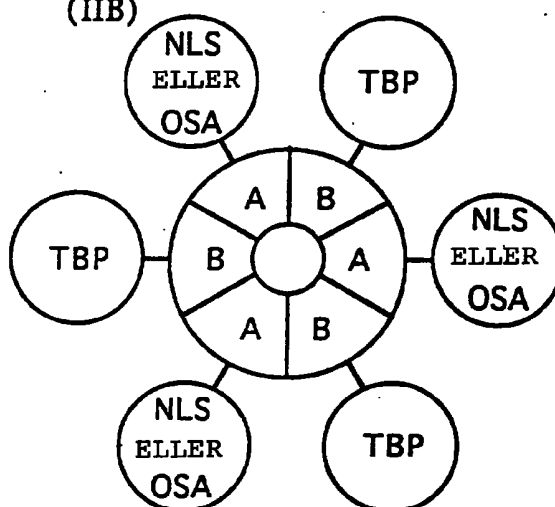


(IIA)



BINDER ETT ELLER FLERE
E2-BINDINGSSETER

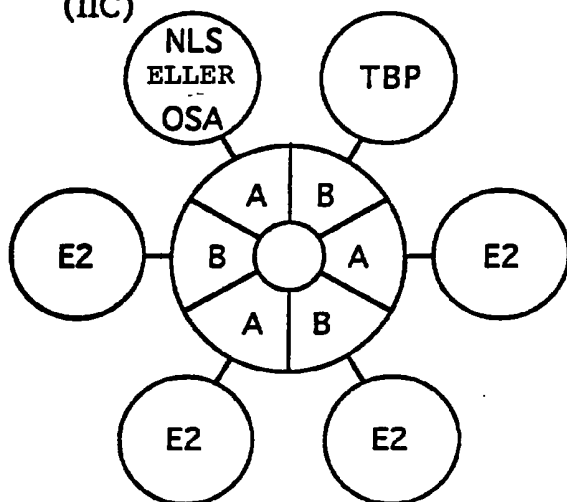
(IIB)



BINDER ETT ELLER FLERE
TATA-BINDINGSSETER

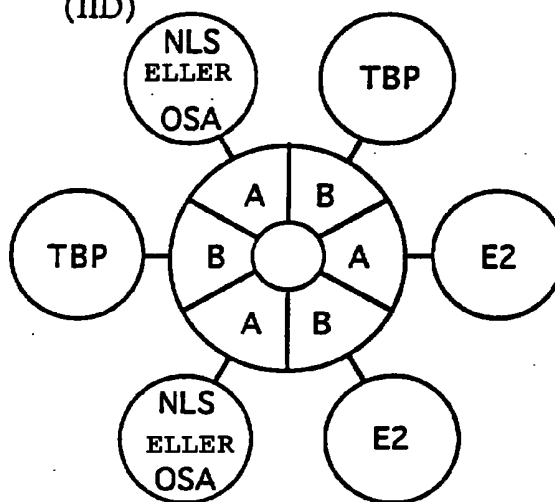
+

(IIC)



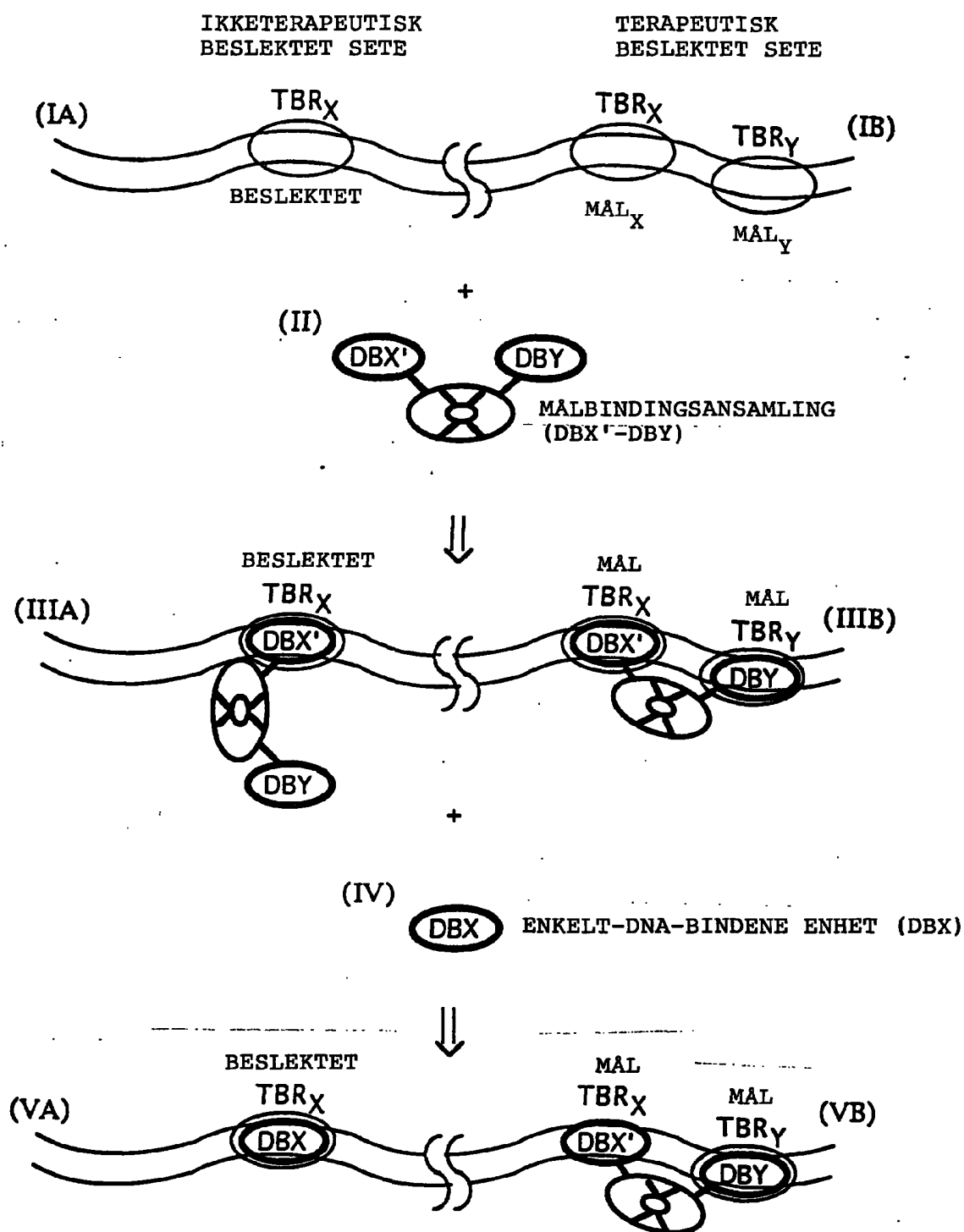
BINDER ETT ELLER FLERE E2-
OG TATA-BINDINGSSETER

(IID)



BINDER E2 OG ETT ELLER FLERE
TATA-BINDINGSSETER

FIGUR 15



FIGUR 16

