(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 15/12

(45) 공고일자 2000년02월01일
(11) 등록번호 10-0242278
(24) 등록일자 1999년11월09일

(21) 출원번호 10-1992-0702482
(22) 출원일자 1992년10월08일
번역문제출일자 1992년10월08일
(86) 국제출원번호 PCT/FR 92/000111
(86) 국제출원일자 1992년02월07일
(81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐스타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈브르크 네덜란드 스웨덴 그리스 모나코
국내특허 : 오스트레일리아 캐나다 일본 대한민국 미국

(65) 공개번호 특1993-0700656
(43) 공개일자 1993년03월15일
(87) 국제공개번호 WO 92/13949
(87) 국제공개일자 1992년08월20일

(30) 우선권주장 91/01487 1991년02월08일 프랑스(FR)
91/04527 1991년04월12일 프랑스(FR)

(73) 특허권자 훽스트 마리온 로우셀 장-끌로드 비에이으포스
프랑스 92800 뿌또 테라스 벨리니 1
(72) 발명자 에르상 떼리
프랑스공화국 에프-94130 너장-수르-마르네 뤼 샤를레 VII 15
트리에벨 프레데릭
프랑스공화국 에프-92200 뇔리-수르-센느 뤼 페로네 36
로망-로망 세르지오
프랑스공화국 에프-75014 파리 뤼 다로 42
페라디니 로렝
프랑스공화국 에프-75014 파리 뤼 레오폴-로베르 6
(74) 대리인 주성민

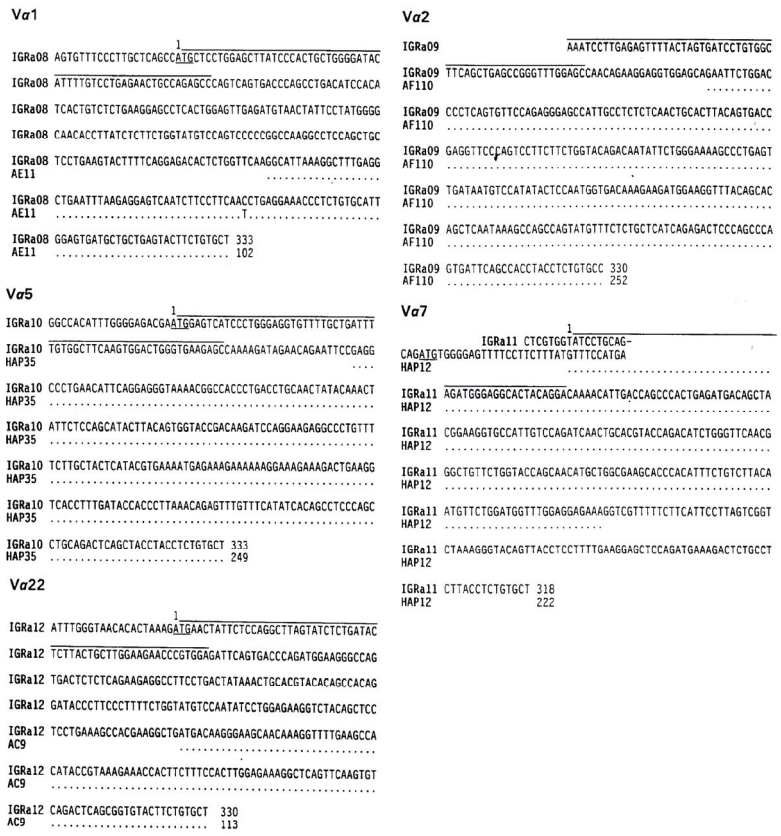
심사관 : 김형준

(54) 인체 임파구 수용체의 알파사슬의 가변성영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 응용

요약

본 발명은 펩티드 세그먼트에 대응하는 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 신규의 뉴클레오티드 서열 및 그의 진단 및 치료 용도에 관한 것이다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

인체 임파구 수용체의 α 사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 그의 응용

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 T-세포 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 신규의 뉴클레오티드 서열, 대응하는 펩티드 세그먼트 및 그의 진단 및 치료 용도에 관한 것이다. 성숙 T 임파구 표면에서 항원을 인지하는 수용체(이하, T-세포 수용체로 포기함)는 면역 글로불린의 구조와 특정한 유사성이 있는 구조를 갖는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 이들은 α 및 β 당단백질 사슬 또는 γ 및 δ 당단백질 사슬을 함유하는 헤테로다이머 구조를 함유한다(뮤이에(Meuer) 등의 참고 문헌(1), 므왱언(Moingeon) 등의 참고 문헌(2), 브렌너(Brenner)등의 참고 문헌(3), 뱅크(Bank) 등의 참고 문헌(4) 참조).

T-세포 수용체의 디렉토리(directory)는 매우 다양한 항원 결정소를 지정할 수 있어야 한다. 이는 T-세포 수용체의 상이한 구조 영역을 코딩하는 유전자의 상이한 불연속 세그먼트의 유전자 재조합에 의해 얻어진다. 따라서, 이 유전자는 V 세그먼트(가변성 세그먼트), 임의로 D 세그먼트(다양성 세그먼트), J 세그먼트(결합 세그먼트) 및 C 세그먼트(정상(定常) 세그먼트)를 함유한다. T-세포가 분화하는 동안, 특정 유전자는 β 및 δ좌(座)에 대해서는 V, D 및 J 세그먼트의 재조합, 및 α 및 γ좌에 대해서는 V 및 J 세그먼트의 재조합에 의해 형성된다. 이 특정 조합 뿐만 아니라 두 사슬의 짝짓기를 조합적 다양성을 형성한다. 이 다양성은 두 개의 보충 메카니즘 즉, V-D-J 또는 V-J 세그먼트의 부정확한 재조합 및 N 영역에 대응하는 뉴클레오티드의 추가에 의해 고도로 증폭된다(데이비스(Davis) 등의 참고 문헌(5)).

특정한 수의 유전자 V 세그먼트는 이미 공지되어 있다. 이 세그먼트는 서열의 유사성의 함수로서 아군으로 분류해왔다. 정의하자면, 뉴클레오티드 서열에서 유사성이 75%를 초과하는 세그먼트는 동일 아군의 원으로 고려해왔다(크루(Crews) 등의 참고 문헌(6)). 공지된 Vα유전자 세그먼트는 22개의 아군으로 분류되어 있고, 이들 중 14개의 아군은 오직 1개의 원을 갖는다(콘캐논(Concannon) 등의 참고 문헌(7), 기무라(Kimura) 등의 참고 문헌(8), 윌슨(Wilson) 등의 참고 문헌(9) 참조).

또한, 약 60개의 Jα세그먼트가 참고 문헌(9)에 기재되어 있다.

게다가, 최근에는, T-세포 수용체의 가변성 부분 특히, β 또는 δ사슬의 특정 세그먼트에 대한 단일 클론 항체가 국제 공개 제90/06758호에 기재되어 있다. 이 단일 클론 항체는 진단 수단으로서 뿐만 아니라 치료 수단으로서 예를 들면 류머티스성 관절염에 대하여 유용하다.

자가 면역 질병 치료시 α 또는 β사슬의 가변성 영역에 대응하는 합성 펩티드의 용도도 또한 기재되어 있다(참고 문헌 (23) 및 (24)참조).

인체 T-세포 수용체의 상이한 가변성 세그먼트의 발현시에 한 개인에서 다른 것으로의 변이가 존재한다는 것도 공지되어 있다(참고 문헌 (27) 및 (28) 참조).

본 발명은 신규 아군에 속하거나 또는 적어도 1개의 원이 이미 공지되어 있는 아군에 속하는 신규 Vα유전자 세그먼트, 또는 신규 Jα유전자 세그먼트를 제공함으로써 T-세포 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 유전자 세그먼트의 디렉토리를 풍요롭게 하는 것을 목적으로 한다.

따라서, 본 발명의 주제는

a - 서열 동정 번호 1 내지 11의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트, 및

b - 서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20의 서열 중의 하나에 대응하는 Jα세그먼트

중의 어느 하나 및 그 중 1개 이상의 뉴클레오티드가 상이한 서열에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이다.

더 구체적으로, 본 발명의 주제는

- 서열 동정 번호 1 내지 10의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트 중의 어느 하나 및 그 중 1개 이상의 뉴클레오티드가 상이한 서열에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 서열.

- 서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20의 서열 중의 하나에 대응하는 Jα세그먼트 중의 어느 하나 및 그 중 1개 이상의 뉴클레오티드가 상이한 서열에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 서열이다.

“그중 1개 이상의 뉴클레오티드가 상이한 서열”이라는 표현은 8개 이하의 뉴클레오티드에 의해 상이하지만, 흔히는 1 또는 2개의 뉴클레오티드가 상이하거나, 또는 1 또는 2개의 코돈의 결실 또는 부가에 의해 상이할 수 있는 대립 유전자를 포함한다.

또한, 본 발명의 더 구체적인 주제는

- 서열 동정 번호 2 내지 5의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트 중의 어느 하나 및 그 중 1 또는 2개의 뉴클레오티드가 상이한 서열에서 선택되는 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 대응하는 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열,

- 서열 동정 번호 1의 1 내지 200, 서열 동정 번호 6의 1 내지 467, 서열 동정 번호 7의 1 내지 77, 서열 동정 번호 8의 1 내지 151, 서열 동정 번호 9의 291 내지 386, 서열 동정 번호 10의 1 내지 260의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트 중의 어느 하나 및 그 중 1 또는 개의 뉴클레오티드가 상이한 서열에서 선택되는 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 대응하는 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열,

- 뉴클레오티드 108을 함유한 서열 동정 번호 11의 서열에 대응하는 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 대응하는 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열,

- 서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20의 서열 중의 하나에 대응하는 Jα세그먼트 중의 어느 하나 및 그 중 1 또는 2개의 뉴클레오티드가 상이한 서열에서 선택되는 뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 대응하는 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이다.

“뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부에 대응하는 cDNA에 대응하는 뉴클레오티드 서열 ”이라는 표현은 상기 완전한 서열 뿐만 아니라 탐침(일반적으로 적어도 10개의 뉴클레오티드를 함유함)으로서 또는 프라이머(일반적으로 적어도 15개의 뉴클레오티드를 함유함)로서 사용될 수 있는 짧은 단편(올리고뉴클레오티드)을 포함하는 상기 완전한 서열의 단편도 포함한다. 일반적으로, 본 발명은 본 발명에 따른 Vα 및 Jα서열의 단편인 신규 올리고뉴클레오티드 군을 포함한다.

1 또는 2개의 뉴클레오티드가 상이한 서열에 관해서, 이들은 수개의 cDNA의 뉴클레오티드 서열의 결정시에 실험적으로 관찰되는 변이에 대응한다.

또한, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열 뿐만 아니라 동일한 기능을 갖는 대립 유전자 및 그의 유도체에 의해 코딩되는 펩티드이다.

또한, 본 발명의 주제는 서열 동정 번호 11의 108 내지 364 서열의 전부 또는 일부에 의해 코딩되는 펩티드 서열로 구성되거나 이루어지는 펩티드이다.

일반적으로, 본 발명은 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 펩티드 서열로 구성되거나 또는 이루어지는 펩티드 뿐만 아니라 이들 펩티드의 단편을 포함한다. 또한, 1개 이상의 아미노산이 상이하지만 동일 기능을 갖는 펩티드도 포함한다. 이 펩티드는 변이단백질(mutein)을 사용하는 공지의 변형에 대응하거나 또는 대립 유전자 변이에 대응할 수 있다. 사실상, 인체 T 임파구 수용체의 사슬의 가변성 영역을 코딩하는 특정 유전자 세그먼트는 대립 유전자 변이라고 불리우는 유전적 다형성 현상에 종속하는 것으로 나타나 있다(참고 문헌(25) 참조). 본 발명은 이 현상으로부터 얻어진 펩티드를 포함한다.

본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열은 다음 단계에 의해 얻어진다.

- 한 개인의 말초 임파구의 RNA를 단리하는 단계;

- 역전사효소 및 Cα영역 특이성 프라이머 A(서열 동정 번호 21)를 사용하여 상보성 DNA를 얻는 단계;

- DNA 폴리머라제, 폴리 C 프라이머(서열 동정 번호 22) 및 Cα영역 특이성 프라이머 B(서열 동정 번호 23)를 사용하여 유전자 증폭(앵커화(Anchored) 복제 연쇄 반응 또는 A-PCR에 의함)시키는 단계;

- DNA 폴리머라제 및 Cα영역 특이성 프라이머 C(서열 동정 번호 24)를 사용하여 A-PCR에 의해 새로이 증폭시키는 단계;

- 플라스미드 벡터 중에 삽입시키는 단계;

- 재조합 벡터를 이용하여 박테리아 숙주를 형질전환시키는 단계;

- Cα특이성의 표지된 올리고뉴클레오티드 D(서열 동정 번호 25)를 이용하여 재조합 박테리아 콜로니를 선별하는 단계;

- 양성 콜로니로부터 플라스미드를 추출시키는 단계; 및

- Cα영역을 함유한 DNA 단편을 서열화하는 단계.

본 발명은 본 발명의 서열 동정 번호 1 내지 13 및 15 내지 20의 서열에 대응하는 가변성 또는 결합 α 세그먼트를 포함하는 mRNA를 발현하는 말초 임파구로부터 출발함으로써 이 특이성 유전자 증폭(복제 연쇄 반응 또는 PCR)시키거나 또는 그렇지 않으면, 무작위로 취한 한 개인의 체세포의 게놈 DNA에 이 PCR 기술을 적용함으로써 재생될 수 있다. 또한, 본 발명은 올리고뉴클레오티드의 화학적 합성에 의해 상기 유전자 서열을 제조합함으로써 재생될 수 있다.

본 발명에 따른 펩티드는 표준 펩티드 합성에 의해 얻을 수 있다. 또한, 이들은 본 발명에 따른 펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 플라스미드와 같은 발현 벡터에 삽입하는 것 및 이 발현 벡터를 이용하여 세포를 형질전환시키는 것을 포함하는 공지의 유전자 공학 기술을 적용하여 얻을 수도 있다.

따라서, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 함유하는 플라스미드 및 발현 벡터 뿐만 아니라 이 벡터로 형질전환된 숙주이다.

또한, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 펩티드에 속하거나 또는 그로 이루어진 항원 결정소에 대한 항체 및 특히, 단일 클론 항체이다.

단일 클론 항체는 세포주 배양물로부터의 항체 분자 생산을 허용하는 임의의 기술에 의해 얻을 수 있다. 이 기술은 하이브리도마를 사용하는 다른 기술을 포함한다.

항체는 본 발명에 따른 천연, 재조합 또는 합성의 펩티드 또는 단편을 임의로 파상풍 아나톡신과 같은 면역원을 커플링시킨 후, 동물에 주사하거나, 또는 대응하는 코딩 서열로 형질감염시킨 재조합 세포를 포함하여 표면에서 대응하는 서열을 발현하는 인체 T 임파구를 주사함으로써 동물을 면역화시켜 생산할 수 있다.

또한, 본 발명의 주제는 본 발명에 따른 폴리펩티드에 대한 단일 클론 항체를 생산하는 하이브리도마이다.

또한, 본 발명은 T-세포 수용체의 한정된 가변성 영역과 반응성인 본 발명에 따른 단일 클론 항체의 단편 및 유도체를 포함한다. 특히, 이들 단편은 펩신을 사용한 항체 분자의 효소적 절단에 의해 얻을 수 있는 $F(ab')_2$ 단편, $F(ab')_2$ 단편의 디술파이드 결합의 환원에 의해 얻을 수 있는 Fab′ 단편 및 환원제 존재하에 파파인을 사용한 항체 분자의 효소적 절단에 의해 얻을 수 있는 Fab 단편이다. 이들 단편은 유전자 공학에 의해 얻을 수도 있다.

예를 들면, 단일 클론 항체 유도체는 방사성 동위 원소와 같은 표식자를 결합시킨 항체 또는 이들 항체의 단편이다. 또한, 단일 클론 항체 유도체는 치료 활성 분자, 특히 세포 독성 화합물이 결합된 항체 또는 이들 항체의 단편이다.

본 발명의 생성물은 진단 분야 및 치료 분야에서 몇가지 용도를 갖는다.

1. 진단 분야에서의 용도

본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열에 함유된 올리고뉴클레오티드는 α사슬의 가변성 영역과 하이브리드화될 수 있는 검출 탐침(일반적으로 적어도 10개의 뉴클레오티드 함유함) 또는 증폭시킬 서열에 결합될 수 있는 DNA 증폭용 프라이머(일반적으로 적어도 15개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 적어도 17개의 뉴클레오티드를 함유함)를 구성하는데 사용할 수 있다.

따라서, 이 올리고뉴클레오티드는 한 환자로부터 얻은 샘플의 mRNA 중의 T-세포 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 유전자와 상동인 헥산 서열의 존재를 검출함으로써 면역 장애 진단에 사용할 수 있다. T-세포 유전자의 발현과 질병 사이의 관련성을 확립하기 위해 다른 방법들을 사용할 수 있다. 이들 방법은

a - 우성 유전자의 빈도를 결정하기 위한, 질병과 관련한 T-세포로부터 얻은 cDNA 발현 라이브러리의 생성 및 분석;

b - T-세포 수용체를 코딩하는 유전자의 유전적 다형성 또는 전위의 존재여부를 결정하기 위한 게놈 DNA 샘플의 블로트(Southern blot) 분석;

c - cDNA 획득, PCR에 의한 증폭 및 표지된 탐침과의 하이브리드화에 의한 샘플 분석;

d - T-세포를 미리 배양하지 않는 상태에서의 T-세포의 자체 하이브리드화를 포함한다.

상기 c에 정의된 바와 같은 방법으로 PCR 반응에 프라이머를 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 단일 클론 항체(특히 항 Vα항체), 이들 항체의 단편 또는 유도체는 예를 들면, 암종학의 자가 면역 질환, 알레르기, 이식 및 전염성 질환 분야에서 T-형 면역 반응을 연구하는데 사용될 수 있다. 특히, T 수용체의 상이한 가변형 α세그먼트의 디렉토리는 그것이 혈액 또는 조직 T-세포이든 간에 연구될 수 있다. 일반적으로, 사용되는 기술은 시험관내 또는 생체내 방법일 수 있다.

시험관내 방법의 경우, 사용되는 샘플은 체액 샘플 또는 조직 샘플일 수 있다. 사용되는 기술은 특히 혈액 T 임파구를 분석하기 위한 유동 세포 형광 정량법 또는 조직을 여과한 임파구를 연구하기 위한 이뮤노퍼옥시다제(immunoperoxidase)를 사용한 해부병리학적 절편 상의 표지법을 포함할 수 있다.

생체내 방법의 경우, 항체, 그의 단편 또는 유도체를 통상의 경로로, 예를 들면, 정맥내로 투여하고, 면역특이성 결합을 검출한다. 이것은 예를 들면 방사성 동위원소로 표지된 항체를 사용하는 경우에 얻을 수 있다.

2. 치료 분야에서의 용도

본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열 중에 함유된 올리고뉴클레오티드를 치료학에서 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오티드로서 사용할 수 있다. 사실상, 시험관내에서는 문제의 유전자에 특이성인 안티센스 올리고뉴클레오티드와 함께 인체 임파구를 인큐베이션시킴으로써 이들 임파구에서의 전사 유전자의 발현을 억제시킬 수 있다는 점이 공지되어 있다(참고 문헌(26)). 이 안티센스 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 적어도 10개, 바람직하게는 적어도 16개의 뉴클레오티드를 함유한다. 특히, 이들 안티센스 올리고뉴클레오티드는 번역 개시 부위(ATG)로부터 출발하여 상류 20개의 뉴클레오티드에 대응하는 역위 및 상보성 서열이다. Vα또는 Jα유전자 세그먼트에 대해 특이성인 안티센스 올리고뉴클레오티드를 시험관내에서 사용하는 것의 의미는 이 Vα또는 Jα세그먼트를 함유하는 T 수용체의 발현을 폐지(또는 강력하게 감소)시킴으로써, T 임파구의 특이적 반응성의 수준에서 클론 삭제 현상을 얻는 것이다. 이 안티센스 올리고뉴클레오티드는 시험관내에서 인체 T 임파구 상에 사용한 후 재주사할 수 있을 뿐만 아니라, 생체내에서는 바람직하게는 생체내 안정성을 증가시키기 위한 변형 및 이들 올리고뉴클레오티드의 T 임파구 내로의 침투 후에 국부 또는 전신 주사에 의해 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 단일 클론 항체, 특히 항 Vα항체는 면역계를 조정하는데 사용할 수 있다. 이 방법에서는 조절인자(effector) T-세포가 그의 특이성 항원과 상호작용하는 것을 차단하기 위해 항체를 투여할 수 있다. 또한, T-세포 수용체의 α사슬 상의 특이적 고정 때문에, 클론 삭제를 얻기 위해 예를 들면 세포 독성 분자 또는 방사성 동위원소에 결합된 항 T 수용체 항체를 투여할 수도 있다. 치료학에서는 T-세포의 특정 서브어셈블리를 특이적 방식으로 활성화시키기 위해 본 발명에 따른 단일 클론 항체를 낮은 분열 촉진 농도로 사용할 수 있거나 또는 이들을 관련 수용체에 고정시킨 후 세망내피계(細網內皮系)에 의한 제거를 목적으로 이들 서브어셈블리를 표지시키기 위해 본 발명에 따른 단일 클론 항체를 훨씬 높은 농도로 사용할 수 있다. 질병 치료시 중요한 척도는 질병과 관련된 T-세포의 서브어셈블리를 조정하는 능력이다. 이러한 치료적 조정법의 정확한 본질 즉, T-세포의 특징 서브어셈블리를 차단 또는 억제하는 것 또는 이와 반대로 특정 서브어셈블리를 자극 및 활성화시키는 것은 문제의 질병 및 관련 T-세포의 특정 서브어셈블리에 따라 좌우될 것이다.

이러한 형태의 치료는 신장 이식을 해서 거부 문제를 갖는 환자에게 있어서 항 CD3 항체를 사용한 치료와 같은 항체를 사용한 현행 치료에 비해 잇점을 갖고 있으며, 이는 본 발명으로 인해 T-세포 개체를 전체적으로 조정하는 것이 아니라 T-세포 수용체에 대해 특이성인 α아군을 발현하는 T-세포의 서브어셈블리만을 조정할 것이기 때문이다.

게다가, T-세포의 반응은 종종 올리고클론이므로 일반적으로 치료학에서는 수개의 항체의 “칵테일(cocktails)”을 사용하는 것이 편리하다.

이밖에, 항 Vα항체는 예를 들면 항체 운반 구(球)를 함유하는 컬럼을 통하여 통과시킴으로써 T 임파구를 시험관내에서 선택하는데 사용할 수 있다. 이와 같은 특정 T 임파구의 분리는 환자에게 재주사하기 전에 이들 임파구를 배양하기 위해 사용할 수 있다.

게다가, 본 발명에 따른 펩티드 서열의 전부 또는 일부 즉, 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 펩티드 서열 또는 이들 서열의 단편(일반적으로 적어도 8 내지 10의 아미노산을 함유함)을 치료학에서 사용할 수 있다. 사람 또는 동물에게 투여된 이들 서열 또는 단편은 미끼로서 작용할 수 있는데, 즉 이들은 유해성 항원에 의해 운반되는 에피토프 상에 자신을 고정시키고, 정상 T-세포와 항원의 반응을 중단시키고, 이러한 방법으로 자기 결정소에 대해 공격적인 질병의 진전을 방지한다. 또한, 이들은 백신 제조시 면역원으로서(임의로, 단백질 담체와 복합시킨 후) 사용할 수 있다.

본 발명은 첨부한 도면을 참조하여 이하에 보다 상세히 설명될 것이다.

[도면의 간단한 설명]

제1(a)도 내지 제1(e)도는 IGRa 08 내지 IGRa 12로 표시한, 서열 동정 번호 6 내지 10의 각 서열에 대한 공지의 Va 서열 및 본 발명에 따른 신장 부분 서열을 일렬로 나타낸다. 이들 도면에서, 뉴클레오티드 번호 설정은 ATG 개시 코돈(밑줄친 부분)에서 출발한다. 점은 동일한 뉴클레오티드를 표시한다. 리더 서열로 추정되는 서열은 그 위에 줄이 그어진 부분이다.

제2도는 IGRJa 01, 02 및 04 내지 09로 표시한 신규 Jα서열(서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20)을 일렬로 나타낸다. 이들 서열에 있어서, 생식 주의 재조합 시그널은 밑줄그어져 있다. 고도로 보존되는 코돈에 대응하는 아미노산은 서열의 상부에 표시되어 있다. 보조된 아미노산의 한 위치에서 치환된 코돈의 2회 밑줄 그어져 있다.

제3도는 서열 동정 번호 1 내지 5의 서열에 특이성인 탐침을 사용한 제한 효소 처리된 게놈 DNA의 서던

블로트 분석을 나타낸다. 사용된 제한 효소는 EcoRI(R난), Hind III(H난) 및 Bam I(B난)이다. 이 도면에서 삼각형은 Cα와 특이적 방식으로 하이브리드화된 DNA 단편의 위치를 표시한다.

제4도는 건강한 개인의 말초 임파구에 의해 발현되는 TCRα사슬의 증폭된 전사체 및 함께 증폭된 β-액틴 대조군의 오토라디오그래피에 의한 검출을 나타낸다.

[I-cDNA 획득 및 PCR에 의한 증폭]

한 개인의 말초 임파구를 DNA 원으로서 사용한다. 전체 RNA는 구아니디늄 이소티오시아네이트 및 염화세슘을 사용하는 방법(셔그윈(Chirgwin)의 참조 문헌(10)) 또는 구아니디늄 이소티오시아네이트, 페놀 및 클로로포름을 사용하여 추출에 의한 일단계 방법(촘크진스키(Chomczynski)의 참고 문헌(11))에 의해 제조하였다.

제1cDNA 가닥은 5㎍의 전체 RNA, 역전사효소, 및 서열 5′ -GTTGCTCCAGGC CACAGCACTG(서열 동정 번호 21)에 의해 구성되는 Cα영역에 대해 특이성인 프라이머 A를 사용하여 1시간 동안 42℃의 온도에서 50㎕의 최종 부피로 합성하였다. 이어서, 이 물질을 페놀/클로로포름을 사용하여 추출 및 아세트산암모늄을 사용한 침전에 의해 정제하였다. 아가로스 겔 상에서 0.45/1kb 분획을 선택한 후, 14단위의 말단 데옥시뉴클레오티딜 전이 효소(TdT)를 함유한 $CoCl_2$ 첨가 완충액 중의 RNA/cDNA 헤테로복합체 상에 dG 말단을 37℃에서 30분 동안 첨가하였다. 이 반응은 70℃에서 10분 동안 유지시켜서 중단시켰다. 1N NaOH(1/3 부피)를 첨가하고 샘플을 50℃에서 1시간 동안 인큐베이션시켜서 RNA를 가수분해시키고, 이어서 2M 트리스 HCl(pH 8) 및 1N HCl로 중화시켰다. 페놀/클로로포름 혼합물로 추출한 후, 말단 G의 제1cDNA 가닥을 에탄올로 침전시키고, 50mM의 KCl, 10mM의 트리스-Cl(pH 8.3), 1.5mM의 $MgCl_2$ 0.1%(중량/부피)의 젤라틴, 200㎛M의 dNTP, 2.5 단위의 Taq 폴리머라제 및 100pM의 2개의 프라이머를 함유하는 100㎕의 최종 부피에서 PCR 기술(사이끼(Saiki) 등의 복제 연쇄 반응(12))을 이용하여 증폭시켰다. 사용되는 2개의 프라이머는 로(Loh)등의 참고 문헌(13)에 기개된 폴리-C 프라이머(5′ -GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG-14G)(서열 동정 번호 22) 뿐만 아니라 Cα영역에 특이성인 프라이머 B(5′ -GTCCATAGACCTCATGTCCAGCACAG)(서열 동정 번호 23)이다.

25회의 증폭 사이클을 수행한 후, 72℃에서 최종적으로 15분간의 신장 기간을 유지하였다. 각 사이클을 92℃에서 1분간의 변성 단계, 55℃에서 2분간의 하이브리드화 단계 및 72℃에서 4분간의 신장 기간을 포함한다. 이어서, 증폭시킨 생성물을 에탄올로 침전시키고, 30mM 아세트산나트륨(pH 5), 50mM NaCl, 1mM $ZnCl_2$, 5부피% 글리세롤 중에서 재현탁시키고, 이 물질의 1/10을 1% 저융점 아가로스 겔 상에서 크기 함수로서 정재하였다.

이어서, 제2증폭 단계는 프라이머 5′ -ATACACATCAGAATTCTTACTTTG(서열 동정 번호 24)을 Cα영역에 대한 특이성인 프라이머 C로서 사용하는 것을 제외하고는 상술한 바와 동이한 조건에 따라 아가로스를 함유하는 밴드의 약 10%상에서 직접적으로 수행하였다. 이어서, 반응 혼합물을 에탄올로 침전시키고 H_2O 60㎕ 중에서 재현탁시켰다.

[II-cDNA의 클로닝 및 서열화]

제2증폭 생성물의 1.3을 Sac II로 분해시키고, 1% 아가로스 겔 상에서 분리하고, 유리 비드 상에 흡수시켜 정제하였다. 이 물질을 블루스크립트 SK^+(벡터(스트라타진(Stratagene), 미합중국 라 졸라 제품)에 삽입시키고, 이와 같이 하여 얻은 재조합체를 사용하여 이.콜라이(E.Coli)의 XL1-블루 균주(스트라타진)를 형질전환시켰다. X-gal 및 IPTG 존재하에서 침강하시킨 후, “도트 블로트(dot blot)” 기술을 이용하여 백색 콜로니 상에서 시험을 수행하고, ^{32}P로 표지된 Cα영역에 대해 특이성인 제3올리고뉴클레오티드(5′ -GTCACTGGATTTAGAGTCT)(서열 동정 번호 25))를 탐침으로서 이용하였다. 양성 콜로니의 플라스미드 DNA를 추출하고, 공급자의 추천에 따라 서열화효소 2.0(미합중국 클리블랜드 소재, 유나이티드 스테이츠 바이오케미칼스(United States Biochmicals)제품)으로 디데옥시 사슬의 종결법(생거(Sanger) 등의 참고 문헌(14))에 의해 2가닥 하에서 서열화하였다. 서열 동정 번호 5의 서열을 제외한 모든 뉴클레오티드 서열은 cDNA의 적어도 2개의 별개의 클론을 사용하여 2가닥상에서 결정하였다.

이와 같이 하여 얻은 서열을 립맨(Lipman) 및 피어슨(Pearson)에 의해 개발된 방법(참고 문헌(15))을 이용하여 공개된 Vα 및 Jα서열과 비교하였다. 추정된 출발 코돈은 진핵 세포에서 번역 개시 부위에 대한 코작(Kozak) 공통 서열의 존재를 조사함으로써 동정하였다(코작의 참고 문헌(16)), N-말단 측의 소수성 리더 서열의 존재는 키트(Kyte)에 의해 기재된 방법(참고 문헌(19))에 의한 소수성 분석에 의해 검출하였다.

[III-서던 블로트 분석]

사람의 적백혈병 세포주 K562로부터 DNA로 추출하고, EcoR I, BamH I 또는 Hind III의 제한 효소 중 하나로 소화시켰다. 이 DNA 15㎍을 0.7% 아가로스 상에서 전기영동시키고, 트리에벨(Tribel)등의 참고 문헌(18)에 기재된 바와 같은 나일론 막 상으로 옮겼다. 65℃에서 6 x SSC, 0.5%의 SDS, 5x덴하르트 및 100㎍의 변성된 연어 정자 DNA를 이용하여 16시간 동안 하이브리드화를 수행하였다. 이 막을 65℃에서 2 x SSC, 0.2%의 SDS로 세척하였다.

Vα특이성 탐침으로서는, 폴리-C 프라이머 및 C 프라이머를 프라이머로서 사용하여 서열 동정 번호 1 내지 5의 서열에 대응하는 Vα단편을 함유한 V-J-C cDNA(〉 500 bp)를 증폭시켜 얻은 탐침을 사용한다. 이 탐침을 1% 아가로스 겔 상에서 정제하였다. ^{32}P로 표지된 DNA 탐침은 페인버그(Feinberg) 방법(참고 문헌(19))에 의해 아가로스 상에서 정제시킨 단편으로부터 제조하였다.

[IV-결과]

A-PCR법을 사용하여, Cα클론과 하이브리드화는 308개의 cDNA를 클로닝 한 후 서열화하였다. 이들 중,

172개의 cDNA는 V-J-Cα가변성 영역에만 대응한다.

본 발명의 Vα및 Jα서열을 서열 목록에서 각각 서열 동정 번호 1 내지 11 및 서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20으로 나타낸다. 서열 동정 번호 1 및 6 내지 11의 서열은 공지된 Vα신장 세그먼트에 대응하는 한편, 서열 동정 번호 2 내지 5의 서열은 신규의 아군(각각 Vα25, Vα26 및 Vα29로 나타냄)에 대응한다.

1. 신규의 아군에 대응하는 Vα서열

서열 동정 번호 2 내지 5의 서열에 대응하는 Vα단편을 함유한 V-J-Cα탐침을 사용한 생식 주 DNA의 서던 블로트 분석을 "저긴축성(low stringency)" 하이브리드화 조건에서 수행하여, 각 군에 속하는 Vα유전자 세그먼트의 수를 동정하고 이들 Vα유전자 세그먼트를 수반하는 DNA 제한 단편을 특성화하였다. 대표적인 결과는 제3도에 나타낸다.

이들 분석의 결과, 서열 동정 번호 3의 서열에 대응하는 아군은 2개 이상의 유전자 세그먼트를 포함하는 한편 그외의 서열(서열 동정 번호 2, 4 및 5)은 유일한 원에 대응하는 것으로 나타난다.

생식 DNA 제한 단편의 크기는 다음과 같다.

서열 동정 번호 2 : EcoR I 2.2 kb, Hind III 4.8 및 5.7 kb, BamH I 25 Kb

서열 동정 번호 3 : EcoR I 4.6 및 7.5 kb, Hind III 4.2 및 6.4 kb, BamH I 23 및 4.5 kb

서열 동정 번호 4 : EcoR I 7.6 kb, Hind III 18 kb, BamH I 9 및 0.9 kb

서열 동정 번호 5 : EcoR I 5.9 및 4.8 kb, Hind III 6.6 kb, BamH I 6.5 kb

2. 공지된 Vα서열의 신장에 대응하는 서열

서열 동정 번호1(IGR a 02)은 LINV 서열(171 bp)(맹글-가우(mengle-Gaw)의 참고 문헌(20))의 5′ 측의 신장에 대응하며, 이 서열은 Vαw24로 잠정적으로 나타낸 아군을 한정한다.

서열 동정 번호 6(IGR a 08): 이 서열은 Vα1 AE11 클론 서열의 5′ 측의 신장에 대응한다(클라인(Klein) 등의 참고 문헌(21)). 두 개의 직선 서열을 제1(a)도에 나타낸다.

서열 동정 번호 7(IGR a 09): 이 서열은 Vα2 AF110 서열의 NH_2 말단을 코딩하는 신장에 대응한다(상기 인용된 클라인의 문헌). 두 개의 직선 서열을 제1(b)도에 나타낸다. 서열 동정 번호 7은 공통 서열에 대응한다. 위치 206에서는 C 대신에 T가 존재하는 것으로 관찰된다.

서열 동정 번호 8(IGR a 10): 이 서열은 VαHAP35 클론의 5′ 영역의 신장에대응한다(요시까이(Yoshikai)의 참고 문헌(22)). 두 개의 직선 서열은 제1(c)도에 나타낸다. 서열 동정 번호 8은 공통 서열에 대응한다. 위치 307에서는 A 대신에 G가 존재하며 위치 360에서는 C 대신 T가 존재하는 것으로 관찰된다.

서열 동정 번호 9(IGR a 11): 이 서열은 Vα7 HAP12 서열의 3′ 측의 신장에대응한다(상기 인용된 요시까이의 문헌). 직선 서열은 제10도에 나타낸다. 서열 동정 번호 9는 공통 서열에 대응한다. 위치 86에서는 T 대신 C가 존재하는 것으로 관찰된다.

서열 동정 번호 10(IGR a 12): 이 서열은 Vα22 아군의 유전자를 모두 코딩하는 영역을 포함하며, 부분 서열(113 bp) AC9에 의해 동정되어 있다(상기 인용된 클라인의 문헌). 두 개의 직선 서열은 제1(e)도에 나타낸다.

서열 동정 번호 9(IGR a 11): 이 서열은 Vα16(8) 아군에 속하며 위유전자(pseudogene)로 나타내는 HAVT 32 및 HAVT 35 클론에 부분적으로 대응한다. 실질적으로 위치 108에 뉴클레오티드를 첨가한 후에 서열 동정 번호 11은 T 임파구 수용체의 본래의 가변성 영역을 코딩한다. 또한, 이 서열은 코딩 부분에 대한 서열 HSTCAYM과 동일하다(클라인 등의 참고 문헌(21)). 그러나, 서열 동정 번호 11의 서열은 온전하며 코딩하는 것이다.

3. Jα서열

신규의 Jα서열 세트를 제2도에 나타낸다. 8개의 Jα세그먼트 중 대부분은 상기 요시까이의 참고 문헌에 기재된 Jα세그먼트의 아미노산 서열 FGXGT를 보유한다. 그러나, IGRJa 07 세그먼트에 대한 트레오닌 잔기는 이소로이신 잔기에 의해 치환된다.

또한, 페닐알라닌 잔기 대신에 시스테인 잔기가 IGRJa 02G에서 발견된다.

본 발명의 목적은 또한, 예를 들면 상기 기재된 바와 같이 환자내에서 특정 Vα아군의 발현 및 궁극적으로 면역 질병의 진단의 연구 관점에서 볼 때 상이한 Vα아군에 대응하는 DNA를 증폭시키는데 프라이머로 사용될 수 있는 상이한 Vα아군의 특정 올리고뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

특정 Vα아군의 우세한 발현에 관한 것은 이미 불완전한 영역의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 연구되어 왔다. 이러한 방식으로, 닛타(Nitta) 등의 참고 문헌(29)에는 종양을 침투시키는 임파구내 Vα7 유전자의 우세한 발현이 기재되어 있다. 또한, 소티니(Sottini) 등의 참고 문헌(30)에는 류마티스성 관절염에 걸린 환자내에서의 Vα의 디렉토리에 관한 연구가 기재되어 있다.

본 발명의 목적은 각 아군에 대해 완전히 특이적인 공지된 Vα아군 및 본 발명의 신규 Vα아군의 연구를 가능케하는 완전한 영역의 올리고뉴클레오티드를 제공하는 것이다. 따라서, 이 올리고뉴클레오티드를 선택하고, 아군 사이의 교차 반응을 감소시키는 천연 서열에 비례하여 도입되어 있는 1 또는 2개의 뉴클레오티드를 변형시킬 필요 및 목적을 위해 합성한다.

또한, 본 발명의 목적은 서열 동정 번호 26 내지 54의 서열에서 선택된, T-세포 수용체의 α사슬의 가변

성 영역에 대응하는 DNA 증폭용 프라이머로서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드이다.

또한, 본 발명의 목적은

a) 서열 동정 번호 26 내지 54의 서열에서 선택되는 올리고뉴클레오티드 중의 하나 및 세그먼트 Cα에 속하는 올리고뉴클레오티드 하나에 의해 형성된 적어도 1쌍의 프라이머를 사용하여 DNA를 증폭시키고,

b) Cα탐침을 사용하여 증폭된 서열을 검출하는 것을 특징으로 하는, 생물학적 샘플 중에서 T 수용체의 Vα세그먼트를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 그의 전사 생성물에 대응하는 cDNA의 검출 방법이다.

이 증폭에 사용된 Cα세그먼트에 속하는 올리고뉴클레오티드는 특히, 서열 동정 번호 55 및 56의 서열에서 선택할 수 있다.

증폭의 효율을 조사하기 위한 조작은 1쌍의 대조 프라이머의 존재하에 수행하고, 대응하는 대조 탐침을 사용하여 증폭된 대응하는 대조 서열을 검출하는 것이 바람직하다.

이러한 대조 프라이머 쌍은 2개의 Cβ세그먼트, 예를 들면 서열 동정 번호 61 및 62의 서열에 대응하는 CβF 및 CβK 프라이머에 대응할 수 있다. 이어서, Cβ검출 탐침(예를 들면, 서열 동정 번호 63의 서열에 대응함)을 사용한다. 그러나, 이 프라이머의 쌍은 β-액틴에 속하는 2개의 프라이머, 특히 서열 번호 58 및 59의 서열에 대응하는 것으로 구성될 수 있다. 이어서, 서열 동정 번호 60의 서열과 같은 β-액틴의 서열에 대응하는 검출 탐침을 사용한다.

또한, 본 발명의 목적은

a) 서열 동정 번호 26 내지 54의 서열에서 선택되는 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드,

b) Cα프라이머 및

c) Cα탐침

을 함유하는 상기 정의된 방법을 수행하기 위한 진단 키트이다.

이러한 키트는

d) 1쌍의 대조 프라이머 및

e) 대조 탐침

을 부가적으로 더 함유하는 것이 유리하다.

이 키트는 특히

a) 서열 동정 번호 26 내지 54의 서열에 대응하는 29개의 올리고뉴클레오티드의 군,

b) 서열 동정 번호 55 내지 56의 서열에 대응하는 서열에서 선택되는 Cα프라이머,

c) 서열 동정 번호 58 및 59의 서열에 각각 대응하는 서열을 갖는 β-액틴용 1쌍의 대조 프라이머,

d) 서열 동정 번호 57의 서열에 대응하는 Cα탐침 및

e) 서열 동정 번호 60의 서열에 대응하는 β-액틴용 대조 탐침

을 함유할 수 있다.

서열 동정 번호 26 내지 60의 서열의 목록에 제공된 정보에 있어서, 서열 동정 번호 26 내지 47의 서열은 공지된 Vα1 내지 Vα22 아군의 클론에 속하는 서열(EMBL 데이터베이스로부터 이용가능함) 또는 그중 1 또는 2개의 뉴클레오티드가 상이한 서열에 대응한다.

서열 동정 번호 49, 50, 51, 52 및 54의 서열은 잠정적으로 나타낸 아군 Vα w24, Vαw25, Vαw26, Vαw27 및 Vαw29(w는 임시직으로 한정된 표시를 나타냄)에 대응하는 본 발명의 신규 아군의 클론에 속하는 서열에 대응한다.

서열 동정 번호 48 및 53의 서열은 아직 한정된 표시로 나타내어지지 않지만 공지된 아군(각각 Vαw23 및 Vαw28)의 클론 IGRa 01 및 IGRa 06에 각각 대응하며, 그중 하나는 이미 기재되어 있다(각각 힌카넨(Hinkkanen A.)등의 참고 문헌(31) 및 버나드(Bernard O.)의 참고 문헌(32)). IGRa 06의 완전한 서열은 아직 밝혀져 있지 않다.

서열 동정 번호 55 및 56의 서열은 증폭용 Cα프라이머로서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오티드의 2가지 예이다.

서열 동정 번호 57의 서열은 증폭된 DNA의 검출에 사용될 수 있는 Cα탐침의 서열이다.

서열 동정 번호 58, 59 및 60의 서열은 각각 증폭을 조사하기 위해 사용될 수 있는 β-액틴의 서열에 속하는 1쌍의 올리고뉴클레오티드의 서열 및 대응하는 증폭된 DNA를 검출하기 위한 탐침의 서열이다.

서열 목록에 나타난 위치는 ATG 번역의 예상 개시 부위로부터 계산하여 5′ 말단의 위치이다. 서열이 불완전한 경우(공지되어 있지 않은 5′ 영역),(*로 표시된) 위치는 서열의 제1뉴클레오티드에 대하여 제공된다. 밑줄 그어진 뉴클레오티드는 천연 서열에 대해 도입된 것과 짝지워지지 않는다.

올리고뉴클레오티드는 β-시아노-에틸포스포르아미다이트법(신하(Sinha N.)등의 참고 문헌(33))을 사용하고 제작자에 의해 추천된 프로토콜에 따라 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystem) 381A 자동화 DNA 합성기로 합성하였다. 올리고뉴클레오티드를 장치중에서 탈트리틸화하고, 지지체로부터 절단하고 암모니아로(60℃에서 5시간 동안)탈보호시켰다. 조 생성물을 0.01M 트리에틸암모늄 아세테이트 완충액(pH

5.5) 중의 아세토니트릴 구배(9 내지 15%)를 사용하는 μ-bondapak C18 컬럼상의 역상 고압 크로마토그래피에 의해 정제시켰다.

증폭은 본 발명에 따른 프라이머, 특히, 사이끼 등의 참고 문헌(12) 및 미합중국 특허 제4 683 195호, 등 제4 683 202호, 동 제4 889 818호에 기재되어 있는 PCR(복제 연쇄 반응)에 의한 증폭 기술을 사용하여 수행하였다.

PCR에 대해서는, 변성되거나 또는 상기 기재된 역전사효소를 사용하여 RNA로부터 얻은 cDNA의 이중 가닥 DNA를 사용할 수 있다.

중합화제는 DNA 폴리머라제, 특히 Taq 폴리머라제이다.

일반적으로 증폭 사이클은 25 내지 40회를 반복한다.

증폭 서열을 검출하는데 사용되는 탐침은 오토라디오그래피에 의한 검출을 초래하는 방사성 동위원소로 올리고뉴클레오티드를 표지하거나, 또는 화학 발광에 의한 검출을 초래하는 퍼옥시다제(ECL 애멀샴 시스템 제품), 알칼리성 포스파타제 또는 β-갈락토시다제(트로픽스 오자임 시스템 제품)과 같은 효소와 결합시킴으로써 얻어질 수 있다.

하기 실시예는 본 발명에 따른 검출 방법의 수행을 실시한다.

건강한 개인의 말초 임파구를 밀도 구배 원심분리에 의해 제조하였다. 전체 DNA를 이소티오시안산 구아니디늄, 페놀 및 클로로포름을 사용하여 추출시킴으로써 1단계법으로 추출하였다(춈크진스키의 참고 문헌(11)). 상보성 DNA는 1 내지 5㎍의 전체 RNA, 역전사효소 및 CαB 프라이머를 사용하여 42℃에서 1 시간 동안 최종 부피를 20μl로 합성하였다(1.25μM).

이렇게 하여 얻은 물질을 95℃에서 3분 동안 가열한 후, 서열 동정 번호 26 내지 54의 서열에 대응하는 특이성 Vα프라이머 및 Cα영역에 특이성인 CαB 프라이머(서열 동정 번호 56)를 병행해서 사용하는 PCR 기술에 따라 증폭시켰다. 이러한 증폭은 50mM의 KCl, 10mM의 트리스-HCl(pH 8.3) 1.5mM의 $MgCl_2$, 0.1(중량/부피)%의 젤라틴, 200μM의 dNTP, 0.25 단위의 Taq 폴리머라제 및 0.25 μM의 각 프라이머를 함유한 튜브 당 10μl의 최종 부피로 수행하였다. 대조 증폭은 PCR 및 액틴에 특이성인 액트(Act) 1 및 액트 2 프라이머(서열 동정 번호 58 및 59)에 의해 제조된 877개의 염기쌍의 β-액틴의 25mN DNA 단편에서 출발하여 각각의 튜브중에서 수행하였다. 72℃에서 5분간의 최종 신장 단계 후에 30회의 중폭 사이클을 수행하였다. 각각의 사이클은 94℃에서 1분간의 변성 단계, 65℃에서 1분간의 하이브리드화 단계 및 72℃에서 1분간의 신장 기간을 포함한다.

이렇게 얻어진 생성물은 2% 아가로스 겔상에서 전기영동에 의해 분리시키고, 알칼리 완충액중에서 나일론 막상으로 옮기고, 폴리뉴클레오티닐 T4 키나제 효소에 의해 ^{32}P로 표지된 CαC 올리고뉴클레오티드 탐침(서열 동정 번호 57) 및 액트 3(서열 동정 번호 60)을 사용하여 동시에 하이브리드화시켰다. 하이브리드화는 6 x SSC, 0.5% SDS, 5 x 덴하르트, 0.05% NaH_2PO_4 및 100㎍/ml의 변성된 연어 정자 DNA를 함유한 완충액 중에서 42℃에서 16시간 동안 수행하였다. 이어서, 막을 SSC로 6회, 20mM NaH_2PO_4로 주변 온도에서 5분간 2회, 50℃에서 30분간 1회 세척한 후, 오토라디오그래피하였다.

얻어진 결과를 제4도에 나타낸다.

액틴용 대조군(877개의 염기쌍의 밴드)에서도 모든 웰에서 입증되도록 증폭이 일어날 수 있다. 대응하는 증폭된 단편의 크기에 대응하는 크기를 갖는 특이성 시그날이 상기 밴드 아래에 나타나며, 각 단편은 특이성 Vα올리고뉴클레오티드의 좌 및 Cα프라이머 사이의 거리에 대응하는 길이를 갖는다.

개별적으로 시험한 후, 제4도에 다른 것에 대하여 한정된 특정 유전자 세그먼트의 선택적 발현을 나타낸다. 예를 들면, Vα27, 28 및 29 아군은 Vα2, 3 및 6 아군보다 적게 나타난다.

[참고 문헌]

1. 뮤이에(Meuer, S.C.) 등, J. Exp. Med. 1983, 157:705.

2. 모잉언(Moingeon, P.) 등, Nature 1986a. 323:638.

3. 브렌너(Brenner, M.B.) 등, Nature 1986. 322:145.

4. 뱅크(Bank, I.) 등, Nature 1986, 322:179.

5. 데이비스(Davis, M.M.) 등, Nature 1988. 334:395.

6. 크루(Crews, S.) 등, Cell 1981. 25:59.

7. 콘캐논(Concannon, P.) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. 83:6598.

8. 기무라(Kimura, N.) 등, Eur. J. Immunol. 1987. 17:375.

9. 윌슨(Wilson, R.K.) 등, Immunological Reviews 1988c. 101:149.

10. 셔그윈(Chirgwin, J.M.) 등, Biochemistry 1979. 18:5294.

11. 촘크진스키(Chomczynski, P.) 등, Anal. Biochem. 1987. 162:156.

12. 사이끼(Saiki, R.K.) 등, Science 1988. 239:487.

13. 로(Loh, E.Y.) 등, Science 1989. 243:217.

14. 생거(Sanger, F.) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977. 74:5463.

15. 립맨(Lipman, D.J.) 등, Science 1985. 227:1435.

16. 코작(Kozak, M.) 등, Nucl. Acids Res. 1984. 12:857.

17. 키트(Kyte, J.) 등, R.F., J. Mol. Biol. 1982. 157:105.

18. 트리에벨(Triebel, F.) 등, J. Immun. 1988. 140:300.

19. 페인버그(Feinberg, A.P.) 등, Anal. Bichem. 1983. 132:6.

20. 맹글-가우(Mengle-Gaw, L.) 등, The EMBO Journal, 1987. 6:2273.

21. 클라인(Klein, M.H.) 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987. 84:6884.

22. 요시까이(Yoshikai, Y.) 등, J. Exp. Med. 1986. 164:90.

23. 노덴바크(Naudenbark, A.) 등, Nature, 341, 541.

24. 제인웨이(Janeway, C.), Nature, 341, 482.

25. 린(Lin, Y.), J. Exp. Med., 171, 221.

26. 아카-오르베아(Acha-Orbea, H.), EMBO Journal, 1990, 9, 12, 3815.

27. 카플러(Kappler, J.), Science 244, 811.

28. 조(Choi, Y.), PNAS, 86, 8941.

29. 닛타(Nitta T.) 등, Science 1990, 249, 672.

30. 소티니(Sottini A.) 등, Eur. J. Immunol, 1991, 21, 461.

31. 힌카넨(Hinkkanen A.) 등, Immunogenetics, 1989, 29, 131.

32. 버나드(Bernard O.) 등, Oncogene, 1988, 2, 195.

33. 신하(Sinha N.) 등, Nucleic Acids Res. 1984, 12, 4539.

[서열 목록]

I - 일반적인 정보

(1) 출원인 : 로우셀 - 우크라프사

(2) 발명의 명칭 :

인체 임파구 수용체의 α 사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드, 대응하는 펩티드 세그먼트 및 그의 진단 및 치료 용도.

(3) 서열 개수 : 62

II - 서열 동정 번호 1의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 371개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 02

서열 : Vαw24

[서열의 설명]

```
           AGTCAACTTC TGGGAGCAGT CTCTGCAGAA TAAAA ATG AAA AAG CAT     47
                                                  Met Lys Lys His
                                                   1

CTG ACG ACC TTC TTG GTG ATT TTG TGG CTT TAT TTT TAT AGG GGG AAT     95
Leu Thr Thr Phe Leu Val Ile Leu Trp Leu Tyr Phe Tyr Arg Gly Asn
5                   10                  15                  20

GGC AAA AAC CAA GTG GAG CAG AGT CCT CAG TCC CTG ATC ATC CTG GAG    143
Gly Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu
                25                  30                  35

GGA AAG AAC TGC ACT CTT CAA TGC AAT TAT ACA GTG AGC CCC TTC AGC    191
Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser
            40                  45                  50

AAC TTA AGG TGG TAT AAG CAA GAT ACT GGG AGA GGT CCT GTT TCC CTG    239
Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu
        55                  60                  65

ACA ATC ATG ACT TTC AGT GAG AAC ACA AAG TCG AAC GGA AGA TAT ACA    287
Thr Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr
    70                  75                  80

GCA ACT CTG GAT GCA GAC ACA AAG CAA AGC TCT CTG CAC ATC ACA GCC    335
Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala
85                  90                  95                  100

TCC CAG CTC AGC GAT TCA GCC TCC TAC ATC TGT GTG                    371
Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val
                105                 110
```

III - 서열 동정 번호 2의 서열에 대한 정보

서열의 특징

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 400개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 03

서열 : Vαw25

[서열의 설명]

```
                                GACTCTAAGC CCAAGAGAGT TTCTTGAAGC AAAAAAAAAA    40

AAAACCCATT CAGGAAATAA TTCTTTGCTG ATAAGG ATG CTC CTT GAA CAT TTA                94
                                        Met Leu Leu Glu His Leu
                                        1               5

TTA ATA ATC TTG TGG ATG CAG CTG ACA TGG GTC AGT GGT CAA CAG CTG               142
Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp Val Ser Gly Gln Gln Leu
            10                  15                  20

AAT CAG AGT CCT CAA TCT ATG TTT ATC CAG GAA GGA GAA GAT GTC TCC               190
Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln Glu Gly Glu Asp Val Ser
        25                  30                  35

ATG AAC TGC ACT TCT TCA AGC ATA TTT AAC ACC TGG CTA TGG TAC AAG               238
Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn Thr Trp Leu Trp Tyr Lys
    40                  45                  50

CAG GAC CCT GGG GAA GGT CCT GTC CTC TTG ATA GCC TTA TAT AAG GCT               286
Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Ile Ala Leu Tyr Lys Ala
55                  60                  65                  70

GGT GAA TTG ACC TCA AAT GGA AGA CTG ACT GCT CAG TTT GGT ATA ACC               334
Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr Ala Gln Phe Gly Ile Thr
                75                  80                  85

AGA AAG GAC AGC TTC CTG AAT ATC TCA GCA TCC ATA CCT AGT GAT GTA               382
Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala Ser Ile Pro Ser Asp Val
            90                  95                  100

GGC ATC TAC TTC TGT GCT                                                      400
Gly Ile Tyr Phe Cys Ala
        105
```

IV - 서열 동정 번호 3의 서열에 대한 정보

서열의 특징

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 339개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 04

서열 : Vαw26

[서열의 설명]

```
   AGCTAAGGG ATG GAG ACT GTT CTG CAA GTA CTC CTA GGG ATA TTG GGG              48
             Met Glu Thr Val Leu Gln Val Leu Leu Gly Ile Leu Gly
             1               5                   10

TTC CAA GCA GCC TGG GTC AGT AGC CAA GAA CTG GAG CAG AGT CCT CAG              96
Phe Gln Ala Ala Trp Val Ser Ser Gln Glu Leu Glu Gln Ser Pro Gln
    15                  20                  25

TCC TTG ATC GTC CAA GAG GGA AAG AAT CTC ACC ATA AAC TGC ACG TCA             144
Ser Leu Ile Val Gln Glu Gly Lys Asn Leu Thr Ile Asn Cys Thr Ser
30                  35                  40                  45

TCA AAG ACG TTA TAT GGC TTA TAC TGG TAT AAG CAA AAG TAT GGT GAA             192
Ser Lys Thr Leu Tyr Gly Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Tyr Gly Glu
                50                  55                  60

GGT CTT ATC TTC TTG ATG ATG CTA CAG AAA GGT GGG GAA GAG AAA AGT             240
Gly Leu Ile Phe Leu Met Met Leu Gln Lys Gly Gly Glu Glu Lys Ser
            65                  70                  75

CAT GAA AAG ATA ACT GCC AAG TTG GAT GAG AAA AAG CAG CAA AGT TCC             288
His Glu Lys Ile Thr Ala Lys Leu Asp Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser
        80                  85                  90

CTG CAT ATC ACA GCC TCC CAG CCC AGC CAT GCA GGC ATC TAC CTC TGT             336
Leu His Ile Thr Ala Ser Gln Pro Ser His Ala Gly Ile Tyr Leu Cys
    95                  100                 105

GGA                                                                         339
Gly
110
```

V - 서열 동정 번호 4의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 335개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 05

서열 : Vαw27

[서열의 설명]

```
         AGAAAAAAAA AATGAAGAAG CTACTAGCAA TGATCCTGTG GCTTCAACTA     50

          GACCGGTTAA GTGGAGAGCT GAAAGTG GAA CAA AAC CCT CTG TTC     95
                                        Glu Gln Asn Pro Leu Phe
                                        1               5

CTG AGC ATG CAG GAG GGA AAA AAC TAT ACC ATC TAC TGC AAT TAT TCA    143
Leu Ser Met Gln Glu Gly Lys Asn Tyr Thr Ile Tyr Cys Asn Tyr Ser
            10                  15                  20

ACC ACT TCA GAC AGA CTG TAT TGG TAC AGG CAG GAT CCT GGG AAA AGT    191
Thr Thr Ser Asp Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Ser
        25                  30                  35

CTG GAA TCT CTG TTT GTG TTG CTA TCA AAT GGA GCA GTG AAG CAG GAG    239
Leu Glu Ser Leu Phe Val Leu Leu Ser Asn Gly Ala Val Lys Gln Glu
    40                  45                  50

GGA CGA TTA ATG GCC TCA CTT GAT ACC AAA GCC CGT CTC AGC ACC CTC    287
Gly Arg Leu Met Ala Ser Leu Asp Thr Lys Ala Arg Leu Ser Thr Leu
55                  60                  65                  70

CAC ATC ACA GCT GCC GTG CAT GAC CTC TCT GCC ACC TAC TTC TGT GCC    335
His Ile Thr Ala Ala Val His Asp Leu Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
                75                  80                  85
```

VI - 서열 동정 번호 5의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 361개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 07

서열 : Vαw29

[서열의 설명]

```
          GAAGCTGACT GGATATTCTG GCAGGCCAAG G ATG GAG ACT CTC CTG     46
                                             Met Glu Thr Leu Leu
                                             1               5

AAA GTG CCT TCA GGC ACC TTG TTG TGG CAG TTG ACC TGG GTG GGA AGC     94
Lys Val Pro Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu Thr Trp Val Gly Ser
                10                  15                  20

CAA CAA CCA GTG CAG AGT CCT CAA GCC GTG ATC CTC CGA GAA GGG GAA    142
Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile Leu Arg Glu Gly Glu
            25                  30                  35

GAT GCT GTC ACC AAC TGC AGT TCC TCC AAG GCT TTA TAT TCT GTA CAC    190
Asp Ala Val Thr Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala Leu Tyr Ser Val His
        40                  45                  50

TGG TAC AGG CAG AAG CAT GGT GAA GCA CCC GTC TTC CTG ATG ATA TTA    238
Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val Phe Leu Met Ile Leu
    55                  60                  65

CTG AAG GGT GGA GAA CAG ATG CGT CGT GAA AAA ATA TCT GCT TCA TTT    286
Leu Lys Gly Gly Glu Gln Met Arg Arg Glu Lys Ile Ser Ala Ser Phe
70                  75                  80                  85

AAT GAA AAA AAG CAG CAA AGC TCC CTG TAC CTT ACG GCC TCC CAG CTC    334
Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Ser Gln Leu
                90                  95                  100

AGT TAC TCA GGA ACC TAC TTC TGC GGG                             361
Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly
            105                 110
```

VII - 서열 동정 번호 6의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 569개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 08

서열 : Vα1

[서열의 설명]

```
                                                                TCAGTTTCTT  10

CTTCCTGCAG CTGGTTGAGT TGTTTCCAGA CAAAGACAAG TGACAAGAAT TAGAGGTTTA  70

AAAAGCAACC AGATTCATCT CAGCAGCTTT TGTAGTTTTA AATAAGCAAG GAGTTTCTCC 130

AGCGAAACTT CCTCACACCT CTTGGTCTTG GTCTCTTCAG ACACTTTCCT TCCTGTTCTC 190

TGGAGATCTT GCAGAAAAGA GCCTGCAGTG TTTCCCTTGC TCAGCC ATG CTC CTG     245
                                                     Met Leu Leu
                                                      1

GAG CTT ATC CCA CTG CTG GGG ATA CAT TTT GTC CTG AGA ACT GCC AGA    293
Glu Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg Thr Ala Arg
    5                  10                  15

GCC CAG TCA GTG ACC CAG CCT GAC ATC CAC ATC ACT GTC TCT GAA GGA    341
Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ile His Ile Thr Val Ser Glu Gly
20                 25                  30                  35

GCC TCA CTG GAG TTG AGA TGT AAC TAT TCC TAT GGG GCA ACA CCT TAT    389
Ala Ser Leu Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Ala Thr Pro Tyr
                40                  45                  50

CTC TTC TGG TAT GTC CAG TCC CCC GGC CAA GGC CTC CAG CTG CTC CTG    437
Leu Phe Trp Tyr Val Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Gln Leu Leu Leu
            55                  60                  65

AAG TAC TTT TCA GGA GAC ACT CTG GTT CAA GGC ATT AAA GGC TTT GAG    485
Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Thr Leu Val Gln Gly Ile Lys Gly Phe Glu
        70                  75                  80

GCT GAA TTT AAG AGG AGT CAA TCT TCC TTC AAC CTG AGG AAA CCC TCT    533
Ala Glu Phe Lys Arg Ser Gln Ser Ser Phe Asn Leu Arg Lys Pro Ser
    85                  90                  95

GTG CAT TGG AGT GAT GCT GCT GAG TAC TTC TGT GCT                    569
Val His Trp Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Ala
100                 105                 110
```

VIII - 서열 동정 번호 7의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 330개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

공통서열

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 09

서열 : Vα2

[서열의 설명]

```
AAA TCC TTG AGA GTT TTA CTA GTG ATC CTG TGG CTT CAG CTG AGC CGG     48
Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser Arg
1               5                  10                  15

GTT TGG AGC CAA CAG AAG GAG GTG GAG CAG AAT TCT GGA CCC CTC AGT     96
Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser
            20                  25                  30

GTT CCA GAG GGA GCC ATT GCC TCT CTC AAC TGC ACT TAC AGT GAC CGA    144
Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg
        35                  40                  45

GGT TCC CAG TCC TTC TTC TGG TAC AGA CAA TAT TCT GGG AAA AGC CCT    192
Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro
    50                  55                  60

GAG TTG ATA ATG TCC ATA TAC TCC AAT GGT GAC AAA GAA GAT GGA AGG    240
Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg
65                  70                  75                  80

TTT ACA GCA CAG CTC AAT AAA GCC AGC CAG TAT GTT TCT CTG CTC ATC    288
Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile
                85                  90                  95

AGA GAC TCC CAG CCC AGT GAT TCA GCC ACC TAC CTC TGT GCC            330
Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
            100                 105                 110
```

IX - 서열 동정 번호 8의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 400개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

공통서열

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 10

서열 : Vα5

[서열의 설명]

```
          GCCAAACAGA ATGGCTTTTT GGCTGAGAAG GCTGGGTCTA CATTTCAGGC     50


          CACATTTGGG GAGACGA ATG GAG TCA TCC CTG GGA GGT GTT TTG      94
                             Met Glu Ser Ser Leu Gly Gly Val Leu
                             1               5

CTG ATT TTG TGG CTT CAA GTG GAC TGG GTG AAG AGC CAA AAG ATA GAA    142
Leu Ile Leu Trp Leu Gln Val Asp Trp Val Lys Ser Gln Lys Ile Glu
10                  15                  20                  25

CAG AAT TCC GAG GCC CTG AAC ATT CAG GAG GGT AAA ACG GCC ACC CTG    190
Gln Asn Ser Glu Ala Leu Asn Ile Gln Glu Gly Lys Thr Ala Thr Leu
                30                  35                  40

ACC TGC AAC TAT ACA AAC TAT TCT CCA GCA TAC TTA CAG TGG TAC CGA    238
Thr Cys Asn Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ala Tyr Leu Gln Trp Tyr Arg
            45                  50                  55


CAA GAT CCA GGA AGA GGC CCT GTT TTC TTG CTA CTC ATA CGT GAA AAT    286
Gln Asp Pro Gly Arg Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ile Arg Glu Asn
        60                  65                  70
GAG AAA GAA AAA AGG AAA GAA AGA CTG AAG GTC ACC TTT GAT ACC ACC    334
Glu Lys Glu Lys Arg Lys Glu Arg Leu Lys Val Thr Phe Asp Thr Thr
    75                  80                  85

CTT AAA CAG AGT TTG TTT CAT ATC ACA GCC TCC CAG CCT GCA GAC TCA    382
Leu Lys Gln Ser Leu Phe His Ile Thr Ala Ser Gln Pro Ala Asp Ser
90                  95                  100                 105

GCT ACC TAC CTC TGT GCT                                        400
Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
```

X - 서열 동정 번호 9의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 386개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

공통서열

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 11

서열 : Vα7

[서열의 설명]

```
          GCCTTCTGCA GACTCCAATG GCTCAGGAAC TGGGAATGCA GTGCCAGGCT     50

          CGTGGTATCC TGCAGCAG ATG TGG GGA GTT TTC CTT CTT TAT GTT     95
                              Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val
                              1               5

TCC ATG AAG ATG GGA GGC ACT ACA GGA CAA AAC ATT GAC CAG CCC ACT   143
Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr
10                  15                  20                  25

GAG ATG ACA GCT ACG GAA GGT GCC ATT GTC CAG ATC AAC TGC ACG TAC   191
Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr
                30                  35                  40

CAG ACA TCT GGG TTC AAC GGG CTG TTC TGG TAC CAG CAA CAT GCT GGC   239
Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly
            45                  50                  55

GAA GCA CCC ACA TTT CTG TCT TAC AAT GTT CTG GAT GGT TTG GAG GAG   287
Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu
        60                  65                  70

AAA GGT CGT TTT TCT TCA TTC CTT AGT CGG TCT AAA GGG TAC AGT TAC   335
Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr
    75                  80                  85

CTC CTT TTG AAG GAG CTC CAG ATG AAA GAC TCT GCC TCT TAC CTC TGT   383
Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Met Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys
90                  95                  100                 105

GCT                                                             386
Ala
```

XI - 서열 동정 번호 10의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 383개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 12

서열 : Vα22

[서열의 설명]

```
          TGTGACTTCT TCATGTTAAG GATCAAGACC ATTATTTGGG TAACACACTA     50

     AAG ATG AAC TAT TCT CCA GGC TTA GTA TCT CTG ATA CTC TTA CTG     95
         Met Asn Tyr Ser Pro Gly Leu Val Ser Leu Ile Leu Leu Leu
         1               5                   10

CTT GGA AGA ACC CGT GGA GAT TCA GTG ACC CAG ATG GAA GGG CCA GTG   143
Leu Gly Arg Thr Arg Gly Asp Ser Val Thr Gln Met Glu Gly Pro Val
15                  20                  25                  30

ACT CTC TCA GAA GAG GCC TTC CTG ACT ATA AAC TGC ACG TAC ACA GCC   191
Thr Leu Ser Glu Glu Ala Phe Leu Thr Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Ala
                35                  40                  45

ACA GGA TAC CCT TCC CTT TTC TGG TAT GTC CAA TAT CCT GGA GAA GGT   239
Thr Gly Tyr Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Glu Gly
            50                  55                  60

CTA CAG CTC CTC CTG AAA GCC ACG AAG GCT GAT GAC AAG GGA AGC AAC   287
Leu Gln Leu Leu Leu Lys Ala Thr Lys Ala Asp Asp Lys Gly Ser Asn
        65                  70                  75

AAA GGT TTT GAA GCC ACA TAC CGT AAA GAA ACC ACT TCT TTC CAC TTG   335
Lys Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Arg Lys Glu Thr Thr Ser Phe His Leu
    80                  85                  90

GAG AAA GGC TCA GTT CAA GTG TCA GAC TCA GCG GTG TAC TTC TGT GCT   383
Glu Lys Gly Ser Val Gln Val Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
95                  100                 105                 110
```

XII - 서열 동정 번호 11의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 364개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : IGR a 13

서열 : Vα16

[서열의 설명]

```
          AATCCCGCCC GCCGTGAGCT TAGCTGGAGC C ATG GCC TCT GCA CCC     46
                                             Met Ala Ser Ala Pro
                                             1                 5

ATC TCG ATG CTT GCG ATG CTC TTC ACA TTG AGT GGG CTG AGA GCT CAG     94
Ile Ser Met Leu Ala Met Leu Phe Thr Leu Ser Gly Leu Arg Ala Gln
                10                  15                  20

TCA GTG GCT CAG CCG GAA GAT CAG GTC AAC GTT GCT GAA GGG AAT CCT    142
Ser Val Ala Gln Pro Glu Asp Gln Val Asn Val Ala Glu Gly Asn Pro
            25                  30                  35

CTG ACT GTG AAA TGC ACC TAT TCA GTC TCT GGA AAC CCT TAT CTT TTT    190
Leu Thr Val Lys Cys Thr Tyr Ser Val Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Phe
        40                  45                  50

TGG TAT GTT CAA TAC CCC AAC CGA GGC CTC CAG TTC CTT CTG AAA TAC    238
Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Arg Gly Leu Gln Phe Leu Leu Lys Tyr
    55                  60                  65

ATC ACA GGG GAT AAC CTG GTT AAA GGC AGC TAT GGC TTT GAA GCT GAA    286
Ile Thr Gly Asp Asn Leu Val Lys Gly Ser Tyr Gly Phe Glu Ala Glu
70                  75                  80                  85

TTT AAC AAG AGC CAA ACC TCC TTC CAC CTG AAG AAA CCA TCT GGC CTT    334
Phe Asn Lys Ser Gln Thr Ser Phe His Leu Lys Lys Pro Ser Ala Leu
                90                  95                  100

GTG AGC GAC TCC GCT TTG TAC TTC TGT GCT                         364
Val Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala
            105                 110
```

XIII - 서열 동정 번호 12의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 264개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα01

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
CCTTCAAGGA AAATTAAGGC AAATAGAATT GGGCTGGGGA GTTGCTACTT ATTAGTATTC  60

CTCCCACGTT CTAACCTAAT TATAAGGAGG TTGTTTTGGC CATGGGCAGT CATCTCAGGT 120

TTTGTTTTCC TGCTTTCCTC CCTAACCTCC ACCTGTCTTC CTAGAGGCCT GAGTCAAGGT 180

TATTGCAATA GCACTAAAGA CTGTGT AAC ACC AAT GCA GGC AAA TCA ACC TTT  233
                                Asn Thr Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe
                                1               5

 GGG GAT GGG ACT ACG CTC ACT GTG AAG CCA                          264
 Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro
 10                  15
```

XIV - 서열 동정 번호 13의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 277개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα02

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
AAGGACACAG ACTGCCTGCA TGAAGGCTGG AGCTGGGCCC AGGATGAGGA AAGGCCTCAG  60

GAAGGAAGGG CTGACACGAA ATAAGGAATA CCATGGCATT CATGAGATGT GCGTCTGAAT 120

CCTCTCTCTT GCCTGAGAAG CTTTAGCTTC CACCTTGAGA CACAAAACAT GTGGTTATGA 180

AGAGATGACA AGGTTTTTGT AAAAGAATGA GCCATTGTGG ATA GGC TTT GGG AAT   234
                                           Ile Gly Phe Gly Asn
                                           1               5

GTG CTG CAT TGC GGG TCC GGC ACT CAA GTG ATT GTT TTA CCA           277
Val Leu His Cys Gly Ser Gly Thr Gln Val Ile Val Leu Pro
             10                  15
```

XVI - 서열 동정 번호 15의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 60개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα04

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
TA GAT ACT GGA GGC TTC AAA ACT ATC TTT GGA GCA GGA ACA AGA CTA     47
   Asp Thr Gly Gly Phe Lys Thr Ile Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu
   1               5                   10                  15

TTT GTT AAA GCA A                                                 60
Phe Val Lys Ala
```

XVII - 서열 동정 번호 16의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 59개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα05

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
C CTA ACT GGG GCA AAC AAC GTC TTC TTT GGG ACT GGA ACG AGA CTC     46
  Leu Thr Gly Ala Asn Asn Val Phe Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu
  1               5                   10                  15

ACC GTT CTT CCC T                                                 59
Thr Val Leu Pro
```

XVIII - 서열 동정 번호 17의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 60개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα06

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
AT GGA GGA AGC CAA GGA AAT CTC ATC TTT GGA AAA GGC ACT AAA CTC     47
   Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu
   1               5                   10                  15

TCT GTT AAA CCA A                                                 60
Ser Val Lys Pro
```

XIX - 서열 동정 번호 18의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 56개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα07

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
GGA GCC AAT AGT AAG CTG ACA TTT GGA AAA GGA ATA ACT CTG AGT GTT    48
Gly Ala Asn Ser Lys Leu Thr Phe Gly Lys Gly Ile Thr Leu Ser Val
1               5                  10                  15

                -
AGA CCA GA                                                       56
Arg Pro
```

XX - 서열 동정 번호 19의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 57개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα08

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
CT GGT GGC TAC AAT AAG CTG ATT TTT GGA GCA GGG ACC AGG CTG GCT    47
   Gly Gly Tyr Asn Lys Leu Ile Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Ala
   1               5                  10                  15

GTA CAC CCA T                                                    57
Val His Pro
```

XXI - 서열 동정 번호 20의 서열에 대한 정보

[서열의 특징]

유형 : 뉴클레오티드 및 그의 대응하는 단백질

길이 : 50개의 염기쌍

가닥 수 : 단일

형태 : 선형

분자의 유형 : mRNA에 대한 cDNA

[기원]

생물 : 인간

세포 주 : 인체 T 임파구

[특성]

DNA의 명칭 : Jα09

서열 : Jα

[서열의 설명]

```
T GGA AAC AAG CTG GTC TTT GGC GCA GGA ACC ATT CTG AGA CTC AAG     46
  Gly Asn Lys Leu Val Phe Gly Ala Gly Thr Ile Leu Arg Val Lys
  1               5                  10                  15

TCC T                                                           50
Ser
```

XXII - 서열 동정 번호 21 내지 25의 서열에 대한 정보

유형 : 올리고뉴클레오티드

[서열의 설명]

서열 동정 번호 21 A (5′-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG)

서열 동정 번호 22 폴리 C (5′-GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG-14C)

서열 동정 번호 23 B (5′-GTCCATAGACCTCATGTCCAGCACAG)

서열 동정 번호 24 C (5′-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG)

서열 동정 번호 25 D (5′-GTCACTGGATTTAGAGTCT)

XXIII - 서열 동정 번호 26 내지 63의 서열에 대한 정보

유형 : 올리고뉴클레오티드

[서열의 설명]

서열 동정 번호	서열	유형	클론	위치
26	5′-GGCATTAACGGTTTTGAGGCTGGA-3′	Vα1	AB22	235
27	5′-CAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGC-3′	Vα2	IGRa09	93*
28	5′-CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTA-3′	Vα3	HAP05	297
29	5′-TTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCA-3′	Vα4	HAP08	153
30	5′-CGGCCACCCTGACCTGCAACTATA-3′	Vα5	IGRa10	113
31	5′-TCCGCCAACCTTGTCATCTCCGCT-3′	Vα6	HAP01	287
32	5′-GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC-3′	Vα7	IGRa11	159
33	5′-CATTCGTTCAAATGTGGGCAAAAG-3′	Vα8	HAP41	204
34	5′-CCAGTACTCCAGACAACGCCTGCA-3′	Vα9	HAVP36	168
35	5′-CACTGCGGCCCAGCCTGGTGATAC-3′	Vα10	HAP58	282
36	5′-CGCTGCTCATCCTCCAGGTGCGGG-3′	Vα11	AB19	254*
37	5′-TCGTCGGAACTCTTTTGATGAGCA-3′	Vα12	V12HA483	213

서열 번호	동정 서열	유형	클론	위치
38	5'-TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGC-3'	Vα13	HAVT15	152*
39	5'-CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT-3'	Vα14	HAVT20	181
40	5'-TTGCAGACACCGAGACTGGGGACT-3'	Vα15	HAVT31	278
41	5'-TCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTC-3'	Vα16	IGRa13	89
42	5'-TGGGAAAGGCCGTGCATTATTGAT-3'	Vα17	AB11	204
43	5'-CAGCACCAATTTCACCTGCAGCTT-3'	Vα18	AB21	114
44	5'-ACACTGGCTGCAACAGCATCCAGG-3'	Vα19	AC24	162
45	5'-TCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGA-3'	Vα20	AE212	232
46	5'-AGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG-3'	Vα21	AF211	92
47	5'-CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA-3'	Vα22	IGRa12	197
48	5'-TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG-3'	Vαw23	IGRa01	246
49	5'-CTGGATGCAGACACAAAGCAGAGC-3'	Vαw24	IGRa02	259
50	5'-TGGCTACGGTACAAGCCGGACCCT-3'	Vαw25	IGRa03	148
51	5'-AGCGCAGCCATGCAGGCATGTACC-3'	Vαw26	IGRa04	299
52	5'-AAGCCCGTCTCAGCACCCTCCACA-3'	Vαw27	IGRa05	268*
53	5'-TGGTTGTGCACGAGGGAGACACTG-3'	Vαw28	IGRa06	95
54	5'-GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCG-3'	Vαp29	IGRa07	210
55	5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG-3'	CαA		129
56	5'-GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT-3'	CαB		201
57	5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT-3'	CαC		57
58	5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGC-3'	액트1	β-액틴	1161
59	5'-GGCATCGTCACCAACTGGGACGAC-3'	액트2	β-액틴	261
60	5'-ACCACCACGGCGGAGCGGG-3'	액트3	β-액틴	642
61	5'-CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG-3'	CβF		135
62	5'-CCCACCCGAGGTCGCTGTG-3'	CβK		20
63	5'-TCTGCTTCTGATGGCTCAA-3'	CβC		58

(57) 청구의 범위

청구항 1

a - 서열 동정 번호 1 내지 11의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트 및, b - 서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20의 서열 중의 하나에 대응하는 Jα세그먼트중의 DSM 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 동정 번호 1 내지 10의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트 중의 어느 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20의 서열 중의 하나에 대응하는 Jα세그먼트 중의 어느 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 4

서열 동정 번호 2 내지 5의 서열 중의 하나에 대응하는 Vα세그먼트 중의 어느 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

청구항 5

서열 동정 번호 1의 1 내지 200, 서열 동정 번호 6의 1 내지 467, 서열 동정 번호 7의 1 내지 77, 서열 동정 번호 8의 1 내지 151, 서열 동정 번호 9의 291 내지 386, 서열 동정 번호 10의 1 내지 260의 서열 중의 어느 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열.

청구항 6

서열 동정 번호 12, 13 및 15 내지 20의 서열 중의 하나에 대응하는 Jα세그먼트 중의 어느 하나에서 선택되는 뉴클레오티드 서열을 함유한 cDNA에 대응하는, 인체 T 임파구 수용체의 α사슬의 가변성 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열.

도면

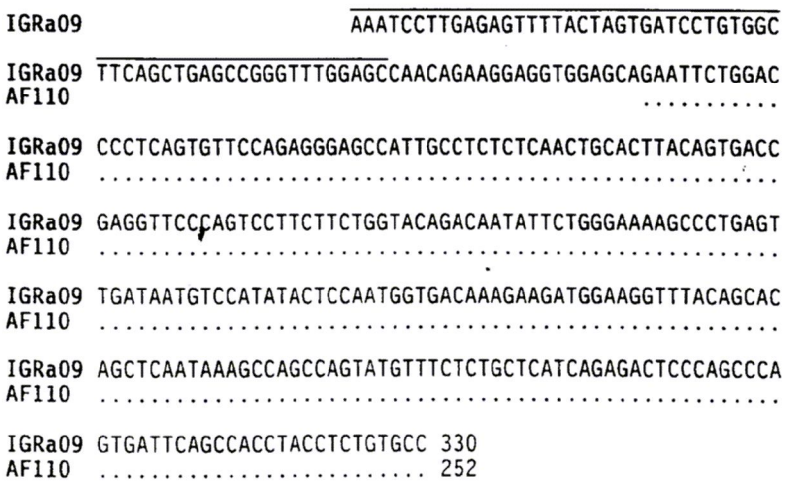
도면1a

Vα1



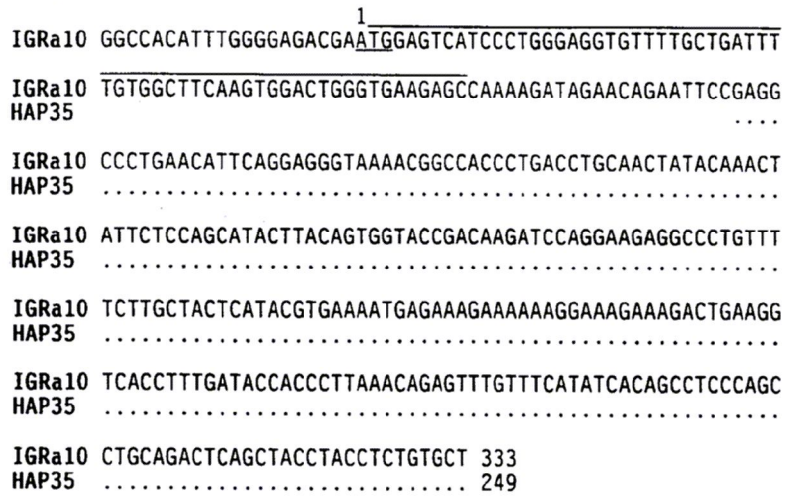
도면1b

Vα2



도면1c

Vα5



도면1d

Vα7

```
                                1
                IGRa11 CTCGTGGTATCCTGCAG-
CAGATGTGGGGAGTTTTCCTTCTTTATGTTTCCATGA
HAP12                          ..................................

IGRa11 AGATGGGAGGCACTACAGGACAAAACATTGACCAGCCCACTGAGATGACAGCTA
HAP12  ..................................................

IGRa11 CGGAAGGTGCCATTGTCCAGATCAACTGCACGTACCAGACATCTGGGTTCAACG
HAP12  ..................................................

IGRa11 GGCTGTTCTGGTACCAGCAACATGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTGTCTTACA
HAP12  ..................................................

IGRa11 ATGTTCTGGATGGTTTGGAGGAGAAAGGTCGTTTTTCTTCATTCCTTAGTCGGT
HAP12  ..........................

IGRa11 CTAAAGGGTACAGTTACCTCCTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGACTCTGCCT
HAP12

IGRa11 CTTACCTCTGTGCT 318
HAP12                 222
```

도면1e

Vα22

```
                                1
IGRa12 ATTTGGGTAACACACTAAAGATGAACTATTCTCCAGGCTTAGTATCTCTGATAC

IGRa12 TCTTACTGCTTGGAAGAACCCGTGGAGATTCAGTGACCCAGATGGAAGGGCCAG

IGRa12 TGACTCTCTCAGAAGAGGCCTTCCTGACTATAAACTGCACGTACACAGCCACAG

IGRa12 GATACCCTTCCCTTTTCTGGTATGTCCAATATCCTGGAGAAGGTCTACAGCTCC

IGRa12 TCCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGACAAGGGAAGCAACAAAGGTTTTGAAGCCA
AC9                            ..................................

IGRa12 CATACCGTAAAGAAACCACTTCTTTCCACTTGGAGAAAGGCTCAGTTCAAGTGT
AC9    ..................................................

IGRa12 CAGACTCAGCGGTGTACTTCTGTGCT  330
AC9    ..........................  113
```

도면2

```
                                                    F  G    G  T
IGRJa01G GGTTATTGCAATAGCACTAAAGACTGTGTAACACCAATGCAGGCAAATCAACCTTTGGGGATGGGACTACGCTCACTGTGAAGCCA

IGRJa02G GGTTTTTGTAAAAGAATGAGCCATTGTGGATAGGCTTTGGGAATGTGCTGCATTGCGGGTCCGGCACTCAAGTGATTGTTTTACCA


IGRJa04                          TAGATACTGGAGGCTTCAAAACTATCTTTGGAGCAGGAACAAGACTATTTGTTAAAGCA

IGRJa05                           CCTAACTGGGGCAAACAACGTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTCTTCCC

IGRJa06                         ATGGAGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTTGGAAAAGGCACTAAACTCTCTGTTAAACCA

IGRJa07                              GGAGCCAATAGTAAGCTGACATTTGGAAAAGGAATAACTCTGAGTGTTAGACCA

IGRJa08                            CTGGTGGCTACAATAAGCTGATTTTTGGAGCAGGGACCAGGCTGGCTGTACACCCA

IGRJa09                                  TGGAAACAAGCTGGTCTTTGGCGCAGGAACCATTCTGAGAGTCAAGTCC
```

도면3

서열 동정 번호1. 서열동정번호 2.서열 동정 번호 3. 서열동정 번호 4. 서열 동정 번호5.



도면4

