

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 955101 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 955101

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 19/00

C07K 7/23

C07K 14/59

C07K 14/725

C07K 14/295

C07K 14/155

C07K 16/28

A61K 38/24

A61K 38/04

A61K 39/395

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 28.04.1994

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.10.1995

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 21.12.1995

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 28.04.1994 PCT/US1994/004832
Internationell ansökan - International
application

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

27.04.1993 US 057166

14.04.1994 US 229275

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •United Biomedical Inc., 25 Davids Drive, Hauppauge NY 11788, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Ladd, Anna E., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Wang, Chang Yi, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •Zamb, Timothy, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Immunogeenisia LHRH-peptidirakenteita ja synteettisiä immunosysteemin yleisstimulaattoreita rokotteita varten

Immunogena LHRH-peptidstrukturer och syntetiska universalstimulatorer för immunosystemet avsedda för vacciner

Immunogeenisia LHRH-peptidirakenteita ja synteettisiä immunosysteemin yleisstimulaattoreita rokotteita varten

Tämä keksintö koskee immunogeenisia luteinisoivaa
 5 hormonia vapauttavan hormonin (LHRH) peptidejä, jotka saavat aikaan LHRH-tasojen toiminnallisen vähenemisen koirilla tai naarailla. Kun koiraspuoliset rotat immunisoidaan näillä peptideillä, seerumin testosteroni vähenee ja androgeeneistä riippuvaiset elimet surkastuvat merkitsevästi. Nämä peptidit ovat hyödyllisiä miehille/koiraille
 10 hedelmättömyyden indusoimisessa ja eturauhasen liikakasvun, androgeeneistä riippuvaisen karsinooman, eturauhas-karsinooman ja kiveskarsinooman hoidossa. Naisille/naaraille peptidit ovat hyödyllisiä endometrioosin, hyvänlaatuisten kohdun kasvaimien, toistuvien toiminnallisten munasarjakystojen ja (vakavan) premenstruaalisyndrooman hoidossa, samoin kuin estrogeenista riippuvaisen rintasyövän
 15 ehkäisyssä tai hoidossa. Nämä peptidit sisältävät auttaja-T-solun epitoopin (Th-epitoopin) ja niissä on LHRH C-päässä. Auttaja-T-solun epitooppi avustaa immuunivasteen stimuloimisessa LHRH:ta vastaan. Nämä peptidit sisältävät valinnaisesti invasiinidomeenin, joka toimii yleisenä immuunistimulaattorina.

Toiselta näkökohdaltaan tämä keksintö koskee immunogeenisiä synteettisiä peptidejä, joissa on invasiinidomeeni, auttaja-T-soluepitooppi ja peptidihapteeni, ja menetelmiä näiden peptidien käyttämiseksi sairauden hoidossa tai suojaavan immunitetin tuottamisessa. Keksinnön mukaisiin peptidihapteeneihin kuuluvat LHRH, amyliini,
 25 gastriini, gastriinia vapauttava peptidi, IgE:n CH4-peptidit, Chlamydian MOMP-peptidit, HIV:n V3-peptidit ja Plasmodium berghei peptidit.

Eturauhassyöpä on kolmanneksi yleisin miesten kuolinsyy ja yleisin pahanlaatuinen kasvaintyyppi yli 70-vuotiailla miehillä. Uusien eturauhassyöpätapausten lukumäärä
 35

on noussut tasaisesti viimeisten 20 vuoden kuluessa, ja on odotettavissa, että enemmän kuin 4 miljoonalle yli 75-vuotiaalle miehelle saattaa ensi vuosituhanen alussa kehittyä kliinisesti havaittava eturauhassyöpä (Perez et al. (1985) julkaisussa *Cancer Principles and Practice of Oncology* Vol. 9 (DeVita et al., toim.)] J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, s. 1023 - 48; Chodak et al. (1990) *Current Concepts in Prostate Cancer Diagnosis and Management*, 26th Annual Meeting, American Society of Clinical Oncology. Valitettavasti diagnoosin ajankohtana noin 40 - 50 %:lla potilaista, joille on juuri diagnosoitu eturauhassyöpä, on pitkälle kehittynyt sairaus (vaihe D), keskimääräisen elinajan ollessa noin 2,4 vuotta (Torty (1988) *Adv. Onc.* 4: 15). Näin ollen tämän sairauden voittamiseksi kehitettyjen hoitojen tulisi osoittaa tehokkuutensa niin nopeasti kuin mahdollista.

Perinteinen kehittyneen eturauhassyövän hoitotapa on ollut kirurginen kivesten poisto, ts. kastreatio, jonka Huggins ja hänen kolleegansa kehittivät varhain 1940-luvulla (Huggins et al. (1941) *Cancer Res.* 1: 293 - 297). Tämä menettely vähentää seerumin testosteronin tasoa 95 %, saa aikaan havaittavan kasvaimen taantumisen noin 45 %:lla potilaista ja sairauden stabiloitumisen vielä noin 40 %:lla potilaista. Vähintään tilapäistä kehittyneen eturauhassairauden stabiloitumista, mihin kuuluu virtsatieoireiden paranemista ja kivun vähenemistä, ilmenee noin 70 %:lla potilaista (Klein (1979) *N. Engl. J. Med.* 300: 824 - 33). Vaikka tällaiset hoidot ovat tehokkaita, erityisesti yhdistettynä estrogeenihoitoon, niihin liittyvä psykologinen trauma on sietämätön joillekin potilaille.

Yli 95 % testosteronista tuotetaan kiveksissä. Luuteinisoivan hormonin (LH) erittyminen aivolisäkkeestä säätelee kivesten Leydigin soluissa tapahtuvaa testosteronin tuotantoa. LH:n erittymistä yhdessä follikkelia stimuloivan hormonin (FSH) kanssa säätelee vuorostaan LHRH:n

sykäyksittäin tapahtuva vapautuminen hypotalamuksesta (katso esimerkiksi Paulsen (1974) kirjassa Textbook of Endocrinology (Williams, toim.) Saunders, Philadelphia, PA, s. 323 - 367). Yritykset estää LHRH:n erittymistä testosteronin vaikutuksen vähentämiseksi androgeeneista riippuvaisissa elimissä, esim. eturauhasessa, tai muiden tämän reitin osien estäminen, ovat osoittautuneet terapeuttiseksi vaihtoehtoiksi eturauhassyövän hoidoissa, mukaanluettuna hoito estrogeeneilla tai LHRH-analogeilla. Valitettavasti terapeuttiset annokset estrogeeneja voivat aiheuttaa huomattavia sivuvaikutuksia, kuten sydämen- ja verisuonten häiriöihin liittyvä kuolleisuus, gynekomastia, pahoinvointi, natriumin pidäytyminen ja impotenssi (Blackard (1975) Can. Chem. Rep., 59: 225 - 7). Hoito LHRH-analogeilla, kuten Leuprolidilla tai gosereliinilla, aiheuttaa lopulta seerumin testosteronin vähenemisen; siihen liittyvä seerumin LH:n ja FHS:n tasojen nousu aluksi (450 ja vastaavasti 250 %) aiheuttaa kuitenkin kivuliaan tilan, joka tunnetaan "leimahdusilmiönä" ("flare up phenomena"), jossa ilmenee tilapäistä seerumin testosteronin lisääntymistä, ja esiintyy muita oireita (Crawford et al. (1991) Urol. Clin. N. A. 18: 55 - 63). Lisäksi hoito LHRH-analogeilla voi sekoittaa mahan ja suoliston toiminnan ja aiheuttaa kuumia aaltoja.

Aktiivisen immunisaation LHRH:ta vastaan on kauan tiedetty käynnistävän monia vaikutuksia, joihin kuuluvat seerumin ja aivolisäkkeen LH- ja FSH-tason aleneminen, seerumin testosteronin väheneminen, spermatogeneesin estyminen ja sukupuolirauhasten ja avustavien sukupuolielinten palautuvan surkastumisen aiheutuminen. (Katso esimerkiksi, Fraser et al. (1974) J. Endocrinol. 63: 399 - 405; Giri et al. (1991) Exp. Molec. Pathol. 54: 255 - 264; Ladd et al. (1989) J. Reprod. Immunol. 15: 85 - 101; ja viitteet, joihin on viitattu näissä).

Androgeenihormonikaskadiin puuttumista immunologisesti voidaan käyttää myös endometrioosin hoidossa naisilla. Tämä sairaus on toiseksi yleisin hedelmättömyyden syy naisilla infektion indusoiman hedelmättömyyden jälkeen.

5 Estrogeeni välittää kohdunulkoista endometrioosikudosten kehittymistä ja ylläpitoa kohdun lihasten ulkopuolella. Koska LHRH säätelee aivolisäkkeen etuosan FSH:n tuotantoa, mikä puolestaan säätelee estrogeenin tuotantoa munasarjoissa, LHRH:n toiminnan estäminen on eräs tämän sairauden
10 hoitomuoto. Näin ollen, samoin kuin eturauhassyövän, estrogeenin aikaansaamien rintakasvaimien tulisi myös olla herkkiä LHRH-immunoterapialle.

Sen lisäksi että androgeenihormonikaskadin säätely immunologisen väliintulon kautta tarjoaa hoidon joukolle
15 vakavia sairauksia sekä miehille että naisille, se tarjoaa myös keinon säädellä kummankin sukupuolen hedelmällisyyttä. Koska LHRH säätelee sekä testosteronin tuotantoa, mikä säätelee sperman muodostusta, että estrogeenin tuotantoa, mikä aiheuttaa munasolujen kypsymisen, LHRH:n toiminnan
20 estäminen immunologisesti johtaa palautuvaan hedelmättömyyteen. Lisäksi LHRH:iin perustuva immunoterapia tarjoaa keinot palautuvalle ehkäisylle koiras- ja naaraspuolisille kotieläimille (esim. koirille, kissoille, hevosille ja kaniineille), samoin kuin se lieventää ei-toivottua androgeenien aikaansaamaa käytöstä, kuten kiimaa, reviiirin merkitsemistä ja aggressiota. Lopuksi, immunologisella kastroatiolla (esim. vasta-aineisiin perustuva LHRH:n toiminnan inhibitio) on sovellutuksia lihakarjaelinkeinoille.
25 Koiraita ei prosessoida ensiluokkaiseksi lihaksi, koska niiden lihassa on epämiellyttävä haju ja maku, mikä johtuu veressä kiertävästä testosteronista (esim. boar taint, 'karjun merkki'). Koska koiraspuolisten ravintoeläinten mekaanista kastroidia ei enää pidetä inhimillisesti hyväksyttävänä, immunologinen kastroatio tarjoaa hyväksyttävän vaihtoehdon tälle käytännölle.
35

Useita LHRH:n immunogeenisiä muotoja on testattu. LHRH on yhdistetty esimerkiksi adjuvantteihin tai konjugoitu proteiiniin immunologisen tehon lisäämiseksi. Nämä adjuvantit ovat kuitenkin olleet sopimattomia ihmisten
 5 käyttöön, ja proteiinikantajat ovat liian kalliita suuren mittakaavan käyttöä varten. Lisäksi tehokas immunisointi LHRH:lla riippuu konjugaatiokohdasta LHRH:n ja kantajan välillä. Kantajaproteiinin (difteriatoksiini tai tetanus-
 10 toksoidi) konjugointi LHRH:n aminopäähän tuotti tehokkaamman rokotteen immunisointia ja ehkäisyä varten verrattuna koostumuksiin, joissa kantajaproteiini on LHRH:n muissa konjugaatiokohdissa (Ladd et al. (1990) Am. J. Reprod. Immunol. 22: 56 - 63).

Lisäksi proteiinisidos LHRH:hon on ongelmallinen,
 15 koska pääosa immuunivasteista suuntautuu kantajaan, ennemmin kuin LHRH:hon (toksiinimolekyylin (-molekyylien) massa on paljon suurempi kuin LHRH:n). Tämä ilmiö johtaa kantajan indusoimaan immuunisuppressioon. Koska pääosa syöpä- tai endometrioosipotilaista on immunisoitu aikaisemmin
 20 difteria- ja tetanusrokotteilla osana pakollisia immunisointiohjelmia, vasta-aine ja/tai suppressori-T-soluvasteet, jotka suuntautuvat rokotteiden tetanus- tai difteriatoksiinikomponentteja vastaan, voivat häiritä seuraavia immuunivasteita toksiiniin liitettyjä LHRH-im-
 25 munogeeneja vastaan.

On siis etsitty immuunitehostajaa, joka soveltuu ihmisten käyttöön, joka on halpa, ja joka kykenee stimuloimaan varhaisen ja voimakkaan immuunivasteen LHRH:ta vastaan. Tämän immuunitehostajan tulisi samoin välttää
 30 kantajan indusoima suppressio. Siten on havaittu, että peptidit, jotka sisältävät Th-epitoopin erityisiä rakenteellisia järjestyksiä yksin tai liitettynä invasiinidomeeniin (immuunivasteen tehostaja) ja LHRH:hon (immunogeeninä), ovat tehokkaita stimuloimaan vasta-ainetuotantoa
 35 LHRH:ta vastaan.

Tämä keksintö koskee peptidejä, edullisesti syntetettisiä peptidejä, jotka kykenevät indusoimaan vastaaineita LHRH:ta vastaan, mikä johtaa LHRH-tasojen suppresioon koiraillla tai naaraillla. Nämä peptidit ovat hyödyllisiä hedelmättömyyden indusoimisessa ja eturauhasen liikakasvun, androgeeneistä riippuvaisen karsinooman, eturauhaskarsinooman, kiveskarsinooman, endometrioosin, hyvänlaatuisten kohdun kasvaimien, toistuvien toiminnallisten munasarjakystojen, (vakavan) premenstruaalisyndrooman hoidossa, tai estrogeenista riippuvaisen rintasyövän ehkäisyssä tai hoidossa. Erityisesti tämän keksinnön mukaisilla peptideillä on Th-epitoppi ja karboksyyliterminaalinen LHRH tai LHRH:n peptidianalogi. Nämä peptidit ovat tehokkaita immunogeeneina ja lääkkeinä. Tämän keksinnön mukaiset peptidit kykenevät vähentämään seerumin testosteronin tasoihin, jotka ovat verrattavissa kivesten poistolla (kastraatiolla) saavutettaviin, ja aiheuttamaan kivesten, eturauhasen ja muiden androgeenistä tai estrogeenistä riippuvaisten sukupuolielinten palautuvaa surkastumista. Nämä peptidit sisältävät valinnaisesti invasiinidomeenin immuunistimulaattorina.

Toinen tämän keksinnön näkökohta tarjoaa käyttöön rokotekoostumuksen, joka käsittää immunologisesti tehokkaan määrän peptidiä tämän keksinnön mukaisesti ja yhtä tai useampaa farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Tällaiset rokotekoostumukset ovat hyödyllisiä hedelmättömyyden indusoimisessa tai eturauhasen liikakasvun, androgeeneistä riippuvaisen karsinooman, eturauhaskarsinooman, kiveskarsinooman, endometrioosin, hyvänlaatuisten kohdun kasvaimien, toistuvien toiminnallisten munasarjakystojen, (vakavan) premenstruaalisyndrooman hoidossa, samoin kuin estrogeenista riippuvaisen rintasyövän ehkäisyssä tai hoidossa.

Vielä yksi tämän keksinnön näkökohta koskee menetelmää veressä kiertävien LHRH-määrien aktiivisuuden supp-

ressoimiseksi nisäkkäässä antamalla yhtä tai useampaa
 näistä peptideistä nisäkkäälle tiettyinä ajanjaksona ja
 olosuhteissa, jotka ovat riittävät indusoimaan toiminnal-
 lisia vasta-aineita, jotka ovat mainittua LHRH:ta vastaan
 5 suunnattuja. LHRH-aktiivisuuden suppressio on hyödyllistä
 eturauhasen liikakasvun, androgeeneistä riippuvaisen kar-
 sinooman, eturauhaskarsinooman, kiveskarsinooman, endomet-
 rioosin, hyvänlaatuisten kohdun kasvaimien, toistuvien
 toiminnallisten munasarjakystojen, (vakavan) premenstruaa-
 10 lisyndrooman hoidossa, samoin kuin estrogeenista riippu-
 vaisen rintasyövän ehkäisyssä tai hoidossa. Erityisemmin
 tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän hedelmättömyyden
 indusoimiseksi nisäkkäässä antamalla näitä rokotekoostu-
 muksia nisäkkäälle tiettyinä ajanjaksona ja olosuhteissa,
 15 jotka tuottavat hedelmättömän tilan nisäkkäälle. Samoin
 tämä keksintö koskee menetelmää androgeenista riippuvaisen
 karsinooman hoitamiseksi antamalla näitä rokotekoostumuk-
 sia nisäkkäälle tiettyinä ajanjaksona ja olosuhteissa, jot-
 ta saadaan aikaan karsinooman taantuminen tai estetään sen
 20 kasvu.

Vielä eräs tämän keksinnön näkökohta koskee immuno-
 geenista synteettistä peptidiä, jossa on noin 30 - 90 ami-
 nohappoa ja joka sisältää immunostimuloivan invasiinido-
 meenin, auttaja-T-solu (T_h) -epitoopin ja peptidihapteenin.
 25 Nämä kolme elementtiä peptidissä voidaan liittää kovalent-
 tisesti mihin tahansa järjestykseen edellyttäen, että joko
 peptidihapteenin immunoreaktiivisuus säilyy olennaisesti,
 tai että immunoreaktiivisuus voidaan luoda omaa peptidiä
 vastaan. Keksinnön mukaisiin peptidihapteeneihin kuuluvat
 30 omat peptidit LHRH, amyliini, gastriini (gastriini₃₄ ja
 gastriini₁₇), gastriinia vapauttava peptidi ja IgE-molekyy-
 lin CH4-domeenista johdettu peptidi, samoin kuin peptidit
Chlamydia trachomitiksesta, ihmisen immuunikatoviruksesta,
Plasmodium bergheistä, tai mikä tahansa muu B-soluepitoop-
 35 pi (kuten patogeenisistä organismeista) tai CTL:n (syto-

toksisen T-solun) luova epitooppi. Lisäksi näillä peptideillä on yksi tai useampi aminotermiinalinen (A)_n ryhmä, jossa A on aminohappo, α-NH₂, tripalmitoyylikysteini tai rasvahappo ja n on yhdestä noin kymmeneen. Näiden peptidien kolme elementtiä voidaan erottaa (B)_o-väliyhmillä, joissa B on toisista riippumatta mikä tahansa aminohappo ja o on nollasta noin kymmeneen.

Kun peptidihapteeni on amyliini tai sen immunogeeninen analogi, peptidi voidaan formuloida rokotteeseen ja antaa insuliinista riippumattoman diabeteksen hoitona. Tämä hoito saa aikaan verenkierron olevien amyliinitasojen vähenemisen ja/tai veren glukoositasojen vähenemisen.

Kun peptidihapteeni on gastriini₃₄, gastriini₁₇ tai sen immunogeeninen analogi, peptidi voidaan formuloida rokotteeseen ja antaa peptisten haavojen tai gastriinia vapauttavan peptidin stimuloimien kasvainten hoitona. Tämä hoito saa aikaan gastriinitasojen ja siten hapon erityksen vähenemisen.

Kun peptidihapteeni on gastriinia vapauttava peptidi tai sen immunogeeninen analogi, peptidi voidaan formuloida rokotteeseen ja antaa peptisten haavojen, gastriinia vapauttavan peptidin stimuloimien kasvainten tai keuhkosyövän hoitona. Tämä hoito saa aikaan gastriinia vapauttavan peptidin tasojen vähenemisen.

Kun peptidihapteeni on johdettu IgE:n CH4-domeenista (SEQ ID NO:79) tai sen immunogeenisestä analogista, peptidi voidaan formuloida rokotteeseen ja antaa allergian hoitamiseksi. Tämä hoito saa aikaan histamiinitasojen vähenemisen tai estää IgE:n välittämän syöttösolujen tai basofiilien aktivaation.

Kun peptidihapteeni on Chlamydia trachomatiksen pääulkomembraaniproteiinin (MOMP) muunteleva domeeni (VDI-IV) tai sen immunogeeninen analogi, peptidi voidaan formuloida rokotteeseen ja antaa immunisoitaessa Chlamydia trachomitis-

ta vastaan ja tuottamaan neutraloivia vasta-aineita sitä vastaan.

Kun peptidihapteeni on HIV V3:n pääasiallinen neutraloiva domeeni tai sen immunogeeninen analogi, peptidi
5 voidaan formuloida rokotteeseen ja antaa immuunikatosyndrooman (AIDS) hoitamiseksi tai HIV-infektion estämiseksi nostattamalla neutraloivia vasta-aineita HIV:iä vastaan.

Kuviossa 1 esitetään graafisesti keskimääräiset androgeeneista riippuvaisten elinten painot (g), jotka on
10 saatu 8 tai 11 viikon kuluttua siitä, kun rotat ($n = 5$) immunisoitiin peptideillä A - E. Kuviossa A esitetään kives-
vesten paino; kuviossa B esitetään lisäkivesten paino; kuviossa C esitetään eturauhasen ja siihen liittyneiden rak-
kularauhasten paino. Elinten painot saatiin viikolla 11
15 peptideille A - C ja viikolla 8 peptideille D ja E. Elin-
ten keskimääräistä painoa kontrollieläimillä ($n = 8$) on merkitty "Co:lla".

Kuviossa 2 esitetään androgeeneistä riippuvaisten elinten suhteelliset painot (g) reagoija- (täyteiset pyl-
vääät) ja ei-reagoija- (tyhjät pylvääät) -eläimissä, jotka
20 immunisoitiin Peptidillä A. lyhenteet: Epid., lisäkives; P+SV, eturauhanen ja rakkularauhaset.

Kuviossa 3 esitetään graafisesti korrelaatio kives-
ten painon (g) ja seerumin anti-LHRH-vasta-ainetasojen
25 (nmol/l) välillä, määritettynä radioimmunoanalyysillä (RIA) Peptidillä A tehdyn immunisaation jälkeen.

Kuvio 4 on valokuva, joka kuvaa androgeeneistä riippuvaisten elinten kokoa kontroleissa tai eläimissä,
jotka on käsitelty Peptidillä F.

Kuvio 5 esittää graafisesti anti-LHRH-spesifisten vasta-aineiden tasoja tuotettuna rotissa immunisaation
30 jälkeen immunogeenisellä LHRH-rakenteella, joka on nimetty HBSAg T_h:ksi: LHRH (peptidi A). Kussakin ryhmässä kahdeksalle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle
35 annettiin 100 µg tai 500 µg peptidiä A intramuskulaaris-

ti. Antigeeni formuloitiin Freundin täydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikolla 0 ja epätäydelliseen Freundin adjuvanttiin ja annettiin viikoilla 3 ja 6. LHRH-spesifinen vasta-aine, kuten tässä ja seuraavissa kuvissa on esitetty, määritettiin tavanomaisella radioimmunoanalyysillä ja ilmaistiin nanomooleina keskiarvona kokonais-LHRH-vasta-ainetta litraa seerumia kohti. Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta Freundin adjuvantissa käyttäen samaa immunisointiaikataulua.

10 Kuviossa 6 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa peptidin A antamisen jälkeen, kuten kuviossa 5 on esitetty. Kuten tässä ja seuraavissa kuvissa esitetään, testosteroni määritettiin seeruminäytteistä, joita käytettiin LHRH-spesifisten vasta-ainetiittereiden määrittämiseen. Seerumin testosteroni määritettiin radioimmunoanalyysillä ja ilmaistiin nanomooleina keskiarvona testosteronia litraa seerumia kohti.

20 Kuviossa 7 esitetään graafisesti eläinten kivesten painot peptidin A antamisen jälkeen, kuten kuviossa 5 on esitetty. 11 viikkoa kuvion 5 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten painot esitetään elimen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. HypoX tarkoittaa rottia, joilta on poistetty aivolisäke. Ryhmän 1 eläimet immunisoitiin Freundin adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samantyyppistä aikataulua kuin koeryhmissä.

25 Kuviossa 8 esitetään graafisesti eläinten eturauhasen ja rakkularauhasen painot peptidin A antamisen jälkeen, kuten kuviossa 5 on esitetty. Eturauhaset ja rakkularauhaset punnittiin yhdessä ja niiden yhteispainot ilmaistiin kudoksen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. HypoX tarkoittaa rottia, joilta on poistettu aivolisäke. Ryhmän 1 eläimet immunisoitiin

Freundin adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samantyyppistä aikataulua kuin koeryhmissä.

Kuviossa 9 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisten vasta-aineiden tasoja, tuotettuna rotissa immunisaation jälkeen immunogeenisellä LHRH-rakenteella, joka on nimetty HBSAg T_h: GG : LHRH:ksi (peptidi 18). Kussakin ryhmässä annettiin kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle 100 µg peptidiä 18 subkutaanisesti. Antigeeni formuloitiin Freundin täydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikolla 0 ja epätäydelliseen Freundin adjuvanttiin ja annettiin viikoilla 3 ja 6. Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta Freundin adjuvantissa käyttäen samaa immunisaatioaikataulua.

Kuviossa 10 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisen vasta-aineen tasot, tuotettuna rotissa immunisaation jälkeen HBSAg T_h: LHRH:lla (peptidi A). Kussakin ryhmässä annettiin kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle 100 µg peptidiä A subkutaanisesti. Antigeeni formuloitiin Freundin täydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikolla 0 ja epätäydelliseen Freundin adjuvanttiin ja annettiin viikoilla 3 ja 6. Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta Freundin adjuvantissa käyttäen samaa immunisaatioaikataulua.

Kuviossa 11 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu peptidiä 18 Freundin adjuvantissa. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 9 selostuksessa on esitetty.

Kuviossa 12 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu peptidiä A. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 10 selostuksessa on esitetty.

Kuviossa 13 esitetään graafisesti eläinten eturauhasen ja rakkularauhasen painot, kun niille oli annettu peptidiä 18. Koesuunnitelma on esitetty kuvion 9 selostuksessa. Eturauhaset ja rakkularauhaset punnittiin yhdessä

ja niiden yhteispainot ilmaistiin kudoksen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. Kontrollieläimet immunisoitiin Freundin adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

5 Kuviossa 14 esitetään anti-LHRH-spesifisen vasta-
 aineen tasot, jotka tuotetaan rotissa immunisoinnin jäl-
 keen MV F T_h: LHRH:lla (peptidi 19). Peptidi 19 käsittää
 F-proteiinin segmentin tuhkarokkoviruksesta liitettyä
 LHRH:n aminopäähän. Kussakin ryhmässä annettiin subku-
 10 taanisesti kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-
 Dawley-rotalle peptidiä 19 määrä, joka vastasi 100 µg:aa
 peptidiä A. Antigeeni formuloitiin Freundin täydelliseen
 adjuvanttiin ja annettiin viikolla 0, ja Freundin epätäy-
 delliseen adjuvanttiin ja annettiin viikoilla 3 ja 6.
 15 Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta Freundin
 adjuvantissa käyttäen samaa immunisointiaikataulua.

Kuviossa 15 esitetään graafisesti seerumin testo-
 steronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu peptidiä
 19. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 14 selostuksessa on
 20 esitetty. Kuviossa A esitetään tulokset eläimille, joiden
 seerumin testosteronitasot saavuttivat tason alle kastra-
 tion kynnyksarvon, kun taas kuviossa B esitetään tulokset
 eläimille, joiden testosteronitasot eivät saavuttaneet
 kastraatiotasoa viikkoon 8 mennessä.

25 Kuviossa 16 esitetään graafisesti eläinten kivesten
 painot, kun niille oli annettu peptidiä 19. Kymmenennellä
 viikolla kuvion 14 selityksessä kuvatun kokeen alkamisen
 jälkeen eläimet tapettiin ja kyseessä olevat elimet irro-
 tettiin ja punnittiin. Kivesten painot esitetään elimen
 30 painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa
 kohti. Kontrollieläimet immunisoitiin Freundin adjuvantil-
 la ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin
 koeryhmissä.

Kuviossa 17 esitetään graafisesti eläinten eturau-
 35 hasen ja rakkularauhasen painot, kun niille oli annettu

peptidiä 19. Koesuunnitelma on esitetty kuvion 14 selostuksessa. Eturauhaset ja rakkularauhaset punnittiin yhdessä ja niiden yhteispainot ilmaistiin kudoksen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti.

5 Kontrollieläimet immunisoitiin Freundin adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

Kuviossa 18 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisen vasta-aineen tasot, tuotettuna rotissa immunisaation jälkeen PT T_h2: LHRH:lla (peptidi K, SEQ ID NO:16). Peptidi K käsittää hinkuyskä-toksiinisegmentin liitettyinä LHRH:n aminopäähän. Kussakin ryhmässä annettiin subkutaanisesti kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle peptidiä K määrä, joka vastasi 100 µg:aa peptidiä A.

15 Antigeeni formuloitiin Freundin täydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikolla 0, ja Freundin epätäydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikoilla 3 ja 6. Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta Freundin adjuvantissa käyttäen samaa immunisaatioaikataulua.

20 Kuviossa 19 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu peptidiä K. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 18 selostuksessa on esitetty. Kuviossa A esitetään tulokset eläimille, joiden seerumin testosteronitasot saavuttivat tason

25 alle kastraation kynnyksarvon, kun taas kuviossa B esitetään tulokset eläimille, joiden testosteronitasot eivät saavuttaneet kastraation aikaansaamia tasoja viikolla 8.

Kuviossa 20 esitetään graafisesti eläinten kivesten painot, kun niille oli annettu peptidiä K. 10 viikkoa kuvion 18 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten painot esitetään elimen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. Kontrollieläimet immunisoitiin Freundin adjuvantilla ilman

30

antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

Kuviossa 21 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisten vasta-aineiden tasoja tuotettuna rotissa immunisaation jälkeen immunogeenisellä LHRH-rakenteella, joka on nimetty TT T_h 1: LHRH:ksi (peptidi H). Kussakin ryhmässä annettiin subkutaanisesti kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle 100 µg:aa peptidiä H. Antigeeni formuloitiin Freundin täydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikolla 0, ja Freundin epätäydelliseen adjuvanttiin ja annettiin viikoilla 3 ja 6. Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta alunassa käyttäen samaa immunisointiaikataulua.

Kuviossa 22 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu peptidiä H. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 21 selostuksessa on esitetty.

Kuviossa 23 esitetään graafisesti eläinten kivesten painot, kun niille oli annettu peptidiä H. 10 viikkoa kuvion 21 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten painot esitetään elimen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. Kontrollieläimet immunisoitiin aluna-adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

Kuviossa 24 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisen vasta-aineen tasot, jotka tuotettiin immunisoinnin jälkeen prototyyppisellä immunogeenisekoituksella, joka oli formuloitu Freundin adjuvantilla. Sekoitettiin samat määrät HBsAg T_h : LHRH:ta + MV F T_h : LHRH:ta + PT T_h : LHRH:ta + TT T_h :LHRH:ta ja formuloitiin Freundin adjuvanttiin. Kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle annettiin immunogeenisekoitusta molaarisesti ekvivalentti määrä, joka vastasi 100 µg:aa peptidiä A Freundin täydellisessä adjuvantissa viikolla 0 ja Freundin epätäydelli-

sessä adjuvantissa viikoilla 3 ja 6. Kaikki immunisoinnit tehtiin subkutaanisesti.

5 Kuviossa 25 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu prototyyppistä immunogeenisekoitusta Freundin adjuvantissa. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 24 selostuksessa on esitetty.

10 Kuviossa 26 esitetään graafisesti niiden eläinten kivesten painot, joille oli annettu prototyyppistä immunogeeniseosta Freundin adjuvantissa. 10 viikkoa kuvion 24 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten painot esitetään elimen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. Kontrollieläimet immunisoitiin Freundin adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

20 Kuviossa 27 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisen vasta-aineen tasot, jotka tuotettiin immunisoimalla prototyyppisellä immunogeenisekoituksella. Sekoitettiin samat määrät HBsAgT_h: LHRH:ta + MV F T_h:LHRH:ta + PT T_h: LHRH:ta + TT T_h: LHRH:ta ja formuloitiin alunaan. Kussakin ryhmässä annettiin kuudelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle intramuskulaarisesti molaarisesti ekvivalentti määrä immunogeeniseosta, joka vastasi 25 100 µg:aa peptidiä A viikoilla 0, 3 ja 6.

Kuviossa 28 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu immunogeeniseoksen prototyyppiä. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 27 selostuksessa on esitetty.

30 Kuviossa 29 esitetään graafisesti niiden eläinten kivesten painot, joille oli annettu prototyyppistä immunogeeniseosta. 10 viikkoa kuvion 27 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten ja 35 eturauhasen painot on ilmoitettu grammoina. Kontrollieläi-

met immunisoitiin aluna-adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

Kuviossa 30 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisen vasta-aineen tasot, tuotettuna rotissa immunisaation jälkeen Inv: HBsAg T_h : LHRH:lla (peptidi 32). Peptidi 32 käsittää segmentin Yersinian adheesiomolekyylistä, invasiinista, liitettynä auttaja T-soluepitooppiin, joka oli saatu hepatiitti-B-viruksen pinta-antigeenistä, joka oli liitetty LHRH:hon. Kussakin ryhmässä annettiin viidelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle subkutaanisesti peptidiä 32 määrä, joka vastasi 100 µg peptidiä A. Antigeeni formuloitiin alumiinihydroksidiin ja annettiin viikoilla 0, 3 ja 6. Kontrolliryhmälle annettiin muuntamatonta LHRH:ta alunassa käyttäen samaa immunisointiaikataulua.

Kuviossa 31 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu peptidiä 32. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 30 selostuksessa on esitetty.

Kuviossa 32 esitetään graafisesti eläinten kivesten painot, kun niille oli annettu peptidiä 32. 10 viikkoa kuvion 30 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten painot esitetään elimen painon keskiarvoina grammoina 100 grammaa ruumiinpainoa kohti. Kontrollieläimet immunisoitiin aluna-adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

Kuviossa 33 esitetään graafisesti anti-LHRH-spesifisen vasta-aineen tasot, jotka tuotettiin immunisoimalla immunogeenisekoituksella, joka sisälsi peptidiä H. Sekoitettiin yhtä suuret määrät Inv:HBsAg T_h : LHRH:ta + MV F T_h :LHRH:ta + PT T_h : LHRH:ta + TT T_h : LHRH:ta ja formuloitiin alunaan. Kussakin ryhmässä annettiin viidelle sukukypsälle koiraspuoliselle Sprague-Dawley-rotalle intramuskulaari-

sesti molaarisesti ekvivalentti määrä immunogeeniseosta, joka vastasi 100 µg:a peptidiä A viikoilla 0, 3 ja 6.

5 Kuviossa 34 esitetään graafisesti seerumin testosteronitasot rotissa sen jälkeen kun oli annettu immunogeeniseoksen prototyyppiä. Koesuunnitelma on sama kuin kuvion 33 selostuksessa on esitetty.

10 Kuviossa 35 esitetään graafisesti niiden eläinten kivesten painot, joille oli annettu prototyyppistä immunogeeniseosta. 10 viikkoa kuvion 33 selostuksessa esitetyn kokeen alkamisen jälkeen eläimet tapettiin ja asiaan kuuluvat elimet irrotettiin ja punnittiin. Kivesten painot on ilmoitettu grammoina. Kontrollieläimet immunisoitiin aluna-adjuvantilla ilman antigeeniä, käyttäen samanlaista aikataulua kuin koeryhmissä.

15 Tämä keksintö koskee peptidejä, edullisesti synteettisiä peptidejä, jotka kykenevät indusoimaan vasta-aineita LHRH:a vastaan, ja jotka vasta-aineet saavat aikaan aktiivisen LHRH:n tasojen suppression koiraille tai naaraille. Tätä keksintöä varten seuraavat tekijät vastaavat näiden LHRH-rakenteiden immunologisesta tehokkuudesta. Näitä tekijöitä, yksin tai yhdistelmänä, pidetään tärkeinä näkökohtina tämän keksinnön mukaisten peptidien valmistamiseksi.

25 1. Satunnaisten auttaja-T (T_h) -soluepitooppien lisääminen

Tehokkaan vasta-ainevasteen herättämiseksi immunogeenit täytyy yhdistää pääasiallisen histokompatibiliteetitilukan (MHC) II antigeeneihin. Antigeenejä ilmentävien solujen (APC:iden) tuottamat MHC-luokan II antigeenit sitoutuvat T-soluepitooppeihin, joka ovat immunogeenissä sekvenssispesifisellä tavalla. Tämän MHC-luokan II immunogeenikompleksin tunnistavat $CD4^+$ -lymfosyytit (T_h -solut), jotka aiheuttavat spesifisten B-solujen jakaantumisen, jotka puolestaan kykenevät tunnistamaan B-soluepitoopin esitetystä immunogeenista, ja niiden suorittaman B-so-

luepitoopille spesifisen vasta-aineen tuotannon. Koska LHRH on itsen (oma) molekyyli, sillä ei ole mitään tunnistettavia T_h -epitoopeja. Tällaiset epitootit voidaan saada aikaan spesifisillä sekvensseillä, jotka on johdettu mahdollisista immunogeeneistä, joihin kuuluvat jäykkäkouristustoksiini, hinkuyskätoksiini, tuhkarokkoviruksen F-proteiini ja hepatiitti-B-viruksen pinta-antigeeni (HBsAg). Valitut T_h -epitootit kykenevät edullisesti saamaan esiin auttaja-T-soluvasteet monissa yksilöissä, jotka ilmentävät erilaisia MHC-haplotyypppejä. Nämä epitootit toimivat heterogeenisen populaation monissa eri yksilöissä, ja niitä pidetään satunnaisina T_h -epitoopeina. Satunnaiset T_h -epitootit tarjoavat sen etuisuuden, että useimmissa geneettisesti hajanaisten populaatioryhmien jäsenissä nousee voimakas LHRH-vasta-ainevaste.

Näin ollen tämän keksinnön mukaiset auttajaepitootit valitaan, ei ainoastaan kykynsä mukaan aiheuttaa immuunivastetta useimmissa tietyn populaation jäsenissä, vaan myös kykynsä mukaan saada aikaan muisti/takaisinkutsuvastetta. Suurin osa ihmispotilaista, jotka saavat LHRH-immunoterapiaa, on jo immunisoitu rokotteilla lastentauteja vastaan (ts. tuhkarokko + sikotauti + vihurirokko ja kurkkumätä + hinkuyskä + jäykkäkouristusrokotteet) ja mahdollisesti uudemmalla hepatiitti-B-virusrokotteella. Nämä potilaat on näin ollen aikaisemmin altistettu useammalle kuin yhdelle immunogeeniseoksessa olevista T_h -epitoopeista. Aikaisemman altistuksen T_h -epitoolle immunisoimalla tavallisilla rokotteilla tulisi herättää T_h -soluklooneja, jotka pystyvät lisääntymään välittömästi annettaessa LHRH-immunoterapiaa (ts. muistivaste), stimuloiden siten nopean B-soluvasteen LHRH:lle. Lisäksi T_h -epitoopeilla vältetään kaikki patogeeneille spesifiset B-solu ja/tai suppressori-T-soluepitootit, jotka voisivat johtaa kantajan indusoimaan immuunisuppressioon, mikä ongelma kohdataan, kun käy-

tetään toksiinimolekyyliä nostattamaan auttaja-T-soluvasteita.

2. Välikejäännösten lisääminen immunogeenisten elementtien väliin

5 Immunogeenisyyttä voidaan parantaa lisäämällä välijäännöksiä (esim. Gly-Gly) satunnaisten T_h -epitoppien ja LHRH:n väliin. Sen lisäksi että erotetaan fyysisesti T_h -epitoppi B-soluepitopista (ts. LHRH:sta), glysiinijäännökset voivat rikkoa kaikki keinotekoiset sekundäärirakenteet, joita T_h -epitopin liittäminen LHRH:hon on luonut, ja siten poistaa T- ja/tai B-soluvasteiden välisiä häiriöitä. Ero konformaatiotasolla auttajaepitopin ja vasta-aineen herättävän domeenin välillä sallii siten tehokkaampien vuorovaikutusten syntymisen kyseessä olevan immunogeenin ja oikeiden T_h - ja B-solujen välillä.

3. T_h -epitopista muunnettujen immunogeenien sekoittaminen saamaan aikaan laajakirjainen tehokkuus

Keksinnön mukaiset T_h -epitopit ovat satunnaisia, mutta eivät universaaleja. Tämä ominaisuus tarkoittaa, 20 että T_h -epitopit ovat reaktiivisia suuressa osassa ulkosiittoista populaatiota, joka ilmentää eri MRC-antigeenejä (reaktiivisia 50 - 90 %:ssa populaatiosta), mutta eivät kaikissa sen populaation jäsenissä. Jotta tarjottaisiin käyttöön kattava, kaikenkattavaa lähestyvä immuno-reaktiivisuus LHRH:ta vastaan, voidaan valmistaa immunoterapeuttinen rakenne, LHRH-rakenteen yhdistelmä eri T_h -epitoppien kanssa. Esimerkiksi yhdistelmä, jossa on neljä T_h -epitoppi:LHRH-rakennetta, mukaanluettuna satunnaiset T_h -epitopit tetanus- ja pertussistoksiineista, tuhkarokkovi- 25 ruksen F-proteiinista ja HBsAg:sta, on erityisen tehokas. Ekvimolaariselta pohjalta tämä seos on laajemmin tehokas kuin mikään seoksessa oleva yksittäinen immunogeeni. 30

4. T_h -epitopikirjastojen luominen

Toisessa suoritussuodossa T_h -epitoppi voi olla järjestetty synteettinen antigeenikirjasto (SSAL), kuten US- 35

patenttihakemuksessa, jonka sarjanumero on 143 412, hakemispäivä 26.10.1993, on kuvattu; tämä julkaisu esitetään tässä kirjallisuusviitteenä. Tätä teknologiaa voidaan käyttää toisena, ja ehkäpä tehokkaampana tapana saavuttaa

5 universaali immuunireaktiivisuus (verrattuna satunnaisten auttajaepitooppi-rakenteiden sekoittamiseen). SSAL koostuu järjestetystä sarjasta, kahdesta useaan triljoonaan erilaista, mutta läheistä peptidiä, jotka on tehty samanaikaisesti yhdellä automatisoidulla peptidisynteesillä.

10 Kirjastossa olevien peptidien sekvenssit määritellään sarjaksi peptidejä tai proteiinidomeeneja, joilla on yhteisiä rakenteellisia ja/tai toiminnallisia ominaisuuksia. Järjestys minkä tahansa SSAL:n sisällä tehdään muuntelemattomilla aminohappojäännöksillä, jotka määrittelevät kirjaston ydinsekvenssin. Ydinsekvenssi määritellään linjaamalla läheisten epitooppien perheen primääriset aminohapposekvenssit, tunnistamalla muuntelemattomat lokukset linjassa ja spesifiset aminohappojäännökset, jotka ovat kussakin muuntelemattomassa asemassa. SSAL syntetoidaan sitten konservoituneiden aminohappojäännösten ollessa muuntelemattomissa asemissa, kuten linjauksella on määritelty. Degeneraation kirjastossa määrittelevät ne lokukset linjauksessa, joissa on eri aminohappojäännökset, kun verrataan järjestettyjä epitooppeja. Degeneroitumisaste järjestelmässä määritellään muuntelevien lokusten lukumäärällä linjauksessa ja kussakin muuntelevassa lokuksessa havaittujen eri aminohappojen määrällä.

Satunnaiset T_h -epitoopit sisältyvät järjestettyihin kirjastoihin, koska niillä on usein yhteisiä rakenteellisia ominaisuuksia, jotka perustuvat samanlaisiin tunto-

30 merkkisekvensseihin. Satunnaisten T_h -epitooppien koko vaihtelee esimerkiksi noin 15:stä noin 30 jäännökseen. Amfipaattiset heliksit ovat yhteinen piirre T_h -epitoopeille. Amfipaattinen heliksi määritellään alfa-helikaalisen rakenteen perusteella hydrofobisten aminohappojäännösten

35

dominoidessa heliksin yhtä pintaa ja varauksellisten ja polaaristen jäännösten dominoidessa ympäröiviä pintoja. T_h -epitoopit sisältävät tavallisesti myös muita aminohapporakenteita, kuten: Gly tai varauksellinen jäännös, jota seuraa kahdesta kolmeen hydrofobista jäännöstä, joita puolestaan seuraa varauksellinen tai polaarinen jäännös. Tämä rakenne määrittelee Rothbard-sekvenssit. T_h -epitoopit noudattavat usein 1, 4, 5, 8 -sääntöä, jossa positiivisesti varautunutta jäännöstä seuraa hydrofobinen jäännös neljännessä, viidennessä ja kahdeksannessa asemassa varauksellisen jäännöksen jälkeen. Koska kaikki nämä rakenteet koostuvat tavallisista hydrofobisista, varautuneista ja polaarista aminohapoista, kukin rakenne voi esiintyä samanaikaisesti yhdessä T_h -epitoopissa.

15 5. Invasiinidomeenin liittäminen kovalenttisesti adjuvantiksi

Patogeenisten bakteerien *Yersinia* spp. invasiinit ovat ulkomembraaniproteiineja, jotka välittävät bakteerin tunkeutumista nisäkässoluihin (Isberg ja Leong, 1990 Cell 60: 861). Bakteerin invaasion viljeltyihin nisäkässoluihin osoitettiin vaativan vuorovaikutusta *Yersinian* invasiinimolekyylin ja useiden viljellyissä soluissa olevien integriinien $\beta 1$ -perheen lajeihin (Tran Van Nhieu ja Isberg, 1991, J. Biol. Chem. 266: 24367). Koska T-lymfosyyteissä on runsaasti $\beta 1$ -integriinejä (erityisesti aktivoituissa immuuni- tai muisti-T-soluissa), invasiinin vaikutuksia ihmisen T-soluihin on tutkittu (Brett et al. 1993, Eur. J. Immunol. 23: 1608). Ajatellaan, että integriinit edistävät immuuni-T-solujen kulkeutumista verisuonista ulos ja sidekudosten läpi antigeenien altistuskohtiin vuorovaikutuksellaan solunulkoisten matriisiproteiinien kanssa, joihin kuuluvat fibronektiini, laminiini ja kollageeni. Invasiinimolekyylin karboksipään havaittiin olevan yhteisstimuloitavissa ihmisen luonnollisten $CD4^+$ T-solujen kanssa epäspesifisen mitogeenin, anti-CD3-vasta-

aineen läsnä ollessa, mikä aiheuttaa huomattavaa lisääntymistä ja sytokiinien ilmentymistä. Tunnistettiin myös spesifinen invasiinidomeeni, joka on vuorovaikutuksessa β 1-integriinien kanssa, aiheuttaen tämän stimulaation (Brett et al., 1993). T-solujen tähän domeeniin liittyvien osoitettujen yhteisstimuloivien ominaisuuksien vuoksi se voidaan liittää satunnainen T_h -epitoppi: LHRH -rakenteisiin.

6. Pam₃Cys:n liittäminen kovalenttisesti adjuvantiksi

Monet Gram-negatiivisten bakteerien ulkomembraaniproteiineista ovat sekä lipidein muunneltuja että erittäin immunogeenisiä. Ilmeisen korrelaation kovalenttisen lipidiliitoksen ja immunogeenisyyden johdosta tripalmitoyylis-glyserolikysteiini (Pam₃Cys), bakteerien membraaniproteiineissa yleinen lipidi, voidaan kytkeä synteettisiin peptideihin, jotka edustavat joko B-solun tai sytotoksisen T-solun epitoppeja. Koska tämä lipidiliitos tuo esiin merkitseviä immuunivastetta tehostavia reaktioita, voidaan valmistaa lipidimuunneltuja satunnaisen T_h -epitopin: LHRH:n -rakenteita. Tällaiset lipidimuunnetut rakenteet ovat immunogeenisempiä kuin saman peptidin muuntamaton versio.

7. Adjuvantti/emulsiokoostumuksen valitseminen vasta-ainevasteen maksimoimiseksi

T_h -epitoppi: LHRH -rakenteiden (esim. invasiinidomeeni ja/tai Pam₃Cys) kovalenttisiin muunnoksiin liittyvien merkittävien tehostavien ominaisuuksien lisäksi on tutkittu eksogeenisten adjuvantti/emulsiokoostumusten lisäämistä, jotka maksimoivat immuunivasteet LHRH-immunoterapeuttisia immunogeenejä vastaan. Arvioidut tehostajat ja kantajat ovat niitä, joita: (1) on käytetty menestyksellä faasin I kokeissa ihmisillä; joilla (2) esikliinissä turvallisuustutkimuksissa havaitun reaktogeenisyyden puutteen perusteella on mahdollisuuksia tulla hyväksy-

tyiksi käytettäväksi ihmisille; tai jotka (3) on hyväksytty käytettäväksi ravinto- ja seuraeläimille.

8. Muunnettujen immunogeenien antaminen mikropartikkeleissa

5 Immunoterapiamentelmät, jotka saavat aikaan maksimaaliset immuunivasteet vähimmän määrän annoksia antamisen jälkeen, ihanteellisesti yhdellä annoksella, ovat erittäin toivottavia. Tämä voidaan saavuttaa sulkemalla immunogeeni mikropartikkeleihin. Absorboituva ommelmateriaali poly(laktidi-ko-glykolidi)-kopolymeeri voidaan muotoilla mikropartikkeleiksi, jotka sisältävät immunogeeniä. Oraa-

10 lisen tai parenteraalisen annon jälkeen, mikropartikkelien hydrolyysi in vivo tuottaa ei-toksisia sivutuotteita, maito- ja glykoli happoja, ja vapauttaa immunogeenin sieppausprosessilla suurimmaksi osaksi muuttumattomana. Mikropartikkelien hajoamisnopeutta ja niihin pidätetyn immunogeenin vapautumista voidaan kontrolloida useilla parametreillä, joihin kuuluvat (1) partikkelien muodostuksessa käytettyjen polymeerien suhde (Partikkelit, joissa on suuremmat koglykolidikonsentraatiot hajoavat nopeammin); (2)

20 partikkelien koko (pienemmät partikkelit hajoavat nopeammin kuin suuremmat) ja (3) pidätystehokkuus (partikkelit, joissa on suuremmat konsentraatiot niiden sisään suljettua antigeenia, hajoavat nopeammin kuin partikkeli, jossa on pienempi lasti). Mikropartikkelikoostumukset voivat tarjota käyttöön myös primaarisia ja myöhempiä tehosteimmunisaatioita yhtenä antokertana sekoittamalla immunogeeniä sisältäviä mikropartikkeleja, joilla on eri vapauttamisnopeudet. Yhden annoksen koostumukset, jotka

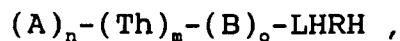
25 kykenevät vapauttamaan antigeenia aikavälillä vähemmän kuin yksi viikko ja enemmän kuin kuusi kuukautta, voidaan saada helposti aikaan (katso esimerkiksi US-sarjanumero 201,524, jättöpäivä 25.2.1994). Lisäksi mikropartikkeleihin pidätettyjen satunnaisten T_h -epitoppien: LHRH-immunogeenien luovuttaminen voi olla tehokkaampaa kun mikro-

30
35

partikkelinen immunogeeni on sekoitettu eksogeenisen ajdುವantín/emulsiokoostumukset kanssa.

Tämän keksinnön mukaiset peptidit sisältävät auttaja-T-solun epitoopin (Th-epitoopin) ja karboksyyli-terminaalisen LHRH:n. Lisäksi näiden peptidien LHRH voi olla korvattu LHRH:n immunogeenisellä analogilla.

Tämän keksinnön mukaisia peptidejä edustaa kaava



10

jossa A on toisista riippumatta aminohappo, α -BH₂, tripalmitoyylikysteiiniryhmä, rasvahappo, invasiinidomeeni tai vastaavan invasiinidomeenin immunostimuloiva analogi; B on aminohappo; kukin Th on toisista riippumatta aminohapposekvenssi, joka käsittää auttaja-T-soluepitoopin tai sen immuunitehostaja-analogin tai sen segmentin; LHRH on luteinisoivaa hormonia vapauttava hormoni tai sen immunogeeninen analogi; n on yhdestä noin kymmeneen; m on yhdestä noin neljään ja o on nollasta noin kymmeneen.

20

Tämän keksinnön mukaisissa peptideissä on noin 20 - 100 aminohappojäännöstä, edullisesti noin 20 - 50 aminohappojäännöstä ja vielä edullisemmin noin 20 - 35 aminohappojäännöstä. Vielä yhdessä edullisessa suoritusmuodossa peptidissä on noin 25 - 40 aminohappojäännöstä.

25

Kun A on aminohappo, se voi olla mikä tahansa ei-luonnollinen aminohappo tai mikä tahansa luonnollisesti esiintyvä aminohappo. Ei-luonnollisiin aminohappoihin kuuluvat, mutta eivät rajoitu näihin, β -alaniini, ornitiini, norleusiini, norvaliini, hydroksipropiini, tyroksiini, gamma-aminovoihappo, homoseriini, sitrulliini ynnä muut.

30

Luonnollisiin aminohappoihin kuuluvat alaniini, arginiini, asparagiini, asparagiinihappo, kysteiini, glutamiinihappo, glutamiini, glysiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, lysiini, metioniini, fenyylialaniini, proliini, seriini, treoniini, tryptofaani, tyrosiini ja valiini. Lisäksi kun

35

m on suurempi kuin yksi, ja kaksi tai useampi A-ryhmistä on aminohappoja, kukin aminohappo on toisista riippumatta sama tai eri aminohappo.

5 Kun A on tripalmitoyylikysteini (Pam₃ Cys) -ryhmä, se toimii adjuvanttina tehostamalla Th-epitoopin immuno-
timuloivia ominaisuuksia (Weismuller et al. (1992) Int. J. Peptide Res. 40: 255 - 260, ja siinä siteeratut viitteet).
Kun A on rasvahappo, se sijaitsee tavallisesti peptidin
aminopäässä. Lisäksi kun yksi osa A:sta on rasvahappo, on
10 lisäksi 2 tai 3 muuta aminohappoa A-osana. Tässä käytetty-
nä rasvahappojen hiilivetyketjun pituus on 8 - 24 hiilia-
tomia. Hiilivetyketju voi olla saturoitunut tai saturoitu-
maton.

Kun A on invasiinidomeeni, se on immuunistimuloiva
15 epitooppi Yersinia-lajin invasiiniproteiinista. Tämä in-
vasiinidomeeni kykenee myös vuorovaikutukseen T-soluissa
olevien B1-integriinimolekyylien kanssa, erityisesti akti-
voiduissa immuuni- tai muisti-T-soluissa, kuten edellä on
kuvattu kohdassa 5 osassa 'Yksityiskohtainen kuvaus kek-
20 sinnöstä'. Edullisessa suoritusmuodossa invasiinidomeenin
sekvenssi on:

Thr-Ala-Lys-Ser-Lys-Lys-Phe-Pro-Ser-Tyr-Thr-Ala-Thr
Tyr-Gln-Phe (Seq ID No: 53)

25 tai sen immunostimuloiva analogi vastaavasta alueesta toi-
sen Yersinia-lajin invasiiniproteiinissa. Tällaisissa ana-
logeissa on siten substituutioita, deleetioita tai inser-
tioita mukauttamaan kannoista riippuvaa muuntelua edellyt-
täen, että analogit säilyttävät immunostimuloivat ominai-
suutensa.

30 Eräässä suoritusmuodossa n on neljä ja A on α -NH₂,
lysiini, lysiini ja lysiini tässä järjestyksessä. Toisessa
suoritusmuodossa n on yksi ja A on α -NH₂. Vielä eräässä
suoritusmuodossa m on neljä ja A on α -NH₂, invasiinidomee-
ni, glysiini, ja glysiini tässä järjestyksessä.

B:n aminohapot voivat olla luonnollisesti esiintyviä aminohappoja tai ei-luonnollisesti esiintyviä aminohappoja, kuten edellä on kuvattu. Kukin B on toisista riippumatta sama tai eri aminohappo. kun B on lysiini, voidaan muodostaa polymeeri. Esimerkiksi jos o on 7 ja kaikki seitsemän B-ryhmää ovat lysiinejä, muodostuu haarautuva heptalysyyliydin (K_4K_2K tai K -ydin), kun peptidisynteesi tehdään suojaamatta lysyyilisivuketjun ϵ -aminoryhmää. K-ytimen sisältävissä peptideissä on kahdeksan haarautumaa, joista kukin on samanlainen ja joita edustaa kaava $(A)_n-(Th)_m-(B)_o$. Lisäksi B:n aminohapot voivat muodostaa joustavan nivelen tai välikappaleen, tehostamaan immuunivastetta Th-epitooppia ja LHRH:ta vastaan. Esimerkkejä sekvensseistä, jotka koodittavat joustavia niveliä, löytyy immunoglobuliinin raskaan ketjun nivelaluelta. Joustavat nivelsekvenssit sisältävät usein runsaasti proliinia. Erään erityisen hyödyllisen nivelen tarjoaa käyttöön sekvenssi Pro-Pro-Xaa-Pro-Xaa-Pro, jossa Xaa on mikä tahansa aminohappo, ja edullisesti aspraragiinihappo. Sekvenssi Gly-Gly tarjoaa esimerkin välikappaleesta.

Th on aminohapposekvenssi (luonnollisia tai ei-luonnollisia aminohappoja), joka muodostaa Th-epitoopin. Th-epitooppi voi sisältää jatkuvan tai ei-jatkuvan epitoopin. Näin ollen kaikki Th:n aminohapot eivät ole välttämättä epitoopin osia. Vastaavasti Th-epitoopit, mukaanluettuna Th-epitooppien analogit ja segmentit, kykenevät tehostamaan tai stimuloimaan immuunivastetta LHRH:ta vastaan. Immuunidominantit Th-epitoopit ovat laajalti reaktiivisia eläin- ja ihmispopulaatioissa, joissa on hyvin monimuotoisia MHC-tyyppejä (Celis et al. (1988) J. Immunol. 140: 1808 - 1815; Demotz et al. (1989) J. Immunol. 142: 394 - 402; Chong et al. (1992) Infect. Immun. 60: 4640 - 4647). Näiden peptidien Th-domeenissa on noin 10:stä noin 50:een aminohappoa ja edullisesti noin 10:stä noin 30:een aminohappoa. Kun läsnä on monta Th-epitooppia

(ts. $n \geq 2$), kukin Th-epitoppi on toisista riippumatta sama tai eri Th-epitoppi.

Th-epitopppianalogeihin kuuluvat yhdestä noin kym-
meneen aminohapon pituiset substituutiot, deletiot ja
5 insertiot Th-epitopissa. Th-segmentit ovat Th-epitopin
viereisiä osia, jotka ovat riittäviä tehostamaan tai sti-
muloimaan immuunivastetta LHRH:ta vastaan. Esimerkki Th-
segmenteistä on sarja toisensa osittain kattavia peptide-
jä, jotka on johdettu yhdestä pitemmästä peptidistä.

10 Tämän keksinnön mukaisiin Th-epitoppeihin kuuluvat
hepatiitti-B-pinta-antigeeni - auttaja-T-soluepitoppeja
(HB_s Th), hinkuyskätoksiini - auttaja-T-soluepitopit (PT
Th), jäykkäkouristustoksiini - auttaja-T-soluepitopit (TT
Th), sikotautiviruksen F-proteiini - auttaja-T-soluepi-
15 tooppi (Mv_F Th), Chlamydia trachomitiksen pääulkomem-
braaniproteiini - auttaja-T-soluepitopit (CT T_h), kurkku-
märätoksiini - auttaja-T-soluepitopit (DT T_h), Plasmodium-
falciparumin sirkumsporotsoiitti - auttaja-T-soluepitopit
(PF T_h), Schistosoma mansonin trioosifosfaatti-isomeraasi
20 -auttaja-T-soluepitopit (TraT T_h) ja minkä tahansa näistä
T_h-epitoopeista immuunivastetta tehostavat analogit ja seg-
mentit. Esimerkkejä T_h-epitoppisekvensseistä on esitetty
alla:

25	HB _s Th:	Phe-Phe-Leu-Leu-Thr-Arg-Ile-Leu-Thr-Ile-Pro- Gln-Ser-Leu-Asp	SEQ ID NO:2
	PT ₁ Th:	Lys-Lys-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Tyr-Met-Ile-Tyr- Met-Ser-Gly-Leu-Ala-Val-Arg-Val-His-Val-Ser- Lys-Glu-Glu-Gln-Tyr-Tyr-Asp-Tyr	SEQ ID NO:3
30	TT ₁ Th:	Lys-Lys-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe- Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu	SEQ ID NO:4
	TT ₂ Th:	Lys-Lys-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp- Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu	SEQ ID NO:5
35	PT _{1A} Th:	Tyr-Met-Ser-Gly-Leu-Ala-Val-Arg-Val-His-Val- Ser-Lys-Glu-Glu	SEQ ID NO:6

	TT ₃ Th:	Tyr-Asp-Pro-Asn-Tyr-Leu-Arg-Thr-Asp-Ser-Asp-Lys-Asp-Arg-Phe-Leu-Gln-Thr-Met-Val-Lys-Leu-Phe-Asn-Arg-Ile-Lys	SEQ ID NO:7
5	PT ₂ Th:	Gly-Ala-Tyr-Ala-Arg-Cys-Pro-Asn-Gly-Thr-Arg-Ala-Leu-Thr-Val-Ala-Glu-Leu-Arg-Gly-Asn-Ala-Glu-Leu	SEQ ID NO:8.
	MV _F Th:	Leu-Ser-Glu-Ile-Lys-Gly-Val-Ile-Val-His-Arg-Leu-Glu-Gly-Val	SEQ ID NO:9
10	MV _{F2} T _h :	Gly-His-Leu-Glu-Ser-Arg-Gly-His-Lys-Ala-Arg-His-Thr-His-Val-Asp-Thr-Glu-Ser-Tyr	SEQ ID NO:42
	TT ₄ T _h :	Trp-Val-Arg-Asp-His-His-Asp-Asp-Phe-Thr-Asn-Glu-Ser-Ser-Gln-Lys-Thr	SEQ ID NO:43
15	TT ₃ T _h :	Asp-Val-Ser-Thr-His-Val-Pro-Tyr-His-Gly-Pro-Ala-Leu-Asn-His-Val	SEQ ID NO:44
	CT T _h :	Ala-Leu-Asn-His-Trp-Asp-Arg-Phe-Asp-Val-Phe-Cys-Thr-Leu-Gly-Ala-Thr-Thr-Gly-Tyr-Leu-Lys-Gly-Asn-Ser	SEQ ID NO:45
20	DT ₁ T _h :	Asp-Ser-Glu-Thr-Ala-Asp-Asn-Leu-Glu-Lys-Thr-Val-Ala-Ala-Leu-Ser-His-Leu-Pro-Gly-His-Gly-Cys	SEQ ID NO:46
	DT ₂ T _h :	Glu-Glu-His-Val-Ala-Gln-Ser-His-Ala-Leu-Ser-Ser-Leu-Met-Val-Ala-Gln-Ala-His-Pro-Leu-Val-Gly-Glu-Leu-Val-Asp-His-Gly-Phe-Ala-Ala-Thr-Asn-Phe-Val-Glu-Ser-Cys	SEQ ID NO:47
25	PF T _h :	Asp-His-Glu-Lys-Lys-His-Ala-Lys-Met-Glu-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Phe-Asn-Val-Val-Asn-Ser	SEQ ID NO:48
	SM T _h :	Lys-Trp-Phe-Lys-Thr-Asn-Ala-Pro-Asn-Gly-Val-Asp-Glu-Lys-His-Arg-His	SEQ ID NO:49
30	TraT ₁ T _h :	Gly-Leu-Gln-Gly-Lys-His-Ala-Asp-Ala-Val-Lys-Ala-Lys-Gly	SEQ ID NO:50
	TraT ₂ T _h :	Gly-Leu-Ala-Ala-Gly-Leu-Val-Gly-Met-Ala-Ala-Asp-Ala-Met-Val-Glu-Asp-Val-Asn	SEQ ID NO:51

TraT₃ T_h Ser-Thr-Glu-Thr-Gly-Asn-Gln-His-His-Tyr-Gln-
 Thr-Arg-Val-Val-Ser-Asn-Ala-Asn-Lys

SEQ ID NO:52

5 Edullisessa suoritumuodossa Th-epitoppi on HB_s Th,
 PT Th tai TT₁ Th tai MV_{F1}T_h.

10 LHRH:lla on aminohapposekvenssi on Glu-His-Trp-Ser-
 Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly (SEQ ID NO:1). Keksinnön mukaisis-
 sa LHRH-analogeissa on yhdestä noin neljään aminohappo-
 jäännöksen pituinen substituuutio, deletio tai insertio,
 edellyttäen että analogi kykenee stimuloimaan immuunivas-
 teen ristireaktiivisesti LHRH:n kanssa. Esimerkiksi kor-
 vaamalla glysiini-jäännös asemassa kuusi D-aminohapolla,
 edullisesti D-lysiinillä, saa aikaan LHRH:n immunogeenisen
 analogin (Jayashankar et al). Substituutiot ja insertiot
 15 voidaan tehdä luonnollisilla tai ei-luonnollisilla
 aminohapoilla, kuten tässä on määritelty.

20 Näin ollen tämän keksinnön mukaiset peptidit ovat
 peptidi A (SEQ ID NO: 10, taulukko 1), peptidit F - L (SEQ
 ID NO:T 11 - 17, taulukko 4) ja peptidit 18 - 41 (SEQ ID
 NO:T 18 - 41, taulukko 5). Edullisiin peptideihin kuuluvat
 peptidi A, peptidi F ja peptidi H. Vielä edullisempiin
 peptideihin kuuluvat peptidit 18, 19, 32 - 35, H ja K, ja
 kaikkein edullisimpiin 19, 32, H ja K.

25 Tämän keksinnön mukaiset peptidit voidaan tehdä
 synteettisillä kemiallisilla menetelmillä, jotka ovat alan
 tavanomaiset taidot omaavan hyvin tuntemia. Katso esimer-
 kiksi Grant, toim. (1992) Synthetic Peptides: A User's
 Guide, W. H. Freeman & Co., New York, NY, s. 382. Siten
 peptidit voidaan syntetoida käyttämällä automatisoituja
 30 Merrifield-tekniikoita kiinteäfaasisynteesille joko t-Boc
 tai F-moc-kemialla laitteella Applied Biosystems Peptide
 Synthesizer, malli 430A tai 431. K-ydinosa syntetöimisek-
 si käytetään suojaamattomia (Di(tBoc) tai Di(Fmoc)-N^α, N^ε)-
 lysiini-jäännöksiä suojatut ε-aminoryhmät sisältävien ly-
 35 siini-jäännösten paikalla Pam₃Cys:n lisäämiseksi syntetoi-

daan lipoaminohappo S-[2,3.Bis(palmitoyylioksi)-(2R)-pro-
 pyyli-N-palmitoyyli-(R)-kysteini (Pam₃Cys) kemiallisilla
 menetelmillä. Pam₃Cys on kytketty peptidiin kiin-
 teäfaasisynteesillä käyttäen Pam₃Cys-OH:ta lopullisessa
 5 kytkentävaiheessa liittämään lipoaminohappo hartsiin si-
 dottuun peptidiketjuun. Lopullisen kytkentäreaktion spesi-
 fisyyden parantamiseksi kiinteäfaasipeptidi voidaan piden-
 tää lisäämällä seriini- ja lysiinijäännökset N-päähän.

Kun haluttu peptidi on täysin rakennettu, hartsi
 10 käsitellään tavanomaisten menettelytapojen mukaisesti pep-
 tidin pilkkomiseksi hartsista ja suojaavien ryhmien eston
 poistamiseksi aminohappojen sivuketjuista. Vapaa peptidi
 puhdistetaan HPLC:llä ja karakterisoidaan biokemiallisesti,
 esimerkiksi aminohappoanalyysillä tai sekvensoimalla.
 15 Peptidien puhdistus- ja karakterisointimenetelmät ovat
 alan tavanomaiset taidot omaavan hyvin tuntemia.

Vaihtoehtoisesti pitemmät lineaariset peptidit voi-
 daan syntetoida hyvin tunnetuilla DNA-tekniikoilla. Mikä
 tahansa tavallinen DNA-tekniologian käsikirja tarjoaa yksi-
 tyiskohtaisia menettelytapoja keksinnön mukaisten peptidi-
 en tuottamiseksi. Tämän keksinnön mukaista peptidiä koo-
 dittavan geenin rakentamiseksi aminohapposekvenssi tran-
 skriptoidaan käänteisesti nukleiinihapposekvenssiksi, ja
 edullisesti käyttämällä optimoitua kooditusta sille or-
 25 ganismille, jossa geeni tullaan ekspressoimaan. Seuraavak-
 si tehdään synteettinen geeni, tyypillisesti syntetoimalla
 limittäiset oligonukleotidit, jotka koodittavat peptidiä
 ja mitä tahansa säätelyelementtejä, jos tarpeen. Synteet-
 tinen geeni insertoidaan sopivaan kloonausvektoriin ja
 30 saadaan ja karakterisoidaan rekombinantit. Peptidi eks-
 pressoidaan sitten sopivissa olosuhteissa, jotka ovat oi-
 keat valitulle ekspressiojärjestelmälle ja isännälle. Pep-
 tidin puhdistetaan ja karakterisoidaan tavanomaisilla mene-
 telmällä.

Nämä peptidit voidaan myös polymerisoida. Polymerisointi voidaan suorittaa reaktiolla laimean glutaraldehydin kanssa käyttäen tavanomaista menettelytapaa.

Peptidien tehokkuus voidaan selvittää ja analysoida injektoimalla eläimeen, esimerkiksi rottiin, ja seuraamalla immuunivastetta LHRH:ta vastaan, seerumin testosteronitasoja ja tutkimalla käsin kivekset. Koejakson päätteeksi eläimet voidaan lopettaa ja saada androgeenista riippuvaisten elinten painot. Androgeenistä riippuvaisiin elimiin kuuluvat kivekset, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhaset. Edullisessa menetelmässä tehokkuuden mittaamiseksi LHRH-rakenne formuloidaan alunaan ja injektoidaan rottiin. Tämä menetelmä on esitetty yksityiskohtaisesti esimerkeissä.

Toinen tämän keksinnön näkökohta tarjoaa käyttöön rokotekoostumuksen, joka käsittää immunologisesti tehokkaan määrän yhtä tai useampaa tämän keksinnön mukaista peptidiä ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen. Tällaisia rokotekoostumuksia käytetään menetelmissä hedelmättömyyden indusoimiseksi tai eturauhasen liikakasvun, androgeeneistä riippuvaisen karsinooman, eturauhaskarsinooman, kiveskarsinooman, endometrioosin, hyvänlaatuisien kohdun kasvaimien, toistuvien toiminnallisten munasarjakystojen, (vakavan) premenstruaalisyndrooman hoidossa, samoin kuin estrogeenista riippuvaisten rintasyöpien ehkäisyssä tai hoidossa.

Näin ollen näitä peptidejä voidaan formuloida rokotekoostumukseksi käyttämällä adjuvantteja, farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia tai muita aineosia, joita käytetään tavallisesti rokotekoostumuksissa. Tällaiset formuloinnit ovat alan tavanomaiset taidot omaavalle helposti määritettävissä, ja niihin kuuluvat koostumukset välitöntä vapautumista varten ja pitkitettyä vapautumista varten, esim. mikrokapselointi. Näitä rokotteita voidaan antaa millä tahansa tavanomaisella tavalla, joihin kuuluvat sub-

kutaaninen, oraalinen, intramuskulaarinen tai muu parenteraalinen tai enteraalinen antoreitti. Samoin rokotteet voidaan antaa yhtenä annoksena tai jakaa moniin annoksiin antamista varten. Immunisointiaikataulut ovat alan ammattilaisen helposti määritettävissä. Esimerkiksi adjuvantteihin tai emulgointiaineisiin, joita voidaan käyttää tässä keksinnössä, kuuluvat aluna, epätäydellinen Freundin adjuvantti, liposyyini, saponiini, skvaleeni, L121, emulsigeeni ja ISA 720, samoin kuin muut tehokkaat adjuvantit ja emulgointiaineet, joita on kuvattu taulukoissa 7 - 9. Edullisessa suoritustavassa adjuvantit/emulgointiaineet ovat aluna, epätäydellinen Freundin adjuvantti, liposyyinin ja saponiinin yhdistelmä, skvaleenin ja L121:n yhdistelmä tai emulsigeenin ja saponiinin yhdistelmä.

Tämän keksinnön mukaiset rokotekoostumukset sisältävät immunologisesti tehokkaan määrän yhtä tai useampaa LHRL:ta sisältävää peptidiä ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan. Tällaiset koostumukset annosyksikkömuodossa voivat sisältää noin 0,5 µg:sta noin 1 mg:aan kutakin peptidiä kiloa ruumiinpainoa kohti. Kun anto tapahtuu monena annoksena, annosyksikkömuoto jaetaan sopivasti oikeisiin määriin annosta kohti.

Rokotteet, jotka sisältävät sekoituksen kahdesta tai useammasta tämän keksinnön mukaisesta peptidistä, lisäävät immunologista tehokkuutta suuremmassa populaatiossa ja tarjoavat näin ollen käyttöön paremman immuunivasteen LHRH:ta vastaan. Esimerkiksi peptidien A, F ja H sekoitus on hyödyllinen. Edulliseen sekoitukseen kuuluvat peptidit 18, 19, K ja H; toiseen kuuluvat 32, 19, K ja H. Muita immuunivastetta stimuloivia synteettisiä peptidi-immunogeenejä LHRH:ta vastaan saavutetaan muuntamalla lipopeptideiksi, jotta tuotetaan sisäänrakennettu adjuvanttivaikutus mahdollisille rokotteille. Immuunivastetta synteettisille LHRH-peptidi-immunogeeneille voidaan parantaa antamalla ne pidätettyinä O'Haganin et al. kuvaaman tyypp-

pisiin biologisesti hajoaviin mikropartikkeleihin tai niiden pinnalle. (1991) Vaccine 9: 768 - 771. Immunogeenit voidaan kapseloida adjuvantin kanssa tai ilman sitä, mukaanluettuna kovalenttisesti kiinnittynyt Pam₃Cys (katso
 5 esimerkistä 15), ja tällaiset mikropartikkelit voidaan antaa immuunivastetta stimuloivan adjuvantin, kuten Freundin epätäydellisen adjuvantin tai alunan kanssa. Mikropartikkelit toimivat immuunivasteen tehostajina immunogeeniä vastaan ja tarjoavat ajan suhteen kontrolloidun vapautumisen yllä pidetyille tai ajoittaisille vasteille, oraalista antoa varten ja paikallista antoa varten (O'Hagan et al.,
 10 Eldridge et al. (1991) Molec. Immunol. 28: 287 - 294).

Vielä yksi tämän keksinnön näkökohta koskee menetelmää veressä kiertävien LHRH-tasojen aktiivisuuden vähentämiseksi tai suppressoimiseksi nisäkkäässä antamalla yhtä tai useampaa näistä peptideistä nisäkkäälle tiettyinä ajanjaksona ja olosuhteissa, jotka ovat riittävät indusoimaan toiminnallisia vasta-aineita, jotka ovat mainittua LHRH:ta vastaan suunnattuja. LHRH-tasojen suppressiota
 15 voidaan käyttää indusoimaan hedelmättömyyttä suppressoimalla spermatogeneesiä tai ovulaatiota. Samoin toiminnallisten, veressä kiertävien LHRH-tasojen suppressio on tehokasta hoidettaessa eturauhasen liikakasvua, androgeeneistä riippuvaista karsinoomaa, eturauhaskarsinoomaa, kiveskarsinoomaa, endometrioosia, hyvänlaatuisia kohdun kasvaimia, toistuvia toiminnallisia munasarjakystoja tai (vakavaa) premenstruaalisyndroomaa tai estrogeenista riippuvaisia rintakasvaimia (tällaisten rintakasvaimien hoitoon kuuluu niiden ehkäisy). Eläimillä toiminnallisen
 25 LHRH:n verenkierrossa olevien tasojen vaimentaminen on hyödyllistä karjun merkkien (boar taint) vähentämisessä sioilla, koirien ja kissojen kastroimisessa immunologisesti ja orien kuohitsemisessa.

Seerumin LHRH:ta voidaan määrittää radioimmunooanalysillä (RIA), entsyymiin liitetyn immunoabsorben-
 35

tin analyysillä (EIA) tai muilla tavanomaisilla menetelmillä. LHRH:n vastaiset vasta-aineet määritellään RIA:lla (katso esimerkki 2) tai EIA:lla. Seerumin testosteroni määritetään RIA:lla. Alan tavanomaiset taidot omaava voi
 5 määrittää LHRH:n aktiivisuuden suppressoimiseksi tai vähentämiseksi tarvittavan rokoteannoksen. Tällaiset koostumukset annosyksikkömuodossa voivat sisältää noin 0,5 µg:sta noin 1 mg:aan kutakin peptidiä kiloa ruumiinpainoa kohti. Kun anto tapahtuu monena annoksena, annosyksikkö-
 10 muoto jaetaan sopivasti oikeisiin määriin annosta kohti.

Erityisemmin tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän hedelmättömyyden indusoimiseksi nisäkkäässä antamalla näitä rokotekoostumuksia nisäkkäälle tai karjalle tiettyinä ajanjaksona ja olosuhteissa, jotka tuottavat he-
 15 delmättömän tilan nisäkkäälle tai karjalle. Tässä käytettynä hedelmättömällä tilalla tarkoitetaan sitä tilaa, jossa hedelmöittyminen on estynyt. Hedelmättömyyttä voidaan määrittää alalla tunnetuilla menetelmillä, esim. arvioimalla spermatogeneesiä tai ovulaatiota, samoin kuin koe-
 20 eläintulosten tilastollisella tarkastelulla. Hedelmättömyyden indikaattoreihin koiraille kuuluu seerumin testosteronin väheneminen lähelle kastraatiotasoa. Koostumukset annosyksikkömuodossa voivat sisältää noin 0,5 µg:sta noin 1 mg:aan kutakin peptidiä kiloa ruumiinpainoa kohti. Kun
 25 anto tapahtuu monena annoksena, annosyksikkömuoto jaetaan sopivasti oikeisiin määriin annosta kohti.

Samoin tämä keksintö koskee menetelmää androgeenis-
 ta riippuvaisen karsinooman hoitamiseksi antamalla näitä rokotekoostumuksia nisäkkäälle tiettyinä ajanjaksona ja
 30 olosuhteissa, jotta saadaan aikaan karsinooman taantuminen tai estetään karsinooman (lisä-) kasvu. Koostumukset annosyksikkömuodossa voivat sisältää noin 0,5 µg:sta noin 1 mg:aan kutakin peptidiä kiloa ruumiinpainoa kohti. Kun
 anto tapahtuu monena annoksena, annosyksikkömuoto jaetaan
 35 sopivasti oikeisiin määriin annosta kohti.

Peptidit, joilla on määrätty B-solun tai sytotoksisen T-solun epitooppi ja sitä välittömästi reunustavat sekvenssit, tarjoavat olennaisen komponentin synteettisen peptidi-immunogeenin tuottamiselle. Tarvittavia lisäkomponentteja, kuten tehokkaita auttaja-T-soluepitooppeja, joiden täytyy olla läsnä tarjoamaan täysimittaisen immuunivasteen, joka on välttämätön saamaan aikaan halutun biologisen vaikutuksen, ei kuitenkaan voida sisällyttää tällaisiin sekvensseihin. Universaalin synteettisen immuunistimulaattorin lisääminen huonosti antigeeniseen peptidi-immunogeeniin tarjoaa tehokkaan ratkaisun tälle ongelmalle. Universaali immuunistimulaattori, joka liitettyinä mihin tahansa peptidiin tai proteiiniin (ts. peptidihapteeniin), joka sisältää joko B-solun ja/tai sytotoksisen T-lymfosyytin (CTL) epitooppeja, saa aikaan voimakkaita immuunivasteita kytkettyä peptidiä tai proteiinia vastaan. Universaali immuunistimulaattori käsittää satunnaisen auttaja-T-solu- (T_h)-epitoopin, joka herättää immuunivasteen kytkettyä peptidiä vastaan erilaisia HLA-fenotyypppejä ilmentävän heterogeenisen populaation jäsenissä (kuten tässä edempänä on määritetty) ja Yersinian invasiini-proteiinista peräisin olevan adjuvanttipeptidisekvenssin, joka kykenee sitoutumaan spesifisesti $CD4^+$ - ja $CD8^+$ -lymfosyytteihin (kuten tässä edempänä on määritetty). Lisäksi immuunistimulaattorissa voi olla lipidiosa tai varautuneita aminohappojäännöksiä, jotka toimivat lisäten immuunistimulaattorin sitoutumisaffiniteettia biologisiin membraaneihin. Kohteena oleva peptidihapteeni voi olla itsen (oma) molekyyli, ja siten ei-immunogeeninen ilman muuntelua, kuten LHRH, jota immuunistimulaattorin antamisen jälkeen voidaan käyttää syövän tai muiden ei tarttuvien sairauksien hoitamiseksi. Peptidihapteeni voi samoin olla B-soluepitooppi, joka edustaa neutraloivia determinantteja tai CTL-epitooppipeptidejä virus-, bakteeri- tai parasiit-

tipatogeenistä, käytettäväksi rokotteenä tai immunoterapiassa.

Suurimman mahdollisen kattavuuden aikaansaamiseksi, mikä tarkoittaa suurinta mahdollista immuunivasteiden määrää geneettisesti vaihtelevassa populaatiossa (esim. niin laajapohjaista vastetta kuin mahdollista), synteettiset peptidit sisältävät invasiinidomeenin, satunnaisen T_h -epitootin ja B-soluepitootin (tai CTL-epitootin) voidaan sekoittaa yhteen ja formuloida adjuvantin ja rokotteen kantotekseen kanssa. Vaihtoehtoisesti, mieluummin kuin peptidiseoksia, peptidikirjastoja (ts. SSAL:ia), jotka edustavan satunnaista T_h -epitootia ja/tai B-solu- tai CTL-epitootia, syntetoidaan keksinnön mukaisiksi peptideiksi ja formuloidaan rokotteen antamista varten. Tämä teknologia, ts. SSAL, tarjoaa huomattavan edun sekä yksinkertaistaen valmistusta että parantaen tuotettavaa immunologista kattavuutta, verrattuna yksinkertaisiin peptidiseoksiin käytettäväksi immunogeeneinä.

Keksinnön mukaiset synteettiset peptidit tehdään automatisoidulla kemiallisella synteetillä, kuten edellä on kuvattu.

Tämän keksinnön mukaisia spesifisiä peptidihapteenoja kuvataan jäljempänä sairauksien yhteydessä, jotka voidaan parantaa immuunivasteilla tällaisia peptidejä vastaan tai tällaisten peptidien tarjoamalla immunoterapialla.

Insuliinista riippumattoman diabeteksen hoito amyliiniin pohjautuvalla immunoterapialla

Amyliinin on 37 aminohappojäännöksen sisältävä peptidihormoni, jota β -solut tuottavat Langerhansin saarekkeissa (Snake, et al 1988, J. Biol. Chem. 263:17243 - 17246). Se tuotetaan 89 aminohapon prepropeptidinä, joka pilkotaan proteolyttisesti, jotta luodaan molekyylin kypsä, aktiivinen muoto, joka amidoidaan karboksipäästä pilkkomisprosessin aikana (Cooper, et al., 1989, Biochim.

Biophys. Acta. 1014: 247 - 258). Kypsän amyliinin Cys 2:n ja Cys 7:n välissä on disulfididisidos. Täydellistä biologista aktiivisuutta varten tarvitaan sekä karboksiterminaalinen amidijäännös että disulfididisidos (Cooper, et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7763 - 7766).

5 Amyliini eritetään yhdessä insuliinin kanssa haimasta ja ne säätelevät yhdessä glukoosin aineenvaihduntaa ja hiilihydraattienergiavarastojen tuotantoa aineenvaihduntareitissä, joka tunnetaan Corin kiertona, ja joka yhdistää

10 juovikkaan lihaksen, maksan ja rasvakudoksen. Pääasiassa insuliini ajaa tämän kierron etenemishaaraa, ts. juovikkaiden lihasten glukoosin ottoa verestä ja sen konversiota glykokeeniksi. Amyliini säätelee pääasiassa käänteistä haaraa, ts. lihaksen glykokeenin pilkkoutumista laktaatiksi, joka on glykoneogeneesin ja glykokeenin tuotannon

15 substraatti maksassa. Amyliinin vallitseva vaikutus on olla insuliinin nonkompetitiivinen vastavaikuttaja luustolihaksissa ja maksassa, kun taas tämä peptidihormoni ei estä insuliinin toimintaa rasvakudoksessa.

20 Amyliinin ylituotanto liittyy insuliinista riippumattomaan diabetes mellitukseen (NIDDM), ja johtuu amyliinin kertymisestä β -soluihin liukenemattoman amyloidin muodossa. Yli 2 % USA:n väestöstä kärsii tästä tilasta, mikä tarkoittaa, että pitkälti yli 5 miljoonaa ihmistä on nykyisin sen vaivaama. Amyloidin kertyminen haimaan on myös

25 tila, joka liittyy ikääntymiseen, ja vanhuksilla, joilla on tämä tila, saattaa olla, tai voi olla olematta ilmeisiä oireita. Korkeat amyliinitasot veressä johtavat joukkoon biologisia seuraamuksia, joihin kuuluvat: glukoosin stimuloima insuliinin tuotanto haimassa inhiboituu, insuliinin stimuloiman glukoosin oton ja sen liittämisen glykokeeniksi juovikkaissa lihaksissa taso vähenee, ts. insuliiniresistenssi, joka johtuu glykokeenisyntetaasiaktiivisuuden inhibitiosta, glykogenolyysi lisääntyy juovikkaissa

30 lihaksissa, mitä välittää glykokeenifosforylaasin konver-

35

sio inaktiivisesta aktiiviseen muotoonsa, insuliinin aiheuttama inhibitio glukagonin aikaansaamaan glukosin vapautumiseen voitetaan, laktaatin vapautuminen juovikkaasta lihaksesta ja sen liittyminen glukoosein maksassa lisääntyy ja insuliinin aikaansaama maksan glukosin ulosvirtauksen inhibitio estyy. Näin ollen amyliinin yliekspression tärkein ominaisuus (amyloidin kertymisen ohella) on se, että vereen kertyy suuria määriä glukosia, mikä voi johtaa liikalihavuuteen sen yhtenä jälkitilana, koska glukosin otto ja triglyseridien muodostus rasvakudoksessa ei inhiboidu olosuhteissa, joissa amyliinia on ylimäärin. Kroonisen NIDDM:n pitkän aikavälin seuraus on saarekkeiden β -solujen toiminnan väheneminen amyloidin kertymisen vuoksi, mikä vähentää sekä toiminnallisen amyliinin että insuliinin tuottoa. Krooninen NIDDM voi johtaa pysyvään liikalihavuuteen, kudoksen hapenpuutteeseen, sokeuteen ja lisääntyneisiin tapauksiin, joissa seuraa koko elimistöön liittyvä infektiio ja jäsenen menetys.

Glukosin aineenvaihduntaan liittyvän roolinsa lisäksi amyliini matkii kalsitoniinigeenin vapauttavan peptidin (CGRP) vaikutusta toimimalla myös verisuonia laajentavana aineena. Amyliini esimerkiksi aiheuttaa lyhytaikaisen epänormaalin matalan verepaineen annettuna intravenaalisesti. Näiden kahden molekyylin homologia-aste on aminohappotasolla noin 50 %. Kumpikin on 37 aminohappojäännöstä pitkä, niissä on disulfidisilta cys 2:n ja cys 7:n välillä, ja ne ovat amidoituja karboksipäästään. Disulfididisiltaa ja karboksiterminaalista amidointia tarvitaan sekä amyliinin että CGRP:n täydellistä biologista aktiivisuutta varten. Kuitenkin riippumatta siitä, että amyliini ja CGRP muistuttavat toisiaan läheisesti, CGRP on noin 100 kertaa aktiivisempi verisuonia laajentavana aineena kuin amyliini. Amyliini on rakenteellisesti samankaltainen myös kalsitoniinien kanssa. Sillä on samanlaisia toimintoja näidenkin molekyylien kanssa. Esimerkiksi kun

jompaa kumpaa annetaan aivoihin, kumpikin suppressoi ruoan nauttimista, ja kumpikin säätelee luunsyöjäsolujen (osteoklastien) suorittamaa luiden resorptiota ja seerumin kalsiumtasoja. Kalsitoniini on jälleen kuitenkin vähintään
 5 suuruusluokan tehokkaampi näissä toiminnoissa kuin amyliini.

Jäljempänä esitetään erityisiä esimerkkejä universaalien synteettisen immuunistimulaattorin sidoksesta amyliiniin niin, että vasta-ainevasteet suuntautuvat tähän
 10 peptidihormoniin. Amyliinin toiminnan inhiboiminen nostattamalla selektiivinen immunivaste sitä vastaan aiheuttaa sen ylituotantoon liittyvän patologisen tilan, nimittäin NIDDM:n parantumisen.

Gastriinin ylituotantoon liittyvien peptisten haavojen ja syöpien hoito gastriiniin perustuvalla immunoterapialla
 15

Gastriini on hyvin karakterisoitu gastrinireseptiini-
 lineen hormoni, jonka puhdistus ja kemiallinen karakterisointi saavutettiin ensimmäisen kerran vuonna 1964 (Gregory et al., 1964, Nature 204: 931 - 933). Gastriini tuotetaan ensin 101 aminohappo pitkänä prekursorimolekyylinä, joka tunnetaan preprogastriniinina. Preprogastrini koostuu seuraavista osista, aminopäästä karboksipäähän: 21
 20 aminohappoa pitkä signaalsekvenssi, 33 jäännöstä pitkä välipeptidi, 34 jäännöstä pitkä "iso gastriini" ("big gastrin") molekyyli, Gastriini₃₄, jota seuraa 9 jäännöksen sekvenssi karboksipäässä. Signaalsekvenssi pilkotaan preprogastriniinirungosta sen tunkeutumisen aikana endoplasma-
 25 makalvostoon, tuottaen progastriniin. Trypsiinin kaltainen pilkkominen poistaa sitten välipeptidin progastriniin aminopäästä ja 6 karboksiterminaalista jäännöstä pilkotaan myös samanlaisessa prosessissa (Shields ja Blobell, 1978, J. Biol. Chem. 253: 3753 - 3756). Jäljelle jääneessä pep-
 30 tidissä, jota nimitetään glysiinillä pidentyneeksi gastriiniksi, on sekvenssi Gly-Arg-Arg karboksipäässä. Nämä
 35

kolme jäännöstä poistetaan sen jälkeen ja ison gastriinin tai gastriini₃₄:n karboksipään jäännös Phe amidoidaan (Eipper, et al., 1985, 116: 2497 - 2504). Lopuksi pilkotaan karboksipään 17 aminohappojäännöstä, jotta saadaan
 5 gastriini₁₇ (Dockray, et al., 1975, Nature 243: 770 - 772). Noin puolet prosessoiduista gastriini₃₄- ja 17-molekyyleistä, jotka havaitaan mahanportin sopessa ja pohjukais-suolella, on sulfatoitu ainoasta tyrosiinijäännöksestä (Andersen, 1984, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 168:
 10 5 - 24).

Gastriinilla on useita tärkeitä toimintoja, joista kaksi tärkeintä on gastriinihapon erityksen stimulointi ja solujen kasvun stimulointi maha-suolikanavassa. Hormoni esiintyy vähintään kahtena molekyyli-
 15 muotona, "G₃₄" ja "G₁₇" (katso taulukko 11, SEQ ID NO:t 69 ja vastaavasti 74), jotka on nimetty aminohappojäännösten ("AA") lukumäärän mukaan kussakin molekyyllissä, kuten edellä on kuvattu.

Vaikka G₃₄:n ja G₁₇:n ajatellaan olevan yhtä voimakkaita molaariselta pohjalta hapon vapautumisen stimuloijina, G₃₄ vastaa todennäköisemmin gastointestinaalisen lima-
 20 kalvon kasvun stimuloinnista ja perushappamuuden ylläpidosta mahassa. G₃₄ on pääasiallinen muoto, jota esiintyy ruoansulatusjaksojen välillä. G₃₄:n puoliintumisaika seerumissa on noin kuusinkertainen G₁₇:ään verrattuna (40 minuuttia versus 6 minuuttia), ja sitä tuotetaan sekä mahassa että pohjukais-suolella. Sitä vastoin G₁₇ on gastriinin
 25 stimuloiman hapon erityksen pääasiallinen aiheuttaja aterioiden jälkeen, mikä vastaa karkeasti 60 - 70-prosenttista gastriinin välittämästä hapon vapautumisesta.

Gastriinihappoa tuotetaan erilaistuneissa mahan soluissa, parietaalisoluissa. Parietaalisoluja voidaan stimuloida erittämään happoa asetylkoliinilla, histamiinilla ja gastriinilla, spesifisten reseptorien akti-
 30 voinnin jälkeen kuhunkin näistä yhdisteistä sitoutuvien

parietaalisolujen pinnalla. Näistä stimulaattoreista tehokkain on gastriini₁₇.

5 Mahahapon ylenmääräisen erityksen tiedetään olevan keskeinen tekijä peptisten haavojen aiheuttamassa sairaudessa, jota esiintyy kahtena muotona, pohjukaissuolen haavoina ja mahahaavoina. Antasidivalmisteet ovat yleisesti käytetty menetelmä haavojen hoidossa. Antasidikäsittelyt ainoastaan neutraloivat mahahapon sen tuotannon jälkeen, eivätkä ne ole riittävän hoitavia, koska ne eivät
10 kykene vaikuttamaan hapon tuotannon lähteeseen.

Nykyiset lähestymistavat peptisten haavojen kontrolloimiseksi ja hoitamiseksi keskittyvät sellaisten lääkkeiden suunnitteluun, jotka inhiboivat yhden tai useamman stimulaattoriyhdisteen kykyä herättää hapon tuotanto tai
15 erityys. Kaikkein tehokkain lääkeryhmä, joka on kehitetty tähän käyttöön, on ollut H₂-antagonistit (esim. Tagamet ja Zantac), jotka tukkivat histamiinin H₂ -reseptorit mahan parietaalisoluissa ja inhiboivat hapon eritystä. Nämä lääkkeet kuitenkin edellyttävät suhteellisen suuria annoksia päivittäisessä käytössä ja voivat indusoida useita ei-toivottuja sivuvaikutuksia. Niissä tapauksissa, joissa H₂-antagonistit ovat parantaneet haavoja, uusiutumisia ilmenee melkein 100 %:ssa hoidettuja yksilöitä vuoden kuluessa hoidon lopettamisesta. Ei ole löydetty yhtään menestyksessä
20 kästä antagonistia inhiboimaan peptidihormoni gastriinin toimintaa.

Paitsi että gastriini on tehokkain parietaalisolujen hapon erityksen stimuloija, se myös edistää paksusuolen karsinooman, mahan karsinooman ja mahan karsinoidien kasvua. Toinen peptidihormoni, joka on rakenteellisesti läheinen gastriinille, on kolekystokiniini (CCK). CCK stimuloi haiman karsinoomien ja keuhkojen pienisolusyöpien kasvua. Lisäksi tiettyjen maha-suolikanavan syöpien, apudoomien, on havaittu tuottavan äärimmäisen
30 suuria määriä gastriinia, kun taas joidenkin aivolisäkkeen

kasvaimien on myös havaittu tuottavan suuria määriä CCK:ta. Apudoomien aiheuttama ylenmääräinen gastriinin tuotanto stimuloi happoa erittävän mahan epiteelin hypertrofiaa, mikä johtaa ylenmääräiseen mahahapon eritykseen, peptisiin haavoihin ja neoplastisiin muutoksiin epiteelissä. Haimasolujen ylenmääräisen kroonisen CCK:n stimulaation on osoitettu indusoivan haiman hypertrofiaa, hyperplasiaa ja tiettyjä esimaligneja muutoksia.

Nykyiset gastriinin tai sille läheisen CCK:n stimuloimien kasvainten hoidot, ja gastriinia tai CCK:ta tuottavien kasvainten hoidot käsittävät pääasiassa syöpäkudoksen kirurgisen pienentämisen. Tämä lähestymistapa on jatkuvasti menestyksetön tai ei riittävä, monissa tapauksissa kasvaimia ei voida paikallistaa, tai ne ovat anatomisissa kohdissa, joissa ei voi operoida. Useimmissa tapauksissa nämä kasvaimet eivät reagoi hyvin säteilytys- tai kemoterapiahoitoihin. Tarvitaan kipeästi uusia hoitotapoja korvaamaan nykyiset menettelyt.

Terapeuttinen menetelmä näiden maha-suolihormonien (esim. gastriini₃₄, gastriini₁₇ ja CCK) biologisen aktiivisuuden neutraloimiseksi selektiivisesti tarjoaisi tehokkaan tavan kontrolloida tai estää patologistia muutoksia, jotka kohtuvat ylenmääräisestä hormonin tuotosta. Joko aktiivisella immunisoinnilla tai ennalta muodostettujen vasta-aineiden passiivisella antamisella indusoitujen gastriinin vastaisten vasta-aineiden aikaansaama gastriinitasojen kontrollointi on looginen lähestymistapa tällaisten gastriiniin liittyvien sairauksien väliintulolle. Monet ovat tehneet tällaisia yrityksiä viimeisten kahden vuosikymmenen aikana ilman suurempaa menestystä (Jaffe, B.M., et al., 1971, "Gastrin resistance following immunizations to the C-terminal tetrapeptide amide of gastrin, Surgery 69: 232 - 238; Jaffe, B.M., et al., 1970, "Inhibition of endogenous gastrin activity by antibodies to the carboxyl terminal tetrapeptide amide of gastrin",

Gastroenterology 58: 151 - 156: Jaffe et al., 1969, "Inhibition of endogenous gastrin activity by incubation with antibodies to the C-terminal tetrapeptide of gastrin. Surgery 65: 5633 - 639 ja Gevas, P.C. et al. EP0 380 230 "Immunogens against gastrin peptides"), suurimmaksi osaksi johtuen kohdesuunnatun gastriinireaktiivisuuden puutteesta ja johtuen riittämättömästi suunniteltujen gastriini-immunogeenien huonosta immunogeenisuudesta.

Tarjotaan käyttöön erityisiä esimerkkejä universaal-
lin synteettisen immuunistimulaattorin liittämistä gast-
riiniin ja sen fragmentteihin niin, että herätetään selek-
tiivisiä vasta-ainevasteita tämän peptidihormonin eri koh-
tia vastaan. Nämä spesifiset gastriinin kanssa reagoivat
vasta-aineet voivat neutraloida selektiivisesti hormoni-
peptidin biologisia aktiivisuuksia ja muita patologisia
tiloja. Gastriinin spesifinen inhibitio tai poistaminen
luomalla tehokkaita gastriinin vastaisia ja CCK:n kanssa
ristireaktiivisia vasta-aineita tarjoaa menetelmän
gastriinin tai CCK:n stimuloimien kasvainten hoitamiseksi
ja niiden kasvainten hoitamiseksi, jotka ylituottavat jom-
paa kumpaa hormonia. Tässä keksinnössä kuvattu immunotera-
peuttinen lähestymistapa on ei-invasiivinen, ei edellytä
useita toistuvia hoitoja, ei vahingoita normaalia kudosta,
ja siten aiheuttaa vähemmän sivuvaikutuksia.

**Mahahaavojen, kasvainten ja keuhkosityövän hoito
gastriinia vapauttavaan peptidiin perutuvalle immunotera-
pialla**

Gastriinia vapauttava peptidi (GRP) on 27 aminohap-
pojäännöstä sisältävä hormoni, joka on johdettu 138
aminohappojäännöstä pitkästä prepromolekyylistä (Spindel,
et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 19 - 23). GRP
on nisäkäshomologi sammakkoeläinten bombesiinille (McDo-
nald et al. 1979, Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 227
-233). Se on kaikkialla läsnä oleva hormoni, joka havai-
taan ruoansulatuskanavassa, hermojärjestelmässä ja keuh-

kotiehyessä. Ruoansulatuskanavassa se säätelee ruoansula-
 tuskanavan hormoneja, joihin kuuluvat gastriini₃₄ ja gast-
 riini₁₇ (McDonald, et al., 1983, Regul. Pept. 5: 125 -
 137). Sama hormoni säätelee keskushermostossa hypotermiaa
 5 ja hypoglykemiaa (Tache ja Brown, 1982, Trends Neurosci.
 5: 431 - 433). GRP on keuhkoissa keuhkojen neuroendo-
 kriinisoluissa (Moody, et al., 1981, Science 214: 1246
 -1248) ja sen on havaittu olevan tärkeä neuroendo-
 kriinisolujen hyperplasian merkki (Aguayo, et al., 1989,
 10 J. Clin. Invest. 84: 1105 - 1113). Se on myös merkittävä
 autokriininen kasvutekijä keuhkojen pienisolukarsinoomil-
 le, ja sen vuoksi tärkeä väliintuloterapioiden kohde keuh-
 kosyövän hoitamiseksi (Mulshine, et al., 1991, Oncology 5:
 25 - 33). Sen vuoksi GRP:n immuunisäätely sitä vastaan
 15 suunnattujen vasta-aineiden induktion kautta, immunisoi-
 malla universaalilla synteettisellä immuunistimulaattoril-
 la, joka on liitetty hormoniin, tarjoaa tehokkaan hoidon
 mahahaavoille ja -kasvaimille, samoin kuin keuhkosyöväälle.

Jäljempänä tarjotaan käyttöön erityisiä esimerkkejä
 20 universaalien synteettisen immuunistimulaattorin liittämi-
 sestä GRP:hen ja sen fragmentteihin niin, että herätetään
 vasta-ainevasteita mahdollistamaan tehokas GRP:hen perus-
 tuva immuuniterapia.

25 Allergian hoito IgE-CH4-perustaisella immuunitera- pialla

IgE-välitteisten allergisten vasteiden, kuten ast-
 man ja heinänuhan hoito desensitisaatiolla tai hyposensi-
 tisaatiolla on ollut tunnettua ja käytännössä sovellettua
 tämän vuosisadan alusta lähtien Noon L. (1911) Lancet,
 30 i:1572 - 1573). Rajoituksiin tällaiselle allergeeniin pe-
 rustuvalle immunoterapialle kuuluvat vaikeudet tunnistaa
 asiaankuuluva allergeeni ja allergeenin käytöstä, kun se
 on tunnistettu, toistuvasti aiheutuvat vastareaktiot
 (Maailman terveysjärjestö ja Immunologisten seurojen kan-
 35 sainvälinen liitto (International Union of Immunological

Societies), työryhmäraportti: Current status of allergen immunotherapy (1989) Lancet, i:259 - 261). Muihin hoitoihin allergian helpottamiseksi kuuluvat terapeutiset yhdisteet allergisista reaktioista vastuussa olevan, soluis-
 5 sa tapahtuvan tapahtumasarjan estämiseksi. Valitettavasti antihistamiinien esto toimii hyvin myöhään tapahtumasarjassa, ja siten saa aikaan ainoastaan viivästyneen ja osittaisen helpotuksen, ja kortikosteroidit toimivat liian aikaisin tapahtumasarjassa ja aiheuttavat ei-toivottavan
 10 laajan immunosuppression. Näiden kahden yhdisteluokan käytöstä saadut tulokset osoittavat vielä lisää tarpeen kehittää hoitomodaliteetti inhiboimalla allergisia vasteita IgE-tasolla. Tämä voi olla mahdollista joko inhiboimalla sen synteesiä, kuten hankalassa desensitisaatiomenetelmäs-
 15 sä tehdään, tai estämällä IgE:n stimuloiva vaikutus syöttösoluihin ja basofiileihin.

Stanworth et al. (Stanworth D.R., Kings M, Roy PD, et al. (1979) Biochem. J., 180: 665 - 668; Stanworth D.R. (1984) Mol. Immunol., 21: 1183 - 1190; Stanworth D.R., ja
 20 Bint DS. (1986) Mol. Immunol., 23: 1231 - 1235, 1986; Bint DS, ja Stanworth D.R. (1987) Eur. J. Immunol., 17: 437 - 440; Stanworth D.R. (1988) Mol. Immunol. 25: 1213 - 1215 raportoivat ihmisen IgE:n Fc CH4-alueelle paikallistetun kohdan tunnistuksesta, joka kohta osallistuu immunologi-
 25 seen käynnistysprosessiin.

Stanworth et al. osoittivat vielä, että immunoterapiaa on mahdollista tarjota potilaille, joilla on IgE-välitteisiä allergisia reaktioita (Stanworth D.R., Jones VM, Lewin IV, ja Nayyar S. (1990) Lancet, 336: 1279 - 1281;
 30 Jones V, Lewin IV, Nayyar S, ja Stanworth D.R. GB patenttihakemus 9013478.4) käyttämällä peptideihin perustuvaa rokotetta. Spesifisemmin, IgE-CH4-dekapeptidi, jolla on sekvenssi Lys-Thr-Lys-Gly-Ser-Gly-Phe-Phe-Val-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 79), jonka oli aikaisemmin osoitettu olevan lähellä
 35 IgE:n rakennekohtaa, joka osallistui IgE:n aiheuttamaan

syöttösolujen ja basofiilien aktivaatioon, kytkettiin kantajaproteiineihin, kuten avaimenreikäkotilon hemosyaniiniin (KLH) ja käytettiin immunogeeninä. Eläinten immuuniseerumin, joka saatiin tällaisista immunisoinneista, havaittiin vähentävän hieman dekaeptidien indusoimaa histamiinien vapautumista rotan peritoneaalisista syöttösoluista tiitteristä riippuvalla tavalla. Näiden immuuniseerumien inhiboiva aktiivisuus varmistettiin vielä passiivisten ihoanafylaksiatestien (PCA) avulla in vivo olosuhteissa, joissa annettiin monta allergeenia.

Suurin heikkous näissä prototyyppisissä "IgE-CH4-peptidi"-rokotteissa on heikko immunogeenisyys, sisäsyntyinen ongelma, joka liittyy melkein kaikkiin itse-antigeneihin. Tässä keksinnössä tarjotaan käyttöön spesifisiä esimerkkejä universaalin synteettisen immuunistimulaattorin liittämiseksi IgE:n CH4-peptidiin niin, että voidaan luoda tehokkaita vasta-aineita, jotka on suunnattu tätä IgE:ssä olevaa aktivaatiokohtaa vastaan, ja jotka puolestaan estävät IgE:n stimuloivan toiminnan syöttösoluissa ja basofiileissä, johtaen siten allergian tehokkaaseen hoitoon.

Muita peptidihapteeneja ja hoitoja

Chlamydia trachomatis on obligaatisti intrasellulaarinen bakteeri, joka infektoi sukupuolitiehyiden ja silmän limakalvojen pintaa. Serologisen reaktiivisuuden perusteella C. trachomatiksesta on olemassa viisitoista erilaista merkityksellistä serovarianttia. Nämä serovariantit ryhmitellään niiden pääasiallisten sairauden oireiden perusteella, joihin kukin liittyy, silmäsaIRAuteen tai trakoomaan liittyvään ryhmään kuulussa serovariantit B, Ba, A ja C, seksuaalisesti tarttuvaan sairauteen liittyvään ryhmään kuulussa serovariantit D, E, F, G, H, I, J & K, ja lymfogranuloma venereumiin liittyvään ryhmään kuulussa serovariantit L₁, L₂ & L₃ (Murdin, et al., 1993, Infect. Immun. 61: 4406 - 4414). C-trachomatiksen aiheuttama infek-

tio sinänsä ja yhdessä Neisseria gonorrhoeae kanssa on vastuussa yli puolista naisten diagnostisoiduista lantion tulehdussairauksista (PID) tai salpingiitista. Joka vuosi yli miljoona naista Yhdysvalloissa saa diagnoosin PID:stä ja hedelmättömyys on odotettavissa oleva seuraus yli 25 %:lle tapauksista (Washington, et al., 1987, J. Am. Med. Assoc. 257: 2070 - 2072). Sukuelintiehyiden sairauden lisäksi C. trachomatis on estettävissä olevan sokeutumisen (ts. trakooman) pääasiallinen syy maailmassa. Nykyisin yli 10 miljoonaa ihmistä on tämän tilan sokeuttama pysyvästi (Su ja Caldwell, 1992, J. Exp. Med. 175: 227 - 235).

C. trachomatis elinkierto sisältää kaksi vaihtoehtoista muotoa. Tarttumismuoto, elementary body (EB) joka on ekstrasellulaarinen, ei replikoituva, tiivis, itiön kaltainen organismin infektoiva muoto ja lisääntymismuoto, reticulate body (RB) on intrasellulaarinen vegetatiivinen muoto, joka tuottaa EB:itä. Infektiosykli alkaa EB:iden kiinnittymisellä alttiin isännän soluihin. Tähän prosessiin liittyy epäspesifisiä varausvuorovaikutuksia, joita seuraa spesifinen reseptori-ligandi-sitoutuminen EB:n ja isännän solumembraanin välillä. Varausvuorovaikutuksia välittää Chlamydian tärkein ulkomembraaniproteiini (MOMP), kun taas bakteerin spesifistä kiinnittymisproteiinia (ts. proteiinia, joka liittyy isännän solun reseptorin tunnistukseen) ei ole vielä tunnistettu (Stephens, 1993, Infect. Agents Dis. 1: 279 - 293).

Ensimmäisen akuutin infektiovaiheen jälkeen, jonka aikana EB:t leviävät, sairaus etenee krooniseksi patologiaksi, johon solun lymfoproliferatiiviset vasteet suurelta osin liittyvät (Morrison et al. 1989, J. Exp. Med. 169: 663 - 675; Morrison et al., 1989, J. Exp. Med. 170: 1271 - 1283; Taylor, et al., 1990, Infect. Immun. 58: 3061 - 3063). Näin ollen suurimpaan osaan sairauden patologiasta liittyvät immuunivasteet klamydiaproteiineja vastaan, eikä

patogeenin replikaatio sinänsä. Tämän kroonisen vaiheen aikana on harvinaista eristää/tunnistaa EB:tä tai RB:tä.

Rokotesuunnittelu kohdistuu EB:n kiinnittymisen häiritsemiseen alttiisiin soluihin, koska RB on luokse-
 5 pääsemätön ja Chlamydia-proteiineja ei ekspressoida infek-
 toituneiden solujen pinnalla. Sen vuoksi EB:n pääasialli-
 nen membraaniproteiini (MOMP) on ollut hyvin tutkittu.
 MOMP on pinta-EB:iden pinnan dominantti immunogeeni, vä-
 littää EB:n kiinnittymistä soluihin ja MOMP:in vastaiset
 10 vasta-aineet eivät liity patologiaan. MOMP:in immuunido-
 minantit kohdat koostuvat neljästä pinnalla esillä olevas-
 ta muuntelevasta domeenista (VDI-IV), liitettynä ei-vari-
 oivilla alueilla (Cheng, et al., 1992, Infect. Immun. 60:
 3428 - 3432). MOMP:ia tai MOMP:in spesifistä tärkeää muun-
 15 televaa domeenia vastaan herätetyt vasta-aineet voivat
 tukkia EB:n alussa tapahtuvan vuorovaikutuksen alttiin
 isäntäsolun membraanin kanssa ja estää infektion (Caldwell
 et al., 1987, Infect. Immun. 55: 93 - 98; Taylor, et al.,
 1988, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29: 1847 - 1853; Su ja
 20 Caldwell, 1991, Infect. Immun. 59: 2843 - 2845). Siksi ro-
 kotteen, joka on suunniteltu maksimoimaan immuunivasteet
 suurta joukkoa MOMP:in immunogeenisiä, muuntelevia domee-
 neja vastaan, odotetaan olevan laajalti tehokas. Tämä ro-
 kote tarjotaan käyttöön liittämällä universaaliin synteet-
 25 tiseen immuunistimulaattoriin, tai peptideihin, jotka
 edustavat MOMP:in muuntelevia domeeneja.

Maailman terveysjärjestö arvioi, että 14 miljoonaa
 ihmistä on nykyisin HIV-1:n infektoima. Lisäksi WHO arvi-
 oi, että vuoteen 2 000 mennessä, 40-miljoonaa ihmistä on
 30 saanut HIV-1-tartunnan (Centers for Disease Control,
 1991). HIV-infektion luonnonhistoria antaa olettaa, että
 käytännössä kaikki HIV:n infektoimat ihmiset etenevät lo-
 pulta asymptoattisesta infektiosta sairaalloisuuteen ja
 kuolemaan, joka liittyy AIDS:iin. Huolimatta maailmanlaa-
 35 juisista investoinneista ehkäisy- ja valistuskampanjoihin,

HIV-infektioiden määrä on yhä kasvamassa useilla maailman alueilla. Julkisen terveydenhuollon kannalta turvallisen ja tehokkaan rokotteen kehittäminen, joka suojaa HIV-infektiolta ja sairaudelta, täytyy olla kansainvälisesti etusijalla.

Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että neutraloivat vasta-aineet, joilla on riittävä tiitteri, ja jotka on suunnattu gp120:n V3-domeenia vastaan, suojaavat simpansseja altistumasta HIV-1:lle (Berman et al., 1990, Nature 345: 622 - 625; Girard et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 542 - 546; Emini et al., 1992, Nature 355: 728 - 730). Mikään tähän mennessä tunnistettu HIV-1:n domeeni ei ole yhtä tehokas kuin V3 herättämään suojaavia vasta-ainevasteita, näin ollen V3 on tunnettu tärkeimpänä neutraloivana domeenina (PND). V3-domeeni sisältää lineaarisen aminohappojuosteen, joka välittää elintärkeitä tapahtumia, joita vaaditaan viruksen tunkeutumiseksi soluihin, ja jota vastaan virusta neutraloivat vasta-aineet on suunnattu. Sen vuoksi universaali synteettinen immuunistimulaattori, joka on liitetty synteettiseen peptidisekvenssiin, joka vastaa V3-PND:tä, voi tehdä mahdolliseksi vasta-ainevasteet V3:a ja siten HIV:tä vastaan. Jäljempänä esitetty esimerkki kuvaa rakennetta, joka on tärkeä immunogeeni sisällytettäväksi tehokkaaseen HIV-1-rokotteeseen.

Seuraavat esimerkit kuvaavat lisää keksintöä.

Esimerkki 1

Rottien immunisaatio lineaarisilla ja oktameerisillä LHRH:ta sisältävillä peptideillä

A. Immunogeenin valmistus: Peptidit A-E (taulukko 1) ja kaikki muut peptidit syntetisitiin käyttämällä kiinteäfaasisynteesistrategiaa, jossa käytetään tavanomaista F-moc-kemiala, Applied Biosystems Peptide Synthesizer, malli 430A tai 431, valmistajan ohjeiden mukaisesti. Käytettiin Di(Fmoc)- α , ϵ NH₂ suojattua lysiiniä, kaksinkertaisi-

na konsentraatioina kunkin kytkennän lisäkierroksen jälkeen, heptalysyyliytimen (K_4K_2K tai $K_{y_{din}}$) synteesiä varten. Kun haluttu peptidi oli täysin rakennettu, hartsi käsiteltiin TFA:lla (trifluorietikkahappo) tavanomaisten menettelytapojen mukaisesti peptidin pilkkomiseksi hartsista ja suojaavien ryhmien eston poistamiseksi aminohappojen sivuketjuista. Vapaa peptidi puhdistettiin sen jälkeen HPLC:llä ja karakterisoitiin biokemiallisesti, aminohappo-analyysillä.

Peptidien rakenne aminopäästä karboksyylipäähän on seuraava: peptidi A on lineaarinen peptidi, jossa on kolme domeenia: 3 lysiinijäännöstä ($3K$), hepatiitti B:n pinta-antigeenin auttaja T-soluepitooppi (HB , T_h -epitooppi) ja LHRH. Peptidiä A edustaa siten kaava $3KHB_sTh$ -LHRH. Peptidi B on oktameerinen peptidi, jonka kussakin haarassa on kaksi LHRH:n kopiota. Haarat ovat kiinnittyneet heptalysyyliyttimeen, jolla on HB_sTh -epitooppi kiinnittyneenä C-terminaaliseen häntäänsä. Peptidiä B edustaa siten kaava $(LHRH-LHRH)_8-K_{y_{din}}-HB_sTh$. Peptidi C, jota edustaa $(LHRH-LHRH-LHRH)_8-K_{y_{din}}-HB_sTh$, on samanlainen kuin peptidi B, paitsi että haarassa on kolme kopiota LHRH:sta. Peptidi D, $(LHRH-HB_sTh)_8-K_{y_{din}}-AA$, on oktameerinen peptidi, jonka jokaisessa haarassa on yksi LHRH-domeeni ja yksi HB_sTh -domeeni. Haarat ovat kiinnittyneet heptalysyyliyttimeen, jolla on kaksi alaniinijäännöstä (AA) kiinnittyneenä C-terminaaliseen lysiiniinsä. Peptidi E, $(LHRH-LHRH-HB_sTh)_8-K_{y_{din}}-AA$, on oktameerinen peptidi, jonka jokaisessa haarassa on kaksi LHRH-domeenia ja yksi HB_sTh -domeeni. Haarat ovat kiinnittyneet heptalysyyliyttimeen, jolla on kaksi alaniinijäännöstä kiinnittyneenä C-terminaaliseen lysiiniinsä. Näiden peptidien todelliset sekvenssit on esitetty taulukossa 1.

Immunisaatioita varten, jotka annettiin viikoilla 0 ja 2, 600 μg kutakin peptidiä liuotettiin 3 ml:aan adjuvanttiliuosta, jossa oli 0,2 % Tween 80:tä, 2,5 % Pluronic L 121:tä, 0,9 % NaCl:a (TP). Liuosta säilytettiin

4 °C:ssa, kunnes se käytettiin ja vorteksoitiin 3 - 5 minuuttia ennen injektiota. Kukin rotta sai 100 µg injektiota kohti 0,5 ml:ssa. Immunisaatiota varten annettuna viikolla 5 Freundin täydellisessä adjuvantissa, 4 mg kutakin peptidiä liuotettiin 2 ml:aan 0,9-prosenttista NaCl:a ja emulgoitiin samalla määrällä Freundin täydellistä adjuvanttia. Kukin rotta sai 500 µg injektiota kohti.

B. Immunisaatioaikataulu ja seerumin kerääminen:

Sukukypsät koiraspuoliset Sprague-Dawley-rotat (n = 5) immunisoitiin subkutaanisesti (s.c.). Tehosteinjektiot annettiin s.c. viikoilla 2 ja 5. Verta otettiin viikoilla 3, 6, 7 ja 11 rotista, jotka oli injektoitu peptideillä A, B ja C tai viikoilla 3, 6, 7, ja 8 rotista, jotka oli injektoitu peptideillä D ja E.

Veren ottaminen keskimmäisestä häntävaltimosta tehtiin injektoimalla rottiin 1 ml natriumpentobarbitalia (64,8 mg/ml; Anthony Products Co., Accadia CA) laimennettuna 1:10 0,9-prosenttisessä NaCl:ssa annettuna intraperitoneaalisesti. Hännät pidettiin 48 °C:ssa ± 0,5 °C vedessä 2 minuuttia ja hierottiin nopeasti paperipyyhkeillä (ts. lypsettiin). Veri kerättiin välittömästi 5 ml ruiskuun, joka oli varustettu 23 gaugen neulalla. Tyypillisesti saatiin 3 - 4 ml verta. Seerumi kerättiin sentrifugoimalla 25 min 3 000 rpm. Seerumi jaettiin 300 µl:n tilavuuksiin ja sitä säilytettiin jäädytettynä ennen käyttöä analyyseissä.

Esimerkki 2

Peptidien A - E immunogeeninen ja terapeutinen tehokkuus

A. Analyysimenetelmät ja elinten painojen määritykset:

Kunkin seeruminäytteen anti-LHRH-tiitteri määritettiin RIA:lla (Ladd et al. (1988) Am. J. Reprod. Immunol. 17: 121 - 127). Antiseerumi laimennettiin 1:100 (V:V) 1-prosenttiseen seerumin albumiiniin (BSA), pH 7,4. Sama määrä laimennettua seerumia lisättiin 100 µl:aan [¹²⁵I]-

LHRH:ta, joka oli laimennettu 1-prosenttiseen BSA:han niin, että se sisälsi noin 15 000 cpm:ää 5,25 pg:tä LHRH:ta kohti (New England Nuclear Company, Boston, MA). Liuosta inkuboitiin yli yön huoneenlämmössä ja vasta-aineeseen sitoutunut LHRH saostettiin 400 µl:lla 25-prosenttista polyetyleeniglykolia (MW 8 000) 0,01 M fosfaatilla puskuroidussa suolaliuoksessa (PBS), pH 7,6 ja 200 µl:ssa 5 mg/ml naudan gammaglobuliinia PBS:ssä. Vasta-ainetiitterit on ilmaistu nmooleina jodattua LHRH:ta sitoutuneena litraa seerumia kohti.

Seerumin testosteronitasot määritettiin käyttämällä RIA-testipakkausta Diagnostic Productsilta (Los Angeles, CA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Pienin havaitsemistaso testosteronille oli alueella 0,01 - 0,03 nmol/l. Kukin näyte analysoitiin rinnakkaisena.

Viikolla 11 (peptidit A - C) tai viikolla 8 (peptidit D ja E) alkuinjektion jälkeen rotat tapettiin yliannostuksella hiilidioksidia. Suurin mahdollinen määrä verta otettiin talteen vartalosta. Androgeeneista riippuvaiset sukuelimet (kivekset, lisäkivekset, eturauhanen ja rakku-larauhaset) irrotettiin kustakin rotasta, kuivattiin paperi-pyyhkeellä ja punnittiin.

B. Tulokset:

Viiden rotan ryhmät immunisoitiin peptideillä A - E. Tutkimuksen aikana mitattiin anti-LHRH-tiitterit ja testosteronitasot kustakin rotasta. Koejakson päätteeksi eläimet lopetettiin ja saatiin androgeenista riippuvaisten elinten painot. Kunkin rotan anti-LHRH-tiitteri, testosteronitaso ja kivesten paino tappoajankohtana on esitetty taulukossa 2. Yhteenveto näistä tuloksista on esitetty taulukossa 3 yhdessä muiden androgeenista riippuvaisten elinten keskimääräisten painojen kanssa.

Peptidillä A immunisoidut rotat tuottivat vasta-aineita LHRH:ta vastaan määritettynä RIA:lla. Yksikään muilla peptideillä (esim. B, C, D ja E) immunisoiduista

rotista ei tuottanut minkäänlaisia merkitseviä vasta-ainetiittereitä LHRH:ta vastaan. Keskimääräinen anti-LHRH-tiitteri (nmol/l) viikolla 11 (peptidit A - C), viikolla 8 (peptidit D - E) ja kontrollirotissa on esitetty taulukossa 3. Keskimääräinen anti-LHRH-tiitteri 5-rotalle, jotka immunisoitiin peptidillä A, oli 1,94 nmol/l, kun taas muihin ryhmiin kuuluvien rottien tiitterit olivat alueella 0,48 - 0,73 nmol/l. Keskimääräiset androgeeneista riippuvaisten elinten painot näistä eläinryhmistä on esitetty taulukossa 3 ja kuvattu graafisesti kuviossa 1. Peptidillä A immunisoiduissa rotissa näkyi merkitsevä elinten painon väheneminen (noin 40 %) verrattuna kontrollieläimiin.

Tulokset osoittavat, että LHRH:n läsnäolo peptidin C-päässä on tehokkaampi stimuloimaan vasta-ainetuotantoa ja samanaikaista androgeeneista riippuvaisten elinten painojen pienenemistä. Tässä suhteessa peptidillä A on C-terminaalinen LHRH-domeeni, kun taas tehottomilla peptideillä B - E on N-terminaaliset tai sisäiset kopiot LHRH:sta.

Vaikka androgeeneista riippuvaisten elinten painojen keskimääräinen pieneneminen aleneminen A käsitellyillä rotilla verrattuna peptideillä B - E käsiteltyihin rottiin ja kontrollirottiin oli merkitsevä, tämä aleneminen johtui dramaattisesta pienenemisestä, jota esiintyi kolmella viidestä eläimestä. Näin ollen ryhmän A rotat luokiteltiin reagoijiin ja reagoimattomiin, ja tulokset analysoitiin uudelleen. Reagoijien ja reagoimattomien androgeenistä riippuvaisten elinten keskimääräiset painot, jotka on esitetty kuviossa 2, kuvaavat graafisesti suurta eroa näiden kahden ryhmän välillä. Reagoijaeläinten seerumin testosteronitasot olivat muuttumattomat (taulukko 2). Kuviossa 3 esitetään käänteinen vuorovaikutus anti-LHRH-tiittereiden ja kivesten painon välillä. Suhde on samanlainen muille androgeenistä riippuvaisten elinten painoille.

Esimerkki 3

Immunisaatio lineaarisella peptidillä, joka sisältää hinkuyskätoksiinin Th-epitoopin

Peptidi F (PT₁Th-LHRH, taulukko 4) syntetisoiitiin ja puhdistettiin, kuten esimerkissä 1 on kuvattu. Peptidi valmistettiin immunisaatiota varten kuten esimerkissä 1 on kuvattu, paitsi että adjuvantti oli 0,5-prosenttinen aluna. Immunisaatiot tehtiin s.c. Sprague-Dawley-rotille viikoilla 0, 2 ja 4. Anti-LHRH-tiittereiden, testosteronitasojen ja androgeeneista riippuvaisten elinten painojen määritykset tehtiin ja ne analysoitiin kuten esimerkissä 2 on kuvattu. Yksitoista viikkoa alkuimmunisaation jälkeen kivekset, lisäkivekset, eturauhanen ja rakkularauhaset olivat merkitsevästi pienemmät kuin kontrollieläimistä saadut (kuvio 4).

Esimerkki 4

Peptidiseokset anti-LHRH-vasteen indusoimiseksi laajoissa populaatioissa

Sekoitukset tehokkaista synteettisistä LHRH-peptideistä formuloidaan kombinaatioina, jotta saadaan laajalti tehokkaat rokotteet. Peptidit A, F ja H (taulukko 1 ja taulukko 4) on valmistettu, kuten esimerkissä 1 on kuvattu ja yhdistetty seokseksi immunisoitavaksi sukukypsien koiraspuolisiin rottiin viikoilla 0, 3 ja 6. Primaarinen injektio on Freundin täydellisessä adjuvantissa ja tehoste-injektiot ovat Freundin epätäydellisessä adjuvantissa. Verta otetaan viikoilla 0, 3, 6, 9 ja 11. Eläimet tapetaan viikolla 11 elinten painojen määrityksiä varten. Tulokset on analysoitu ja arvioitu kuten esimerkissä 2 on kuvattu.

Esimerkki 5

Peptidin A riippuvuus annoksesta

Peptidi A, 3K-HB₈T_h-LHRH syntetisoiitiin kuten esimerkissä 1 on kuvattu. Tämän peptidin tehokkuus testattiin alla esitetyn koesuunnitelman mukaisesti:

Koesuunnitelma:

Immunogeeni: peptidi A

Kontrollit: muuntamaton LHRH & adjuvanttiryhvät

Annos: 100 tai 500 µg immunisaatiota kohti

5 Antotapa: intramuskulaarinen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Aikataulu: viikko 0 (FCA), 3 ja 6 (IFA)

Laji: 8 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-
rottaa/ryhmä

10 Analyysi: LHRH-spesifinen vasta-aine, seerumin testosteroneni, LH- ja FSH-tasot, kivesten suhteellinen kokokäsin koettelemalla

Nekropsia: 10 viikon kuluttua, määritettiin kivesten painot, eturauhasen + rakkularauhasten painot, lisäki-
15 vesten painot

Tulokset:

Immunisoiduista ja kontrollirotista otettiin ajoittain verinäytteet. Näiden näytteiden serumista analysoitiin peptidille A spesifisen vasta-aineen, LHRH:lle
20 spesifisen vasta-aineen ja seerumin testosteronin läsnäolo. 10 viikon jälkeen eläimet tapettiin ja tutkittavat elimet, joihin kuuluvat kivekset ja eturauhaset ja rakkularauhaset, irrotettiin ja punnittiin. Rotat, joilta oli poistettu hypofyyysi, sisällytettiin kokeeseen positiivisina kontrolleina. Viikolla 3 (ensimmäisen tehosteannoksen päivänä) tehtiin havainnot määritettävistä LHRH-spesifisistä vasta-ainetiittereistä ja merkitsevä näiden tiitte-
25 reiden nousu saavutettiin tehosteimmunisaatioilla (kuvio 5). Vasta-ainetiitterit määritettiin radioimmunoanalyysillä. Nämä tulokset osoittavat, että käytetyn antigeenin määrä oli saturoivilla tasoilla, koska mitään merkitseviä eroja ei ollut 100 µg:n tai 500 µg:n annosten herättämien
30 vasteiden välillä. Kuviossa 6 esitetään voimakas korrelaatio LHRH:ta vastaan suunnatun seerumin vasta-aineen lisääntymisen ja seerumin testosteronin vähenemisen välillä
35

(samanaikainen dramaattinen sekä LH:n että FSH:n väheneminen havaittiin myös). Viikolla 5 (primaarisen immunisaation jälkeen) ilmeni kymmenkertainen seerumin testosteronin väheneminen ja viikolla 8 seerumin testosteroni oli kastroatiotasolla (vähemmän kuin 0,5 nmol/l) kaikilla eläimillä. Kuviossa 7 esitetään LHRH-immunisaatiolla aikaansaadun seerumin testosteronin vähentämisen biologinen vaikutus. 100 µg:n annoksella peptidiä A immunisoitujen eläinten kivesten koko oli merkitsevästi pienentynyt kokeen loppuun mennessä (viikko 10). Kivesten koon pieneneminen näillä eläimillä oli jopa suurempaa kuin vaikutus, joka saatiin aivolisäkkeen poistolla (ts. ryhmä, joilta oli poistettu hypofyyysi). Vaikka asiaa ei testattu pariuttamalla, kivesten tila (mukaanluettuna histopatologinen tutkimus) antoi olettaa, että jokainen eläin, joka oli immunisoitu peptidillä A, oli toiminnallisesti steriili ennen kokeen päättämistä. Eturauhasten painot (kuvio 8) ovat yhtäpitävät tulosten kanssa, jotka saatiin kiveksillä, ts. immunisaatio peptidillä A sai aikaan eturauhasen merkittävää surkastumista. Missään määrittelyssä ei havaittu merkitsevää vaikutusta yksin LHRH:lla tehdyllä immunisaatiolla osoittaen, että satunnaisten auttaja-T-soluepitooppien liittäminen huonoihin immunogeeneihin tarjoaa tavan stimuloida voimakas immuunivaste näitä immunogeeneja vastaan. Johtopäätökset:

1. Hbs T_h-epitoppi indusoi tehokkaat vasta-ainevas-
teet LHRH:ta vastaan.
2. Vasta-aine peptidiä A vastaan neutraloi tehok-
kaasti LHRH-aktiivisuutta rokotetuissa eläimissä.
3. LHRH-inhibitio oli riittävä vähentämään seerumin
testosteronia kastroatiotasolle.
4. Immunisaatio peptidillä A sai aikaan halutut
biologiset vaikutukset, ts. eturauhasen ja kivesten dra-
maattisen surkastumisen.

Esimerkki 5A

Muiden tehokkaiden Th:LHRH-rakenteiden tunnistus ja testaus

Tehokkaat Th:LHRH-rakenteet

5 Tulokset peptidillä A on toisinnettu samalla tavalla
joukossa eri tutkimuksia, kokonaistehokkuuden (elimen
painon vähenemistä käytetään päätepisteenä) ylittäessä 95
%. Sellaisen järjestelmän perustamiseksi, joka mittaisi
10 luotettavasti eri "T_h-epitoppi:LHRH"-rakenteiden suhteel-
lista tehokkuutta tai sen puuttumista, me muunsimme im-
munisaatiomenettelyä. Alkukokeet LHRH-rakenteilla asettui-
vat kahteen erilliseen ryhmään arvioituna esimerkissä 5
kuvatulla menettelytavalla (ts. Freundin adjuvantin koos-
tumusten anto intramuskulaarisesti). Rakenteista joko
15 puuttui tehokkuus, eivätkä ne aiheuttaneet mitään merkit-
sevää elinten painon vähenemistä, tai ne olivat täydelli-
sen tehokkaita ja matkivat peptidillä A saatuja tuloksia,
tehden mahdolliseksi selvittää tehokkaiden ehdokkaiden
paremmuusjärjestystä. Näin ollen edellä kuvatun menettely-
20 tavan muunnos, ts. subkutaaninen antotapa verrattuna ehdo-
kaspeptidikoostumusten intramuskulaariseen antoon, mahdol-
listi paremmuusjärjestyksen määrittämisen. Esimerkiksi
peptidin A anto subkutaanisesti FCA/IFA:ssa lievensi vas-
teita tätä peptidiä kohtaan niin, että arviolta 30 %, ver-
25 rattuna enempään kuin 95 % eläimistä, reagoi riittävästi,
jotta niiden kivesten ja eturauhasen surkastuminen tapah-
tui.

Siispä samat määrät eri T_h:LHRH-rakenteita (vastaten
100 µg:aa peptidiä A) formuloitiin edellä kuvatulla taval-
30 la, mutta annettiin subkutaanisesti viikoilla 0, 3 ja 6.
Testattujen peptidien sekvenssit on esitetty taulukossa 5
ja tulokset useista eri kokeista on koottu taulukkoon 6.
Peptidi A liitettiin kuhunkin tutkimukseen positiivisena
kontrollina normalisoimaan tuloksia eri kokeiden välillä.
35 Kuten on esitetty, peptidit, jotka herättivät merkitseviä

anti-LHRH-vasta-ainetiittereitä, aiheuttivat immunisoitujen eläinten seerumin testosteronitasojen laskemisen alle kastreasiotasojen, ja aiheuttivat kivesten painojen merkitsevää pienenemistä. Tulokset kokeista, jotka tehtiin taulukon 6 tuottamiseksi, esitetään seuraavissa esimerkeissä.

Esimerkki 6

Peptidin 18, HBsAg T_h-epitootin tehokkuus:

LHRH-rakenne, joka sisälsi glysiinivälikkeen (spacer)

Peptidi 18 on 30 aminohappojäännöstä pitkä synteettinen peptidi, joka on organisoitunut neljään lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyyli-päähän seuraavasti: 3 lyysiinijäännöstä (K₃), hepatiitti-B-viruksen auttajaepitootpi₁₉₋₃₃ (HBBsAg-T_h), glysiinivälike (GG) ja LHRH. Peptidiä 18 edustaa siten kaava K₃: HBsAg T_h: GG: LHRH. Näin ollen peptidin 18 rakenne eroaa peptidin A rakenteesta yksinkertaisesti Gly-Gly välisekvenssin lisäyksellä auttajaepitootin ja LHRH:n välille. Seuraavassa kuvataan analyysi peptidin 18 tehokkuudesta formuloituna Freundin adjuvanttiin ja annettuna subkutaanisesti. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, jollei toisin ole esitetty.

Koesuunnitelma:

Immunogeeni: peptidi A tai peptidi 18 (ts. eri ryhmässä)

Annos: 100 µg peptidiä A, peptidiä 18 molaarisena ekvivalenttina 100 µg:lle peptidiä A

Annostapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Laji. 6 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä.

Tulokset:

Kaksi viikkoa toisen tehosterokotuksen jälkeen (ts. viikolla 8) 6:ssa 6 eläimestä, jotka saivat peptidiä 18, ilmenivät anti-LHRH-tiitterit, jotka olivat suuremmat kuin

1 nmooli/l (kuvio 9). Nämä korkeat vasta-ainetasot pidettiin yllä kaikissa eläimissä, kunnes koe lopetettiin (viikko 10). Sitä vastoin, ainoastaan 2:ssa 6 eläimestä, jotka oli immunisoitu peptidillä A, ilmenivät anti-LHRH-vasta-aine tiitterit, jotka olivat suuremmat kuin 1 nmooli/l viikolla 10 (kuvio 10). Erot LHRH-spesifisissä vasta-ainetiittereissä kahden ryhmän välillä heijastuivat myös verenkierrrossa olevan testosteronin tasoon näissä eläimissä. Viikolla 10 (kun eläimet tapettiin), 5:ssä 6 eläimestä, jotka saivat peptidiä 18, ilmeni seerumin testosteroni kastraatiotasolla (kuvio 11), kun taas 1:llä 6 eläimestä, jotka saivat peptidiä A, oli tämän hormonin taso kastraatiotasolla (kuvio 12). Elinten dissektio viikolla 10 osoitti, että 5:llä 6 eläimestä, jotka saivat peptidiä 18, olivat eturauhaset merkitsevästi surkastuneet (kuvio 13), kun taas ainoastaan 1:llä 6 eläimestä, jotka saivat peptidiä A, oli surkastunut eturauhanen.

Johtopäätökset:

1. Peptidi 18 oli tehokas herättämään haluttua biologista vastetta, ts. LHRH-spesifisen vasta-aineen ilmentymistä, seerumin testosteronin vähenemistä ja asiaan kuuluvaa elinten surkastumista.

2. Gly-Gly-välisekvenssin insertio T_h -epitootin ja LHRH:n väliin paransi immuunivastetta peptidiä kohtaan, kuten voidaan nähdä peptidillä 18 saatujen tulosten vertailusta peptidillä A saatuihin.

Esimerkki 7

Peptidin 19, tuhkarokkoviruksen satunnaisen T_h -epitootin: LHRH-rakenteen tehokkuus

15 jäännöksen domeeni tuhkarokkoviruksen (MV) F-glykoproteiinista liitettiin LHRH-sekvenssiin automatisoidulla synteessillä tuottamaan peptidi 19. Peptidi 19 on organisoitu kolmeen lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyyli-päähän seuraavasti: tuhkarokkoviruksen auttaja-epitootppi ($MVF_1 T_h$), glysiinivälike (GG) ja LHRH. Peptidiä

19 edustaa siten kaava $MVF_1 T_h$: GG: LHRH. Tämä peptidi formuloitiin Freundin adjuvanttiin ja annettiin subkutaanisesti, kuten alla on kuvattu. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, paitsi jos toisin on esitetty.

5 **Koesuunnitelma:**

Immunogeeni: peptidi 19

Annos: molaariset ekvivalentit 100 µg:lle peptidiä

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

10 Laji. 6 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Tulokset:

Kahden viikon päästä toisen tehosteimmunisaation antamisesta (viikolla 8), merkitsevät LHRH-spesifisen vasta-aineen tiitterit havaittiin 4:ssä 6 eläimestä, jotka oli immunisoitu (kuvio 14). LHRH-vasta-ainetiittereissä ilmeni vaatimatonta lisääntymistä viikkojen 8 ja 10 välillä ja lisäksi yksi aluksi reagoimattomista eläimistä (rotta nro 726) alkoi ilmentää merkitsevää anti-LHRH-vasta-ainetasoa tämän ajanjakson kuluessa. Kuviossa 15 osoitetaan jälleen voimakas positiivinen korrelaatio merkitsevien LHRH-vasta-ainetasojen ja seerumin testosteronin välillä. Neljällä eläimellä, jotka ilmensivät anti-LHRH-tiittereitä, jotka olivat suuremmat kuin 2 nmol/l viikolla 8, olivat seerumin testosteronitasot alle 0,5 nmol/l viikon 8 jälkeen, ja nämä tasot pysyivät yllä koko viikon 10 (kuvio 15a). Lopuilla eläimistä, joilla oli matalammat LHRH-vasta-ainetiitterit, näytti olevan vähentyneet testosteronitasot, mutta ei kastroatiotasolle (kuvio 15b).

30 Seerumin testosteronin merkitsevä väheneminen alle kastroatiotason aiheutti odotettua kivesten vakavaa surkastumista, kuten kuviossa 16 on esitetty. Eturauhasen atrofiasta havaittiin samoin olennaisesti samanlainen tulos (kuvio 17). Peptidille 19 enemmän kuin 65 % testatuista

35 eläimistä ilmensi testosteronin kastroatiotasoja ja kives-

ten ja eturauhasen vakavaa atropiaa (tässä "muunnetussa" menetelmässä. Annettuna intramuskulaarisesti esimerkin 5 menetelmän mukaisesti, enemmän kuin 95 % eläimistä ilmensi asiaan kuuluvaa elinten surkastumista 10 viikon kuluttua.

5 Peptidistä 19 kertyneet tulokset osoittavat, että LHRH-vasta-ainetiitterit, jotka ovat enemmän kuin 2 nmol/l, aiheuttavat seerumin testosteronin putoamisen kastraatio-
tasoihin (alle 0,5 nmol/l), mikä johtaa sekä kivesten että
10 eturauhasen surkastumiseen). LHRH-spesifisten vasta-aine-
tiittereiden täytyy nousta 1 - 2 viikon ajaksi, jotta
niillä olisi haluttu vaikutus, nimittäin elinten surkastu-
minen. Tämän perusteella on todennäköistä, että rotta nro
726 olisi saavuttanut testosteronin kastraatiotasot, jos
tutkimusta olisi pidennetty yli 10 viikon kestoajan.

15 Kivesten painon väheneminen on looginen lopputulos
seulontakokeille, koska kivesten surkastuminen on etu-
rauhaseen surkastumisen ehdoton ennustaja: eturauhasen ku-
tistuminen edeltää kivesten painon pienenemistä (ts. etu-
rauhaseen ylläpitäminen on voimakkaasti riippuvainen testos-
20 teronista, minkä vuoksi seerumin testosteronin eliminaatio
aiheuttaa eturauhasen nopean kutistumisen, mitä vasta sit-
ten seuraa kivesten surkastuminen); kivesten poistaminen
on vähäistä verrattuna monimutkaiseen leikaukseen, joka
vaaditaan eturauhasen ja siihen liittyvien rakkularauhas-
25 ten poistamiseen, ja kivesten yksinkertainen muoto verrat-
tuna eturauhaseen ja rakkularauhasiin, tekee kivesten pai-
non määrittämisestä tarkemman.

Johtopäätökset:

30 1. peptidi 19 on tehokas (ts. tuottaa seerumin tes-
tosteronin ja kivesten ja eturauhasen painojen merkitsevän
vähenemisen) annettuna Freundin adjuvantissa.

2. Peptidikoostumuksen subkutaaninen anto mahdol-
listaa keinot luokitkaa immunogeenin tehokkuutta.

3. Peptidi 19 on tehokkaampi kuin peptidi A.

Esimerkki 8

Peptidin K, hinkuyskätoksiinin satunnaisen T_h -epitoopin: LHRH-rakenteen tehokkuus

24 aminohappojäännöstä pitkä T_h -epitooppi hinkuyskätoksiinista liitettiin LHRH:hon automatisoidulla synteesillä, jotta muodostui peptidi K. Tämä peptidi on järjestynyt kahteen lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyylipäähän seuraavasti: hinkuyskätoksiinin auttajaepitooppi T_h2 (PT_2 T_h) ja LHRH. Peptidiä K edustaa siten kaava PT_2 T_h : LHRH. Tämän peptidin tehokkuus testattiin käyttämällä samaa menetelmää kuin peptidien 18 ja 19 analyysille on kuvattu (esimerkit 6 ja 7 edellä). Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, jollei toisin ole esitetty.

Koesuunnitelma:

Immunogeeni: peptidi K
Annos: molaariset ekvivalentit 100 μ g:lle peptidiä A.

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Laji. 6 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Nekropsia: 10 viikon kuluttua, määritettiin kives-ten painot.

Tulokset:

Kuviossa 18 esitetään LHRH-spesifisten vasta-aineiden tiitterit, joita peptidiä K subkutaanisesti saaneet eläimet ilmensivät. Kaksi eläintä ilmensi merkitseviä LHRH-spesifisiä vasta-ainetiittereitä (suurempi kuin 4 nmol/l) viikon 8 jälkeen, kaksi välitasoja (1,5 - 2,0 nmol/l) ja kaksi eläintä ei ilmentänyt olennaisesti mitään vastetta. Jälleen ilmeni odotettu korrelaatio anti-LHRH-tiittereiden ja seerumin testosteronitasojen välillä. Kahdella eläimellä, joilla oli korkeat vasta-ainetiitterit, seerumin testosteroni oli kastroatiotasolla viikon 8 jälkeen, ja se pysyi tällä tasolla kokeen lopettamiseen saak-

ka (kuvio 19a). Rotta nro 793 ilmensi LHRH-vasta-ainetiit-
tereitä, jotka olivat suurempia kuin 2 nmol/l viikolla 10,
ja sen testosteroni oli kastroatiotasolla tässä vaiheessa.
Rotalla nro 791, jonka LHRH-vasta-ainetiitterit olivat 1,6
5 nmol/l määritettynä viikolla 10 (kuvio 18), testosteroni-
tasot saavuttivat kastroatiorajan tänä ajankohtana (kuvio
19b). LHRH-vasta-aineita korkeita tasoja ilmentävillä
eläimillä (kuvio 18) oli merkitsevästi surkastuneet kivek-
set viikolla 10 (kuvio 20). Rotan nro 791 kivesten paino
10 väheni jonkin verran, ja seerumin testosteronitasojen ki-
netiikan perusteella on erittäin todennäköistä, että elin-
ten surkastuminen olisi ollut merkitsevää, jos nekropsia
olisi tehty viikon 11 jälkeen.

Vaihtelu reaktioissa peptidiä K vastaan heijastaa
15 todennäköisimmin geneettisiä eroa tähän tutkimukseen käy-
tetyssä ulkosiitoisessa rottapopulaatiossa, ja määrittelee
eläinten välisiä eroja niiden kyvyssä tunnistaa tehokkaas-
ti tähän LHRH-rakenteeseen sisällytetty T_h -epitopoppi. Tämä
tulos tukee rakenteiden seosten käyttämistä, jotka sisältä-
vät erilaisia satunnaisia T_h -epitopoppeja, saamaan aikaan
20 yhtäläiset tehokkaat vasteet populaatioissa, jotka ilmen-
tävät vaihtelevia HLA-haplotyypppejä.

Johtopäätökset:

1. Peptidi K on tehokas (ts. saa aikaan merkitsevän
25 seerumin testosteronin vähenemisen ja kivesten painon vä-
henemisen) annettuna Freundin adjuvantissa.

2. Peptidikoostumuksen anto subkutaanisesti tarjoaa
keinot luokitella immunogeenin tehokkuutta.

3. Satunnaiset T_h -rakenteet kykenevät eri tasoisiin
30 tehokkuuksiin tarkasteltuna geneettisesti heterogeenisissä
populaatioissa.

4. Peptidin K tehokkuus on suunnilleen sama kuin
peptidillä A saavutettu.

Esimerkki 9

Peptidin H, tetanustoksiinin satunnainen T_h -epitoppi:LHRH-rakenteen tehokkuus

27 aminohapon pituinen peptidi joka käsitti 15 aminohapon T_h -epitopin tetanustoksiinista sijoitettuna lähelle aminopäätä ja ennen LHRH-sekvenssiä, syntetisoi käyttäen tavanomaista automatisoitua synteetikniikkaa. Tämä peptidi, peptidi H on, organisoitu kolmeen lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyylipäähän seuraavasti: 2 lysiinijäännöstä (K_2), tetanustoksiini-auttaja-T-soluepitoppi 1 ($TT_1 T_h$) ja LHRH. Seuraavassa kuvataan peptidin H tehokkuuden analyysiä formuloituna Freundin adjuvanttiin ja annettuna subkutaanisesti. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, jollei toisin esitetä.

Koesuunnitelma:

Immunogeeni: peptidi H

Annos: molaarinen ekvivalentti 100 μ g:lle peptidiä A

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Laji: 5 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä.

Nekropsia: viikolla 10, määritetään kivesten painot

Tulokset:

Kuviossa 17 esitetään peptidin H kapasiteetti aiheuttaa LHRH-spesifisten vasta-aineiden tuotanto. Viikon 8 jälkeen (kaksi viikkoa toisen tehosteannon jälkeen) 4 eläintä 5:stä ilmensi anti-LHRH-vasta-ainetiittereitä, jotka olivat suurempia kuin 2,0 nmol/l. Viikon 10 jälkeen viides eläin ilmensi LHRH-vasta-aineita, joiden määrä oli suurempi kuin 1,0 nmol/l. Viikolla 8 kaikissa eläimissä ilmeni merkitsevä seerumin testosteronitasojen aleneminen, ja viikon 10 jälkeen seerumin testosteroni oli kastraatio- tasolla kaikilla eläimillä (kuvio 22). Viikolla 10 eläimet tapettiin ja tarvittavat elimet punnittiin. Neljällä vii-

destä rotasta oli dramaattisesti surkastuneet kivekset (kuvio 23). Viidennellä eläimellä, rotalla nro 103, oli merkitsevästi surkastuneet kivekset, mutta ne olivat hie-
 5 man suuremmat kuin muiden peptidiä H saavien eläinten ki-
 vekset. Tämä vastaa tämän eläimen ekspressoimien anti-
 LHRH-vasta-aineiden matalampia tasoja (kuvio 21).

Johtopäätökset:

1. Peptidi H on tehokas (ts. aiheuttaa seerumin
 10 testosteronin ja kivesten ja eturauhasen painojen merkit-
 sevän vähenemisen) annettuna Freundin adjuvantissa.

2. Peptidikoostumuksen anto subkutaanisesti mahdol-
 listaa keinoit luokitaa immunogeenin tehokkuutta.

3. Peptidi H on merkitsevästi tehokkaampi kuin pep-
 tidi A.

15 Esimerkki 10

Immunogeenisekoitus annettuna Freundin adjuvantissa

Monen erilaisen T_h -epitoppi:LHRH-rakenteen suhteel-
 listen tehokkuuksien selvittäminen (esimerkit 5 - 10, tau-
 lukko 6) mahdollistaa edustavien peptidien valinnan im-
 20 munogeenisekoitukseen. Yksittäiset rakenteet, joissa on T_h
 tuhkarokkoviruksen F:stä, hepatiitti B:n pinta-antigeenis-
 ta, jäykkäkouristustoksiinista ja hinkuyskätoksiinista im-
 munogeenisekoituksessa ovat osoittaneet tehokkuutta (tau-
 lukko 6) ja ne ovat epäyhtenäisiä, tarjoten suurimman mah-
 25 dollisen peittävyys geneettisesti monimuotoisessa popu-
 laatiossa. Sitä paitsi, koska nämä T_h -epitopit ovat läsnä
 aikaisemmin annetuissa rokotteissa, ne tarjoavat käyttöön
 mahdollisuudet ensivasteille. Jäljempänä olevat esimerkit
 osoittavat kohteena olevien elinten nopean surkastumisen,
 30 kun käytetään sekoitussovellutusta. Koesuunnitelma on sama
 kuin esimerkissä 5, jollei toisin ole esitetty.

Koesuunnitelma:

Immunogeeni: sekoitus ($Hbs\ T_h:LHRH + MV_{FI}T_h:LHRH +$
 $PT_2\ T_h:LHRH + TT_1T_h:LHRH$)

Annos: molaarisesti sama määrä kutakin, 100 µg peptidiä A vastaava määrä

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

5 Laji: 6 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Nekropsia: 10 viikolla, määritettiin kivesten painot.

Tulokset:

10 T_h :LHRH-rakenteiden seos annettiin subkutaanisesti Freundin adjuvantissa esimerkeissä 6 - 9 edellä kuvatuilla tavoilla. Kuten kuviossa 24 on esitetty, nopeat ja tehokkaat anti-LHRH-vasta-ainevasteet havaittiin kaikissa eläimissä. Viikon 5 jälkeen, ts. kaksi viikkoa ensimmäisen

15 tehosteimmunisaation jälkeen ja ennen toista tehostetta, 5 eläintä kuudesta ilmensi LHRH-spesifisiä vasta-ainetiitte-reitä, jotka olivat riittävät vähentämään seerumin testosteronitasoja alle sen, joka vaaditaan kastraatioon. Vasta-ainetiitterien merkitsevä nousu saavutettiin kaikille

20 eläimille toisen tehosteimmunisaation jälkeen. Seerumin testosteronitasot laskivat alle vähimmäismäärän, joka vaaditaan kastraatioon viidennen ja kahdeksannen viikon välillä primaarisen immunisaation jälkeen ja pysyivät näissä tasoissa kokeen loppuun saakka (kuvio 25). Tämä seerumin

25 testosteronin huomattava väheneminen aiheutti merkitsevää kivesten surkastumista joka eläimelle määritettynä viikolla 10 (kuvio 26). Tämä koe osoittaa ne edut, joita immunogeenisekoitus tarjoaa (vertaa kuviota 26 kuvioihin 16, 20 ja 23). Haluttu lopputulos saavutetaan kaikille eläimil-

30 le verrattuna muutamaa. Vasteiden yhdenmukaisuuden lisäksi vasteiden nopeus ja intensiteetti lisääntyivät, kun sekoitus annettiin yksittäisten komponenttien sijasta (vertaa kuviota 24 kuvioihin 14, 18 ja 21).

Johtopäätökset:

1. T_h :LHRH -immunogeenien sekoitus on tehokkaampi kuin mikään yksittäinen peptidi sekoituksessa.

2. Immunogeenisekoitus on täysin tehokas (enemmän kuin 95 % eläimistä ilmensi haluttuja ominaisuuksia) tuottamaan halutun vaikutuksen, ts. asiaankuuluvien elinten surkastumisen.

Esimerkki 11**Alunaan formuloitu immunogeenisekoitus**

Ihmisen eturauhassyövän hoitoa varten on välttämätöntä saavuttaa samanlaiset elimen painon alenemiset käyttämällä rokotekoostumusta, joka on hyväksyttävissä käytettäväksi ihmisille. Sen vuoksi T_h :LHRH-rakenteiden sekoituksen, jonka adjuvanttina oli alumiinihydroksidi, testattiin. Seuraava on yhteenveto tästä kokeesta. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, jollei toisin esitetä.

Koesuunnitelma

Immunogeeni: Sekoitus (HBS T_h :LHRH + $MV_{FI}T_h$:LHRH + $PT_2 T_h$:LHRH + TT_1T_h :LHRH)

Annos: 250 Mg, molaarisesti yhtä suuri määrä kutakin

Antotapa: intramuskulaarinen

Adjuvantti: alumiinihydroksidi

Aikataulu: viikot 0, 2 ja 4

Laji: 5 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Nekropsia: viikolla 10, määritetään kivesten painot

Tulokset:

Viikolla 8 kokeen aloittamisen jälkeen havaittiin merkittäviä LHRH-spesifisiä vasta-ainetiittereitä kaikissa eläimissä, kolmen eläimen tiitterit olivat yli 2 nmol/l ja kahden tiitterit olivat välillä 1,5 - 2,0 nmol/l (kuvio 27). Viikkoon 10 mennessä 4:n eläimen 5:stä LHRH-vasta-ainetiitterit olivat yli 2 nmol/l. Tänä ajankohtana 4 eläintä 5:stä ilmensi seerumin testosteronia kastroatiota-

solla (kuvio 28) ja samoilla neljällä eläimellä oli merkitsevästi surkastuneet eturauhaset (kuvio 29). Viidennellä eläimellä, nro 231, ilmeni huomattavaa, vaikka epätäydellistä eturauhasen painon vähenemistä verrattuna ryhmän toisiin eläimiin. Sen eturauhasen paino on yhtenevä vähenyttyneiden, vaikka määritettävien seerumin testosteronin tasojen kanssa tässä eläimessä kokeen lopussa. Tämä on ensimmäinen koskaan esitetty raportti, jossa haluttu biologinen vaikutus (nimittäin seerumin testosteronin eliminatio ja eturauhasen huomattava surkastuminen) saatiin aikaan immunisoimalla LHRH-rakenteilla alunassa. Kaikissa muissa tapauksissa, joita tähän mennessä on kirjallisuudessa kuvattu, yritykset käyttää alunaa LHRH-perustaisille immunogeeneille ovat epäonnistuneet, ja vaatineet reaktogeenisten koostumusten (ts. Freundin adjuvantin) käyttä-

15 mistä tuottamaan halutut vaikutukset.

Alunaan perustuvan koostumuksen vähentynyt tehokkuus (kuvio 28) verrattuna samaan immunogeenisekoitukseen Freundin adjuvantissa (kuvio 25) ilmeni haluttujen reaktioiden ajoituksen viivästymisenä. Tätä osoittaa rotta nro 228 (kuvio 29), jolla oli surkastunut eturauhanen, mutta normaali kivesten paino viikolla 10. On mahdollista, että tällä eläimellä olisi ollut surkastuneet kivekset, jos koetta olisi jatkettu 10 viikon jälkeen. Sitä vastoin jokaisella eläimellä, joka sai Freundin adjuvantti -pohjais-

25 ta koostumusta, oli surkastuneet kivekset viikkoon 10 mennessä (kuvio 26).

Johtopäätökset:

1. Synteettisten epäyhtenäisten T_h : LHRH -peptidirakenteiden sekoittaminen tarjoaa tehokkaan immunoterapeuttisen LHRH-rokotteen.

30

2. Tämä immunogeenisekoitus voidaan formuloida alunan kanssa (Yksi harvoista kaikkein turvallisimmista adjuvanteista, jotka on hyväksytty käytettäväksi ihmisille) ja

saada halutut biologiset vaikutukset, ts. asiaankuuluvien elinten surkastuminen.

Esimerkki 12

5 Keinotekoisien T_h -epitoooppi SSAL:LHRH-rakenteen tehokkuus

Peptidi 38 (jota kutsutaan myös peptidi SSAL1:ksi) on peptidikirjasto, jossa degeneroitunut T_h -sekvenssi, tehty tuhkarokkoviruksen F_1 :n T_h -epitooopin mukaiseksi, on liitetty LHRH:hon. Tämä peptidi on organisoitu kolmeen lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyylipäähän seuraavasti: rakenteellinen synteettinen antigeenikirjasto, jota edustaa synteettinen auttaja-T-soluepitoooppi (SSAL T_h), glysiinivälike (GG) ja LHRH. Peptidiä 38 voi sen vuoksi merkitä kaavalla SSAL1 T_h : GG: LHRH, ja se on analoginen peptidille 19 (ts. MVF_1 T_h : GG: LHRH:lle).

Peptidin 38 sekvenssi on, kuten taulukossa 5 on esitetty: Peptidi SSAL1: SSAL T_h 1:GG: LHRH (SSAL T_h 1 MV_{FI} T_h :n johdannainen).

Tämä peptidikirjasto koostuu seoksesta noin $5,24 \times 10^5$ erilaista sekvenssiä, joista täsmällistä tuhkarokkoviruksen T_h 1-epitoooppia edustaa ainoastaan yksi näistä sekvensseistä. Gly-välike ja LHRH ovat muuntelemattomia kirjaston sekvensseissä.

Peptidissä SSAL1 oleva degeneroitunut auttaja-T-soluepitoooppi mallinnetaan satunnaisten auttaja-T-soluepitooopin mukaan, joka on tunnistettu tuhkarokkoviruksen F-proteiinista, edustaen jäännöksiä 288 - 302 F-proteiinista, ja jolla on seuraava aminohapposekvenssi, LSEIKGVIVHR-LEGV. Kirjaston sekvenssi rakennettiin käyttämällä tätä sekvenssiä templaattina. Varaukselliset jäännökset Glu (E) ja Asp (D) lisättiin asemaan 1 lisäämään amfipaattisen helikaalisen epitooopin hydrofobista pintaa ympäröivää varausta. Tämä pinta koostuu jäännöksistä asemissa 2, 5, 8, 9, 10 ja 16. Satunnaisiin epitoooppiin yleisesti liittyvät hydrofobiset jäännökset lisättiin näihin asemiin.

Rothbardin sekvenssi on asemissa 6 - 10 prototyyppisessä sekvenssissä ja sen luonne säilytetään kaikissa sekvensseissä kirjastossa. Sekvenssit, jotka eivät noudata sääntöä 1, 4, 5, 8, alkavat jäännöksestä 5 prototyyppisessä sekvenssissä ja ne säilyvät samoin kaikissa sekvensseissä.

Peptidi 38 valmistettiin kemiallisella synteesillä käyttäen tavanomaisia tekniikoita, jotka ovat alalla hyvin tunnettuja, kuten kiinteäfaasisynteesireittiä, jonka ensin esitti Merrifield. Monen aminohapon kytkentä tietyssä asemassa tehdään tarjoamalla haluttuja aminohappoja seoksena oikeissa suhteissa, kuten kaava esittää. Esimerkiksi asemissa 2, 5, 8, 9, 10, 13 ja 15 N-päästä, kussakin vastavassa kytkentävaiheessa käytettiin sama määrä suojattua N^o-aminoryhmää, Leu (L), Ile (I), Val (V) ja PHE (F), yhden suojatun aminohapon asemasta. Jos se on välttämätöntä, aminohappojen suhde seoksessa voi vaihdella, jotta varmistetaan näiden aminohappojen erilainen kytkentätehokkuus. Synteesin lopuksi peptidikirjastot pilkottiin yksittäin tavanomaisten menetelmien mukaisesti, jotta vapautettiin vapaat peptidiseokset. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkiksi 5, jollei toisin esitetä.

Koesuunnitelma:

Immunogeeni: peptidi 38 tai peptidi 19 (eri ryhmissä)

Annos: 400 mg kutakin peptidiä

Antotapa: intramuskulaarinen

Aikataulu: viikolla 0 (FCA), 3, ja 6 (IFA)

Laji: 5 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Nekropsia: viikolla 10, määritetään kivesten painot

Tulokset:

Kuusi viikkoa kokeen perustamisen jälkeen (ts. 2 viikkoa ensimmäisen tehosteimmunisaation jälkeen ja välittömästi ennen toista tehostetta), 4 eläintä viidestä, jotka saivat peptidiä 38, ilmensi seerumin testosteronia

kastraatiotasolla. Viikolla 8 seerumin testosteroni oli kastraatiotasolla 5 eläimellä 5:stä. Kivesten tunnustelu käsin tänä ajankohtana osoitti, että 4 eläimellä, joilla seerumin testosteroni oli hyvin vähäinen viikolla 6, oli myös surkastuneet elimet. Sitä vastoin ainoastaan 1 eläin 5:stä, jotka immunisoitiin peptidillä 19, ilmensi seerumin testosteronitasoja kastraatiotasolla viikkoon 6 mennessä, loppujen ollessa normaalilla alueella, ja tämä luku ei muuttunut viikolle 8 ehdittäessä. Viikkoon 8 mennessä eläin, joka sai peptidiä 19, ja jolla oli vähäiset määrät testosteronia viikolla 6, oli käsin koeteltaessa surkastuneet kivekset.

Johtopäätökset:

1. T_h -epitopppikirjasto on osoittanut merkitsevää tehokkuutta aiheuttaen seerumin testosteronin vähenemisen kastraatiotasoilta kaikissa eläimissä, jotka saivat peptidiä 38.

2. T_h -epitopppikirjastopeptidi on tarjonnut, mitä yksi peptidi-immunogeeni, joka käsittää satunnaisen T_h -epitopin liitettynä LHRH:hon, ei voi tarjota, ts. kattavan tehokkuuden kaikissa ulkosiittoisen populaation jäsenissä.

Esimerkki 13

LHRH-immunogeenien muuntelu lisää monistamaan vasta-aineen induktio: invasiinidomeenin lisääminen

T-solujen aktivaatio voidaan myös saavuttaa LHRH:lla, joka on liitetty kovalenttisesti spesifiseen fragmenttiin patogeenisen bakteerin *Yersinia* spp. invasiiniproteiinista. On syntetisoitu peptidi 32, jossa invasiiniproteiinin domeeni on liitettynä HBs T_h -epitoppi:LHRH-rakenteeseen (ts. $Inv_{718-732}$ + peptidi 18). Peptidi 32 on organisoitu viiteen lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyylipäähän seuraavasti: invasiinin T-solustimulaattori (Inv), glysiinivälike (GG), hepatiitti B:n pinta-antigeenin auttaja-T-soluepitoppi (HBsAg T_h1), glysiinivälike (GG) ja LHRH. Peptidiä 32 edustaa siten kaava:

Inv: GG: HBsAg T_h1: GG: LHRH. Seuraavassa tarjotaan spesifinen esimerkki huomattavasta tehokkuudesta, jota invasiinidomeenin lisääminen antaa LHRH-immunogeenille. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, jollei toisin esitetä.

Koesuunnitelma

Immunogeeni: peptidi 32

Annos: 100 µg annosta kohti

Antotapa: subkutaaninen

10 Adjuvantti: alumiinihydroksidi

Laji: 5 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Nekropsia: viikolla 10, kivesten painojen määrittäminen

Tulokset:

15 Kuviossa 30 esitetään LHRH-spesifiset vasta-ainetiitterit, joita peptidillä 32 immunisoidut rotat tuottivat. Merkittävät tiitterit saavutettiin ensimmäisen tehosteimmunisaation jälkeen (viikolla 3), ja ne jatkoivat nousua seuraavan tehosteimmunisaation jälkeen viikolla 6.

20 Viikolla 8, 4 eläintä 5:stä ilmensi LHRH-vasta-ainetiittereitä, jotka olivat yli 2 nmol/l. Kontrollieläimet, jotka oli immunisoitu Inv₇₁₈₋₇₃₂:LHRH-rakenteella, josta puuttui T_h-epitoppi, eivät tuottaneet määritettäviä tasoja LHRH-spesifistä vasta-ainetta. Seerumin testosteronitasot (kuvio

25 31) putosivat huimaavasti eläimissä, jotka reagoivat peptidiin 32, ja viikolla 8 testosteronitasot olivat alle kastration kynnyksarvon. Seerumin testosteroni näissä eläimissä pysyi alle mitattavuuden kokeen loppuun saakka. Kuten kuvassa 32 esitetään, dramaattinen elinten surkastuminen saavutettiin neljälle reagoivalle eläimelle. Peptidillä 18 (HBs T_h: GG: LHRH; invasiinidomeeni puuttuu) immunisoitujen kontrollieläinten kivekset olivat muuttumattomat tämän kokeen lopussa (ts. viikolla 10). Tämä tulos on erityisen tärkeä, koska invasiinia sisältävä LHRH-peptidi oli formuloitu alunaan ja annettu subkutaanisesti.

35

Aikaisemmat tutkimukset LHRH:lla, joka oli liitetty suuri-
molekyyllipainoisiin kantajamolekyyliin, esim. tetanus-
ja difteriatoksiineihin, vaativat formulointia Freundin
täydelliseen adjuvanttiin tai johonkin muuhun reaktogeeni-
seen adjuvanttiin, saavuttamaan minkäänlaista merkitsevää
tehokkuustasoa.

Johtopäätökset:

1. Invasiinifragmentti tarjoaa merkittävän paran-
nuksen immuunivasteeseen T_h :LHRH-rakenteita vastaan.

2. Aluna oli riittävä adjuvantti peptidille 32.

3. Peptidi 32 kykenee aiheuttamaan elinten surkas-
tumista.

Esimerkki 14

Peptidiä 32 sisältävän LHRH-immunogeenisekoituksen
tehokkuus

Tehtiin koe, jossa testattiin esimerkeissä 10 ja 11
kuvatun immunogeenisekoituksen tehokkuutta, paitsi että
HBs T_h : GG: LHRH -rakenne korvattiin peptidillä 32. Tämän
esimerkin menettelytavat ovat samanlaiset kuin esimerkissä
11 käytetyt. Kuten edellä, eläimet saivat 100 µg peptidiä
alunassa, annettuna viikoilla 0, 3 ja 6. Kuten kuvio 33
osoittaa, tuotettiin nopeita ja tehokkaita anti-LHRH-vas-
ta-ainevasteita reaktiona immunisaatioon invasiini-frag-
mentin sisältävällä sekoituksella formuloituna alunan
kanssa. Viikon 8 jälkeen 6 eläintä 6:sta peptidiä 32 si-
sältävää sekoitusta saaneesta eläimestä ilmensi seerumin
testosteronitasoja (kuvio 34), jotka olivat kastraation
kynnysarvon alle (ts. vähemmän kuin 0,5 nmol/l). Sitä vas-
toin 4 eläimellä 6:sta ekvivalentin annoksen yksinomaan
peptidiä 32 alunassa saaneista oli testosteroni kastraati-
otasolla. Nämä tulokset antavat olettaa, että mikä ta-
hansa geneettinen muuntelu, joka liittyy reaktioihin in-
vasiinifragmenttiin, voitetaan antamalla se sekoituksessa,
joka sisältää eri T_h -rakenteita. Kuviossa 35 esitetään ki-
vesten painot kokeen lopussa (viikolla 10). Viidellä eläi-

mellä 5:stä peptidiä 32 sisältävää immunogeenisekoitusta saaneesta eläimestä ilmeni merkitsevää elinten surkastumista ja histologisessa tutkimuksessa ne olivat toiminnallisesti steriilejä.

- 5 Invasiini₇₁₈₋₇₃₂ liitettynä HBs T_h:GG:LHRH:hon tuottaa peptidin 32, liitettynä MV_{FI}T_h:GG:LHRH:hon tuottaa peptidin 33, liitettynä PT₂T_h:GG:LHRH:hon tuottaa peptidin 34, liitettynä TT₁T_h:GG:LHRH:hon tuottaa peptidin 35, liitettynä TT₄T_h:GG:LHRH:hon tuottaa peptidin 36 ja liitettynä
- 10 TT₅T_h:GG:LHRH:hon tuottaa peptidin 37. Esimerkit, jotka suunniteltiin arvioimaan peptidien 32 - 37 tehokkuutta yksin ja yhdistelmänä, on tehty tämän esimerkin ja esimerkin 13 mukaisesti.

Esimerkki 15

- 15 Kovalenttisella sidoksella Pam₃Cys:iin aikaansaatu LHRH-immunogeenin parantunut tehokkuus

- HBsAg T_h: GG: LHRH -peptidiä muunnettiin vielä lisäämällä lipidiosa Pam₃Cys. Lipidijäännös liitettiin kovalenttisesti peptidin 18 aminopäähän ennen sen pilkkomista
- 20 hartsista, jota käytettiin peptidin synteesissä. Sen vuoksi tämä muunnettu peptidi on organisoitu neljään lineaariseen domeeniin, aminopäästä karboksyylipäähän seuraavalla tavalla: tripalmitoyyli-S-glyserolikysteini (Pam₃Cys), hepatiitti B pinta-antigeenin satunnainen auttaja-T-soluepitooppi (HBsAg T_h), glysiinivälike (GG) ja LHRH. Tätä
- 25 peptidiä edustaa seuraava kaava: Pam₃Cys: HBsAg T_h: GG: LHRH. Lipidillä muunnettu peptidi formuloitiin stabiiliin lipidiemulsioon, Liposyyiniin (soijapavun ja saflorin emulgoitujen öljyjen seos) ja annettiin subkutaanisesti Sprague-Dawley-rotille. Käytetty annos oli molaarinen ekvivalentti 100 µg:lle peptidiä 18 annettuna viikoilla 0, 3 ja
- 30 6. Toinen ryhmä eläimiä sai muuntamatonta peptidiä 18 100 µg:n annoksina viikoilla 0, 3 ja 6. 10 viikkoa kokeen aloituksen jälkeen tehtiin ELISA-analyysi immunisoiduista
- 35 eläimistä otetulle seerumille. 5 eläintä 5:stä Pam₃Cys:

HBsAg: GG: LHRH:lla immunisoiduista eläimistä ilmensi merkittävästi peptidin 18 vastaisia vasta-aineita (OD > 0,5 laimennuksella 1:100). Sitä vastoin yksikään muuntamattomalla peptidillä 18 immunisoiduista eläimistä ei ilmentänyt vasta-aineita tällä tasolla. Sen vuoksi kovalenttinen lipidilisyys tarjoaa tehokkaan tavan tehostaa immuunivasteita.

Esimerkki 16

Peptidin A anto mikropartikkeleissa

Saadaan tehokkaita immuunivasteita kun LHRH-immunogeeni suljetaan 10 µm:n tai pienempiin mikropartikkeleihin ja annetaan subkutaanisesti tai intramuskulaarisesti. Makrofaagit ottivat tehokkasti näitä pieniä mikropartikkeleita mahdollistaen antigeenin tehokkaan ilmentämisen.

Peptidiä A sisältävät mikropartikkelit valmistettiin poly(laktidi-ko-glykolidi)kopolymeeristä, kuten US-sarjanumerossa 201 524, hakemispäivä 25.2.1994 on esitetty.

Steriili (vesi öljyssä)vedessä-emulsio valmistettiin seuraavalla tavalla: synteettisen peptidin A 1,5-prosenttinen w/w vesiliuos valmistettiin viemällä peptidiliuos steriilin 0,2 µm:n suodattimen läpi. Polymeeri liuotettiin dikloorimetaaniin konsentraationa 4,0 % w/w; 200 g tätä liuosta lisättiin 20 g:aan peptidiliuosta ja sekoitettiin homogenisoijalla (malli STD 1, Silverson Machiens, East Longmeadow, MA, 2,54 cm:n putkimainen pää, 13 000 rpm, 4 min). Kun vesi öljyssä -emulsio oli muodostettu, 600 g 10-prosenttista w/w liuosta polyvinyylialkoholia lisättiin siihen ja sekoitettiin homogenisoijalla (13 000 rpm, 6 min). Muodostui stabiili (vesi öljyssä)vedessä-emulsio, ja se siirrettiin 2 l suodatuspulloon. Dikloorimetaani haihdutettiin sekoittamalla magneettisekoittajassa 16 tuntia huoneenlämmössä. Haihdutuspulloon johdettiin steriiliä ilmaa 0,2 µm suodattimen läpi ja 4 cm emulsion

yläpuolelle asennettiin kaasudispersioputki. Kun dikloorimetaani haihtui, se poistettiin pullosta ilmavirralla, joka kulki pullon sivuhaaran läpi. Ilma/dikloorimetaaniseos kuljetettiin kuivan jääasetonin kylmänsaan dikloorimetaanin kondensoimiseksi. Dikloorimetaanin haihdutus oli täydellinen 16 tunnin kuluttua ja erillisiä partikkeleita oli muodostunut. Partikkelit otettiin talteen polyvinyylialkoholiliuoksesta sentrifugoimalla, pesemällä steriilillä vedellä ja lyofilisoimalla 24 tuntia, jotta tuotettiin kuiva jauhe. Partikkelikoko on vähemmän kuin 10 µm. Immuunivasteet mikropartikkelista peptidiä A vastaan arvioitiin rotissa kokeessa, joka on kuvattu alla, ja josta on esitetty yhteenveto taulukossa 7. Koesuunnitelma on sama kuin esimerkissä 5, jollei toisin esitetä.

15

Koesuunnitelma

Immunogeeni: peptidi A (HBsAg T_h: LHRH, ilman väliskettä) nopeasti vapauttavissa mikropartikkeleissa (1:1 polylaktidi:ko-glykolidi)

Annos: 100 µg peptidiä A annosta kohti

20

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: koemuuntuja

Laji: 6 sukukypsää koiraspuolista Sprague-Dawley-rottaa/ryhmä

Nekropsia: viikolla 10, määritettiin kivesten painot

25

Tulokset:

Mikropartikkelinen peptidi A sai aikaan merkitsevää LHRH-spesifisen vasta-aineen tuotantoa ja dramaattista kivesten surkastumista 2 eläimessä 6:sta. Kun annettiin sama määrä peptidiä A formuloituna alunaan samalla tavalla, yksikään eläimistä ei osoittanut merkitsevää elinten painon vähenemistä. Näin ollen mikropartikkelit olivat tehokkaampia kuin aluna aiheuttamaan haluttuja vaikutuksia, ts. nousseita LHRH-vasta-ainetiittereitä, seerumin testosteronin eliminaatiota ja elinten surkastumista. Mik-

35

ropartikkeliannostelu on hyvin vertailukelpoinen tehokkuuteen, jota liukoisen peptidin A Freundin adjuvantissa annettuna osoittaa, se aiheutti elinten surkastumista 3:lle eläimelle 6:sta. Vertailun vuoksi, kuten esimerkissä 6 on esitetty, yksinkertaisesti lisäämällä glysiinivälikese-

5

venssit (joita on peptidissä 18) HBsAg T_h: LHRH -rakenteeseen, paransi immunogeenisyyttä merkitsevästi; 6 eläimellä 6:sta peptidiä 18 FCA:ssa/IFA:ssa saaneesta eläimestä oli surkastuneet kivekset.

10

Peptidillä A ladattujen mikropartikkelien sekoittamisen eri adjuvantti/emulsiokoostumuksiin vaikutukset tutkittiin. Kuten taulukosta 7 voidaan nähdä, tietyt koostumukset, jotka sisältävät Liposyyä + saponiinia ja skvaleenia + L121:tä (4 eläimellä 6:sta kussakin ryhmästä

15

oli surkastuneet kivekset) näyttävät parantavan immuunivasteita, jotka herätetään mikropartikkelista peptidiä A vastaan. Liposyyä on soijapapupuöljy- ja safloniöljy-emulsio, joka on valmistettu ihmisten intravenaalista ruokkimista varten, saponiini on vesiliukoinen uute Quil

20

A:sta, skvaleeni on metaboloitava eläinöljy, jota on testattu aikaisemmin ihmisillä rokoteantajana ja L121 on kolmiosainen polymeeri, joka on osoittautunut tehokkaaksi ihmisten syöpäterapiakokeissa. 100-prosenttinen tehokkuus saavutettiin peptidillä A ladatuilla mikropartikkeleilla,

25

joita oli formuloitu emulsigeeniin + saponiiniin. Emulsogeenin on adjuvantti, joka on hyväksytty käytettäväksi ravintoeläimille, ja tätä koostumusta (ts. immunogeenisekoitus emulsigeenissa + saponiinissa) voidaan käyttää lemmikkieläinten ehkäisyrokotteena tai 'karjun merkin' käsittelyyn.

30

Formuloidaan polylaktidi-ko-glykolidi-mikropartikkeleita, jotka sisältävät immunogeenisekoituksen, ja testataan niiden immuunitehoa tämän esimerkin mukaisesti.

Esimerkki 17

T_h :LHRH:n tehokkuus annettuna emulsioina

T_h -epitoooppi: LHRH -immunogeeniä on tunnistettu ja luokiteltu niiden tehokkuuden mukaan (taulukko 6) käyttäen tavanomaista Freundin täydellistä/epätäydellistä immunisaatioprotokollaa. Nämä tulokset ovat mahdollistaneet joukon erilaisia T_h -rakenteita valinnan formuloitavaksi immunogeenisekoitukseen. Tämä sekoitus, kytkettynä alunaan, on osoittanut merkitsevää tehokkuutta (esimerkki 11). Invasiinidomeenin lisäys on parantanut näiden LHRH-rakenteiden immunogeenisyyttä niin, että yhden invasiiniepitooopin sisältävä peptidi osoittaa merkitsevää tehokkuutta annettuna alunassa (esimerkki 13). Invasiinia sisältävä rakenne herättää myös poikkeuksellisia ja yhdenmukaisia reaktioita, kun se on immunogeenisekoituksen komponenttina (esimerkki 14).

Immunoterapeuttisten immunogeenien mikropartikkeliliannon emulsiokoostumuksissa lisäksi on arvioitu liukoisien immunogeenien adjuvantti/emulsiopohjaisia koostumuksia. Jälleen käytettiin peptidiä A tarjoamaan keinot vertailla eri koostumusten suhteellisia tehokkuuksia. Arvioidut eri adjuvantti/emulsioyhdistelmät on luetteloitu taulukossa 8. Taulukossa 8 esitetään, mitkä adjuvantti/emulsioyhdistelmät ovat sopivia käytettäväksi ihmisille tai eläimille. Mukaan otettiin joitakin reaktogeenisemmistä adjuvanteista (esim. Freundin epätäydellinen), jotka on hyväksytty käytettäväksi syöpäpotilaille. Eläimet immunisoitiin viikoilla 0, 3 ja 6 100 µg:lla peptidiä A esitetyissä koostumuksissa annettuna subkutaanisesti. Merkitsevää tehokkuutta, yhtä hyvää tai parempaa kuin Freundin täydellisellä adjuvantilla saavutettu, saatiin aikaan joillakin näistä koostumuksista, esim. emulsigeeni + L121 ja ISA 720.

Esimerkki 18

**Invasiinia sisältävän peptidisekoituksen tehokkuus
ainutlaatuisissa emulsiokoostumuksissa**

Adjuvanttikoostumuksia, jotka paransivat peptidin A
5 tehokkuutta verrattuna alunapohjaiseen koostumukseen,
esim. IFA, ISA 720, ISA 51, Detox, Liposyn + Avridine,
skvaleeni + L121, MPL + TDE, emulsigeeni + DDA ja emulsi-
geeni + L121, käytettiin sitten esimerkissä 14 kuvatus-
peptidiä 32 sisältävän sekoituksen valmistamiseen. Näiden
10 eri koostumusten tehokkuuden testauksen tuloksista on esi-
tetty yhteenveto taulukossa 9. Merkitsevää tehokkuutta
(määritettynä seerumin testosteronitasoina alle kastraati-
on kynnsarvon viikolla 8 100 %:lla eläimistä ja surkas-
tuneet kivekset 100 %:lla eläimistä viikolla 10) havait-
15 tiin usealle adjuvanteista. Nämä havainnot osoittavat voi-
man, jota tehokkaan immunogeenin, nimittäin T_h -epitoppi:
LHRH -sekoituksen, joka sisältää invasiinidomeenin, yhdis-
täminen tehokkaisiin ja turvallisiin emulsiokoostumuksiin
tuottaa.

20 **Esimerkki 19**

**Universaali synteettinen immuunistimulaattori-amy-
liini-rakenteiden tehokkuus**

Peptidit 92 - 94 (peptidi ID nro 92 - 94) syntetoi-
daan käyttämällä tavanomaisia Fmoc-synteesimenettelyitä.
25 HPLC:llä tehdyn puhdistuksen jälkeen peptidien yhtenäisyys
ja autenttisuus määritetään massaspektrometria-analyyseil-
lä. Kunkin synteettisen peptidirakenteen tehokkuus määri-
tetään yksittäin ja rakenteiden sekoituksena immunisoimal-
la koe-eläimiä koesuunnitelman mukaisesti:

30 Immunogeeni: peptidit 92 - 94 yksittäin

peptidit 92 - 94 yhdessä

Annos: molaarisesti ekvival. 100 µg:lle peptidiä 92

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Aikataulu: viikolla 0, peptidi Freundin täydellisessä, viikoilla 3 ja 6, peptidi Freundin epätäydellisessä

Laji: 5 naaraspuolista Sprague-Dawley-rottaa kussakin ryhmässä

5 Kontrolli: yksi ryhmä, sai ainoastaan adjuvanttia
Verinäytteet: otettiin viikoilla 0, 3, 6 ja 10 primäärin immunisaation jälkeen

Nekropsia: viikolla 10, eristettiin haimat.

Immunisoiduilta eläimiltä otetuista verinäytteistä
10 erotetusta seerumista testataan amyliinille spesifiset vasta-aineet tavanomaisella ELISA-analyysillä. Täysipituista amyliinipeptidiä käytetään mikrotiitterilevyjen peittämiseen ja testataan laimennussarja kustakin seeruminäytteestä tiittereiden määrittämiseksi. ELISA-positiivisissa seerumeissa olevien amyliinille spesifisten vasta-
15 aineiden kapasiteetti estää amyliinin välittämää glukoosin oton inhibitiota määritetään insuliinin stimuloiman glykogeenin synteesille tehdyllä analyysillä in situ, kuvanneet Cooper et al. (1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7763 -
20 7766). Lyhyesti esitettynä, soleus-lihassäikeitä valmistetaan paastolla oelvista koiraspuolisista Wistar-rotista ja pidetään muunnetussa Krebs-Ringer-bikarbonaattipuskurissa. Lyhyen inkuboinnin (30 min.) jälkeen lihassäikeet siirretään uusiin puskuriliuoksiin, jotka sisältävät [U^{14}]-
25 glukoosia ja laimennussarjoihin täysipituista amyliinipeptidiä, jota on aikaisemmin inkuboitu ELISA-positiivisten rottien seerumissa. Yhden tunnin inkuboinnin jälkeen määritetään glykokeeniin liittyneen [U^{14}]-glukoosin määrä lihaskudoksessa. Kontrollinäytteet, amyliini, jota on inkuboitu tavallisessa suolaliuoksessa ja amyliini, jota on
30 inkuboitu adjuvanttikontrollieläinten seerumissa, sisällytetään myös. Vasta-aineet, jotka kykenevät estämään amyliinin toiminnallisen aktiivisuuden, estävät amyliinin aiheuttaman inhibition insuliinin stimuloimalle glukoosin
35 otolle lihassyihin.

Kokeen päättyessä (ts. viikolla 10) eläimet tapetaan ja niiden haimat poistetaan. Kudossektioista näistä elimistä arvioidaan amyliinin läsnäolo käyttämällä peptidihormonille spesifistä immunohistokemiallista värjäysmenetelmää (Westermarck et al., 1987, Diabetologia 30: 887 - 892). Niiden synteettisten immunogeenien, jotka inhiboivat merkittävästi inhiboivat amyliinin toimintaa ja estävät amyliinin kertymistä saarekkeiden soluihin, tehokkuus testataan rottamallissa käyttämällä ihmisille hyväksyttäviä adjuvantteja.

Esimerkki 20

Universaalisten synteettisten immuunistimulaattorigastriinirakenteiden tehokkuus

Peptidit 95 - 100 (peptidit ID NO: 95 - 100) syntetoidaan käyttämällä tavanomaisia Fmoc synteesimenetelmiä. Puhdistuksen HPLC:llä jälkeen peptidien yhtenäisyys ja aitous määritetään massaspektrofotometri-analyysillä. Kunkin synteettisen peptidirakenteen tehokkuus määritetään yksittäin ja rakenteiden sekoituksena immunisiomalla koe-eläimiä koesuunnitelman mukaisesti:

Immunogeeni: peptidit 95 - 100 yksittäin

peptidit 95 - 100, yhdessä

Annos: molaarisesti sama määrä kuin 100 µg peptidiä

95

25 Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Aikataulu: 0 viikkoa, peptidi Freundin täydellisessä, 3 ja 6 viikkoa, peptidi epätäydellisessä Freundin adjuvantissa

30 Laji: 5 naaraspuolista Sprague-Dawley-rottaa ryhmää kohti

Kontrolli: yksi ryhmä, sai ainoastaan adjuvanttia

Verinäytteet: otettiin 0, 3, 6 ja 10 viikkoa primaarisen immunisaation jälkeen

Tulokset:

Immunisoiduilta ja kontrollirotilta otetaan ajoittain verinäytteet. Näistä näytteistä valmistetusta seerumista analysoidaan Gastriini₁₇-, Gastriini₃₄-, ja CCK-spesifiset vasta-aineet.

Käytetään kahta analyysityyppiä osoittamaan anti-gastriini-vasta-aineita: kiinteän faasin entsyymiin liitetty immunosorbenttianalyysi (ELISA) ja nestefaasin radioimmunoanalyysi (RIA).

ELISA:a käytetään seulottaessa gastriinia₃₄, gastriinia₁₇ ja CCK:ta vastaan nostatettujen antiseerumien reaktiivisuutta tai ristireaktiivisuutta. RIA:a käytetään kvantitoimaan seerumin vasta-ainetasoja kustakin immunisoidusta eläimestä antamalla samojen määrien seerumia reagoida kunkin näistä hormoneista kanssa antigeenin sitomiskapasiteetin määrittämiseksi, ilmaistuna pg:oina hormonia sitoutuneena mikrolitraan antiseerumia (pg/μl).

ELISA tehdään päällystämällä polystyreeniset 96 kaivon levyt 1 μg:lla/ml peptidejä gastriini₃₄, gastriini₁₇ tai CCK. Antiseerumin testaamiseksi käytetään laimennussarjoja, määrittämään seerumin tiittereiden loppupisteet.

RIA:ssa 0,1, 1,0 tai 10,0 μl:n määrät antiseerumia inkuboidaan ¹²⁵I:llä leimatulla gastriini₃₄:llä, gastriini₁₇:llä tai CCK:lla. Antiseerumia inkuboidaan leimattujen hormonien kanssa 2 tuntia, mitä seuraa hormoni-vasta-ainekompleksien saostus 25-prosenttisella polyetyleeniglykolilla. Kunkin antiseerumin antigeenin sitomiskapasiteetit määritetään saostuneen vastaavan radioaktiivisen hormonin määrästä.

ELISA- tai RIA-positiivisissa seerumeissa olevien gastriinin kanssa reaktiivisten vasta-aineiden kapasiteetti neutraloida gastriinin happoa stimuloivaa aktiivisuutta in vivo määritetään käyttämällä kostutettujen rotanmahojen menetelmää, jonka kuvasivat Gevas, P. C. et al, EP-patenttihakemus 380 230, 1991. Lyhyesti, gastriinilla tai gast-

riini-anti-gastriinikompleksilla hapon erityksen indusoi-
miseksi injektoidut rotat valmistellaan kirurgisesti maha-
eritteiden keräämistä varten. Yleisen anestesian alaisena
ja trakeostomian jälkeen rottiin asetetaan kanyyli ruoka-
5 torven ja pohjukaissuolen läpi, mahdollistamaan mahan jat-
kuva perfuusio 0,9-prosenttisella suolaliuoksella. Mahan
perfuusionestettä kerätään ajoittain ja kustakin välistä
titrataan happomääränäytteet neutraloimalla emäksellä
(NaOH). Määritetään hapon tuoton nousu ja kokonaismäärä
10 kokeen keston aikana ja välittömästi kunkin käsittelyn
jälkeen.

Mahahapon tuottoa lasketaan prosentteina suurimmas-
ta mahdollisesta hapon tuotosta = $100 \times (A_n - A_n / A_{max} - A_b)$,
jossa A_n = kussakin näytteenottovälissä tuotetun hapon mää-
15 rä (määritettynä titraatiolla NaOH:illa), A_{max} = suurin
mahdollinen mahahapon vapautuminen näytteenottovälissä
stimulaation jälkeen ja A_b = annetun stimulaation ajankoh-
tana ollut mahahapon perustaso. ELISA- tai RIA-positiivi-
sissa seerumeissa olevien gastriinin kanssa reagoivien
20 vasta-aineiden kapasiteetti neutralisoida gastriinin kas-
vaimia stimuloivaa aktiivisuutta in vitro määritetään im-
muuniseerumin kyvyllä inhiboida gastriinin indusoimaa pak-
susuolen karsinoomasolulinjan lisääntymisreaktiota määri-
tettynä [H^3]-tymidiinin liittymisellä.

25 Esimerkki 21

Universaalisten synteettinen immuunistimulaatto- ri GRP -rakenteiden tehokkuus

Peptidit 101 - 102 (peptidi ID NO: 101 - 102) syn-
tetoidaan käyttämällä tavanomaisia Fmoc-synteessimenetel-
miä. HPLC:llä tehdyn puhdistuksen jälkeen peptidien yh-
tenäisyys ja aitous määritetään massaspektrofotometriana-
lyyseillä. Kunkin synteettisen peptidirakenteen tehokkuus
30 määritetään yksittäin ja rakenteiden sekoituksena im-
munisiomalla koe-eläimiä koesuunnitelman mukaisesti:

Immunogeeni: peptidit 101 ja 102 yksittäin

peptidit 101 ja 102 yhdessä

Annos: molaarisesti sama määrä kuin 100 µg peptidiä

101

5 Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

Aikataulu: 0 viikkoa, peptidi Freundin täydellisessä, 3 ja 6 viikkoa, peptidi epätäydellisessä Freundin adjuvantissa

10 Laji: 5 naaraspuolista Sprague-Dawley-rottaa ryhmää kohti

Kontrolli: yksi ryhmä, sai ainoastaan adjuvanttia

Verinäytteet: otettiin 0, 3, 6 ja 10 viikkoa primaarisen immunisaation jälkeen

15 Immunisoiduista eläimistä otetuista verinäytteistä erotellusta seerumista testataan gastriinia vapauttavalle peptidille (GRP9 spesifisten vasta-aineiden määrä tavanomaisella ELISA-analyysillä. Täysipituista GRP-peptidiä käytetään mikrotiitterilevyjen päällystämiseen ja kustakin seeruminäytteestä testataan laimennussarjat tiittereiden määrittämiseksi.

20 ELISA-positiivisissa seerumeissa olevien GRP-spesifisten vasta-aineiden kapasiteetti inhiboida GRP:n välittämää kasvainten kasvun induktiota määritetään GRP:n indusoiman, valittujen karsinoomasolulinjojen jakaantumisreaktioiden analyysillä in vitro [H^3]-tymidiinin otolle.

Esimerkki 22

Universaalisten synteettinen immuunistimulaattori-IgE-CH4-rakenteiden tehokkuus

30 Peptidit 103 - 104 (peptidit ID NO: 103 - 104) syntetoidaan käyttämällä tavanomaisia Fmoc-synteesimenetelmiä. HPLC:llä tehdyn puhdistuksen jälkeen peptidien yhtenäisyys ja aitous määritetään massaspektrofotometrianalyyseillä. Kunkin synteettisen peptidirakenteen tehokkuus

määritetään yksittäin ja rakenteiden sekoituksena immunisiomalla koe-eläimiä koesuunnitelman mukaisesti:

Immunogeeni: peptidit 103 ja 104 yksittäin

peptidit 103 ja 104 yhdessä

5 Annos: molaarisesti sama määrä kuin 100 µg peptidiä
103

Antotapa: subkutaaninen

Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen

10 Aikataulu: 0 viikkoa, peptidi Freundin täydellisessä, 3 ja 6 viikkoa, peptidi epätäydellisessä Freundin adjuvantissa

Laji: 5 naaraspuolista Sprague-Dawley-rottaa ryhmää kohti

Kontrolli: yksi ryhmä, sai ainoastaan adjuvanttia

15 Verinäytteet: otettiin 0, 3, 6 ja 10 viikkoa primäärin immunisaation jälkeen

Immunisoiduista eläimistä otetuista verinäytteistä erotellusta seerumista testataan IgE-CH4-spesifisten vasta-aineiden määrä tavanomaisella ELISA-analyysillä. IgE CH4 -peptidiä (SEQ ID NO: 79) käytetään mikrotiitterilevyjen päällystämiseen ja kustakin seeruminäytteestä testataan laimennussarjat niillä tiittereiden määrittämiseksi.

20 ELISA-positiivisissa seerumeissa olevien IgE-CH4-spesifisten vasta-aineiden kapasiteetti inhiboida IgE CH4-peptidin suoraa histamiinin vapauttamistoimintaa rotan peritoneaalisissa syöttösoluissa testataan, kuten Stanworth D, R, et al. (Lancet 1990, 336: 1279 - 1281) ovat kuvanneet. Näitä positiivisia seerumeita testataan vielä analyyseissä in vivo, jotta määritetään seerumin kyky inhiboida sinistymisreaktiota rotan passiivisen kutaanisen anafylaksian analyysissä, jonka ovat kuvanneet Stanworth D. R. et al. (Lancet 1990, 336: 1279 - 1281).

Esimerkki 23

Universaalisten synteettinen immuunistimulaattori-
Chlamydia trachomatisin MOMP-rakenteiden tehokkuus

- Peptidit 105 - 114 (peptidit ID NO: 105 - 114) syn-
 5 tetoitiin käyttäen tavanomaista Fmoc-synteesimenetelmää.
 kukin universaalinen immuunistimulaattori - C. trachomati-
sin MOMP -peptidirakenne formuloitiin, yksin ja yhdistel-
 mänä, ja injektoitiin koe-eläimiin suhteellisten im-
 munogeenisyyksien määrittämiseksi käyttämällä seuraavaa
 10 koejärjestelyä:
- Immunogeeni: peptidit 105 - 114 yksittäin
 peptidit 105 - 114 yhdessä
- Annos: molaarisesti sama määrä kuin 100 µg peptidiä
 107
- 15 Antotapa: intraperitoneaalinen
- Adjuvantti: Freundin täydellinen/epätäydellinen
- Aikataulu: 0 viikkoa, peptidi Freundin täydellisessä, 3 ja 6 viikkoa, peptidi epätäydellisessä Freundin ad-
 juvantissa
- 20 Laji: 5 naaraspuolista Dunkin-Hartley-marsua (450 -
 500 grammaa) ryhmää kohti
- Kontrolli: yksi ryhmä, sai ainoastaan adjuvanttia
- Verinäytteet: otettiin viikoilla 0, 5, 8 ja 12
- Immunisoiduista eläimistä otetuista verinäytteistä
 25 erotellusta seerumista testataan MOMP:in muuntelevalle
 domeenille spesifisten vasta-aineiden määrä tavanomaisella
 ELISA-analyysillä. Yksittäiset mikrotiitterilevyt päällystetään synteettisillä peptideillä, jotka edustavat MOMP:in
 muuntelevia domeeneja I - IV, joista puuttuu universaali
 30 immuunistimulaattori, kukin eri levyille. Kustakin im-
 munisoidusta eläimestä peräisin olevan seerumin laimennus-
 sarjat testataan niillä anti-MOMP-peptidi-vasta-aineiden
 tiitterien määrittämiseksi. ELISA:ssa positiivisten seeru-
 mien kapasiteetti sitoutua puhdistettuihin elementary bo-
 35 deihin (EB:ihin), jotka edustavat kukin eri C. trachomatis

-serovarianttia (A - L3), joilla mikrotiitterilevyt on päällystetty). EB:itä sitovista positiivisista seerumeista testataan sitten niiden kapasiteetti estää alttiiden nisäkässolujen infektoituminen viljelmissä kaikilla merkityksellisillä C. trachomatis -serovarianteilla (Su et al., 1990, Infect. Immun. 58: 1017 - 1025). Niiden synteettisten immunogeenien, jotka osoittavat merkitsevää kykyä herättää C. trachomatista neutraloivia vasta-aineita, tehokkuus testataan marsuissa käyttäen adjuvantteja, jotka ovat hyväksyttäviä käytettäväksi ihmisille. Peptidien kapasiteetti estää infektiota in vivo arvioidaan käyttämällä hiiren salpingitis-mallia (Tuffrey et al., 1992, J. Gen. Microbiol. 138: 1707 - 1715) tai cynomolgus-apinan silmän altistusmallia (Taylor, et al., 1988, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29: 1847 - 1853).

Esimerkki 24

Universaalisen immuunistimulaattori-HIV-1 V3 PND -rakenteen tehokkuus

Peptidi 115 (SED ID NO: 115) syntetisoiin käyttämällä tavanomaista Fmoc-synteesimenetelmää. Rakenteen tehokkuus herättää HIV-1:tä neutraloivia vasta-aineita koe-eläimissä määritetään seuraavan koesuunnitelman mukaisesti:

Immunogeeni: peptidi
 Annos: 100 µg immunisaatiota kohti
 Antotapa: subkutaaninen
 Adjuvantti: Freundin täydellinen/eptäydellinen
 Aikataulu: viikolla 0, peptidi Freundin täydellisessä adjuvantissa, viikolla 4, peptidi Freundin epätäydellisessä adjuvantissa
 Laji: 5 naaraspuolista Dunkin-Hartley marsua (450 - 500 grammaa) ryhmää kohti
 Kontrolli: yksi ryhmä sai ainoastaan adjuvanttia
 Verinäytteet: otettiin viikoilla 0, 4 ja 8

Immunisoiduista eläimistä otetuista verinäytteistä erotellusta seerumista testataan anti-V3 PND vasta-aineiden läsnäolo tavanomaisella ELISA-analyysillä. Monomeeristä versiota V3 PND:stä, joka ei ole liitettyä syntetiseen immuunistimulaattoriin, käytetään ELISA-mikrotiitterilevyjen päällystämiseen, ja kunkin seeruminäytteen laimennussarjat testataan niillä ELISA-tiittereiden määrittämiseksi. Positiivisista näytteistä testataan niiden kapasiteetti neutraloida HIV-1-kantaa MN in vitro käyttämällä solusitkospesäkkeiden pienenemisanalyysiä (Wang et al., 1991, Science 245: 285). Niistä seerumeista, jotka kykenevät neutraloimaan laboratorioon sopeutuneen kannan HIV-1_{MN} infektiokykyä, testataan niiden kyky estää lajitelman kenttäviruskantoja aiheuttama primaaristen lymfosyyttien infekcio (White Scharf et al., 1993, Virology 192: 197 - 206).

Taulukko 1
Peptidien A - E aminohapposekvenssit

Peptidi	SEQ ID NO.	Aminohapposekvenssit
5	A 10	Lys-Lys-Lys-Phe-Phe-Leu-Leu-Thr-Arg-Ile- Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-Ser-Leu-Asp-Glu-His- Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
10	B -	[Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro- Gly-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro- Gly-],-Lys ₄ -Lys ₂ -Lys-Phe-Phe-Leu-Leu-Thr- Arg-Ile-Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-Ser-Leu-Asp
15	C -	[Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro- Gly- Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg- Pro-Gly- Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu- Arg-Pro-Gly-],-Lys ₄ -Lys ₂ -Lys-Phe-Phe-Leu- Leu-Thr-Arg-Ile-Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-Ser- Leu-Asp
20	D -	[Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro- Gly- Phe-Phe-Leu-Leu-Thr-Arg-Ile-Leu- Thr-Ile-Pro-Gln-Ser-Leu-Asp-Met],-Lys ₄ - Lys ₂ -Lys-Ala-Ala
25	E -	[Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro- Gly- Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg- Pro-Gly- Phe-Phe-Leu-Leu-Thr-Arg-Ile- Leu-Thr-Ile-Pro-Gln-Ser-Leu-Asp-Met],- Lys ₄ -Lys ₂ -Lys-Ala-Ala
30		

Taulukko 2

Immunogeenisyys ja terapeutinen teho immunisaation jälkeen peptideillä A - E rotissa

	Peptidi	α -LHRH ^a	Testosteroni ^a	Kivekset ^b	P+SV ^c
5	A	3,93	<0,01	0,4	0,2
		2,55	<0,01	0,4	0,3
		2,06	<0,01	0,6	0,2
		0,72	5,3	1,8	1,8
10		0,42	2,1	1,7	1,8
	B	0,53	14,0	1,7	1,7
		0,51	16,5	1,7	1,6
		0,49	12,6	1,7	1,6
		0,45	4,6	1,6	1,7
15		0,42	10,5	1,7	2,2
	C	0,78	5,6	1,6	2,3
		0,45	12,3	1,8	1,6
		0,41	3,9	2,1	1,6
		0,41	5,3	1,6	1,8
20		0,39	11,2	1,7	1,8
	D	1,44	2,6	1,7	2,1
		0,44	3,6	1,7	1,3
		0,43	2,3	1,6	2,0
		0,39	2,1	1,7	1,6
25		0,39	2,8	1,4	2,1
	E	1,69	<0,01	1,4	2,0
		0,66	0,9	1,5	1,9
		0,51	3,3	1,2	1,9
		0,40	4,0	1,6	2,0
30		0,40	13,9	1,3	0,9

^anmol/l

^bkivesten paino grammoina

^ceturauhasen ja rakkularauhasten (P + SV) paino grammoina

Taulukko 3

Keskimääräiset anti-LHRH-tiitterit ja androgeeneista riippuvaisten elinten painot rotilla, jotka oli immunisoitu peptideilla A - E

5	Peptidi ^a	α -LHRH	Kivekset	Lisäkives	P+SV ^b
		(nmol/L)	(g)	(g)	(g)
10	A	1,94	1,0	0,4	0,9
	B	0,48	1,7	0,6	1,8
	C	0,49	1,8	0,6	1,8
	D	0,62	1,6	0,6	1,8
	E	0,73	1,4	0,6	1,7
	Kontrolli	0,45	1,6	0,7	2,0

15 ^aKutakin peptidiä injektoitiin 5 rottaan

^bLyhenteet: P + SV, eturauhanen ja rakkularauhaset

Taulukko 4

	Peptidi	SEQ ID No.	Sekvenssi
5	F (PT ₁ Th-LHRH)	11	Lys-Lys-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Tyr-Met-Ile-Tyr-Met-Ser-Gly-Leu-Ala-Val-Arg-Val-His-Val-Ser-Lys-Glu-Glu-Gln-Tyr-Tyr-Asp-Tyr-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
10	G (PT _{1A} Th-LHRH)	12	Tyr-Met-Ser-Gly-Leu-Ala-Val-Arg-Val-His-Val-Ser-Lys-Glu-Glu-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
15	H (TT ₁ Th-LHRH)	13	Lys-Lys-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Leu-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
20	I (TT ₂ Th-LHRH)	14	Lys-Lys-Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
25	J (TT ₃ Th-LHRH)	15	Tyr-Asp-Pro-Asn-Tyr-Leu-Arg-Thr-Asp-Ser-Asp-Lys-Asp-Arg-Phe-Leu-Gln-Thr-Met-Val-Lys-Leu-Phe-Asn-Arg-Ile-Lys-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
30	K (PT ₂ Th-LHRH)	16	Gly-Ala-Tyr-Ala-Arg-Cys-Pro-Asn-Gly-Thr-Arg-Ala-Leu-Thr-Val-Ala-Glu-Leu-Arg-Gly-Asn-Ala-Glu-Leu-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly
	L (MV _F Th-LHRH)	17	Leu-Ser-Glu-Ile-Lys-Gly-Val-Ile-Val-His-Arg-Leu-Glu-Gly-Val-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly

Taulukko 5
Keksinnön mukaiset peptidit

	Peptidi SEQ ID NO:	Sekvenssi ^a
5	18 (HB ₁ T ₁ -GG-LHRH)	K K K F F L L T R I L T I P Q S L D G G E H W S Y G L R P G
	19 (MV _{F1} T ₁ -GG-LHRH)	L S E I K G V I V H R L E G V G G E H W S Y G L R P G
10	20 (MV _{F1} T ₁ -MV _{F1} T ₁ -GG-LHRH)	L S E I K G V I V H R L E G V L S E I K G V I V H R L E G V G G E H W S Y G L R P G
	21 (MV _{F2} T ₁ -GG-LHRH)	G I L E S R G I K A R I T H V D T E S Y G G E H W S Y G L R P G
15	22 (TT ₄ T ₁ -GG-LHRH)	K K W V R D I I D D F T N E S S Q K T G G E H W S Y G L R P G
	23 (TT ₃ T ₁ -GG-LHRH)	K K D V S T I V P Y I G P A L N I V G G E H W S Y G L R P G
20	24 (CTT ₁ -GG-LHRH)	A L N I W D R F D V F C T L G A T T G Y L K G N S G G E H W S Y G L R P G
	25 (DT ₁ T ₁ -GG-LHRH)	D S E T A D N L E K T V A A L S I L P G I G C G G E H W S Y G L R P G
25	26 (DT ₂ T ₁ -GG-LHRH)	E E I V A Q S I A L S S L M V A Q A I P L V G E L V D I G F A A T N F V E S C G G E H W S Y G L R P G
	27 (PFT ₁ -GG-LHRH)	D I E K K I A K M E K A S S V F N V V N S G G E H W S Y G L R P G
30	28 (SMT ₁ -GG-LHRH)	K W F K T N A P N G V D E K I R I G G E H W S Y G L R P G
	29	G L Q G K I A D A V K A K G G G E H W
	(TraT ₁ T ₁ -GG-LHRH)	S Y G L R P G
35	30 (TraT ₂ T ₁ -GG-LHRH)	G L A A G L V G M A A D A M V E D V N G G E H W S Y G L R P G

Peptidi SEQ ID NO:		Sekvenssi
5	31 (TraT ₃ T ₆ -GG-LHRH)	S T E T G N Q H H Y Q T R V V S N A N K G G E H W S Y G L R P G
	32 (Inv-GG-HB ₁ T ₆ -GG-LHRH)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T G G E H W S Y G L R P G I P Q S L D
	33 (Inv-GG-MV _{F1} T ₆ -GG-LHRH)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G L S E I K G V I V H R L E G V G G E H W S Y G L R P G
10	34 (Inv-GG-PT ₂ T ₆ -GG-LHRH)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G G A Y A R C P N G T R A L T V E L R G N A E L G G E H W S Y G L R P G
	35 (Inv-GG-TT ₁ T ₆ -GG-LHRH)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G K K Q Y I K A N S K F I G I T E L G G E H W S Y G L R P G
	36 (Inv-GG-TT ₂ T ₆ -GG-LHRH)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G K K W V R D I I D D F T N E S S Q K T G G E H W S Y G L R P G
15	37 (Inv-GG-TT ₃ -GG-LHRH)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G K K D V S T I V P Y I G P A L N I V G G E H W S Y G L R P G
	38 (SSAL1-GG-LHRH) ^b	D L S E L K G L L L H K L E G L G G- E I D I R I I I R I D I V V V V V V F F F F F F E H W S Y G L R P G
	39 (SSAL2-GG-LHRH) ^b	K K K L F L L T K L L T L P Q S L D- R R R I K I I R I I I L I R V R V V V V V V F F F F F F F F G G E H W S Y G L R P G
20		
25		

Peptidi		Sekuenssi	
SEQ ID NO:			
5	40 (Inv-GG-SSAL3-GG-LHRH) ^b	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G	
		D L S E L K G L L L H K L E G L-	
		E I D I R I I I R I D I	
		V V V V V V	
		F F F F F F	
		G G E H W S Y G L R P G	
10	41 (Inv-GG-SSAL4-GG-LHRH) ^b	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G	
		K K K L F L L T K L L T L P Q S L D-	
		R R R I K I I R I I I L I R	
		V V V V V I V	
		F F F F F F V	
15		G G E H W S Y G L R P G	

^aSekuenssit on esitetty standardin mukaisesti yksikirjaimisilla aminohappokodeilla.

20 ^bYksinkertaisuuden vuoksi kirjaston kussakin asemassa olevat aminohapot on merkitty pääketjun alle. Muuntelemattomat aminohapot on määritelty molaarisella arvolla yksi, ja muuntelevat aminohapot lisätään synteessin aikana ekvimo-

25 laarisessa suhteessa riippuen varianttien lukumäärästä siinä asemassa, ts. jos asemassa on 2 aminohappoa, kumpaa-

kin lisätään suhteessa 0,5 verrattuna muuntelemattoman määrään, 3 aminohapolle suhde on 0,33, 4 aminohapolle suhde on 0,25, 5 aminohapolle suhde on 0,20 jne.

Taulukko 6

 T_h :LHRH -synteettisten peptidien tehokkuus

	Peptidi ^a	Seq ID No.	T_h -epitoppi	α -LHRH Ab ^b	Vähentynyt S.T. ^c	Kivesten surkast. ^d
5	A	10	HBs	45	40	35/90
	18	18	HBs	100	85	65/95
	19	19	MV _{PI} T _h	85	85	80/95
	K	16	PT ₂ T _h	65	50	35/90
	H	13	TT ₁ T _h	100	100	95/-
10	I	14	TT ₂ T _h	80	60	40/-
	22	22	TT ₄ T _h	-	-	-/95
	23	23	TT ₃ T _h	-	-	-/95
	LHRH		None	0	0	0

15 ^akaikissa tapauksissa eläimet saivat ekvimolaariset määrät peptidiä, vastaten 100 µg:aa peptidiä A. Peptidi annettiin subkutaanisesti viikolla (CFA:ssa) ja viikoilla 3 ja 6 (IFA:ssa).

20 ^bNiiden eläinten osuus prosentteina, joiden LHRH-spesifiset vasta-ainetiitterit olivat 1,0 nmol/l tai suuremmat.

^cNiiden eläinten osuus prosentteina, joiden seerumin testosteronitasot olivat alle 0,5 moolia/l.

25 ^dNiiden eläinten osuus prosentteina, joiden kivesten painojen keskiarvot olivat vähemmän kuin 10 % adjuvanttikontrolliryhmien kivesten painoista. Ensimmäinen luku on eläimistä, jotka saivat peptidiä subkutaanisesti; toinen luku on eläimistä, jotka saivat peptidiä intramuskulaarisesti.

Taulukko 7

HBsAg T_h: LHRH:n antamisen mikropartikkeleissa tehokkuus

	Koostumus ^a	α -LHRH Ab ^b	RVähent.S.T. ^c	Kiv. surkast. ^d
5	Detox	65	15	15
	Skvaleeni + L121	85	65	65
	FCA/ IFA	50	0	0
	IFA/ IFA	15	0	0
	Aluna	15	15	15
10	Liposyyini	0	0	0
	Liposyyini + avridiini	65	35	35
	Liposyyini + L121	50	0	0
15	Liposyyini + saponiini	85	65	65
	Emulsigeeni	85	50	50
	Emulsigeeni + DDA	85	65	65
20	Emulsigeeni + saponiini	100	100	100
	Suolaliuos	35	35	35
	Vapaa peptidi alunassa ^e	20	0	0
	Vapaa peptidi FCA/IFA ^f :ssä	60	40	40
25				

^aSprague-Dawley-rotille annettiin 100 µg peptidiä A suljetuna nopeasti vapauttaviin mikropartikkeleihin viikoilla 0, 3 ja 6. Kaikki immunisaatiot tehtiin subkutaanisesti. Tulokset on esitetty niiden eläinten prosentuaalisina osuuksina, joilla ilmenivät osoitetut reaktiot 14 viikkoa tutkimuksen alkamisen jälkeen.

^bLHRH-spesifisten vasta-aineiden tiitterit 1,0 nmol/l tai enemmän.

^cSeerumin testosteronitasot alle 0,5 nmol/l.

^dKivesten painot vähemmän kuin 10 % adjuvantti-kontrolliryhmien jäsenten kivesten painoista.

^ePeptidi A annettiin liukosessa muodossaan sidottuna alunaan.

^fPeptidi A annettiin liukoisessa muodossaan formuloituna Freundin adjuvanttiin.

Taulukko 8

HBs T_h: LHRH:n tehokkuus emulsiokoostumuksissa

	Koostumus ^a	α -LHRH Ab ²	Vähent. S.T. ³	Kiv. surkast. ⁴
5	FCA/ IFA	80	80	60
	IFA/ IFA ^b	80	60	40
	DETOX ^b	60	20	0
	MPL ^b	60	40	0
10	MPL+TDE ^b	40	0	0
	DEAE-dekstraani ^b	20	0	0
	Liposyyini ^b	0	0	0
	Liposyyini + avridiini ^b	80	40	40
15	Liposyyini + L121 ^b	0	0	0
	ISA 51 ^b	60	40	40
	ISA 720 ^b	80	60	60
	Emulsigeeni ^a	60	60	40
20	Emulsigeeni + DDA ^a	60	40	40
	Emulsigeeni + saponiini ^a	0	0	0
	Emulsigeeni + L121 ^a	100	80	80
	Emulsigeeni + F127 ^a	60	20	20
25	Emulsigeeni + MDP ^a	60	40	40
	L121+TWEEN ^a	60	40	40
	Aluna ^b	20	0	0

¹ Sprague-Dawley-rotille annettiin 100 µg peptidiä I formuloituna edellä esitettyihin emulsioihin viikoilla 0, 3 ja 6. Kaikki immunisaatiot tehtiin subkutaanisesti. Tulokset on esitetty niiden eläinten prosentuaalisina osuuksina, joilla ilmenivät osoitetut reaktiot 10 viikkoa tutkimuksen alkamisen jälkeen.

² LHRH-spesifisten vasta-aineiden tiitterit 1,0 nmoolia/l tai enemmän.

³ Seerumin testosteronitasot alle 0,5 nmoolia/l.

⁴ Kivesten painot vähemmän kuin 10 % adjuvantti-kontrolliryhmien jäsenten kivesten painoista.

^a Eläimissä käytettävät adjuvantit

^b Ihmisissä käytettävät adjuvantit

Taulukko 9

Peptidiä 32 sisältävän T_h: LHRH -immunogeenisekoituksen tehokkuus

	Koostumus ^a	α -LHRH Ab ^b	Vähent. S.T. ^c	Kiv. surkast. ^d
5	FIA	100	100	100
	DETOX	100	100	100
	MPL+TDE	100	100	65
10	MPL	100	35	15
	Skvaleeni + L121	100	85	85
	ISA 51	100	85	80
	ISA 720	100	85	85
15	Liposyyini + avridiini	100	100	100
	Emulsigeeni	100	85	65
	Emulsigeeni + DDA	100	100	100
20	Emulsigeeni + L121	100	100	85
	Aluna	100	100	100
	cocktail w/o pept.32 IFA ^e :ssä	65	35	35
25				

^a Sprague-Dawley-rotille annettiin 100 µg sekoitusta, joka koostui ekvimolaarisista määristä seuraavia: Inv: GG: HBsAg T_h: GG: LHRH (peptidi 32) + MV F T_h1: GG: LHRH + PT T_h2: LHRH + TT T_h1: LHRH viikoilla 0, 3 ja 6. Kaikki immunisaatiot tehtiin intramuskulaarisesti. Tulokset on ilmoitettu prosentteina niistä eläimistä, joilla ilmeni osoitetut reaktiot 10 viikkoa kokeen aloittamisen jälkeen.

^b LHRH-spesifisten vasta-aineiden tiitterit 1,0 nmol/l tai enemmän.

^c Seerumin testosteronitasot alle 0,5 nmol/l.

^d Kivesten painot vähemmän kuin 10 % adjuvantti-kontrolliryhmien jäsenten kivesten painoista.

^e Samojen peptidien sekoitus ilman peptidiä 32 (molaarisesti ekvivalenttina määränä peptidiä 32 sisältävän sekoituksen kanssa) formuloitiin IFA:an ja annettiin samanlaisella tavalla kuin edellä.

Taulukko 10

Esimerkkejä universaalisista synteettisistä immunostimulaattoreista, joissa on GG-välikkeet

	Peptidi SEQ ID NO:	Sekvenssi
5	54 (Inv-GG-HB ₁ T ₁ -GG)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G
10	55 (Inv-GG-MV _{P1} T ₁ -GG)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G L S E I K G V I V H R L E G V G G
	56 (Inv-GG-PT ₂ T ₁ -GG)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G G A Y A R C P N G T R A L T V A E L R G N A E L G G
	57 (Inv-GG-TT ₁ T ₁ -GG)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G K K Q Y I K A N S K F I G I T E L G G
15	58 (Inv-GG-TT ₄ T ₁ -GG)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G K K W V R D I I D D F T N E S S Q K T G G
	59 (Inv-GG-TT ₁ T ₁ -GG)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G K K D V S T I V P Y I G P A L N I V G G
	60 (GG-HB ₁ T ₁ -GG-Inv)	G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
20	61 (GG-MV _{P1} T ₁ -GG-Inv)	G G L S E I K G V I V H R L E G V G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
	62 (GG-PT ₂ T ₁ -GG-Inv)	G G G A Y A R C P N G T R A L T V A E L R G N A E L G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
25	63 (GG-TT ₁ T ₁ -GG-Inv)	G G K K Q Y I K A N S K F I G I T E L G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
	64 (GG-TT ₄ T ₁ -GG-Inv)	G G K K W V R D I I D D F T N E S S Q K T G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
30	65 (GG-TT ₅ -GG-Inv)	G G K K D V S T I V P Y I G P A L N I V G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F

Taulukko 11
Esimerkkejä peptidihapteeneista

	Peptidi SEQ ID NO:	Sekvenssi
5	66 Human Amylin	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S S N N F G A I L S S T N V G S N T Y-amide
	67 Ihmisen amyliinin N-fragmentti	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S S
10	68 Ihmisen amyliinin C-fragmentti	S S N N F G A I L S S T N V G S N T Y
	69 Gastriini ₃₄	Q L G P Q G P P H L V A D P S K K Q G P W L E E E E E A Y G W M D F
	70 Gastriini ₃₄	Q L G P Q G P P H L V A D P S K K Q G P W L
15	71 Gastriini ₃₄	Q L G P Q G P P H L V A D P S K K Q
	72 Gastriini ₃₄	Q L G P Q G P P H
	73 Gastriini ₃₄	Q L G P Q G P P P P P
20	74 Gastriini ₁₇	Q G P W L E E E E E A Y G W M D F
	75 Gastriini ₁₇	Q G P W L E E E E E A Y
	76 Gastriini ₁₇	Q G P W L E E E
25	77 GRP (gastriinia vapauttava peptidi)	V P L P A G G G T V L T K M Y P R G N H W A V G H L M
	78 GRP 10	G N H W A V G H L M
	79 IgE CH4	K T K G S G F F V F

5	80 Chlamydia trachomatis MOMP VDI (serovar A C,H,I,J,K & L3) ^b	E F Q M G A A P T T S D T A G L Q N D P T- E N V E D E K V K A S K R
		T N V A R A V
10	81 Chlamydia trachomatis MOMP VDI (serovar B, Ba,D,E,L1 & L2) ^b	E F Q M G A K P T T T T G N A A A P S T L- D A D S T T C S S V
		T A R
	82 Chlamydia trachomatis MOMP VDI (serovar F & G) ^b	E F E M G E A L A G A S G N T T S T L S K L V E R
15	83 Chlamydia trachomatis MOMP VDII (serovar A, C,H,I,J,K & L3) ^b	F G T K T Q S S N F N T A K L V P N T A L- K A T S D N I F I Y G A D K
		N Q A V V D R E
20	84 Chlamydia trachomatis MOMP VDII (serovar B, Ba & L2) ^b	F G N N E N Q T K V S N S A F V P N M S L D H A T D G T L K
		D Q S V V
25	85 Chlamydia trachomatis MOMP VDII (serovar D, E,F,G & L1) ^b	F G D N E N Q K T V K A E S V P N M S F D- G V A S K P A T N A I V Q L N T Q K D T
		Q S V V
30	86 Chlamydia trachomatis MOMP VDIV (serovar A, B,Ba,D,E,I,L1 & L2) ^b	S A T A I F D T T T L N P T I A G A G D V- L E T V L V K T K P E K T S A E G Q L G V A G N E A S N

5	87 Chlamydia trachomatis MOMP VDIV (serovar C, F,G,H,J,K,L3) ^b	L A E A I L D V T T L N P T I A G K G S V- V T P V V I T C T K A V A S G S E N E L A A S A N T D G D I S G Q
	88 Chlamydia trachomatis MOMP VDIII (serovar A, B,Ba,C,D,E,F,G,H,I,L1 & L3) ^b	K G Y V G A E F P L D I T A G T E A A T G- T K L A L I S D Q N T K D A
10	89 Chlamydia trachomatis MOMP VDIII (serovar L2)	K G Y V G A E F P L D L K A G T D G V T G- T K D
15	90 HIV-1 MN PND	[E S V Q I N C T R P N Y N K R K R I H I G P G R A F Y T T K N M],K ₂ K G G
	91 Plasmodium berghei	N N N D D S Y I P S A E K I L E F V K Q

^aSekvenssit on esitetty standardin mukaisesti yksikirjaimisilla aminohappokoodeilla.

- 20 ^bYksinkertaisuuden vuoksi kirjaston kussakin asemassa olevat aminohapot on merkitty pääketjun alle. Muuntelemattomat aminohapot on määriteltä molaarisella arvolla yksi, ja muuntelevat aminohapot lisätään synteessin aikana ekvimo-
- 25 laarisessa suhteessa riippuen varianttien lukumäärästä siinä asemassa, ts. jos asemassa on 2 aminohappoa, kumpaa-
- kin lisätään suhteessa 0,5 verrattuna muuntelemattoman määrään, 3 aminohapolle suhde on 0,33, 4 aminohapolle suhde on 0,25, 5 aminohapolle suhde on 0,20 jne.

Taulukko 12

Esimerkkejä "universaalisista synteettisistä immunostimulaattori-peptidihapteeni"rakenteista

	Peptidirakenne	Sekvenssi
5	92 (SEQ ID NO:92) ihmisen amyliini- GG-HBsT _h -GG-Inv (No:66-60)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S S N N F G A I L S S T N V G S N T Y G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
10	93 (SEQ ID NO:93) ihmisen amyliinin N-frag.-GG-HBsT _h - GG-Inv (No:67-60)	K C N T A T C A T Q R L A N F L V H S S G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
	94 (SEQ ID NO:94) Inv-GG-HBsT _h -GG- ihmisen amyliinin C-frag. (No:54-68)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G H S S N N F G A I L S S T N V G S N T Y
15	95 (SEQ ID NO:95) gastrini _{1,4} -GG- HBsT _h -GG-Inv (No:69-60)	Q L G P Q G P P H L V A D P S K K Q G P W L E E E E E A Y G W M D F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
	96 (SEQ ID NO:96) gastrini _{1,4} N-frag.- GG-HBsT _h -GG-Inv (No:70-60)	Q L G P Q G P P H L V A D P S K K Q G P W L G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
20	97 (SEQ ID NO:97) gastrini _{1,4} N-frag.- GG-HBsT _h -GG-Inv (No:71-60)	Q L G P Q G P P H L V A D P S K K Q G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
	98 (SEQ ID NO:98) gastrini _{1,4} N-frag.- GG-HBsT _h -GG-Inv (No:72-60)	Q L G P Q G P P H G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
25	99 (SEQ ID NO:99) Inv-GG-HBsT _h -GG-gast- riini _{1,7} (No:54-74)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G Q G P W L E E E E E A Y G W M D F
	100 (SEQ ID NO:100) Inv-GG-HBsT _h -GG-gast- riini _{1,7} N-fragmentti (No:54-75)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G Q G P W L E E E E E A Y
30	101 (SEQ ID NO:101) gastrinia vapaut- tava peptidi HBsT _h - GG-Inv (No:77-60)	V P L P A G G G T V L T K M Y P R G N H W A V G H L M G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F

5	102 (SEQ ID NO:102) Inv-GG-HBs-GG- gastrinina vapaut- tava peptidi 10 (No:54-78)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G G N H W A V G H L M
10	103 (SEQ ID NO:103) IgE CH4-GG-HBsT ₁ -GG- Inv (No:79-60)	K T K G S G F F V F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
15	104 (SEQ ID NO:104) Inv-GG-HBsT ₁ -GG- IgECH4 (No:54-79)	T A K S K K F P S Y T A T Y Q F G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G K T K G S G F F V F
20	105 (SEQ ID NO:105) Chlamydia trachomatis MOMP VDI-GG-HBsT ₁ -GG-Inv (No:80-60)	E F Q M G A A P T T S D T A G L Q N D- E N V E D E K K A S R P T T N V A R G G F F L L T R I L T G- V A K V G I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y- T A T Y Q F
25	106 (SEQ ID NO:106) Chlamydia trachomatis MOMP VDI-GG-HBsT ₁ -GG-Inv (No:81-60)	E F Q M G A K P T T T T G N A A A P S- D A D S T T S S V T L T A R G G F F L L T R I L T I P Q- C S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y- Q F
	107 (SEQ ID NO:107) Chlamydia trachomatis MOMP VDI-GG-HBsT ₁ -GG-Inv (No:82-60)	E F E M G E A L A G A S G N T T S T L S K L V E R G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F

5	108 (SEQ ID NO:108) Chlamydia trachomatis MOMP VDII-GG-HBst ₁ -GG-Inv (No:83-60)	F G T K T Q S S N F N T A K L V P N T- K A T S D N I F I Y G A D K A L N Q A V V G G F F L L T R I L T I- D R E P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A- T Y Q F
10	109 (SEQ ID NO:109) Chlamydia trachomatis MOMP VDII-GG-HBst ₁ -GG-Inv (No:84-60)	F G N N E N Q T K V S N S A F V P N M- D H A T D G T L K S L D Q S V V G G F F L L T R I L T I- P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A- Q F
15	110 (SEQ ID NO:110) Chlamydia trachomatis MOMP VDII-GG-HBst ₁ -GG-Inv (No:85-60)	F G D N E N Q K T V K A E S V P N M S- G V A S K P A T N A I V Q T Q K D T F D Q S V V G G F F L L T R I L T I P- L N Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T- Y Q F
20	111 (SEQ ID NO:111) Chlamydia trachomatis MOMP VDIV-GG-HBst ₁ -GG-Inv (No:86-60)	S A T A I F D T T T L N P T I A G A G- L E T V L V K K P D V K T S A E G Q L G G G F F L L T R- T V A G N E A E S N I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P- S Y T A T Y Q F
25		

5	112 (SEQ ID NO:112) Chlamydia trachomatis MOMP VDIV-GG-HBsT ₁ -GG-Inv (No:87-60)	L A E A I L D V T T L N P T I A G K G- V T P V V I T C K S V V A S G S E N E L A G G F F L L T- T A S A N T D G D I S A G Q R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F- P S Y T A T Y Q F
10	113 (SEQ ID NO:113) Chlamydia trachomatis MOMP VDIII-GG-HBsT ₁ -GG-Inv (No:88-60)	K G Y V G A E F P L D I T A G T E A A- T K L A L I S D Q N T G T K D G G F F L L T R I L T I P Q- A S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y- Q F
15	114 (SEQ ID NO:114) Chlamydia trachomatis MOMP VDIII-GG-HBsT ₁ -GG-Inv (No:89-60)	K G Y V G A E F P L D L K A G T D G V T G T K D G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F
	115 HIV-1 MN PND-HBsT ₁ -GG-Inv (No:90-60)	[E S V Q I N C T R P N Y N K R P G R A F Y T T K N M] ₂ K G G G G F F L L T R I L T I P Q S L D G G T A K S K K F P S Y T A T Y Q F

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Ladd, Anna
Wang, Chang Yi
Zamb, Timothy

(ii) TITLE OF INVENTION: Immunogenic LHRH peptide constructs and
synthetic universal immune stimulators for vaccines

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 114

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: SCULLY, SCOTT, MURPHY & PRESSER
(B) STREET: 400 Garden City Plaza
(C) CITY: Garden City
(D) STATE: NY
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 11530

(v) COMPUTER READABLE FORM:

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

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

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

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: GROLZ, EDWARD W.
(B) REGISTRATION NUMBER: 33,705
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 9284

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: (516) 742-4343
(B) TELEFAX: (516) 742-4366

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp
1 5 10 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 28 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Lys Lys Leu Arg Arg Leu Leu Tyr Met Ile Tyr Met Ser Gly Leu Ala
1 5 10 15

Val His Val Ser Lys Glu Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr
20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 22 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

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

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 27 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(A) LENGTH: 24 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

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

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(A) LENGTH: 28 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Lys Lys Lys Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
35

(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
20 25

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 34 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 25 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 30 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Lys	Lys	Lys	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser
1			5					10					15		

Leu Asp Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 20 25 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 27 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

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

Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 42 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

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

Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val Gly Gly
 20 25 30

Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 35 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 32 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Gly	Ile	Leu	Glu	Ser	Arg	Gly	Ile	Lys	Ala	Arg	Ile	Thr	His	Val	Asp
1				5					10					15	
Thr	Glu	Ser	Tyr	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly
			20					25					30		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

Lys	Lys	Asp	Val	Ser	Thr	Ile	Val	Pro	Tyr	Ile	Gly	Pro	Ala	Leu	Asn
1				5					10					15	
Ile	Val	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly		
			20					25					30		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

Ala	Leu	Asn	Ile	Trp	Asp	Arg	Phe	Asp	Val	Phe	Cys	Thr	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Thr	Thr	Gly	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr
		20						25					30		
Gly	Leu	Arg	Pro	Gly											
		35													

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 35 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Ser
1				5					10					15	
Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Cys	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu
		20						25					30		
Arg	Pro	Gly													
		35													

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 51 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

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

[illegible]

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe
1 5 10 15
Asn Val Val Asn Ser Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro
20 25 30
Gly

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 29 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 amino acids
(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 31 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Gly	Met	Ala	Ala	Asp	Ala	Met	Val	Glu
1				5					10					15	
Asp	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	
			20					25					30		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 32 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 45 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
			20					25					30		
Asp	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly			
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:33:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 45 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	Leu	Glu	Gly
			20					25					30		
Val	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly			
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:34:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 54 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr
 20 25 30
 Val Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu Gly Gly Glu His Trp Ser
 35 40 45
 Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:35:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 47 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile
 20 25 30
 Thr Glu Leu Gly Gly Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
 35 40 45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:36:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 49 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

35

40

45

Gly

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:37:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 48 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:38:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 28 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 2
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 4
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 6
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;R0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 9
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 10
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 12
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;R0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 13
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 14
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 16
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:38:

Asp	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Leu	Glu	Gly	Leu
1				5					10					15	
Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly				
			20					25							

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:39:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 30 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 1
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;K0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 2
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;R0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 3
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;R0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 4
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 5
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.34;K0.33;R0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 6
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 7
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 9
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;R0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 10
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 11
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 13
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 15
- (D) OTHER INFORMATION: /note="Q0.20;L0.20;I0.20;F0.20V0.20"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 17
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 18
- (D) OTHER INFORMATION: /note="D0.50;R0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:39:

Lys	Lys	Lys	Leu	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	Thr	Leu	Pro	Gln	Ser
1				5					10					15	
Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly		
			20					25					30		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:40:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 46 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 19
- (D) OTHER INFORMATION: /note="D0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 20
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 22
 (D) OTHER INFORMATION: /note="E0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 23
 (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 24
 (D) OTHER INFORMATION: /note="K0.50;R0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 26
 (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 27
 (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 28
 (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 30
 (D) OTHER INFORMATION: /note="K0.50;R0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 31
 (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 32
 (D) OTHER INFORMATION: /note="E0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 34
 (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:40:

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe

1	5	10	15												
Gly	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	His	Lys	Leu	Glu
		20						25					30		
Gly	Leu	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly		
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:41:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 48 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 19
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="K0.50;R0.50"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 20
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="K0.50;R0.50"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 21
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="K0.50;R0.50"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 22
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 23
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="F0.34;K0.33;R0.33"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 24
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 25
 - (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

- (ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 27
- (D) OTHER INFORMATION: /note="K0.50;R0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 28
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 29
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 31
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 33
- (D) OTHER INFORMATION: /note="Q0.20;L0.20;I0.20;F0.20;V0.20"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 35
- (D) OTHER INFORMATION: /note="L0.25;I0.25;V0.25;F0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 36
- (D) OTHER INFORMATION: /note="D0.50;R0.50"

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

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Lys	Lys	Lys	Leu	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	Thr	Leu	Pro
			20					25					30		
Gln	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:42:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:43:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 17 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Trp	Val	Arg	Asp	Ile	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Asn	Glu	Ser	Ser	Gln	Lys
1				5					10					15	
Thr															

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:44:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:44:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:45:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 25 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:45:

Ala Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Cys Thr Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Thr Thr Gly Tyr Leu Lys Gly Asn Ser
 20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:46:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:46:

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

Ile Leu Pro Gly Ile Gly Cys
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:47:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 39 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala
 1 5 10 15

Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala
 20 25 30

Thr Asn Phe Val Glu Ser Cys
 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:48:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 21 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe
 1 5 10 15
 Asn Val Val Asn Ser
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:49:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 17 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys Ile Arg
 1 5 10 15
 Ile

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:50:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 14 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ala Asp Ala Val Lys Ala Lys Gly
 1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:51:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 19 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:51:

Gly Leu Ala Ala Gly Leu Val Gly Met Ala Ala Asp Ala Met Val Glu
 1 5 10 15
 Asp Val Asn

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:52:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 20 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:52:

Ser Thr Glu Thr Gly Asn Gln His His Tyr Gln Thr Arg Val Val Ser
 1 5 10 15
 Asn Ala Asn Lys
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:53:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 16 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:53:

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
 1 5 10 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:54:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 35 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:54:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:55:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 35 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:56:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 43 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr
 20 25 30
 Val Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu Gly Gly
 35 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:57:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:58:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 39 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:58:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:59:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 38 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:59:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:60:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 35 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:60:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:61:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 35 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:61:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:62:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 43 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:62:

Gly Gly Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Ala Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu Gly Gly Thr Ala Lys Ser Lys
 20 25 30
 Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe
 35 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:63:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 37 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:64:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 39 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:64:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:65:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 38 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:65:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:66:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 37 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:66:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:67:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 20 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:67:

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15
Val His Ser Ser
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:68:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:68:

Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly Ser
1 5 10 15
Asn Thr Tyr

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:69:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 34 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:69:

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

Lys Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met
20 25 30

Asp Phe

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:70:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

Lys Gln Gly Pro Trp Leu
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:71:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 18 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:71:

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

Lys Gln

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:72:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 9 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:72:

Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro His
 1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:73:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 11 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:73:

Gln Leu Gly Pro Gln Gly Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:74:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 17 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

Phe

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:75:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 12 amino acids

(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:76:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 8 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Gln Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:77:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

Arg Gly Asn His Trp Ala Val Gly His Leu Met
20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:78:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 10 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:78:

Gly	Asn	His	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Met
1				5				10	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:79:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Phe	Val	Phe
1				5				10	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:80:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 7
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 11
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.25;N0.25;K0.25;R0.25"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 13
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;V0.33;A0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 14
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;E0.50"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 15
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 17
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.34;E0.33;S0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 18
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;K0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 21
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;V0.33;K0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 22
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;A0.33;V0.33"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:80:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:81:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 24 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 6
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 11
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;A0.33;S0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 12
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;D0.33;S0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 15
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;S0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 16
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;V0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 19
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;T0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 21
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;C0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:81:

Glu	Phe	Gln	Met	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Asn	Ala	Ala
1				5				10						15	
Ala Pro Ser Thr Leu Thr Ala Arg															
20															

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:82:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

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

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:82:

Glu	Phe	Glu	Met	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	Asn	Thr	Thr
1				5				10						15	
Ser Thr Leu Ser Lys Leu Val Glu Arg															
20 25															

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:83:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 26 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 6
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;K0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 7
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.34;A0.33;Y0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 8
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 9
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.20;S0.20;G0.20;D0.20;K0.20"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 11
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 14
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;N0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 15
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 16
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;F0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 19
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;I0.33;A0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 22
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 23
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.34;R0.33;E0.33"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:83:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:84:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 7
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;H0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.50;A0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 9
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;T0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 12
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 13

(D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;G0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 14

(D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;K0.33"

(ix) **FEATURE:**

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 15

(D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:84:

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

Asn Met Ser Leu Asp Gln Ser Val Val
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:85:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 25 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 4

(D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;G0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 5

(D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;V0.50"

(ix) **FEATURE:**

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 7

(D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;A0.50"

(ix) **FEATURE:**

(A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 8

(D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.34;S0.33;T0.33"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 9
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;K0.33;Q0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 10
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;P0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 11
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 12
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;K0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 13
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.25;N0.25;D0.25;T0.25"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 14
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 15
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 18
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "M0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 19
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;Q0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 20
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 21
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.50;N0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:85:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:86:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 30 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 1
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;L0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 3
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;E0.33;K0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 4
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;P0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 5
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "I0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 6
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 8
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 18
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;K0.50"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 20
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.34;T0.33;E0.33"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 22
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;V0.50"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 23
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;A0.33;S0.33"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 24
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.34;G0.33;N0.33"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 27
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;N0.50"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 28
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 30
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;A0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:86:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:87:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 31 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 3
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.34;T0.33;K0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 4
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;P0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 5
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "I0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 6
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 8
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 16
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 18
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;C0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 20
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.34;T0.33;A0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 22
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 23
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;S0.33;G0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 24
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;A0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 25
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;N0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 26
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;T0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 27
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 28
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;G0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 29
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.34;D0.33;Q0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 30
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;I0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 31
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;S0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:87:

Leu	Ala	Glu	Ala	Ile	Leu	Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Thr	Ile	Ala
1				5					10					15	
Gly	Lys	Gly	Ser	Val	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Glu	Asn	Glu	Leu	Ala	
			20					25					30		

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:88:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 1
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 6
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;K0.33;Q0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 8
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 11
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.34;A0.33;N0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 12
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "I0.50;L0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 13
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 14
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;S0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 17
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 24
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.50;A0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:88:

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

Glu Ala Ala Thr Gly Thr Lys Asp
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:89:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 24 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:90:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 32 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:91:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 20 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

Asn Asn Asn Asp Asp Ser Tyr Ile Pro Ser Ala Glu Lys Ile Leu Glu
 1 5 10 15

Phe Val Lys Gln
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:92:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 55 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:92:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:93:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 55 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:93:

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 Val His Ser Ser Gly Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
 20 25 30
 Pro Gln Ser Leu Asp Gly Gly Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln Phe

50

55

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:94:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:94:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:95:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 63 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

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

Phe

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:96:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 57 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:96:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:97:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 53 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:97:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:98:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 44 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:98:

Gln	Leu	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Pro	His	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr
1				5					10					15	
Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Thr	Ala	Lys	Ser
			20					25					30		
Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe				
		35					40								

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:99:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 50 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:99:

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe	
1				5					10					15		
Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	
			20					25					30			
Asp	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	Gly	Trp
		35					40					45				
Met	Asp	Phe														
50																

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:100:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 45 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:100:

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
			20					25					30		
Asp	Gly	Gly	Gln	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Tyr	
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:101:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 62 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:101:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:102:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 43 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:102:

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu

	20		25		30
Asp	Gly	Gly	Gly	Asn	His
	35		40		45
Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu
					Met

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:103:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 45 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:103:

Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Phe	Val	Phe	Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu
1				5					10					15	
Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly	Thr	Ala	Lys
			20					25					30		
Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe			
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:104:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 33 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:104:

Thr	Ala	Lys	Ser	Lys	Lys	Phe	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gln	Phe
1				5					10					15	
Gly	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
				20				25					30		
Asp	Gly	Gly	Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Phe	Val	Phe			
		35					40					45			

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:105:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 63 amino acids

(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 7
(D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 11
(D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.25;N0.25;K0.25;R0.25"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 13
(D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;V0.33;A0.33"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 14
(D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 15
(D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 17
(D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.34;E0.33;S0.33"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 18
(D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;K0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 21
(D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;V0.33;K0.33"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
(B) LOCATION: 22
(D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;A0.33;V0.33"

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:106:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 59 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 6
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 11
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;A0.33;S0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 12
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;D0.33;S0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 15
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;S0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 16
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;V0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 19
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site

(B) LOCATION: 21
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;C0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:106:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:107:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 60 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:107:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:108:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 61 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site

- (B) LOCATION: 6
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;K0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 7
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.34;A0.33;Y0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 8
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 9
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.20;S0.20;G0.20;D0.20;K0.20"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 11
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 14
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;N0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 15
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 16
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;F0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 19
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;I0.33;A0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 22
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 23
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.34;R0.33;E0.33"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:108:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:109:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 57 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 7
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;H0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.50;A0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 9
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;T0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 12
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 13
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;G0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 14
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;K0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 15
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:109:

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:110:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 60 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 4
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;G0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;V0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 7
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;A0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.34;S0.33;T0.33"

- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 9
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;K0.33;Q0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 10
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;P0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 11
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 12
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;K0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 13
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.25;N0.25;D0.25;T0.25"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 14
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 15
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 18
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "M0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 19
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;Q0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 20
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 21
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.50;N0.50"

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

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:111:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 65 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;L0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 3
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;E0.33;K0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 4
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;T0.33;P0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 5
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "I0.50;V0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 6
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.50;V0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 18
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;K0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 20
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.34;T0.33;E0.33"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 22
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;V0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 23
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.34;A0.33;S0.33"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 24
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.34;G0.33;N0.33"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 27
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;N0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 28
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Q0.50;E0.50"

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 30
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;A0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:111:

Ser Ala Thr Ala Ile Phe Asp Thr Thr Thr Leu Asn Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Asp Val Lys Thr Ser Ala Glu Gly Gln Leu Gly Gly Gly
 20 25 30

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Gly
 35 40 45

Gly Thr Ala Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Gln
 50 55 60

Phe
65

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:112:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 66 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 2
 - (C) OTHER INFORMATION: /note= A0.50;V0.50
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 3
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.34;T0.33;K0.33"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 4
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;P0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 5
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "I0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 6
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;V0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 8
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 16
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 18
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;C0.50"
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: Modified-site
 - (B) LOCATION: 20
 - (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.34;T0.33;A0.33"

- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 22
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "V0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 23
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;S0.33;G0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 24
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;A0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 25
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "G0.50;N0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 26
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "S0.50;T0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 27
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;D0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 28
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "N0.50;G0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 29
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.34;D0.33;Q0.33"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 30
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "L0.50;I0.50"
- (ix) FEATURE:
 (A) NAME/KEY: Modified-site
 (B) LOCATION: 31
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;S0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:112:

Leu Ala Glu Ala Ile Leu Asp Val Thr Thr Leu Asn Pro Thr Ile Ala

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:113:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 59 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 1
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "K0.50;T0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 6
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.34;K0.33;Q0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 8
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "F0.50;L0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 11
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.34;A0.33;N0.33"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 12
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "I0.50;L0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 13
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "T0.50;I0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 14
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "A0.50;S0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 17
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "E0.50;D0.50"

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: Modified-site
- (B) LOCATION: 24
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "D0.50;A0.50"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:113:

```

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

```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:114:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 59 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

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

```

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

```

Patenttivaatimukset

1. Peptidi, joka stimuloi immuunivastetta LHRH:ta vastaan nisäkkäissä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää auttaja-T-soluepitoopin (Th) ja luteinisoivaa hormonia vapauttavan hormonin (LHRH), jolloin mainittu LHRH on mainitun peptidin karboksyyli-päässä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainittua peptidiä edustaa kaava $(A)_n-(Th)_m-(B)_o-LHRH$, jossa A on toisista riippumatta aminohappo, $\alpha-NH_2$, tripalmitoyylikysteiini, rasvahappo, invasiinidomeeni tai vastaavan invasiinidomeenin immunostimuloiva analogi; B on aminohappo; kukin Th on toisista riippumatta aminohapposekvenssi, joka käsittää auttaja-T-soluepitoopin, tai sen immuunivastetta tehostava analogi tai segmentti; LHRH on luteinisoivaa hormonia vapauttava hormoni tai sen immunogeeninen analogi; n on yhdestä noin kymmeneen, m on yhdestä noin neljään ja o on nollasta noin kymmeneen.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että immunisaatio mainitulla peptidillä kykenee saamaan aikaan seerumin testosteronin vähenemisen alle 10 %:iin normaaliarvoista.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että immunisaatio mainitulla peptidillä aiheuttaa eturauhasen surkastumista tai estää sen kasvua.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun peptidin aminohapposekvenssi on SEQ ID NO: 1.

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun Th:n aminohapposekvenssi valitaan mistä tahansa SEQ ID NO:ista 2 - 9 tai 42 - 52, tai niiden analogista tai segmentistä.

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että mainitun peptidin aminohapposek-
venssi on mikä tahansa SEQ ID NO:ista 10 - 41.

5 n e t t u siitä, että vähintään yksi A on invasiinidomee-
ni.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen peptidi, t u n -
n e t t u siitä, että n on 4 ja A on α -NH₂, invasiinido-
meeni, glysiini ja glysiini tässä järjestyksessä.

10 10. Patenttivaatimuksen 2 tai 9 mukainen peptidi,
t u n n e t t u siitä, että mainitun invasiinidomeenin
sekvenssi on SEQ ID NO: 53.

15 11. Peptidi, t u n n e t t u siitä, että sen ami-
nohapposekvenssi on SEQ ID NO: 10, 13, 16, 18, 19, 32 tai
38.

12. Rokotekoostumus, t u n n e t t u siitä, että
se käsittää immunologisesti tehokkaan määrän patenttivaa-
timuksen 1, 2, 7, 8 tai 11 mukaista peptidiä ja farmaseut-
tisesti hyväksyttävän kantajan.

20 13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen rokotekoostu-
mus, t u n n e t t u siitä, että mainittu immunologisesti
tehokas määrä mainittua peptidiä on noin 0,5 µg - noin
1 mg kilogrammaa ruumiinpainoa kohti annosta kohti.

25 14. Menetelmä hedelmättömyyden indusoimiseksi ni-
säkkäälle, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä an-
netaan mainitulle nisäkkäälle patenttivaatimuksen 12 mu-
kaista rokotekoostumusta aikana, joka on riittävä tuotta-
maan hedelmättömän tilan mainitulle nisäkkäälle.

30 15. Menetelmä LHRH:n aktiivisuuden suppressoimisek-
si nisäkkäässä, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä
annetaan mainitulle nisäkkäälle mikä tahansa patenttivaa-
timuksista 1, 2, 7, 8 tai 11 mukaista peptidiä ajanjakso,
joka on riittävä pienentämään mainitun LHRH:n tasoa seeru-
missa.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu LHRH-aktiivisuuden suppressio on eturauhasen liikakasvun, androgeenista riippuvaisen karsinooman, eturauhaskarsinooman, kiveskarsinooman, endometrioosin, hyvänlaatuisten kohdun kasvainten, toistuvien toiminnallisten munasarjakystojen, (vakavan) premenstruaalisyndrooman tai estrogeeneista riippuvaisten rintakasvaimien hoitamiseksi; estrogeenistä riippuvaisen rintasyövän estämiseksi tai hedelmättömyyden indusoimiseksi.

17. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu LHRH-aktiivisuuden suppressio on 'karjun merkin' vähentämiseksi sioista, koirien tai kissojen kastroimiseksi immunologisesti tai orien kuohitsemiseksi.

18. Peptidikoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kahden tai useamman patenttivaatimuksen 1, 2, 7, 8 tai 11 mukaisen peptidin seoksen.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu seos käsittää yhdistelmän peptideistä, joiden aminohapposekvenssit ovat SEQ ID NOT: 13, 16, 18 ja 19.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainittu seos käsittää yhdistelmän peptideistä, joiden aminohapposekvenssit ovat SEQ ID NOT: 13, 16, 19 ja 32.

21. Noin 30:sta noin 90:ään aminohapon pituinen synteettinen peptidi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää immunostimuloivan invasiinidomeenin, auttaja-T-solu (Th) -epitoopin ja peptidihapteenin.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu peptidi stimuloi immuunivasteen mainittua peptidihapteenia vastaan.

23. Patenttivaatimuksen 21 tai 22 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun invasiinidomeenin

aminohapposekvenssi on SEQ ID NO: 53 tai mainittua sekvenssiä vastaava immunostimuloiva analogi.

24. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 21 - 23 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun T_h -epitoopin aminohapposekvenssi valitaan mistä tahansa SEQ ID NO:ista 2 - 9, 42 - 52 tai mainittua sekvenssiä vastaavasta immuunivastetta tehostavasta analogista tai segmentistä.

25. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 21 - 24 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi valitaan mistä tahansa SEQ ID NO:ista 1, 66 - 91 tai mainittua sekvenssiä vastaavasta immunogeenisestä analogista.

26. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 21 - 25 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun peptidin aminopäähän on kovalenttisesti sidottuna $(A)_n$, jolloin A on toisista riippumatta aminohappo, $\alpha-NH_2$, tripalmitoyylikysteini tai rasvahappo; ja n on yhdestä noin kymmeneen.

27. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 21 - 26 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainittu invasiinidomeeni, mainittu T_h -epitooppi ja mainittu peptidihapteeni ovat aminohapporyhmiä, jotka ovat kovalenttisesti yhteen liitetyt missä tahansa järjestyksessä, joka säilyttää olennaisesti immunoreaktiivisuuden, ja välikkeen $(B)_o$ ollessa minkä tahansa kahden mainituista ryhmistä välissä, jolloin B on itsenäisesti mikä tahansa aminohappo ja o on nollasta noin kymmeneen.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että o on kaksi ja B on glysiini ja glysiini.

29. Patenttivaatimuksen 21 tai 22 mukainen peptidi, t u n n e t t u siitä, että mainitun peptidin aminohapposekvenssi on mikä tahansa SEQ ID NO:ista 92 - 114 tai peptidi 115.

30. Patenttivaatimuksen 22 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainittu peptidihapteeni on amyliini tai sen immunogeeninen analogi.

5 31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi on mikä tahansa SEQ ID NO:ista 66 - 68.

10 32. Patenttivaatimuksen 22 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainittu peptidihapteeni on gastriini₃₄, gastriini₁₇, tai niiden immunogeeninen analogi.

33. Patenttivaatimuksen 32 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi on mikä tahansa SEQ ID NO:ista 69 - 76.

15 34. Patenttivaatimuksen 22 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainittu peptidihapteeni on gastriinia vapauttava peptidi tai sen immunogeeninen analogi.

20 35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi on mikä tahansa SEQ ID NO:ista 77 tai 78.

25 36. Patenttivaatimuksen 22 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainittu peptidihapteeni on peptidi IgE-molekyylin CH4-domeenista tai sen immunogeeninen analogi.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi on SEQ ID NO: 79.

30 38. Patenttivaatimuksen 22 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainittu peptidihapteeni on Chlamydia trachomatisin pääasiallisen ulkomembraaniproteiinin (MOMP) muunteleva domeeni (VDI-IV) tai sen immunogeeninen analogi.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi on mikä tahansa SEQ ID NO:ista 80 - 89.

5 40. Patenttivaatimuksen 22 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että peptidihapteeni on HIV V3:n pääasiallinen neutraloiva domeeni tai sen immunogeeninen analogi.

10 41. Patenttivaatimuksen 40 mukainen peptidi, tunnettu siitä, että mainitun peptidihapteenin aminohapposekvenssi on SEQ ID NO: 90.

15 42. Rokotekoostumus, tunnettu siitä, että se käsittää immunologisesti tehokkaan määrän patenttivaa-
timuksen 30 - 41 mukaista peptidiä ja farmaseuttisesti
hyväksyttävän kantajan.

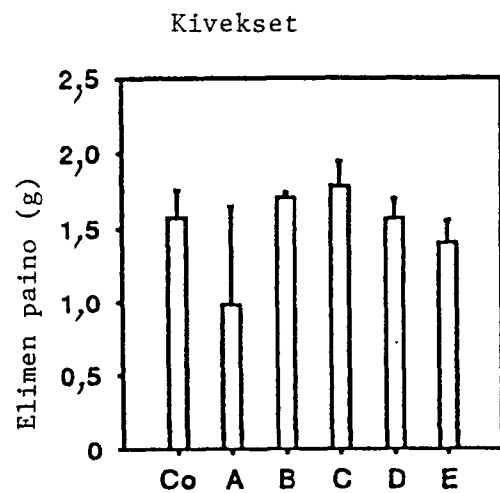


Fig. 1A

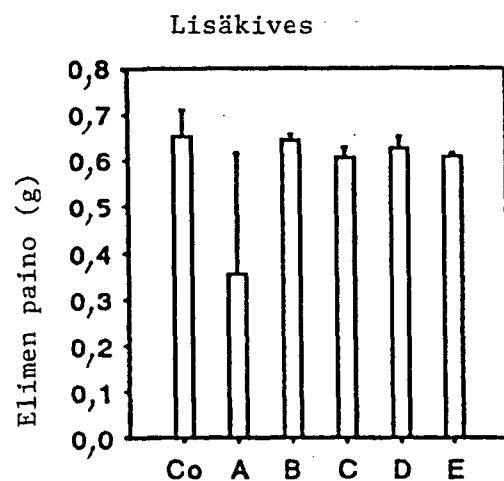


Fig. 1B

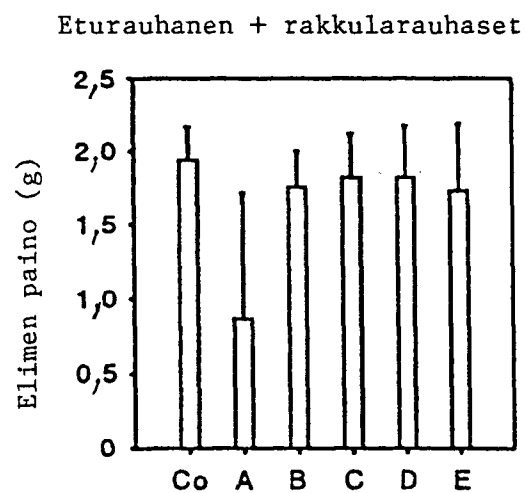


Fig. 1C

Fig. 1

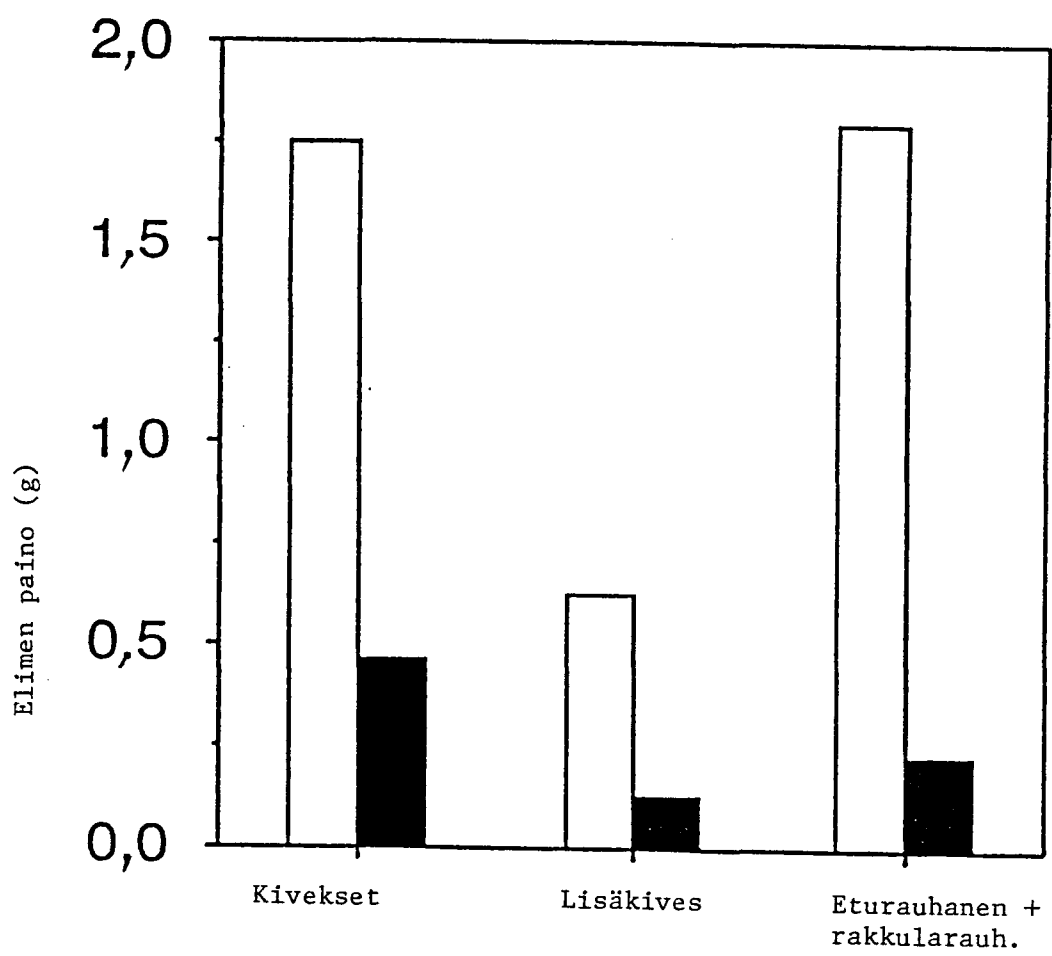


Fig. 2

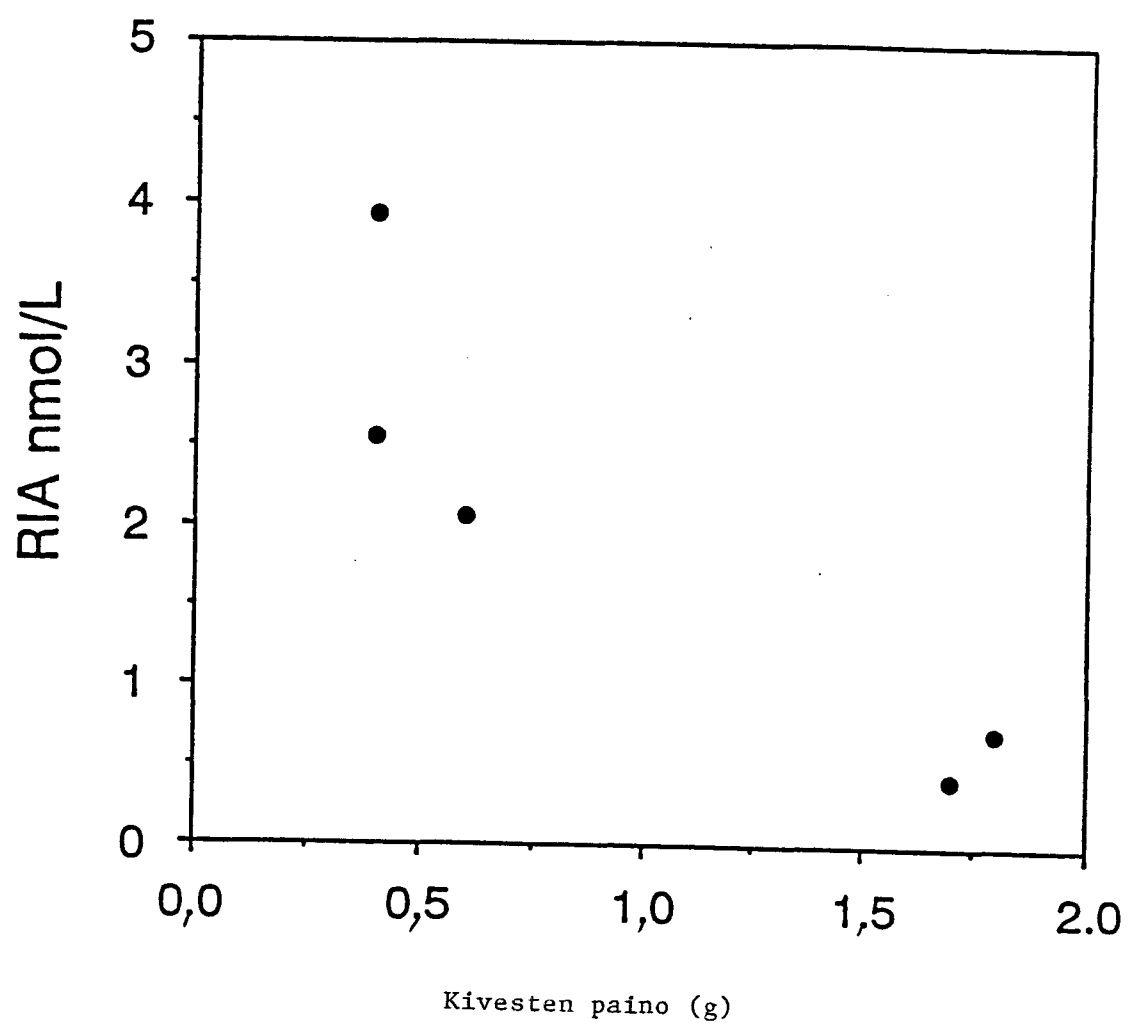


Fig. 3

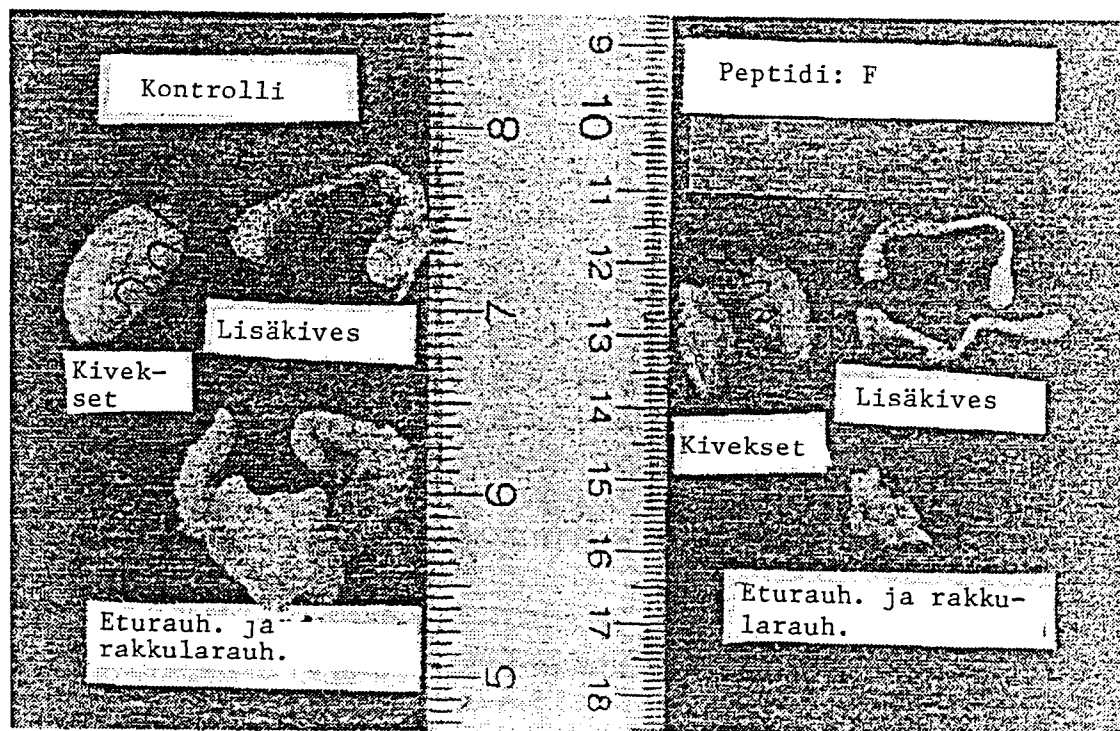


Fig. 4

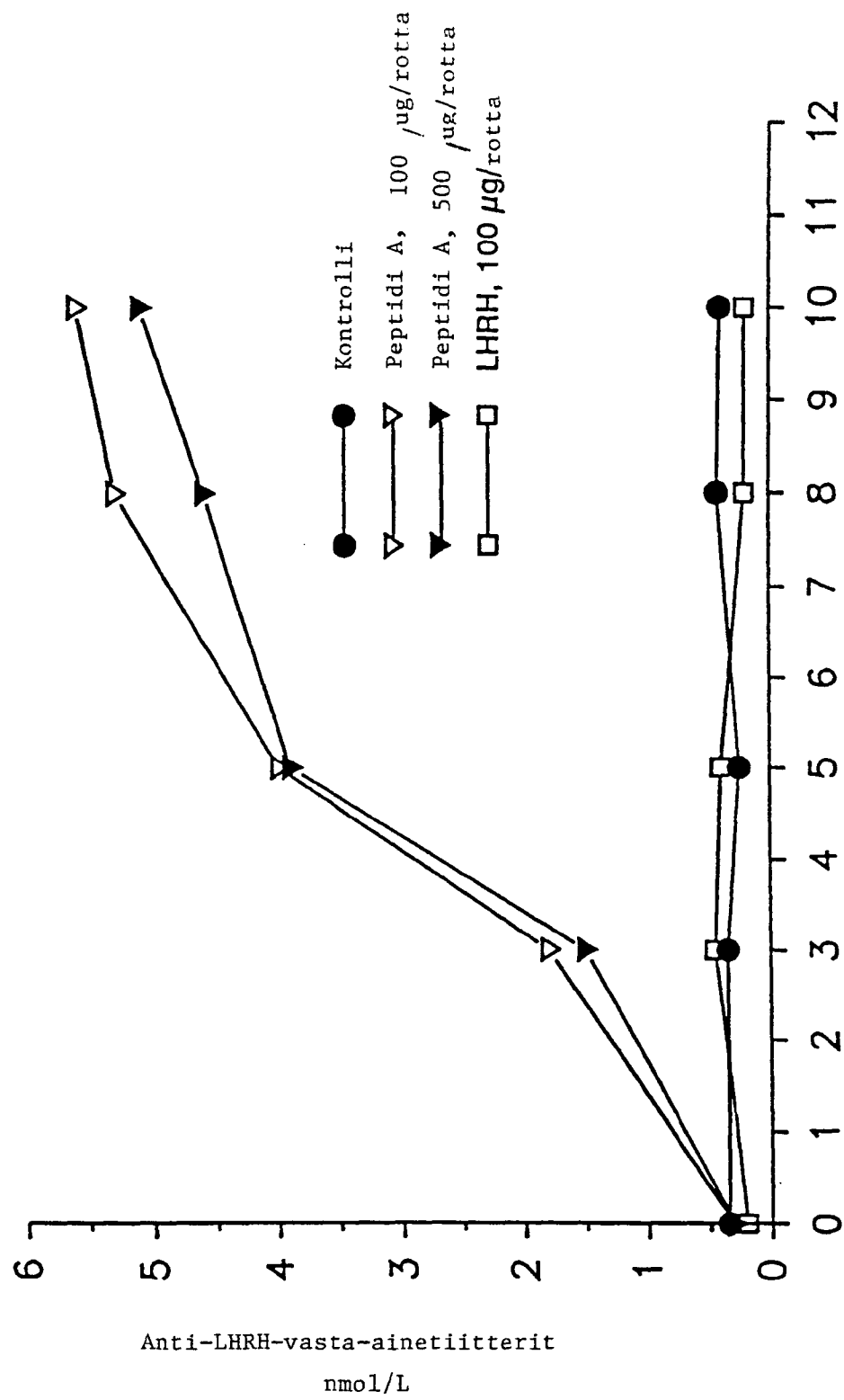


Fig. 5

Viikot immunisaation jälkeen

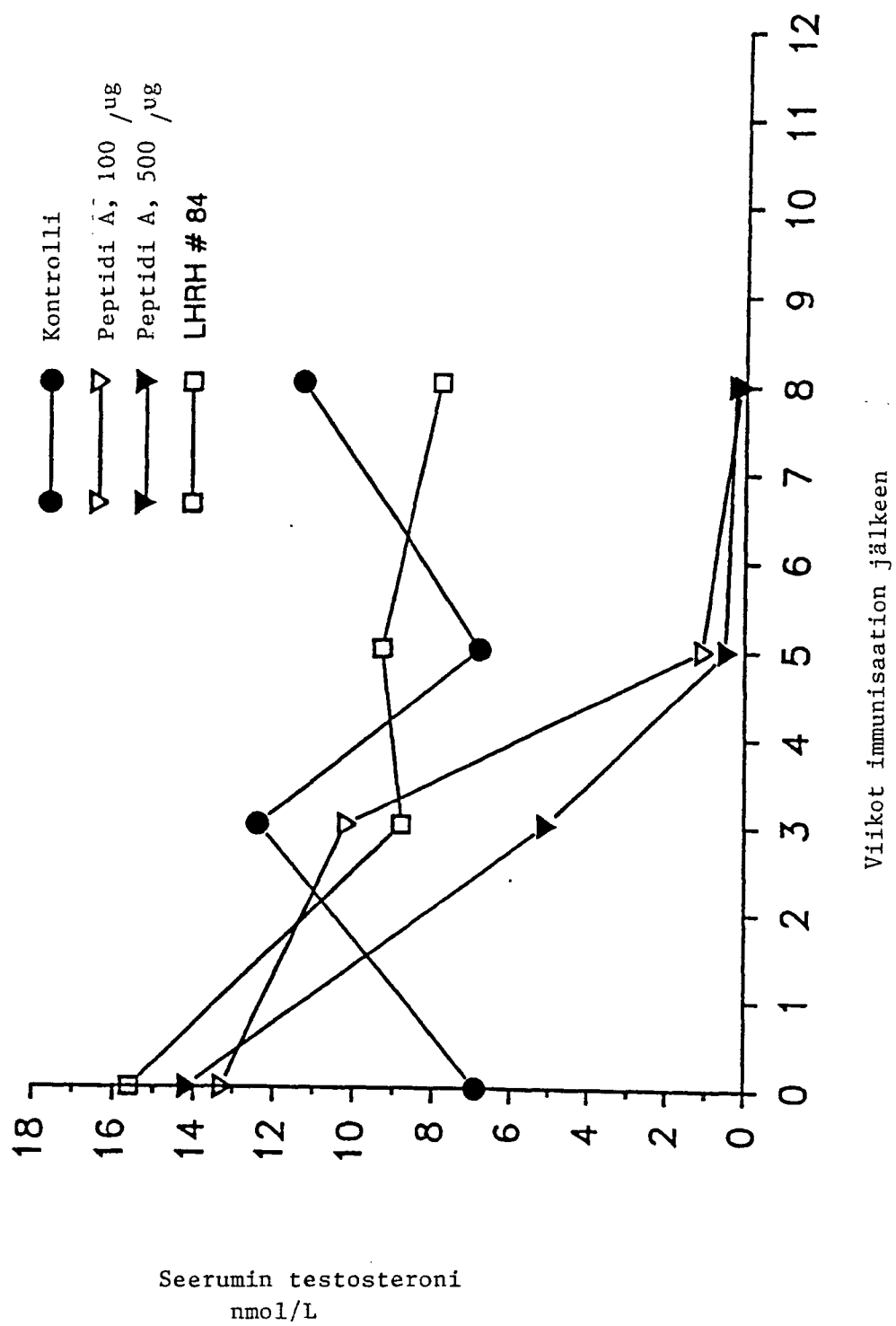
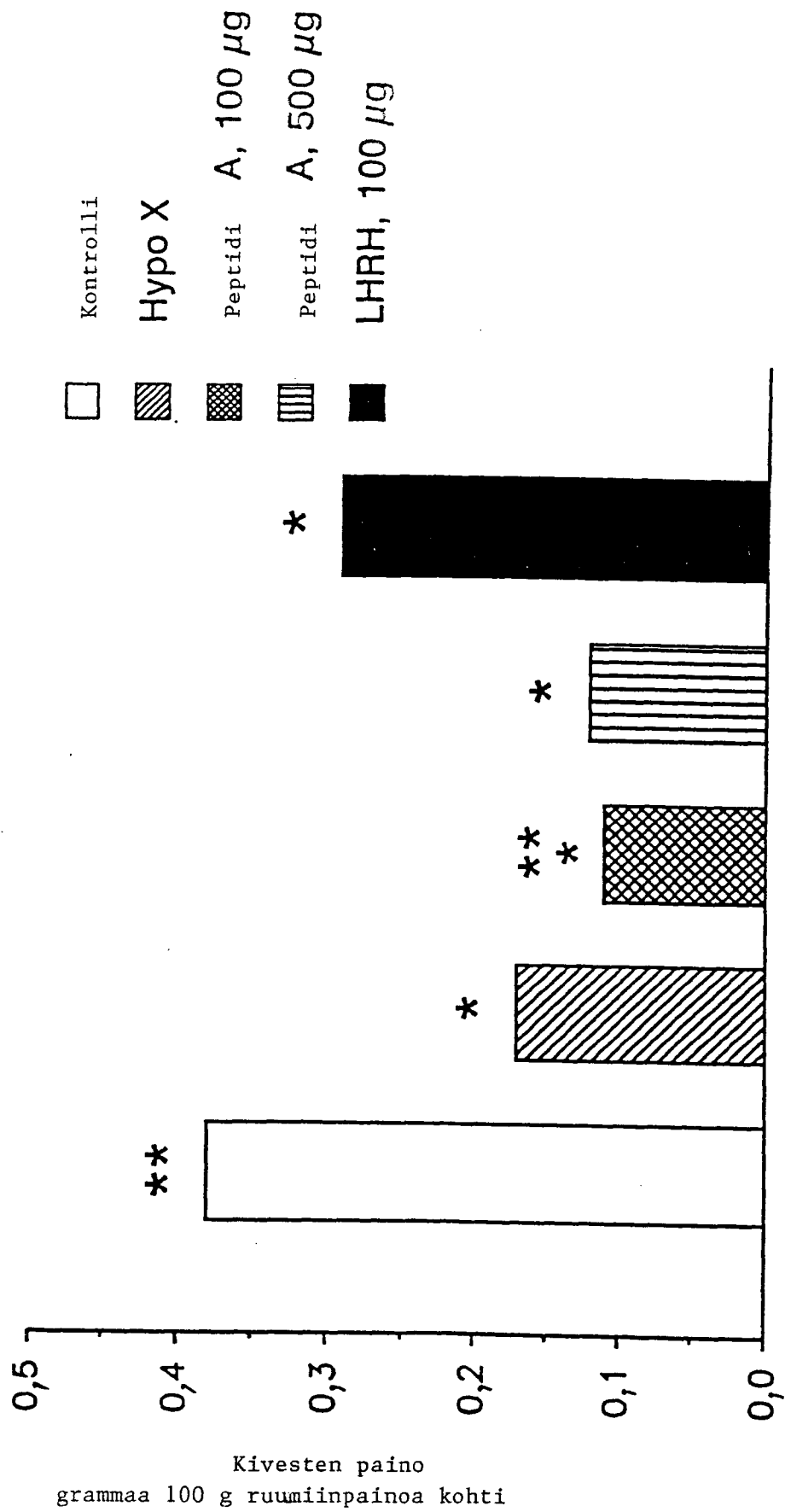


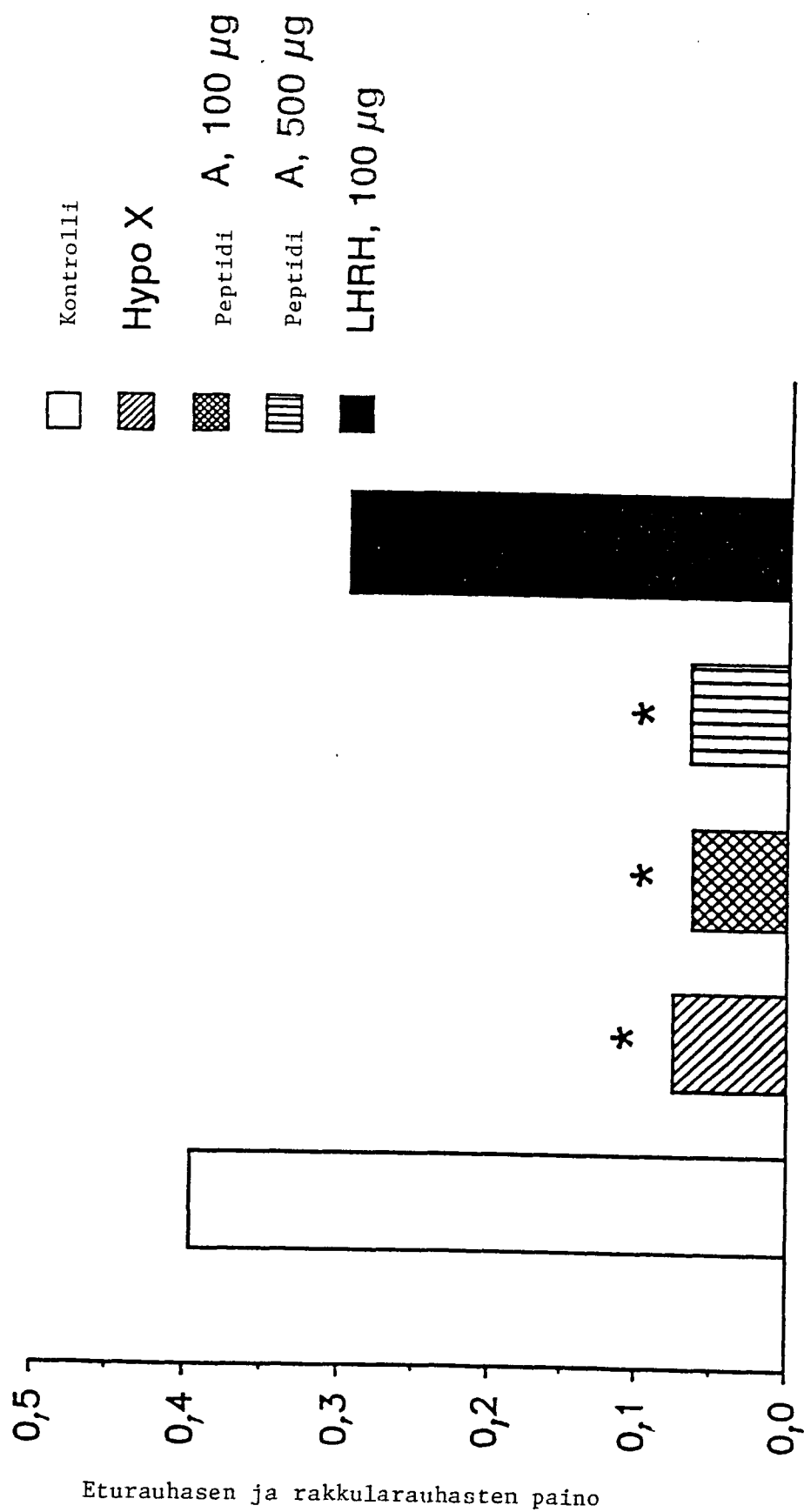
Fig. 6



*: Eroaa merkitsevästi ei-immunisoiduista kontrolleista

** : Eroaa merkitsevästi rotista, joilta on poistettu hypofyysi

Fig. 7



*: eroaa merkitsevästi ei-immunisoiduista kontrolleista

Fig. 8.

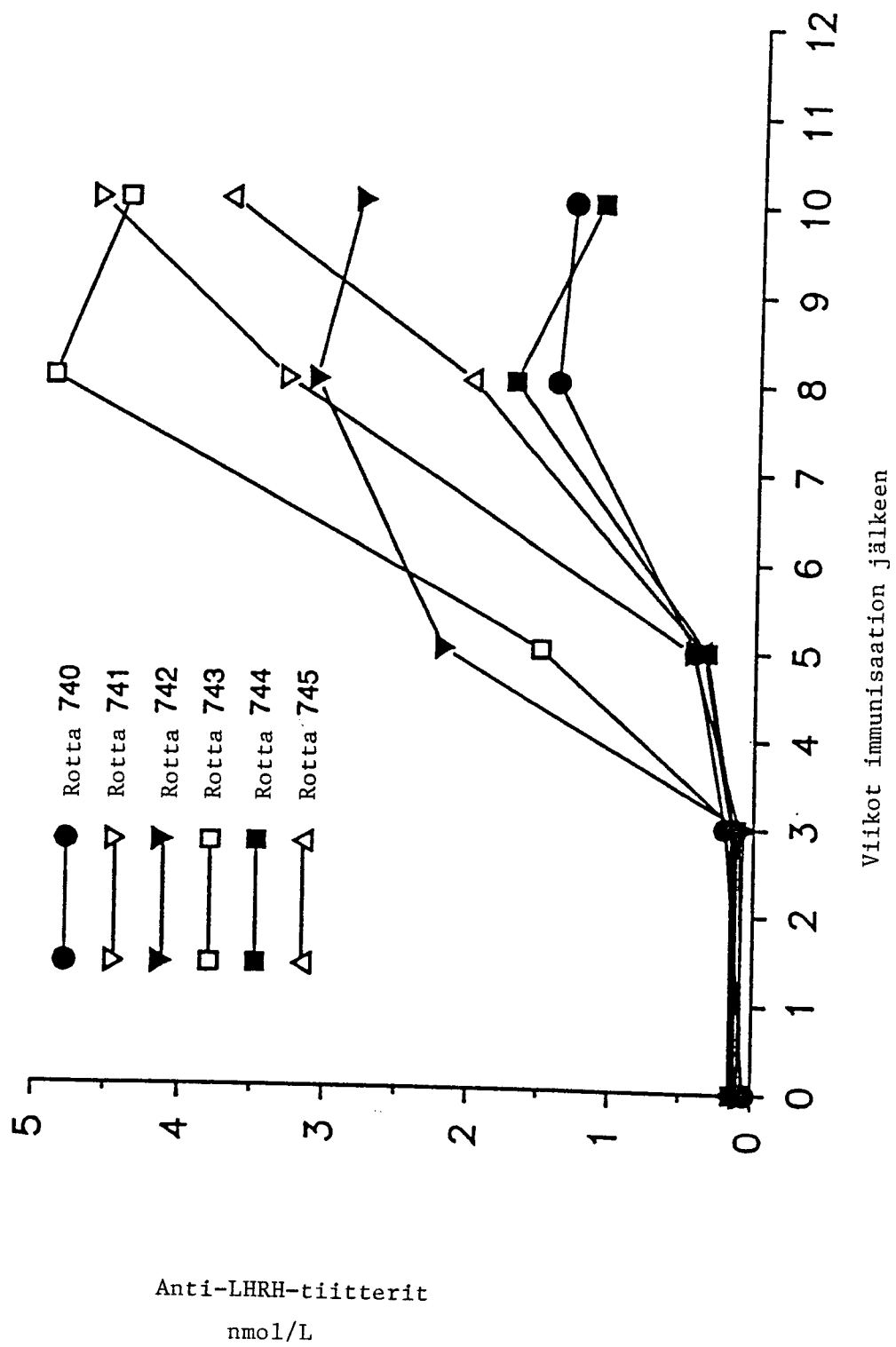


Fig. 9

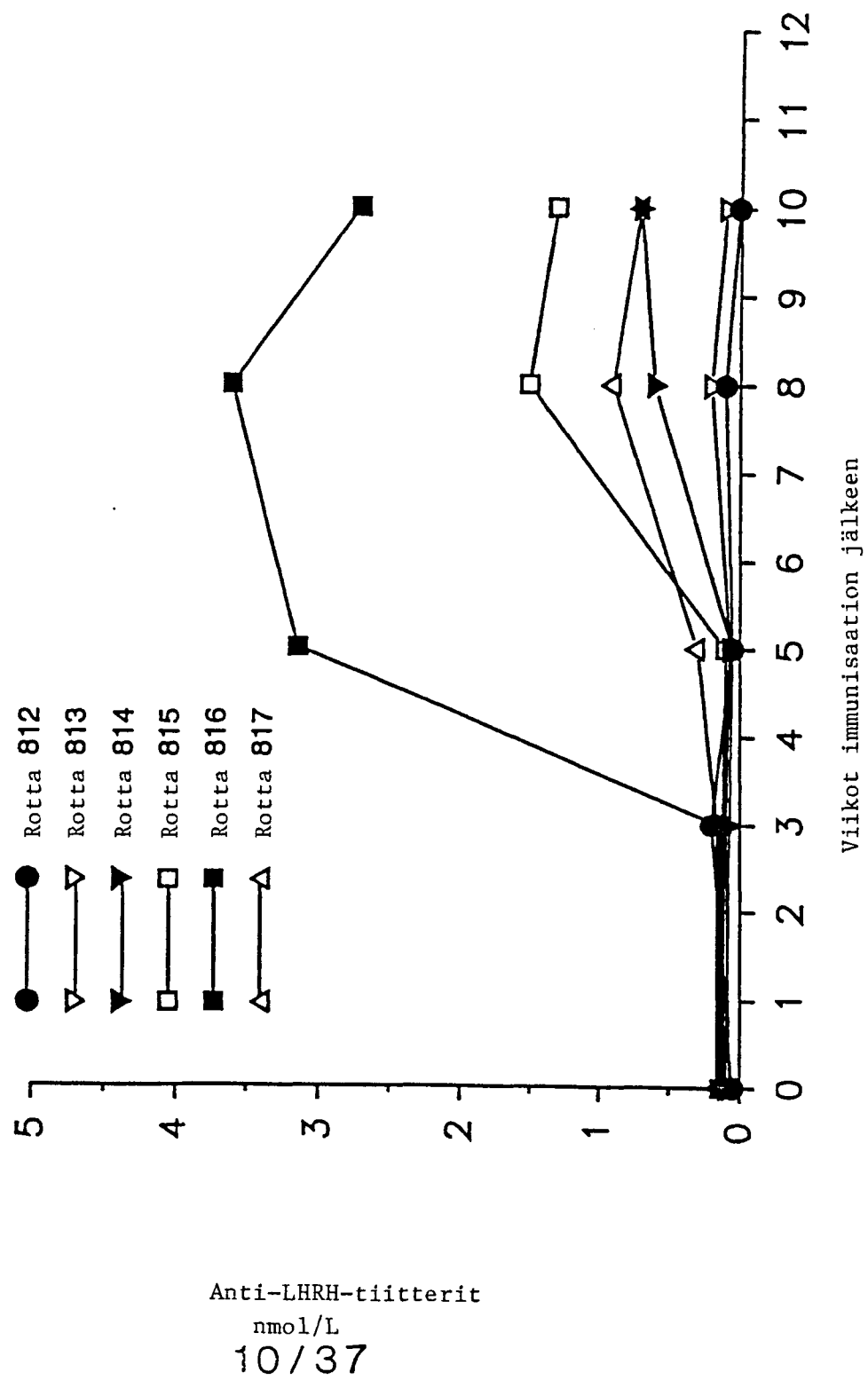


Fig. 10

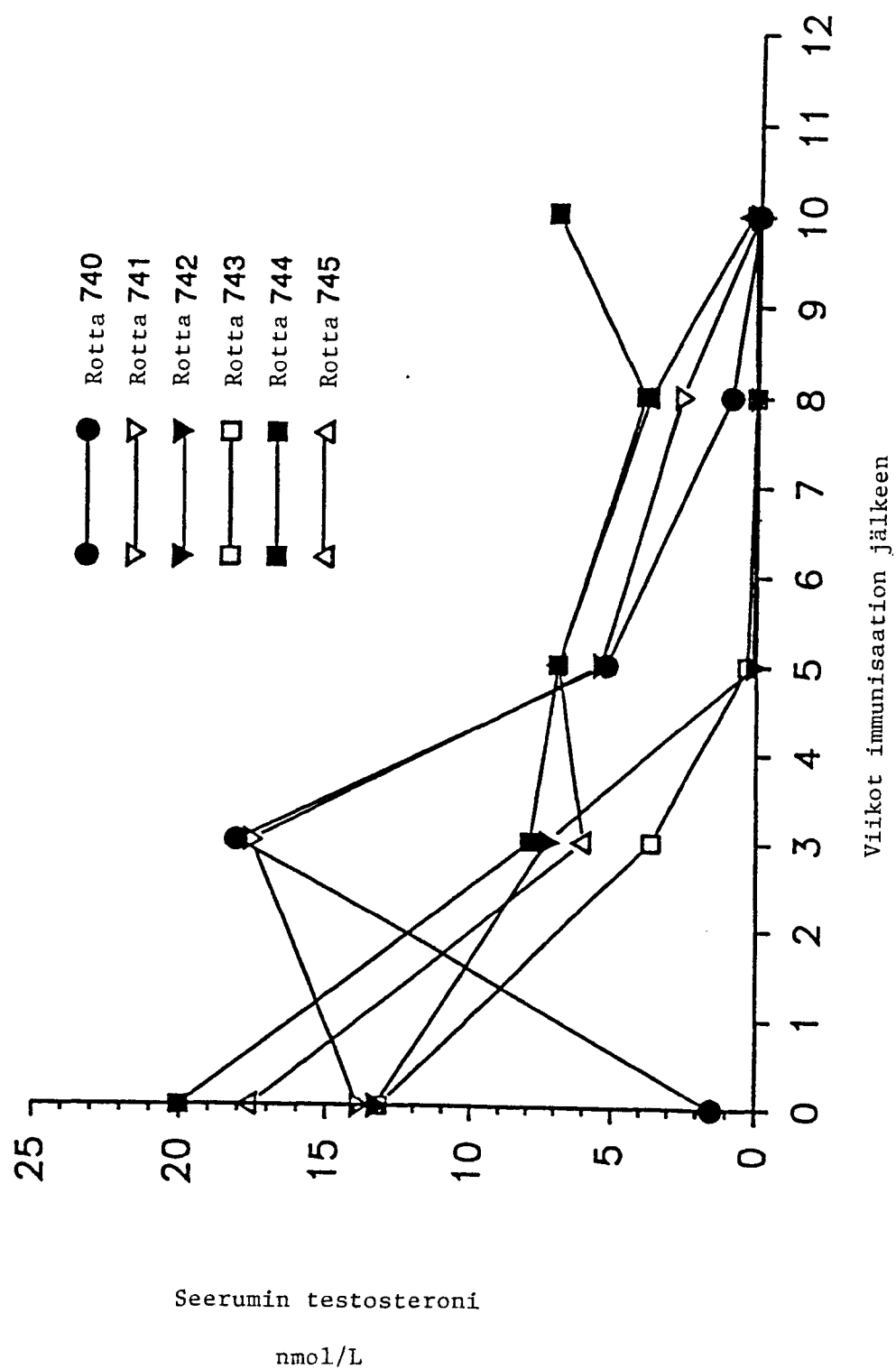


Fig. 11

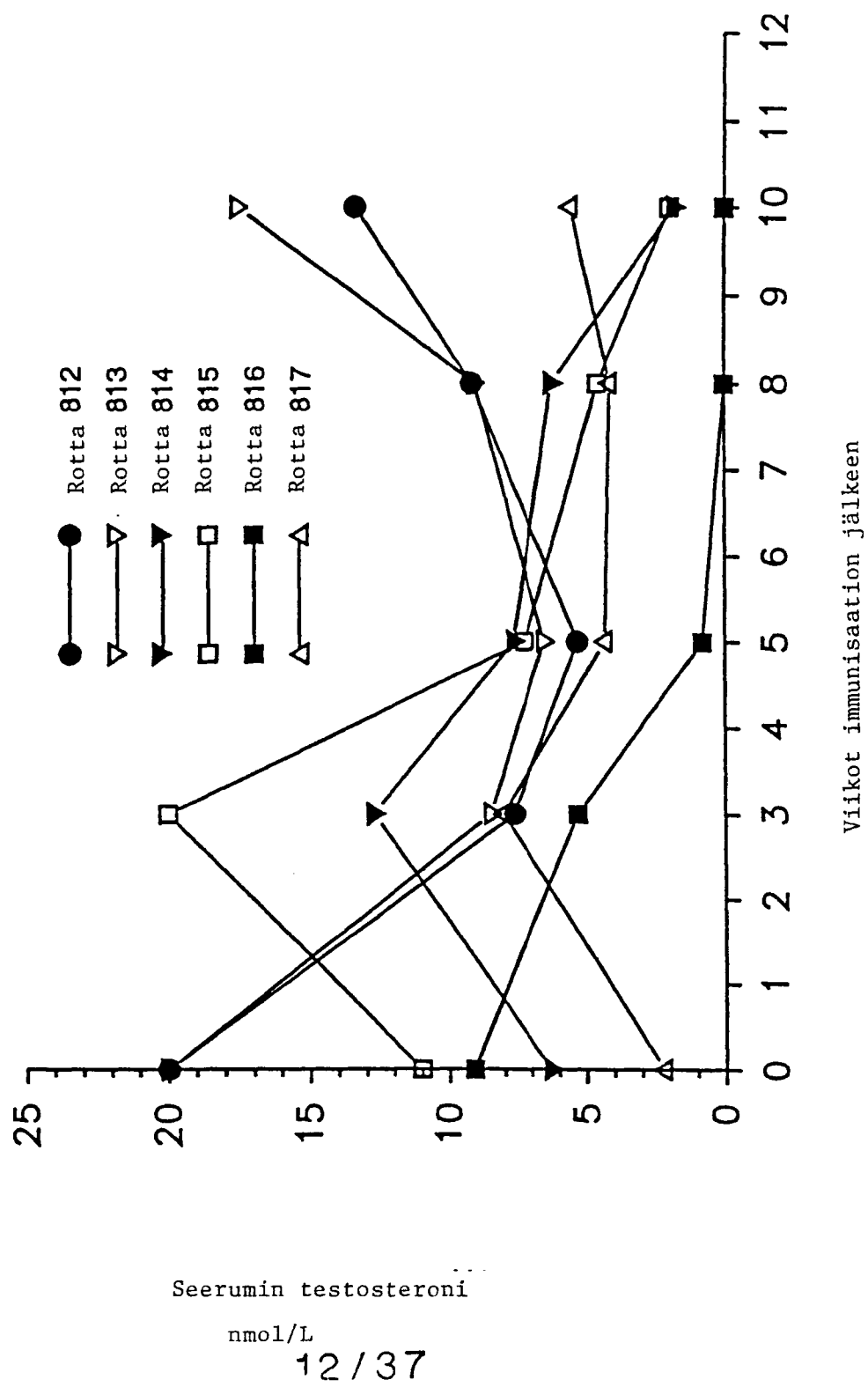


Fig. 12

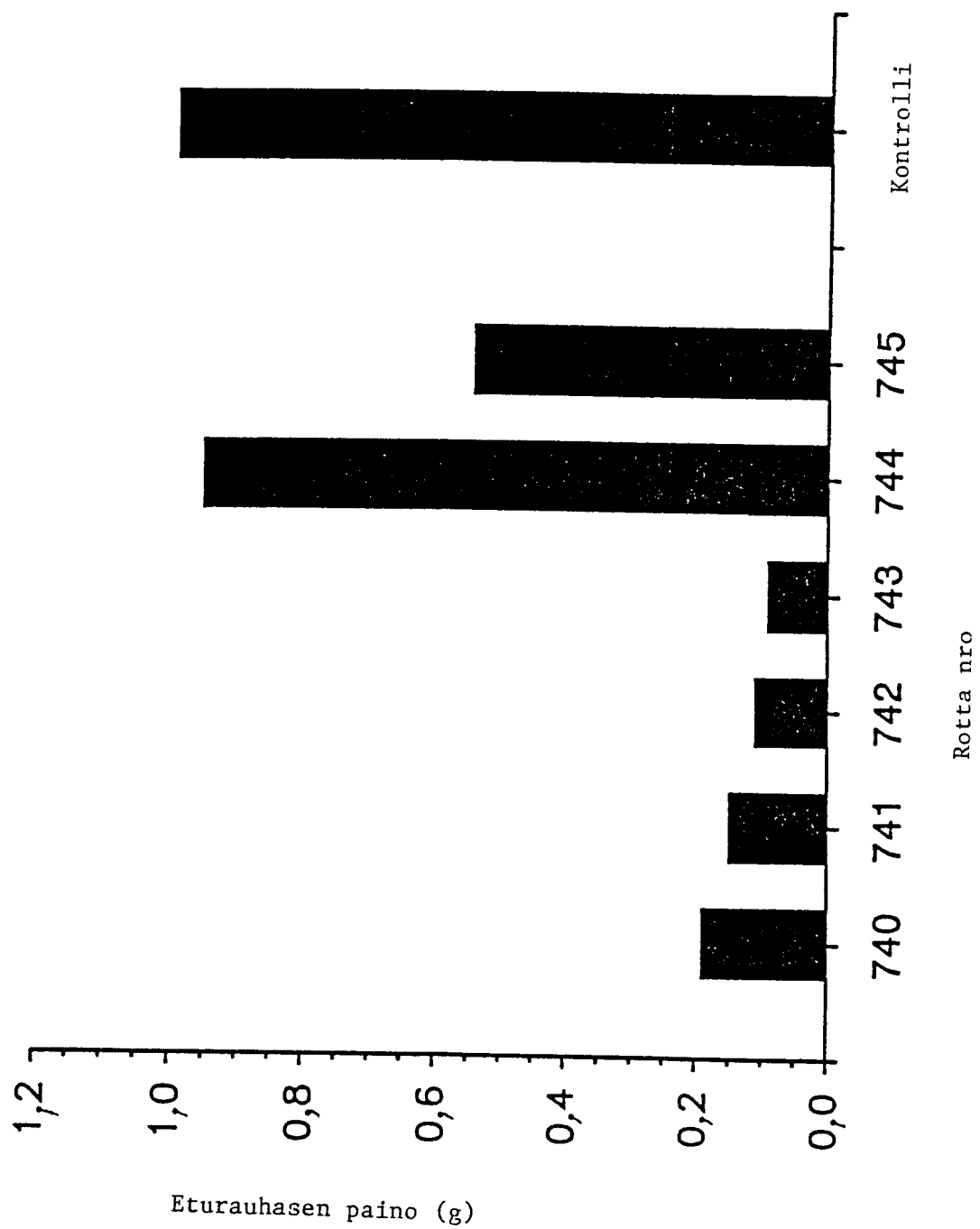


Fig. 13.

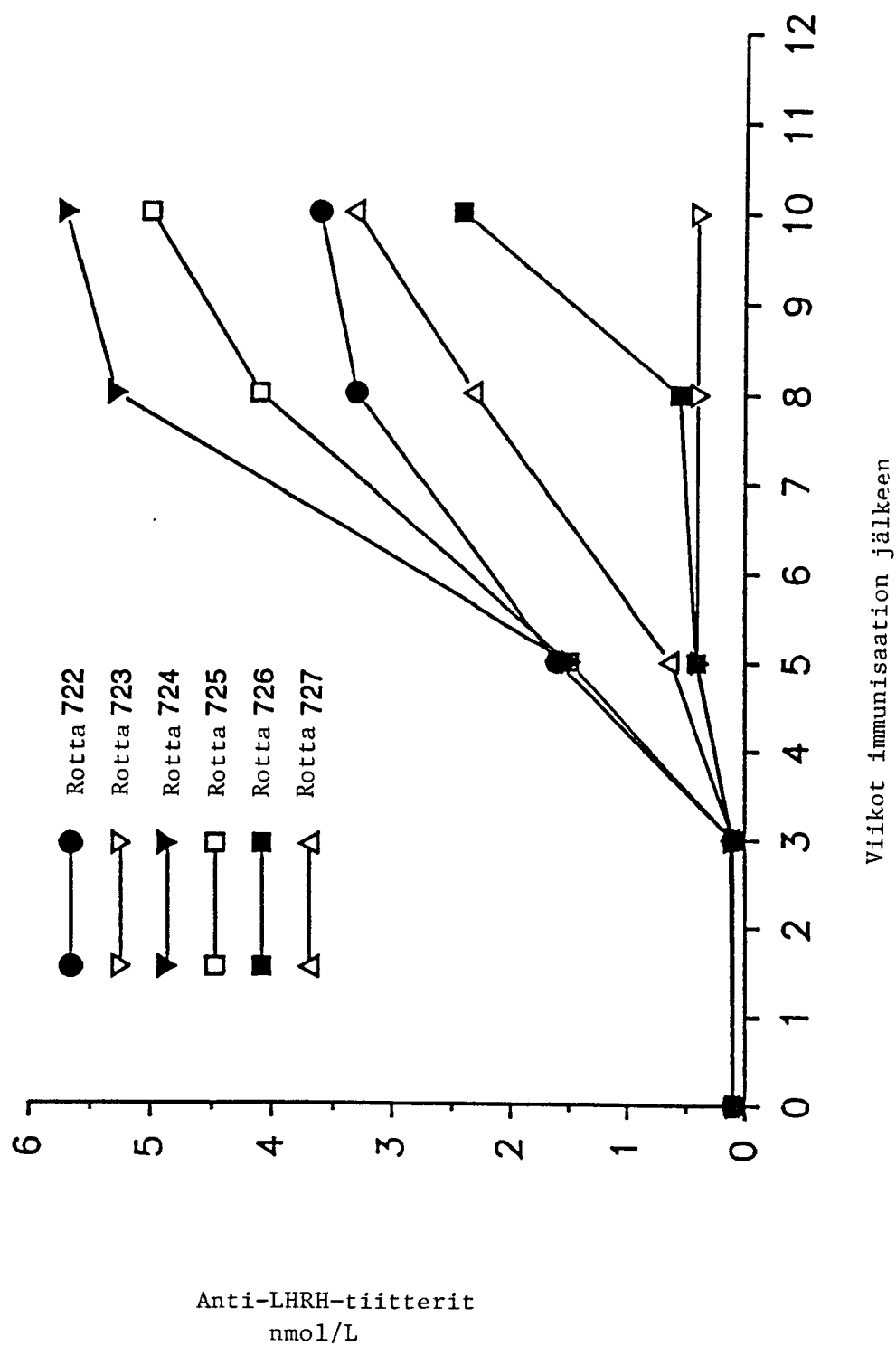


Fig. 14

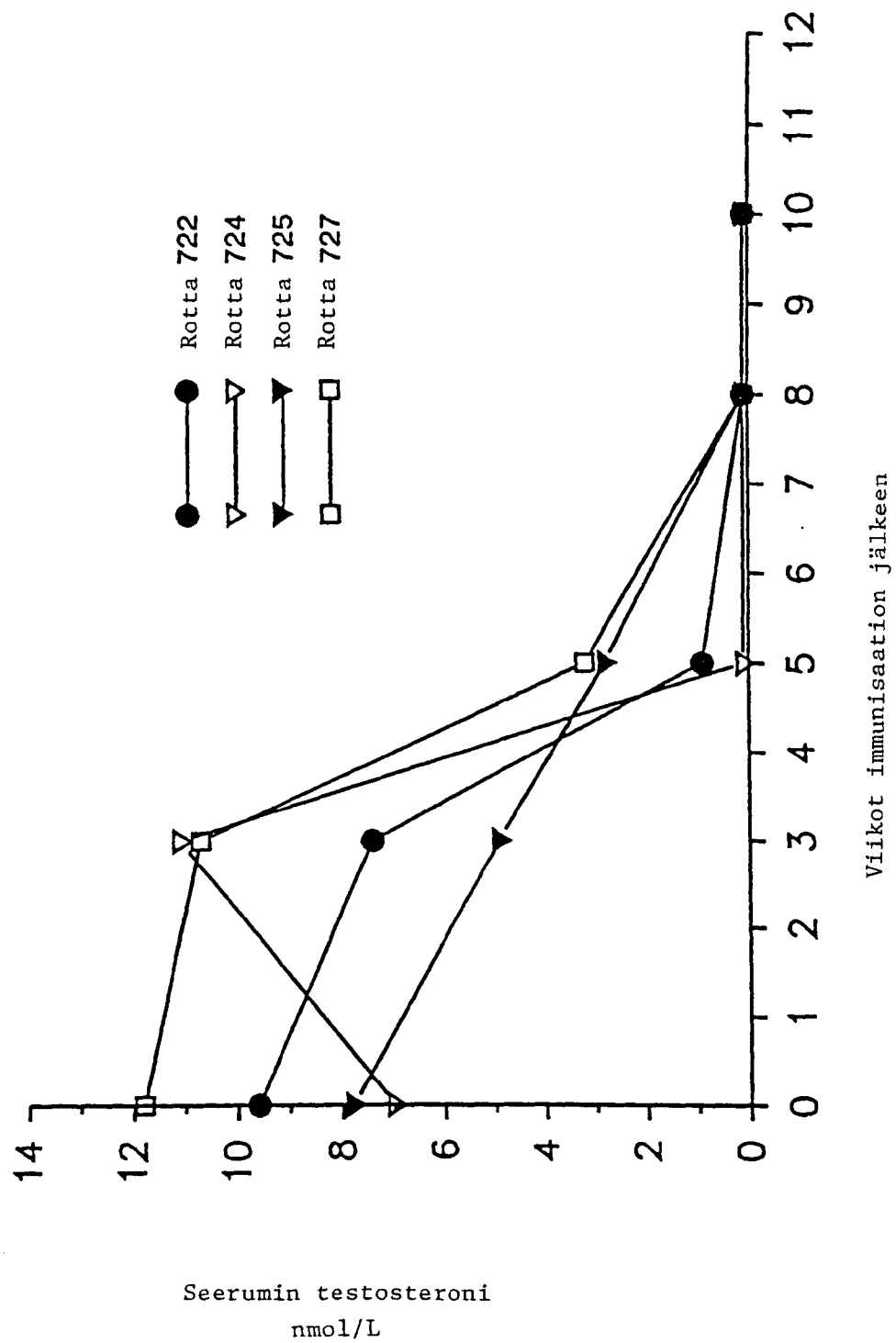


Fig. 15a

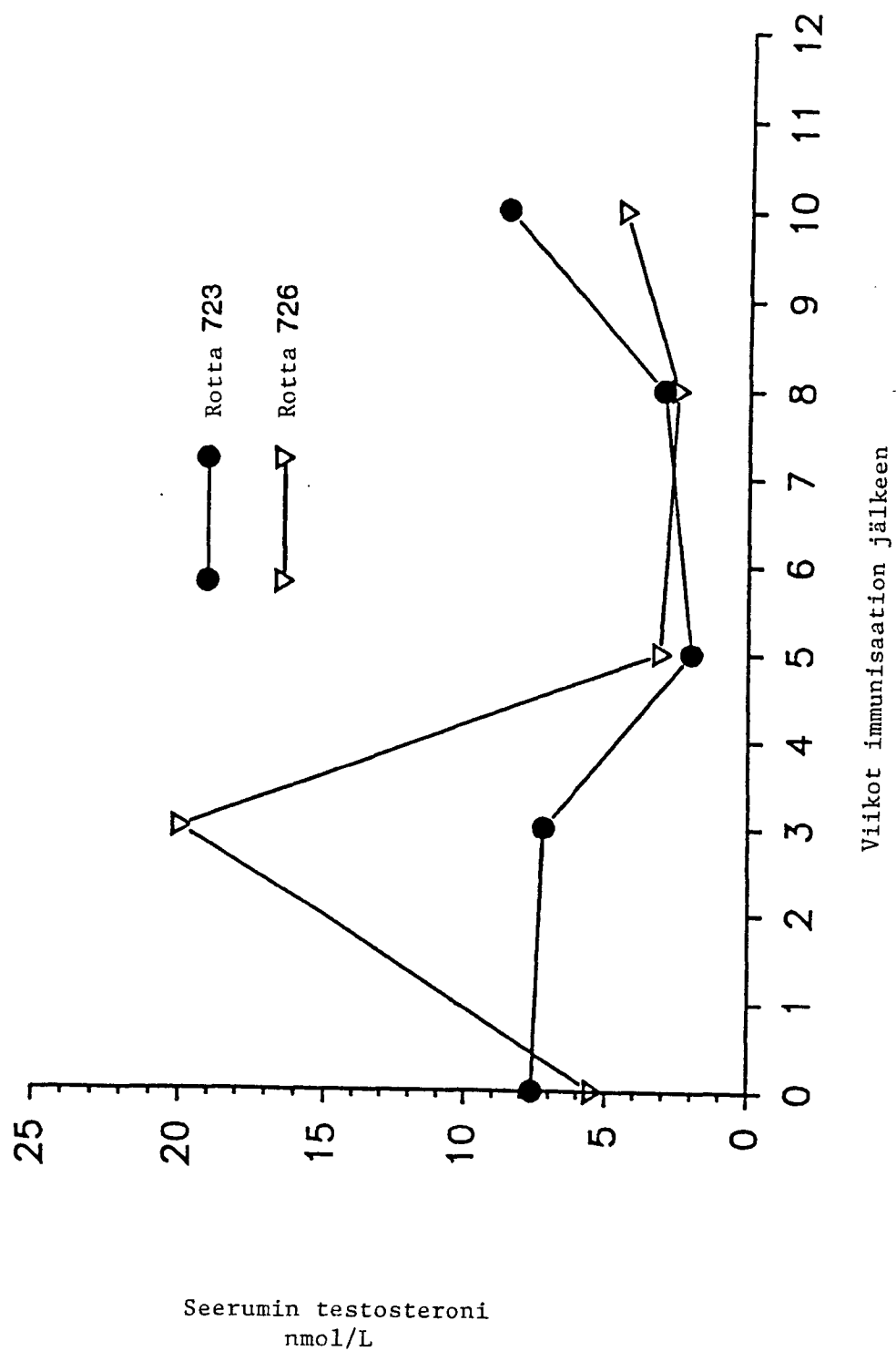


Fig. 15b

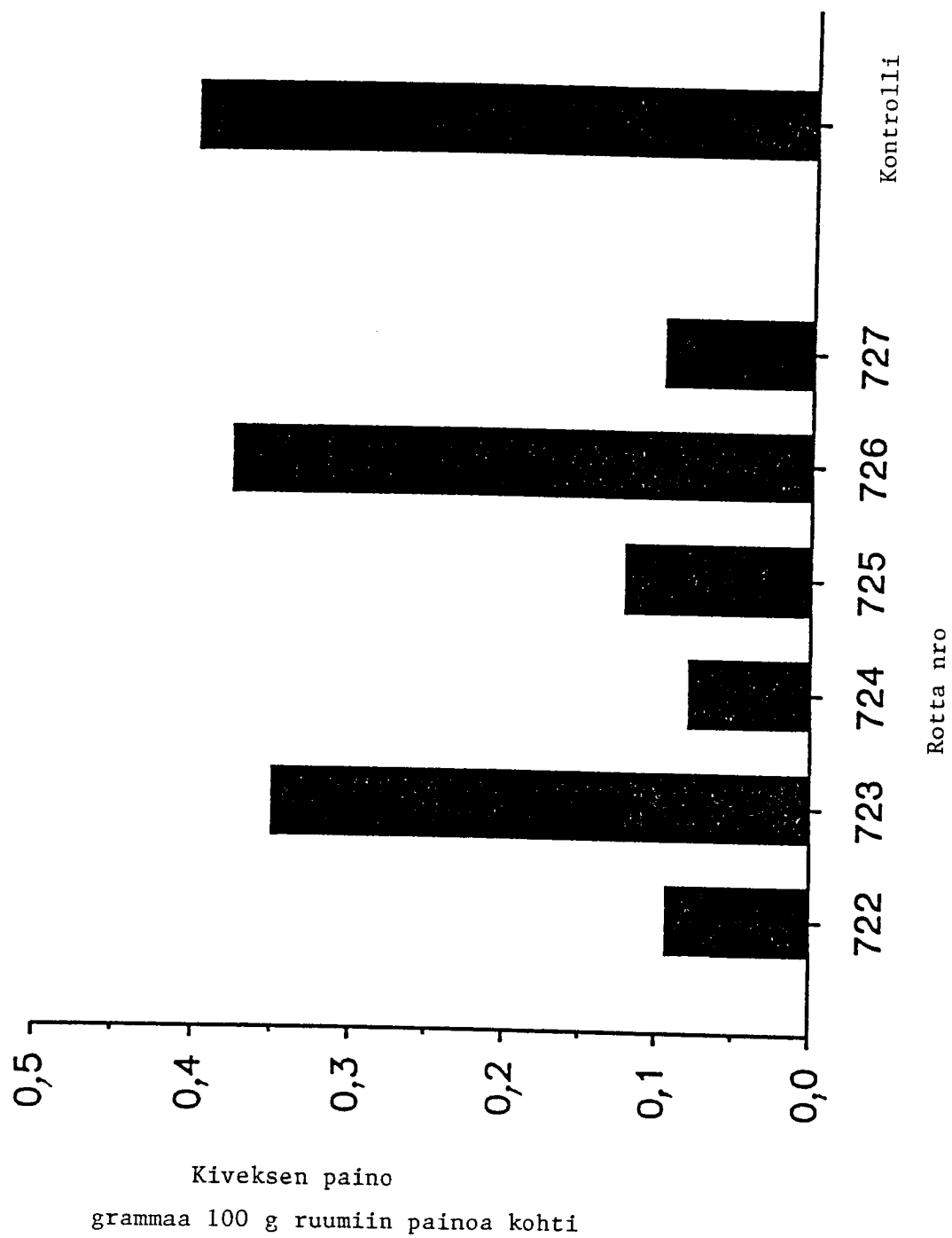


Fig. 16

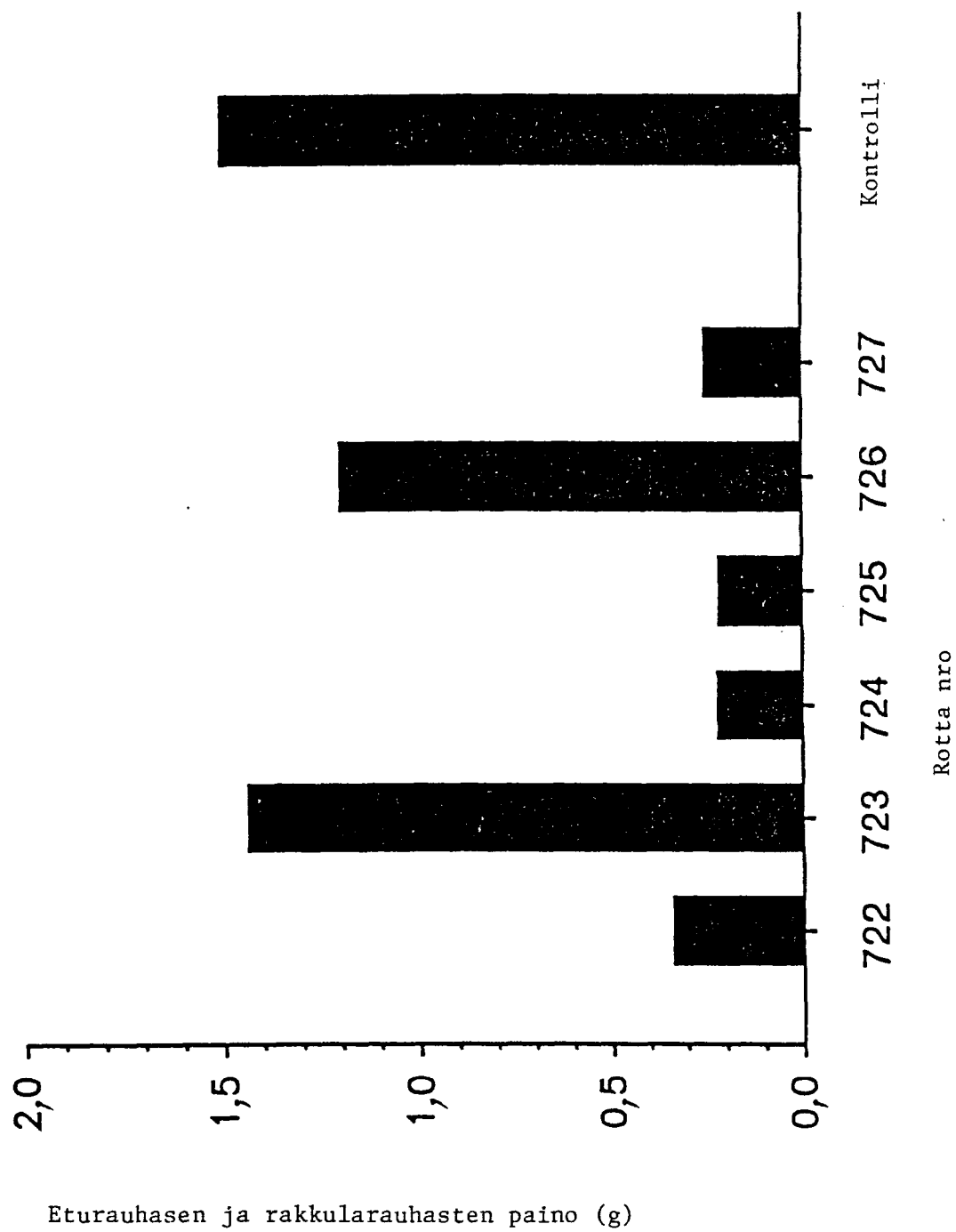


Fig. 17

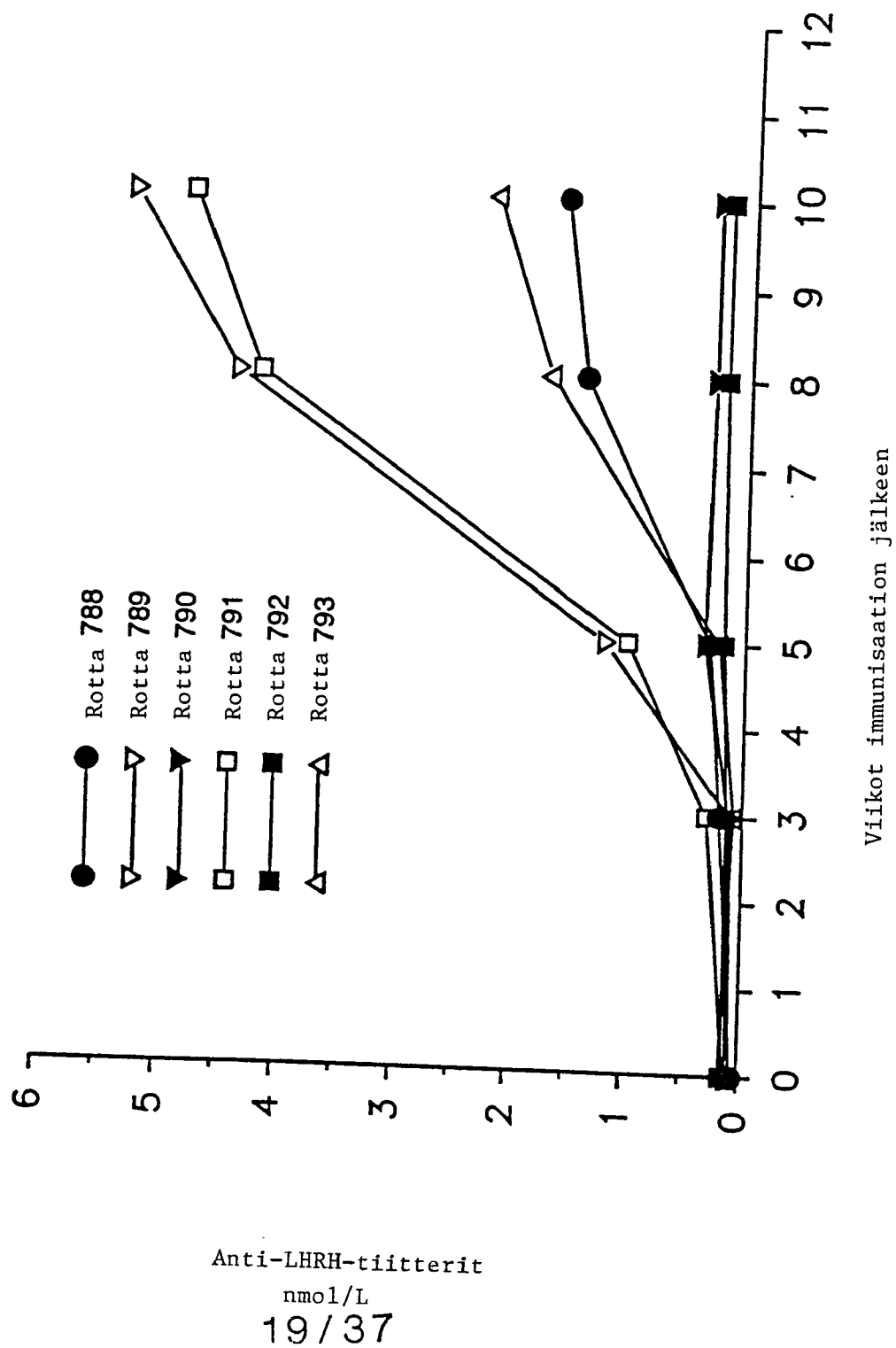
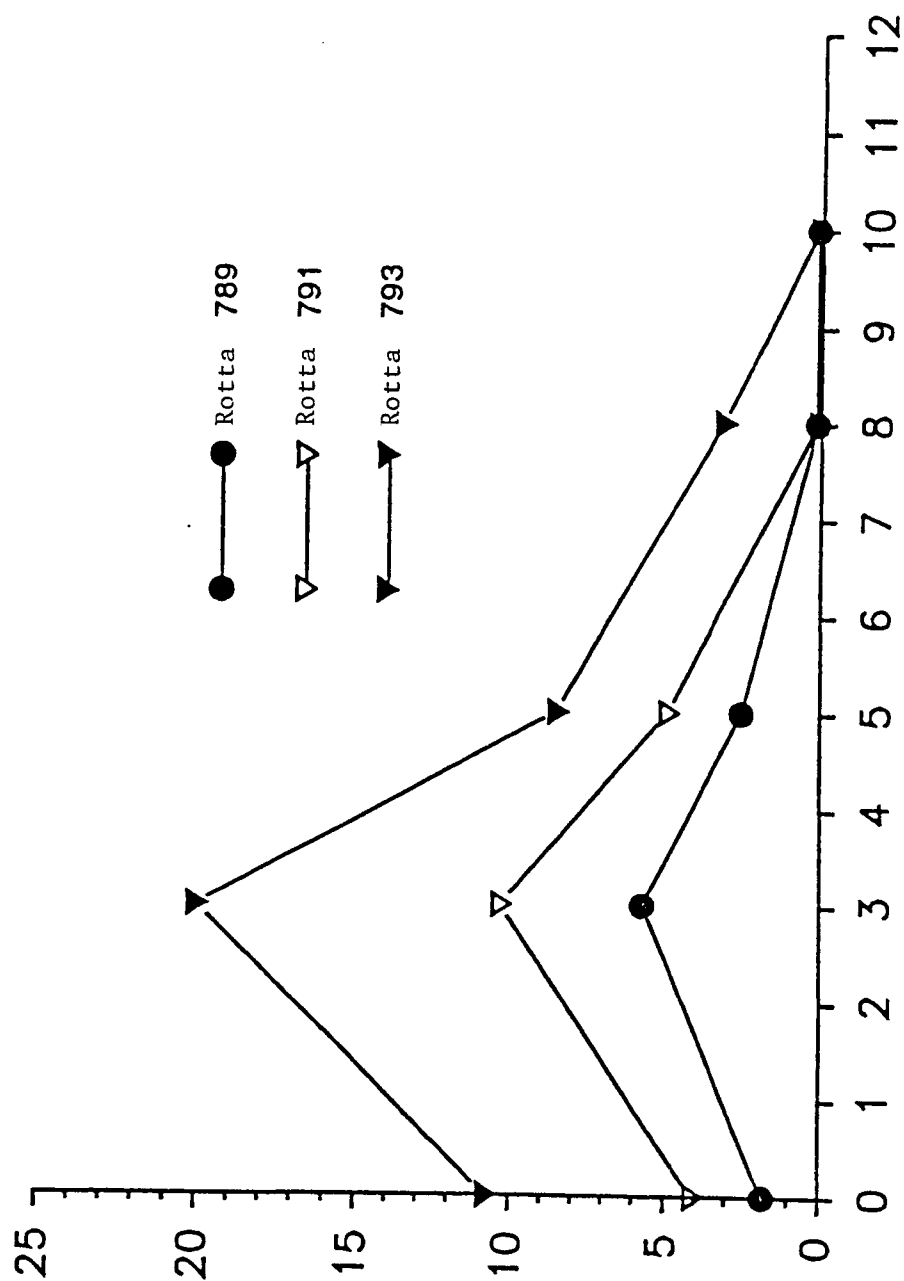


Fig. 18



Viikot immunisaation jälkeen

Fig. 19a

Seerumin testosteroni
nmol/L
20/37

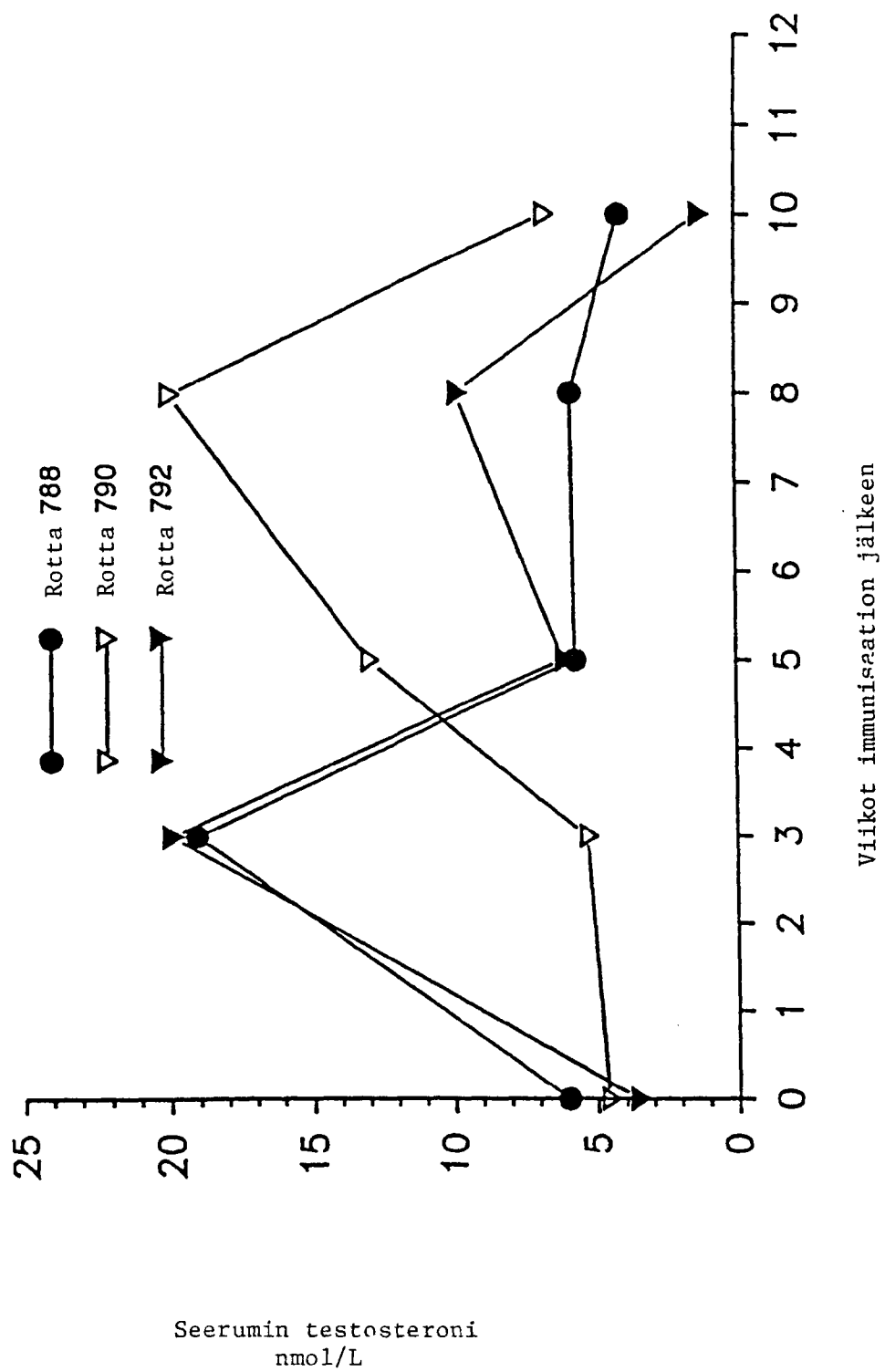


Fig. 19b

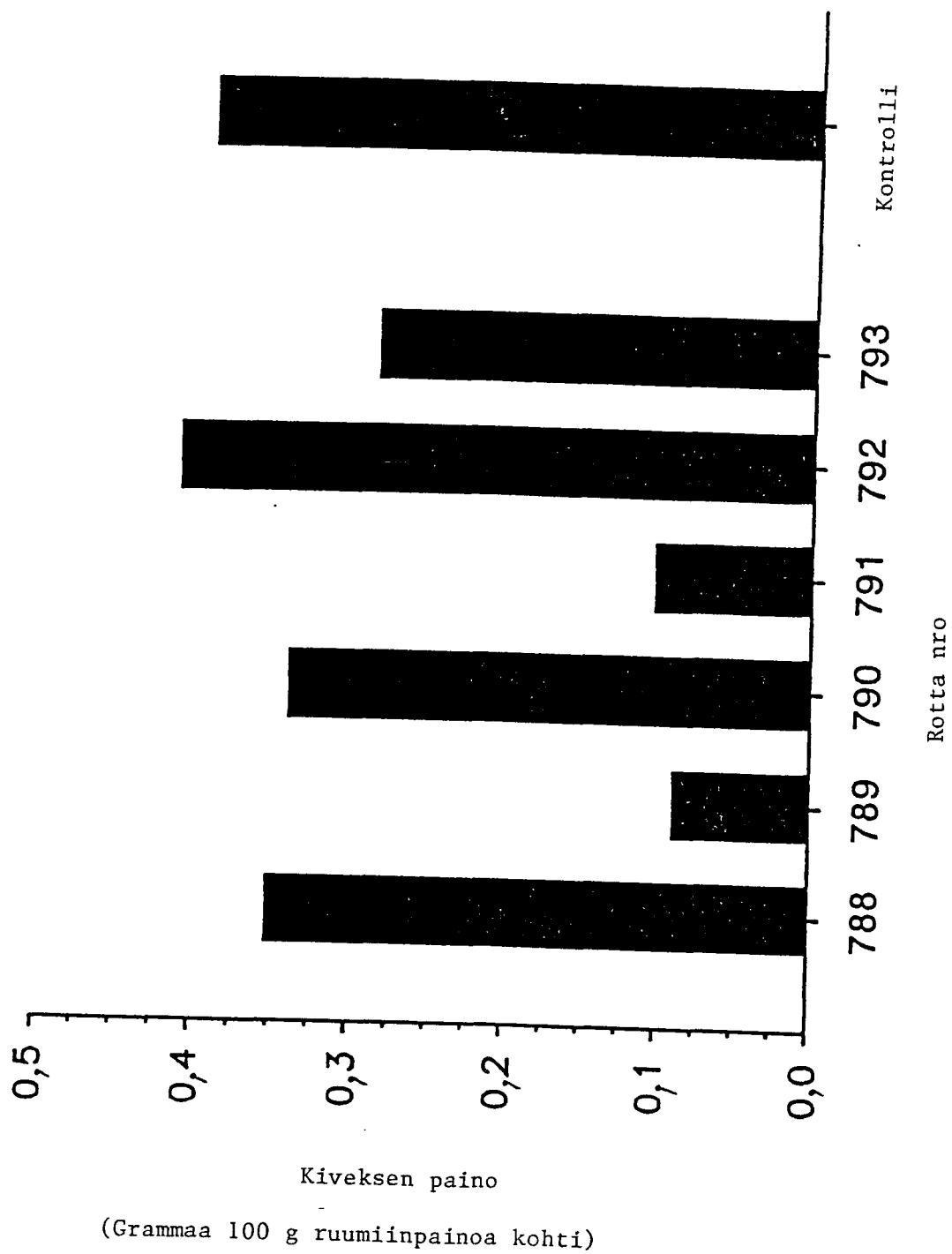


Fig. 20

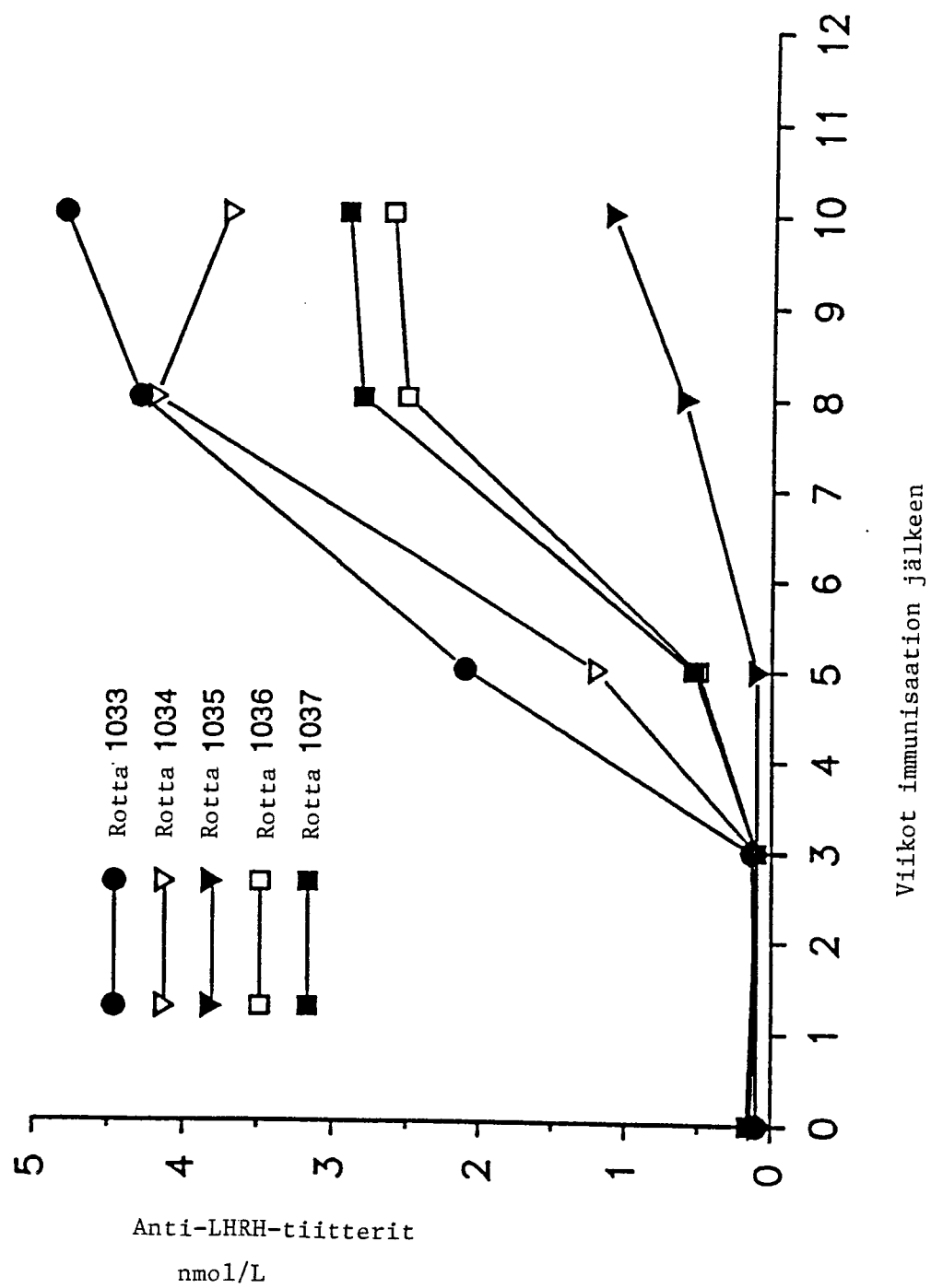


Fig. 21

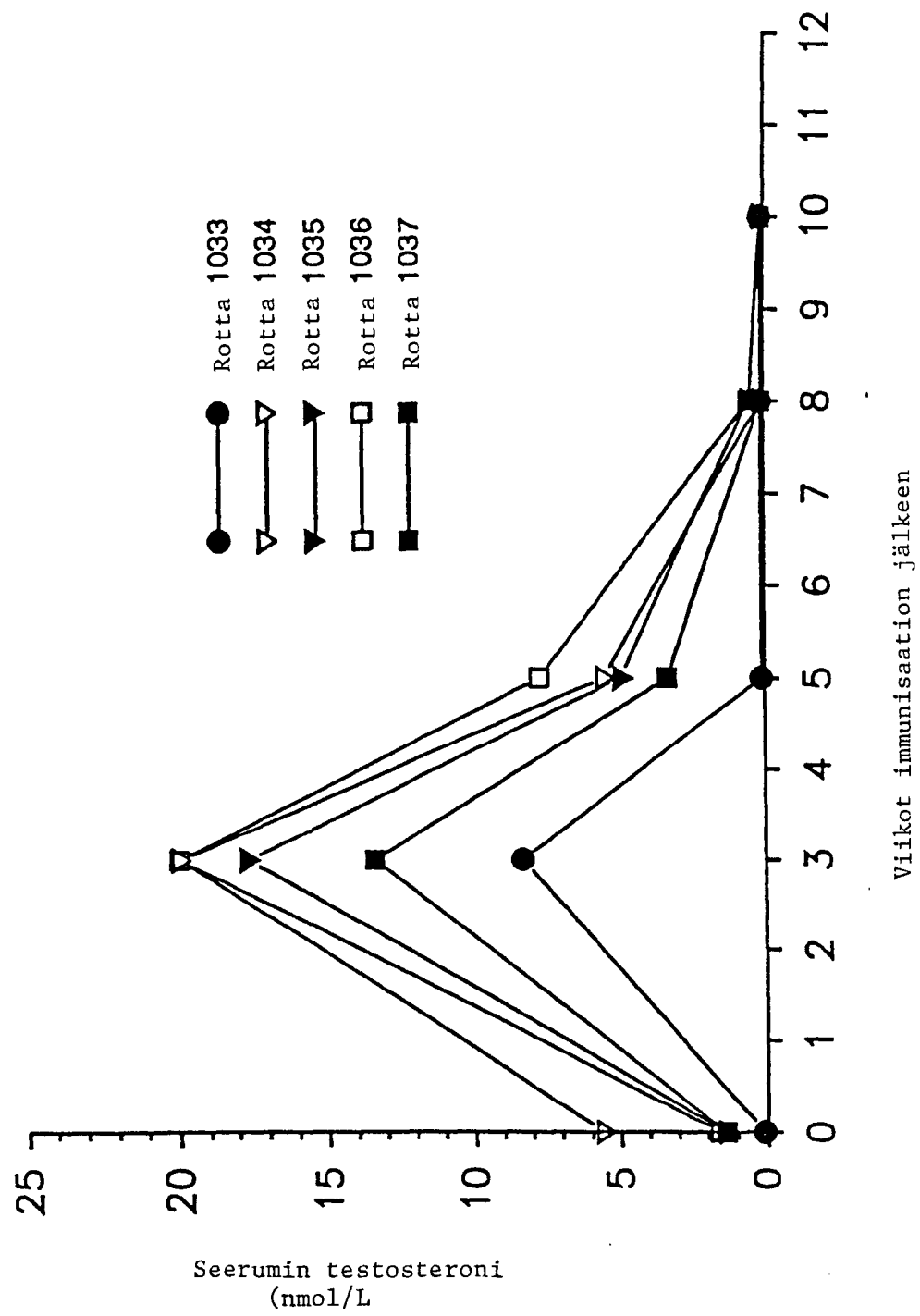


Fig. 22

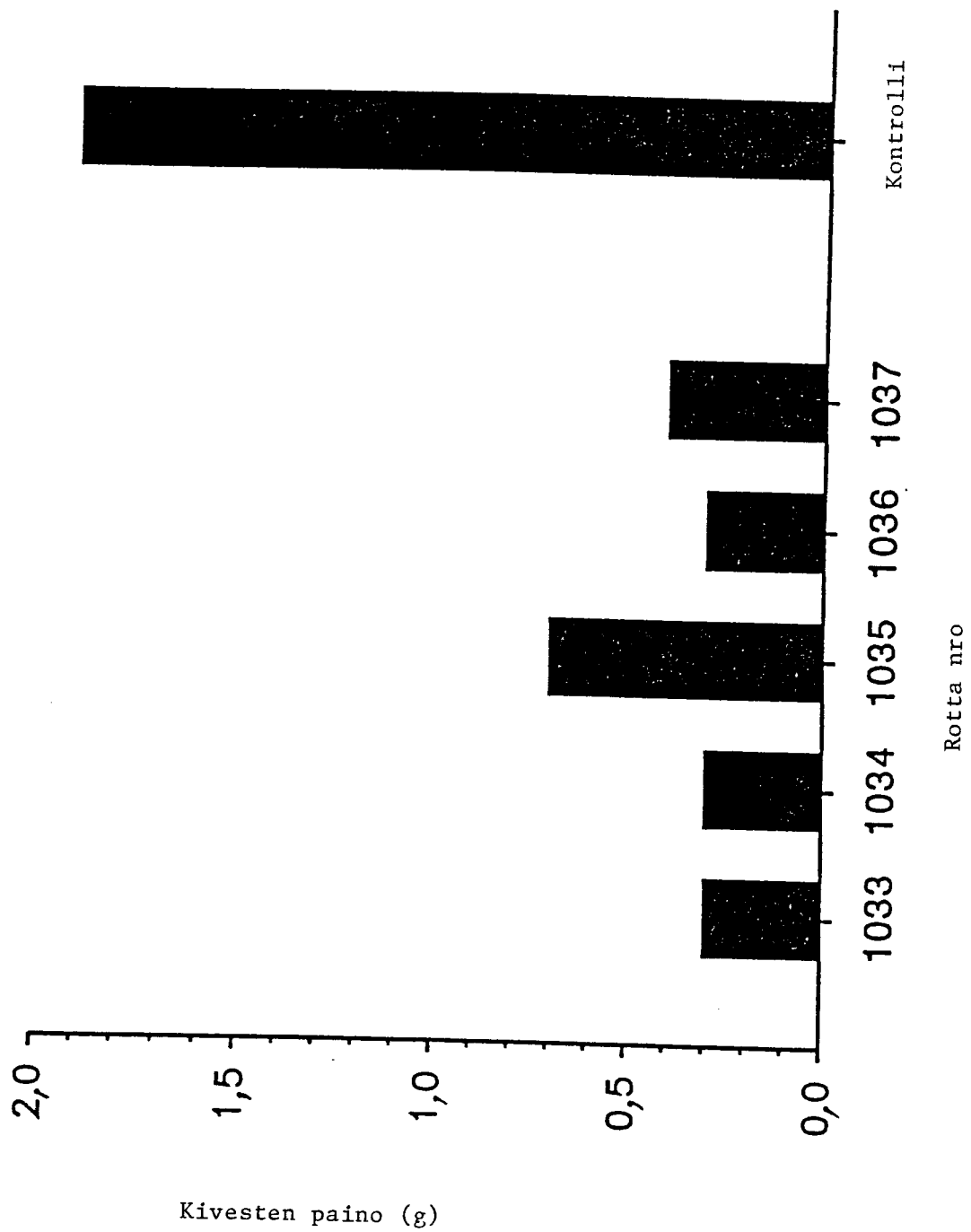


Fig. 23

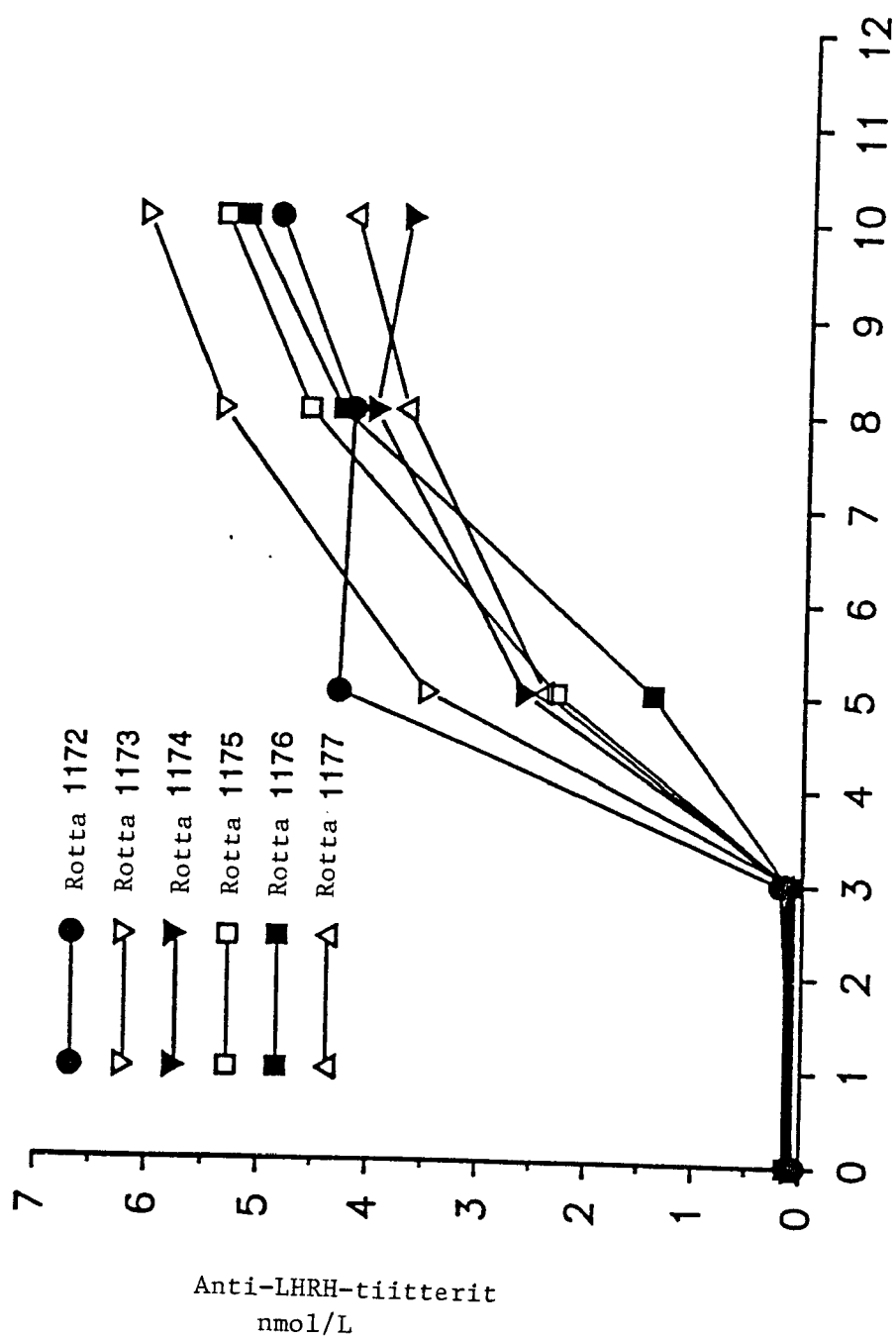


Fig. 24

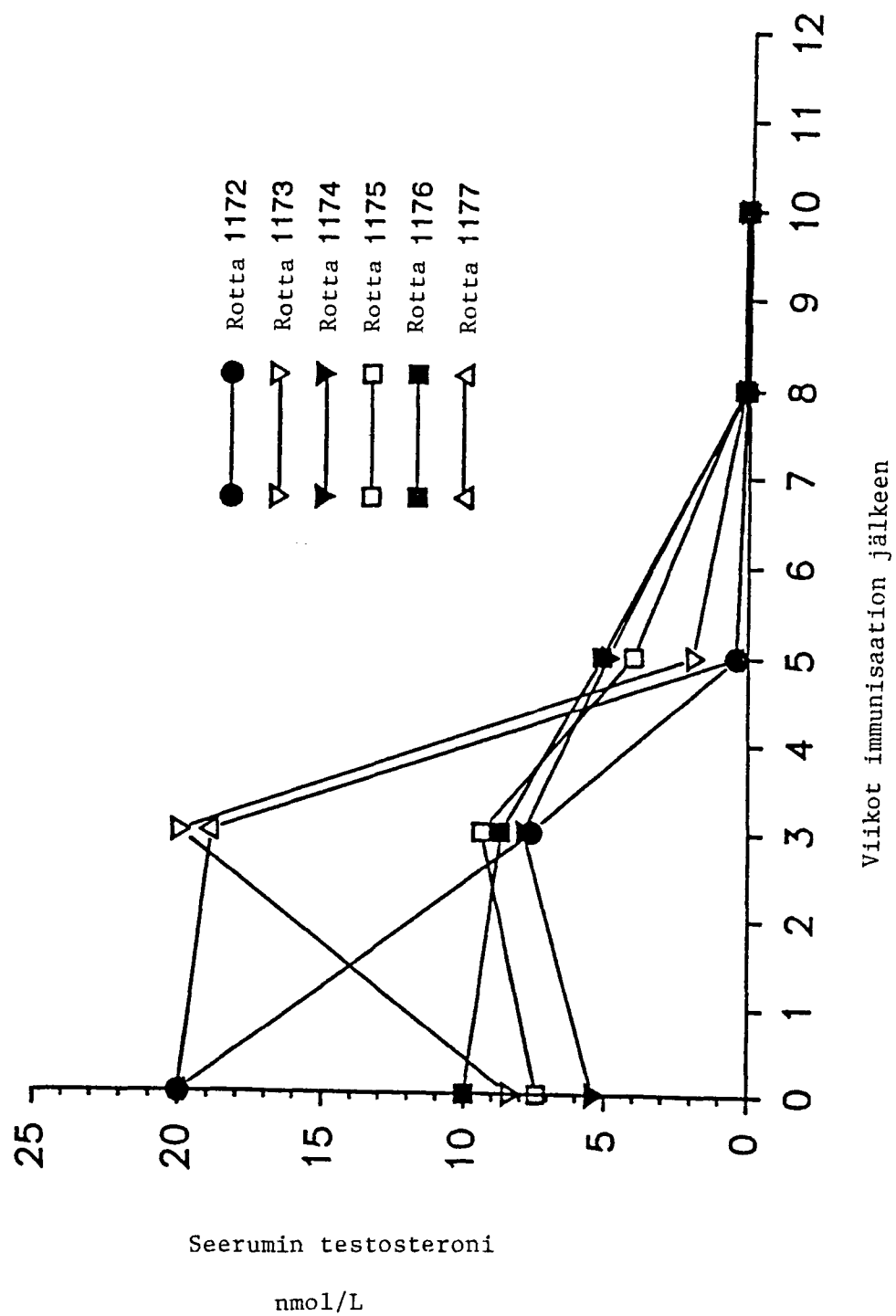


Fig. 25

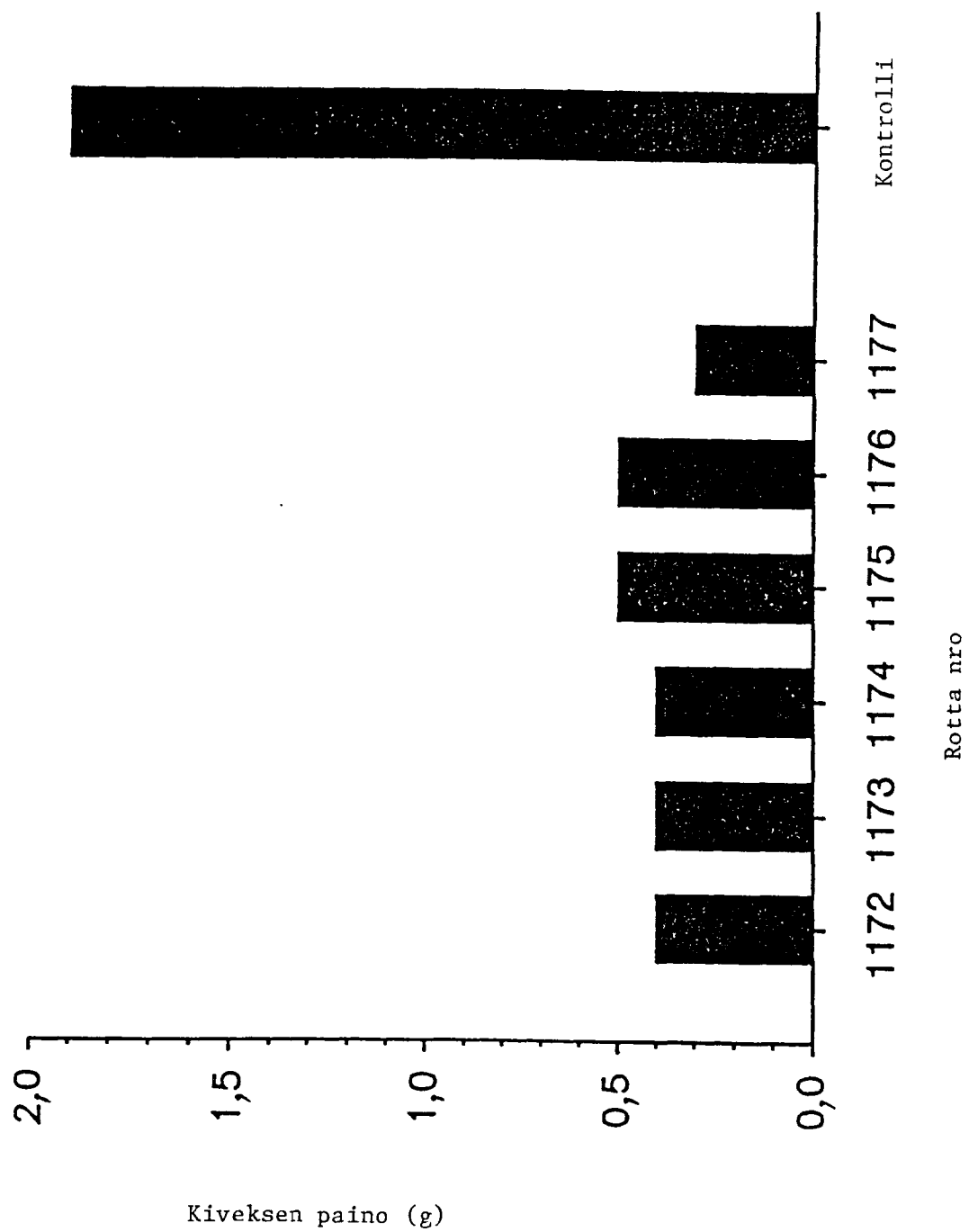


Fig. 26

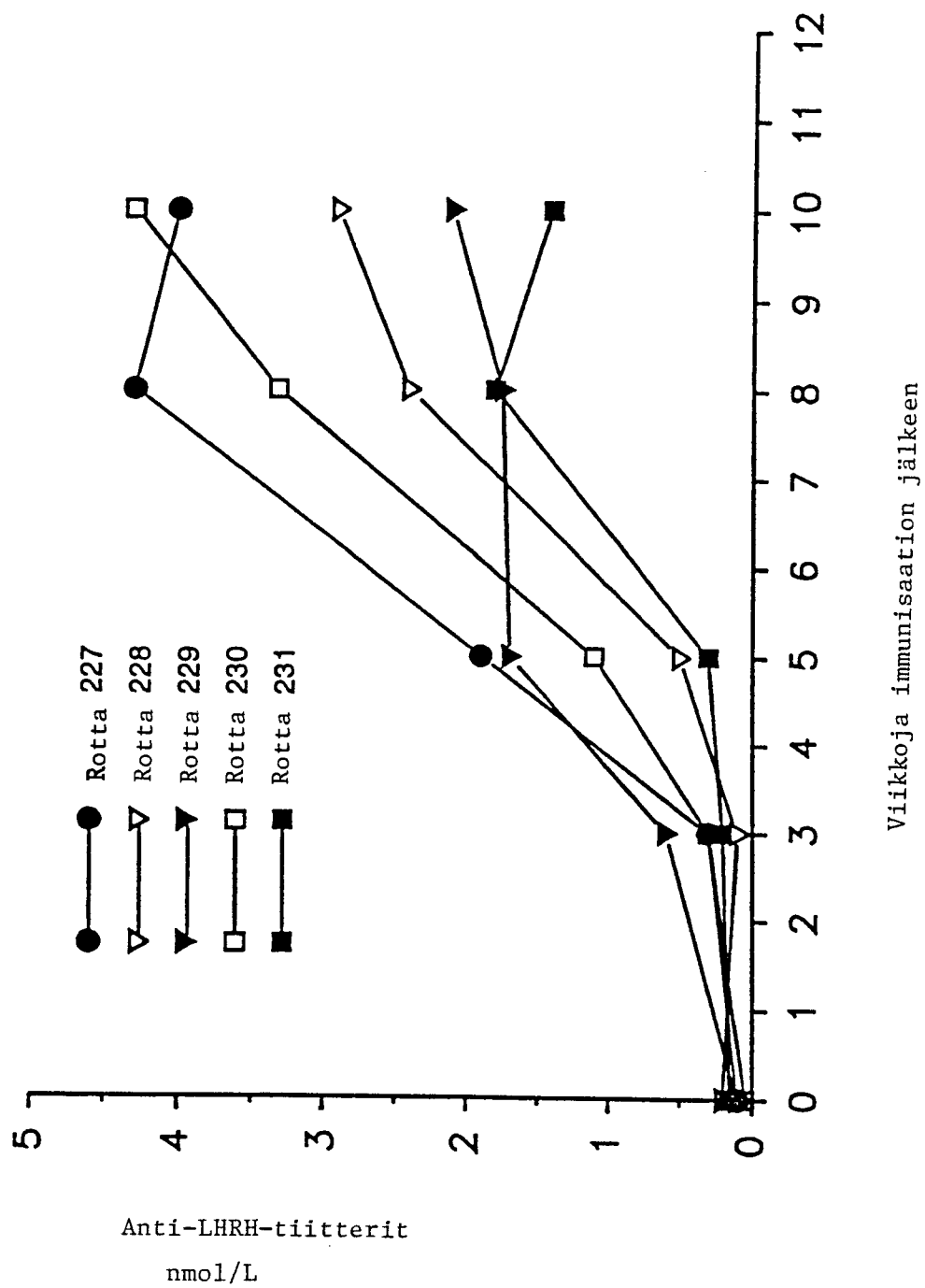


Fig. 27

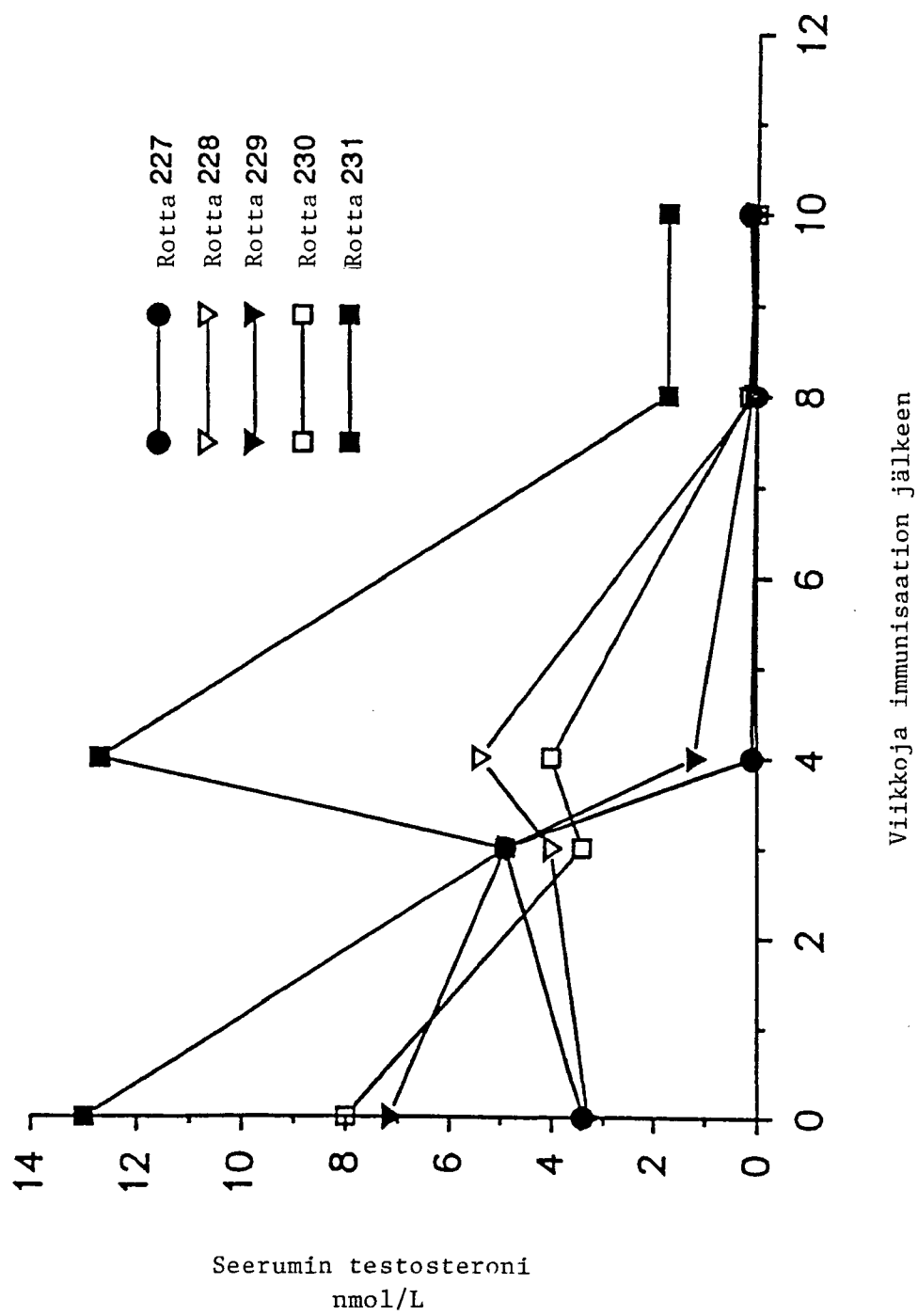


Fig. 28

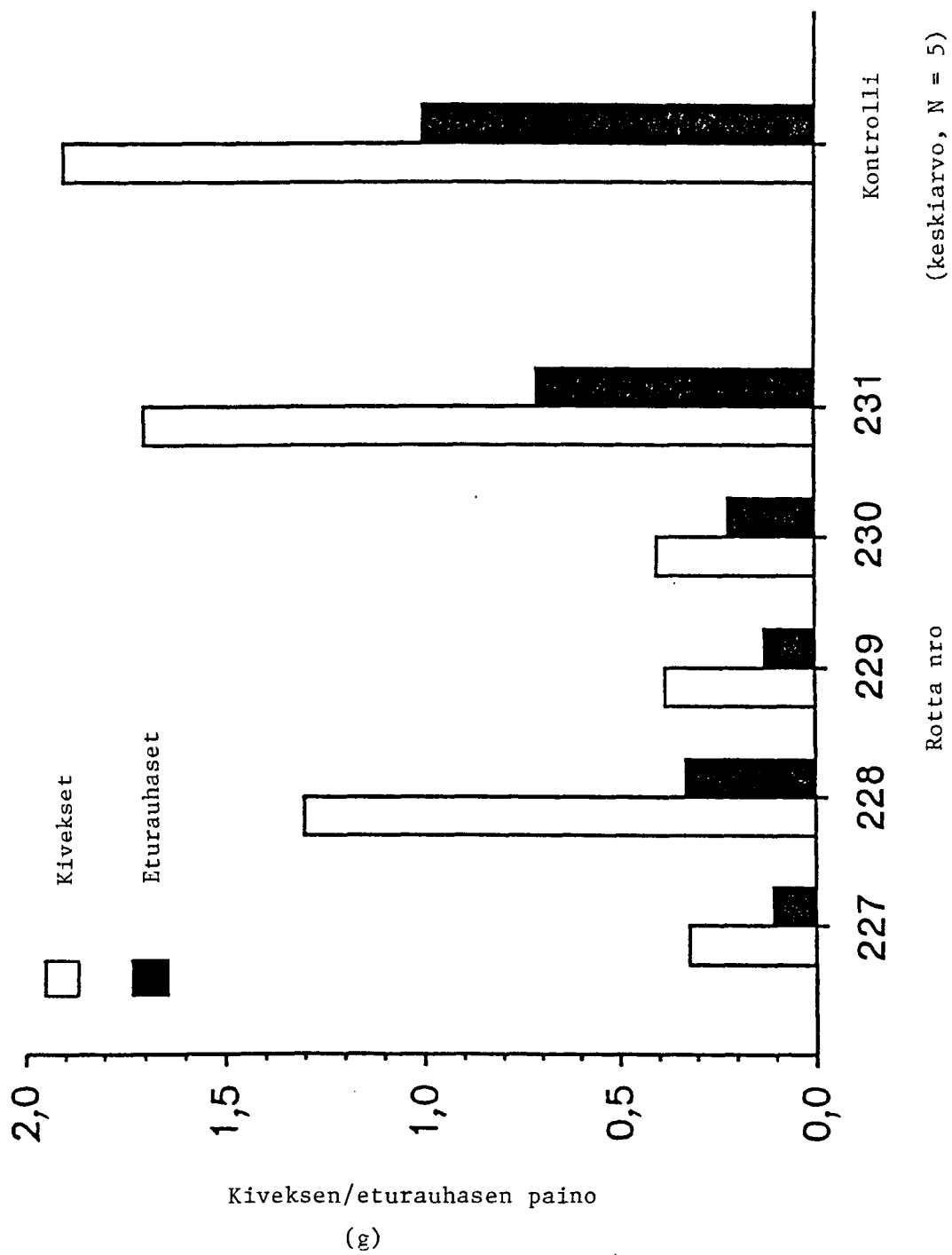


Fig. 29

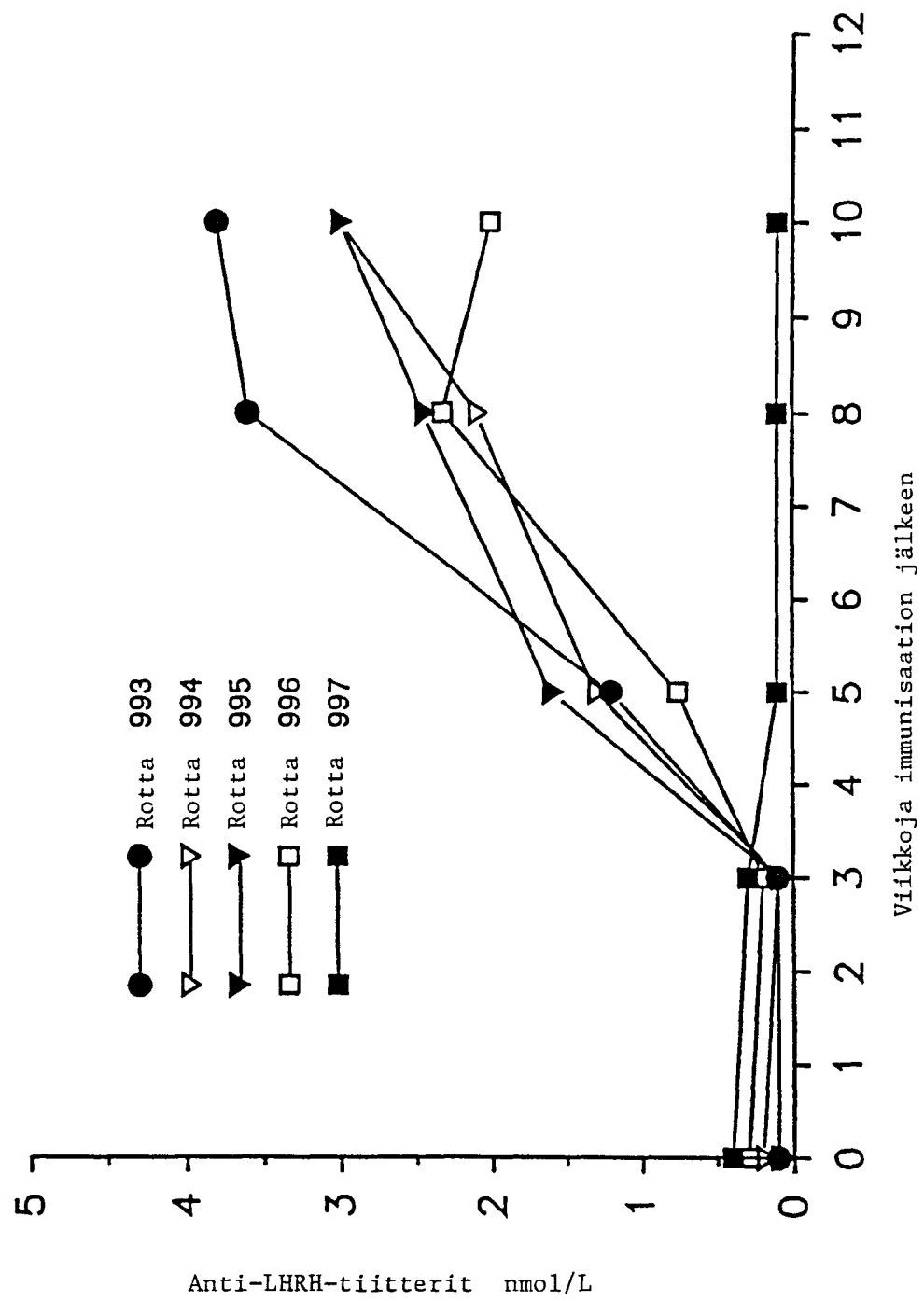


Fig. 30

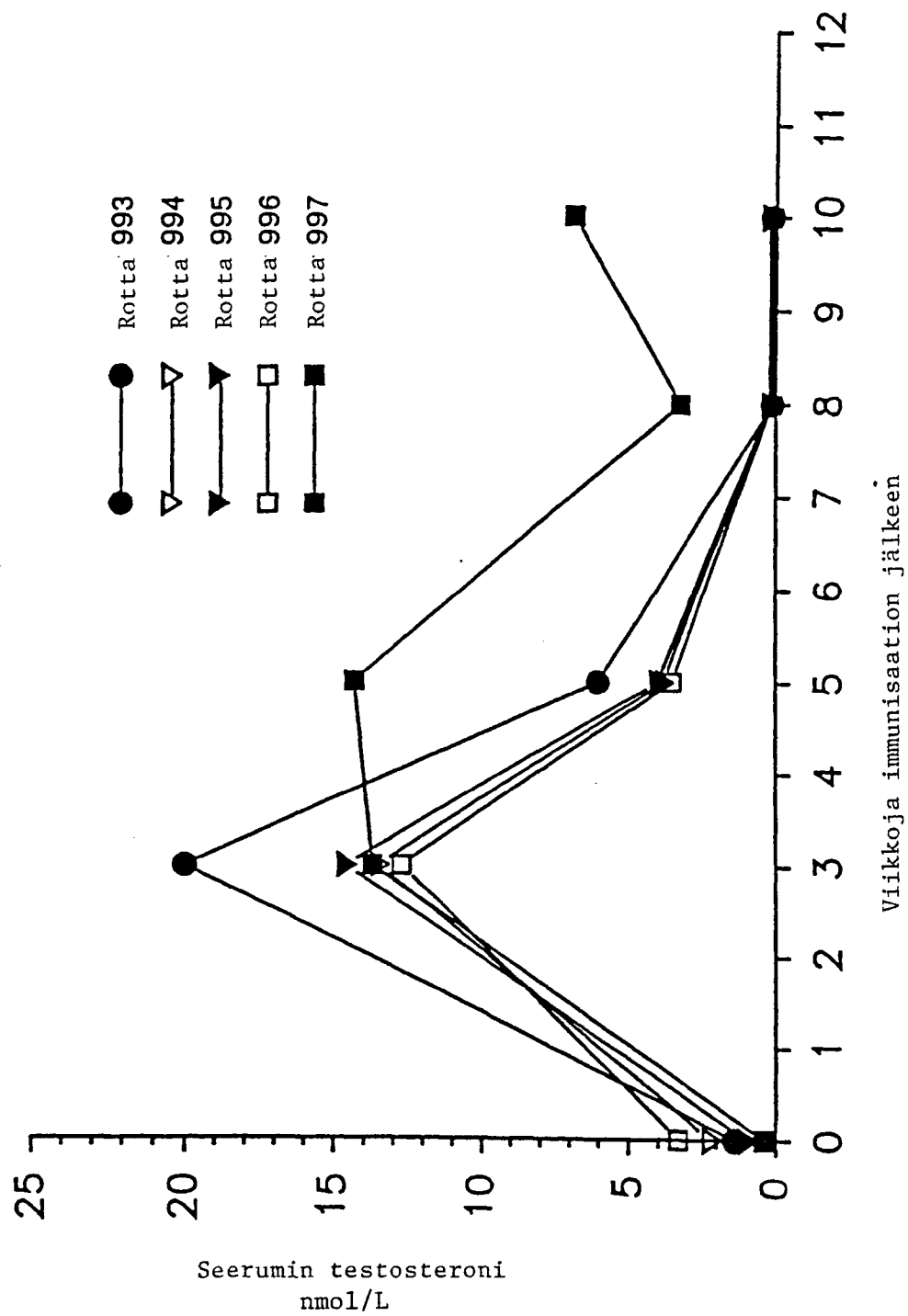


Fig. 31

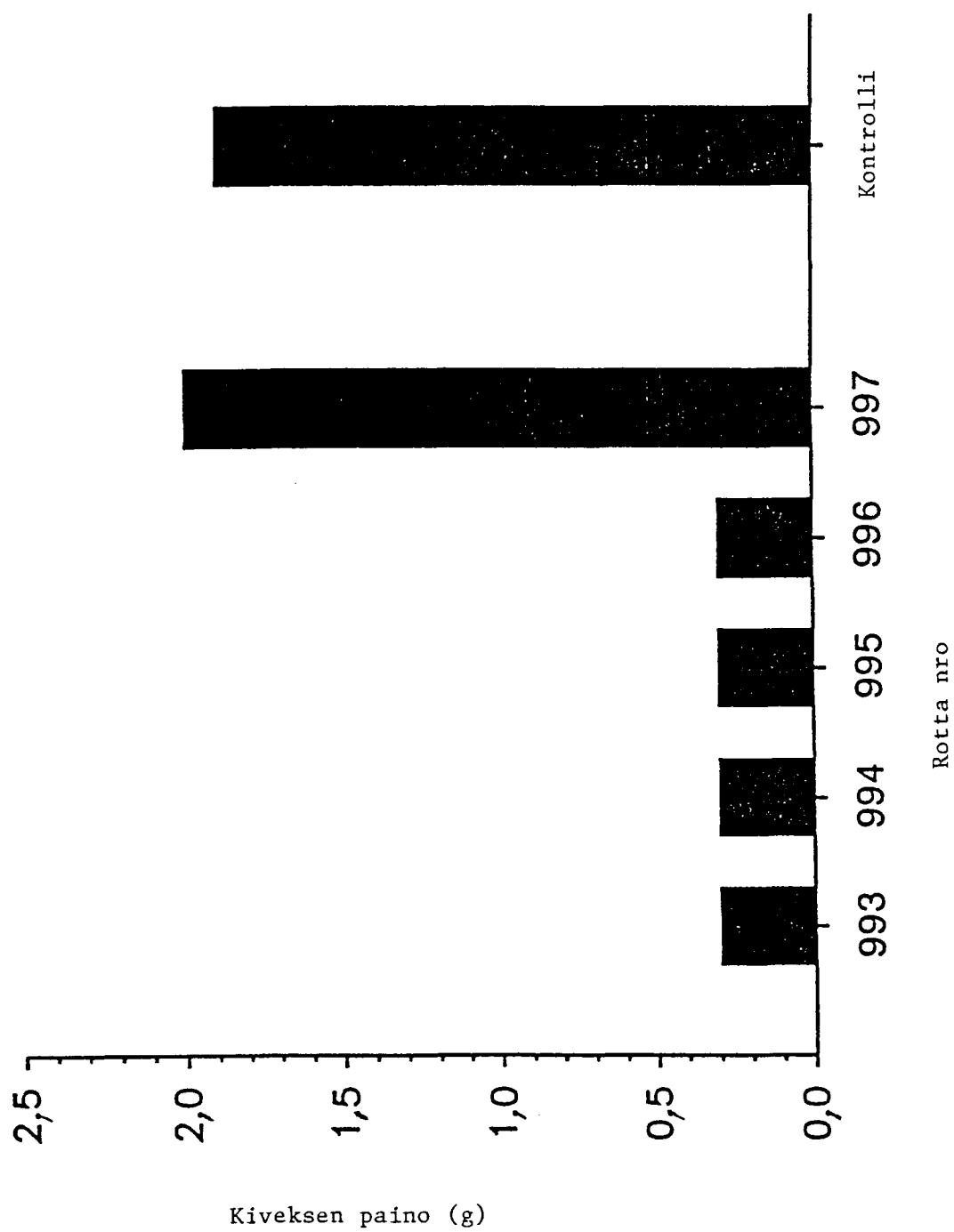


Fig. 32

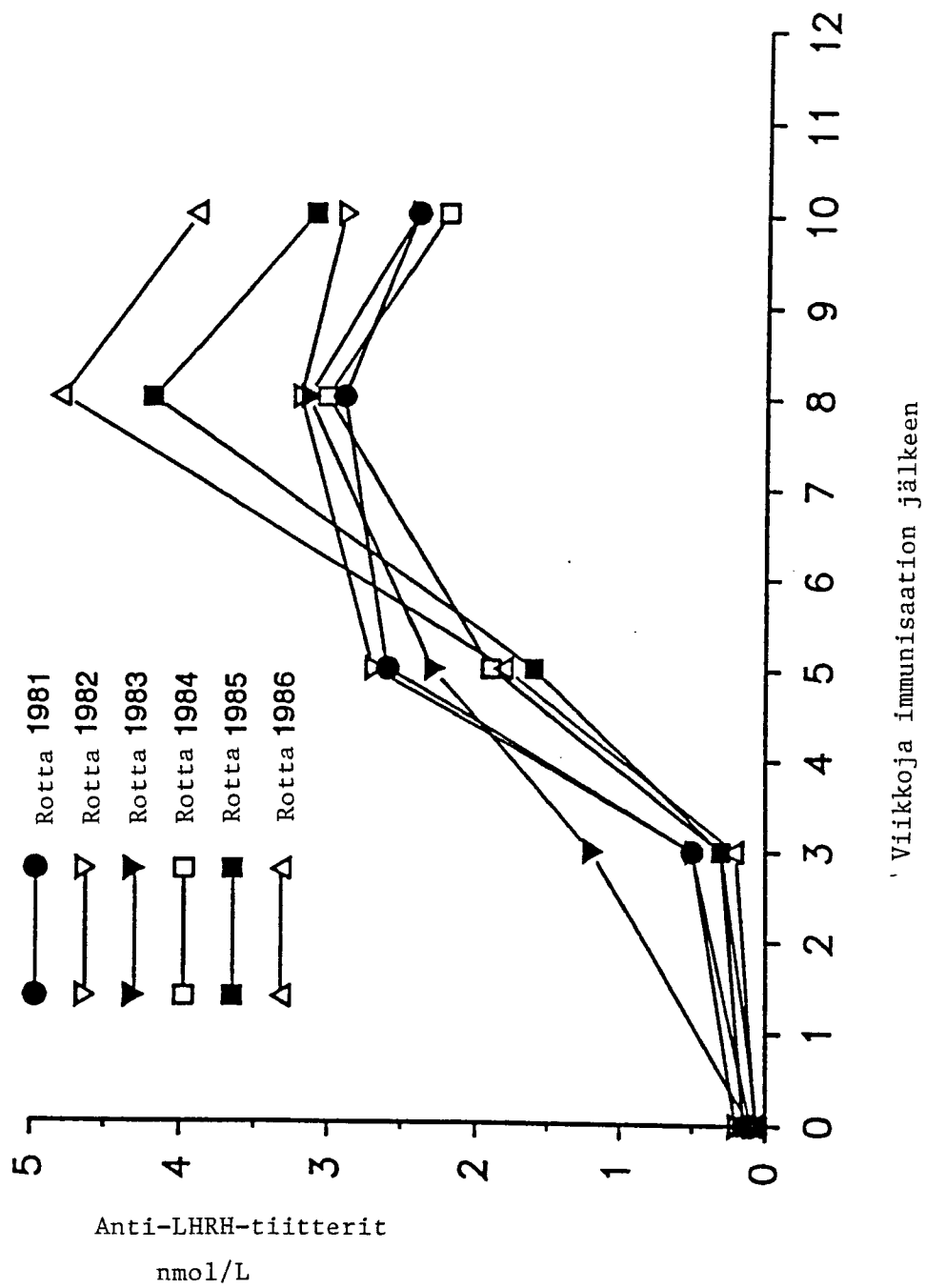


Fig. 33

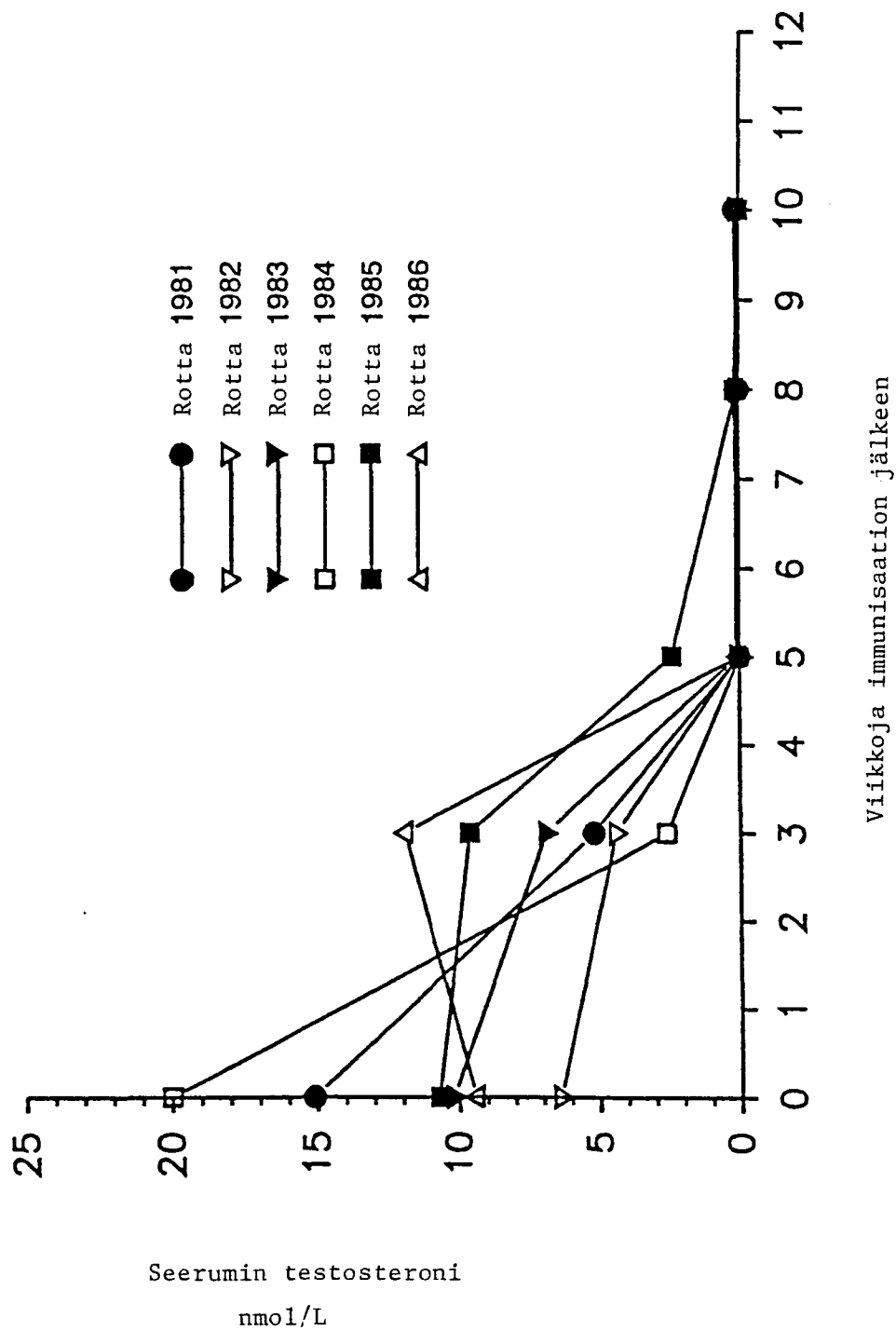


Fig. 34

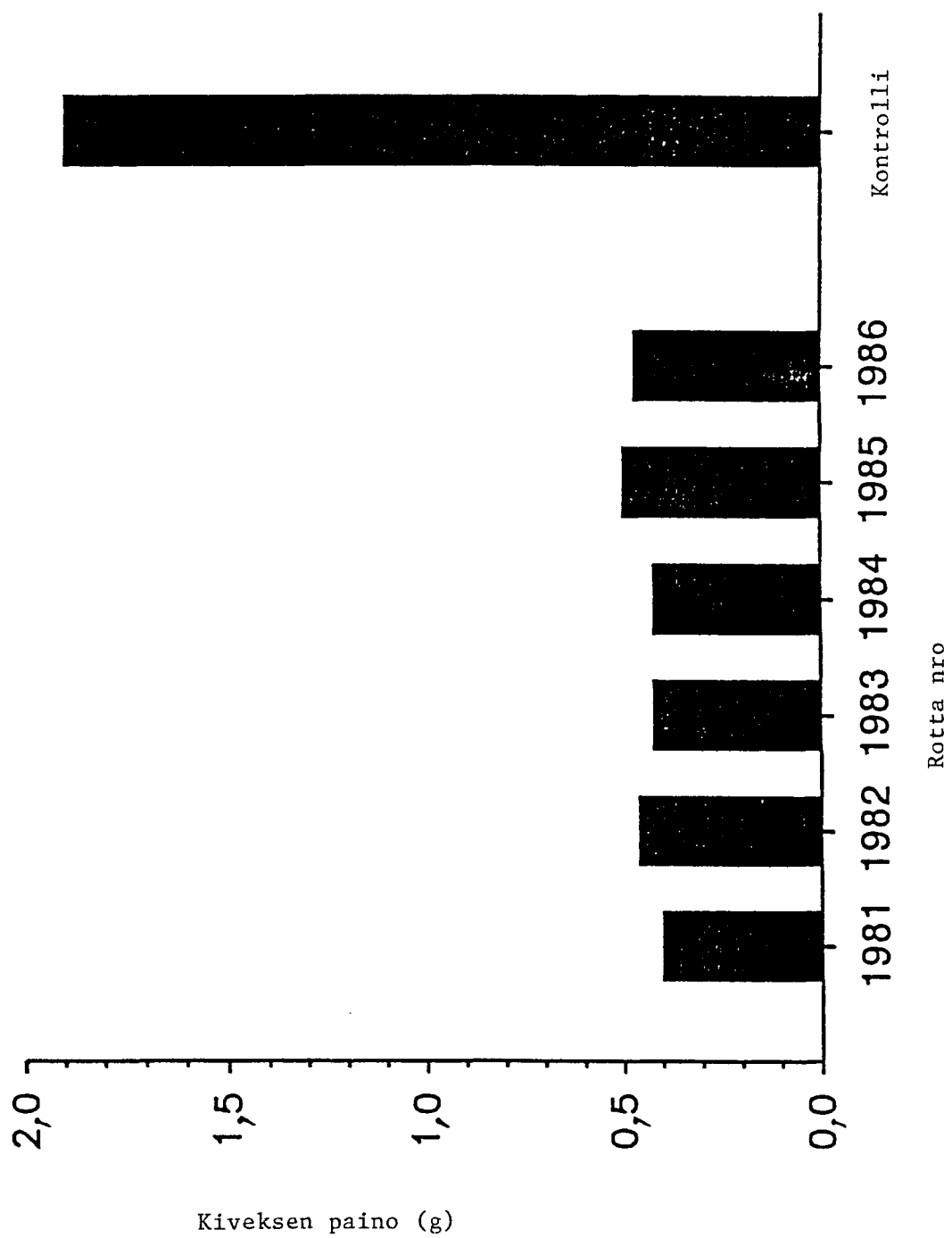


Fig. 35