PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets [5] : C12N 15/12, 15/63, C12P 21/08 A61K 37/02, 39/395, G01N 33/577 C12Q 1/68, C07K 15/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/13949
		(43) Date de publication internationale: 20 août 1992 (20.08.92)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00111

(22) Date de dépôt international: 7 février 1992 (07.02.92)

(30) Données relatives à la priorité:
91/01487 8 février 1991 (08.02.91) FR
91/04527 12 avril 1991 (12.04.91) FR

(71) Déposant *(pour tous les Etats désignés sauf US):* ROUSSEL-UCLAF [FR/FR]; 35, boulevard des Invalides, F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(US seulement) :* HERCEND, Thierry [FR/FR]; 15, rue Charles VII, F-94130 Nogent-sur-Marne (FR). TRIEBEL, Frédéric [FR/FR]; 36, rue Perronet, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). ROMAN-ROMAN, Sergio [FR/FR]; 42, rue Dareau, F-75014 Paris (FR). FERRADINI, Laurent [FR/FR]; 6, rue Léopold-Robert, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataire: BOURGOUIN, André; Roussel-UCLAF, 111, route de Noisy - B.P. 9, F-93230 Romainville (FR).

(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR ALPHA CHAIN VARIABLE REGIONS IN HUMAN LYMPHOCYTE RECEPTORS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES REGIONS VARIABLES DE CHAINES ALPHA DES RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES HUMAINS AINSI QUE LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Novel nucleotide sequences coding for alpha chain variable regions in human T lymphocyte receptors, corresponding peptide segments and diagnostic and therapeutic applications thereof.

(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, les segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**FI**	Finlande	**ML**	Mali
AU	Australie	**FR**	France	**MN**	Mongolie
BB	Barbade	**GA**	Gabon	**MR**	Mauritanie
BE	Belgique	**GB**	Royaume-Uni	**MW**	Malawi
BF	Burkina Faso	**GN**	Guinée	**NL**	Pays-Bas
BG	Bulgarie	**GR**	Grèce	**NO**	Norvège
BJ	Bénin	**HU**	Hongrie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**IE**	Irlande	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**IT**	Italie	**RU**	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	**JP**	Japon	**SD**	Soudan
CG	Congo	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SE**	Suède
CH	Suisse			**SN**	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	**KR**	République de Corée	**SU**	Union soviétique
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LK**	Sri Lanka	**TG**	Togo
DE	Allemagne	**LU**	Luxembourg	**US**	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	**MC**	Monaco		
ES	Espagne	**MG**	Madagascar		

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES REGIONS VARIABLES DE CHAINES ALPHA DES RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES HUMAINS AINSI QUE LEURS APPLICATIONS

La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléotidiques codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des cellules T, les segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.

Il est connu que les récepteurs reconnaissant les antigènes à la surface des lymphocytes T matures (désignés ci-après récepteurs des cellules T) possèdent une structure ayant une certaine analogie avec celles des immunoglobulines. Ainsi, ils comprennent des structures hétérodimériques comportant des chaînes glycoprotéiques α et β ou des chaînes glycoprotéiques γ et δ (voir Meuer et al. (1), Moingeon et al. (2), Brenner et al. (3), Bank et al. (4)).

Le répertoire des récepteurs des cellules T doit pouvoir faire face à l'immense diversité des déterminants antigéniques. Ceci est obtenu par recombinaison génétique des différents segments discontinus des gènes qui codent pour les différentes régions structurales des récepteurs des cellules T. Ainsi, les gènes comprennent des segments V (segments variables), éventuellement des segments D (segments de diversité), des segments J (segments de jonction) et des segments C (segments constants). Pendant la différenciation des cellules T, des gènes spécifiques sont créés par recombinaison des segments V, D et J pour les locus β et δ et des segments V et J pour les locus α et γ. Ces combinaisons spécifiques ainsi que l'appariement des deux chaînes créent la diversité combinatoire. Cette diversité est fortement amplifiée par deux mécanismes supplémentaires, à savoir la réunion imprécise des segments V-D-J ou V-J et l'addition de nucléotides correspondant à la région N (Davis et al. (5)).

On connaît déjà un certain nombre de segments géniques V. Ces segments ont été groupés en sous-familles en fonction de

la similarité des séquences. Par définition, les segments qui présentent plus de 75 % de similarité dans la séquence nucléotidique ont été considérés comme des membres de la même sous famille (Crews et al. 6)). Les segments géniques Vα connus ont ainsi été classés en 22 sous familles dont 14 avec un seul membre (voir Concannon et al. (7), Kimura et al. (8), Wilson et al. (9)).

Par ailleurs, environ 60 segments géniques Jα ont été décrits (9).

On a par ailleurs décrit récemment dans WO 90/06758 des anticorps monoclonaux dirigés contre des segments spécifiques des parties variables des récepteurs des cellules T, notamment des chaînes β et δ. Ces anticorps monoclonaux sont utiles non seulement comme outils de diagnostic mais également comme outils thérapeutiques, par exemple vis-à-vis de l'arthrite rhumatoïde.

On a également décrit l'utilisation de peptides synthétiques correspondant à des régions variables des chaînes α ou β dans le traitement des maladies auto-immunes (23 et 24).

Il est connu par ailleurs qu'il existe des variations d'un individu à un autre dans l'expression des différents segments variables du récepteur T chez l'homme (27 et 28).

La présente invention vise à enrichir le répertoire des segments géniques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des cellules T en fournissant d'une part de nouveaux segments géniques Vα appartenant à des nouvelles sous familles ou appartenant à des sous-familles dont on connaît déjà au moins un membre et d'autre part, de nouveaux segments géniques Jα.

La présente invention a ainsi pour objet des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque :

a - des segments Vα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 11, et

b - des segments Jα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20,

et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

La présente invention a plus particulièrement pour objet :

- des séquences codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 10, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

- des séquences codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Jα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

Par l'expression "et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides", on englobe les allèles qui présentent jusqu'à 8 nucléotides de différence, mais le plus souvent 1 ou 2 nucléotides de différence ou qui peuvent différer par la délétion ou l'addition d'un ou deux codons.

La présente invention a également plus particulièrement pour objet :

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides,

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lympho-cytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vα correspondant à l'une des séquences

1 à 200 de SEQ ID N° 1

1 à 467 de SEQ ID N° 6

1 à 77 de SEQ ID N° 7

1 à 151 de SEQ ID N° 8

291 à 386 de SEQ ID N° 9

1 à 260 de SEQ ID N° 10

et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides,

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie de la séquence nucléotidique correspondant à la SEQ ID N° 11 et qui comprennent le nucléotide 108,

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Jα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20 et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

Par l'expression "séquences nucléotidiques correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques", on désigne aussi bien les séquences complètes que des fragments de ces séquences y compris des fragments courts (oligonucléotides) qui trouvent des applications en tant que sondes (comportant généralement au moins 10 nucléotides) ou en tant qu'amorce (comportant généralement au moins 15 nucléotides). D'une manière générale, l'invention englobe l'ensemble des nouveaux oligonucléotides qui sont des fragments des séquences Vα et Jα selon l'invention.

Quant aux séquences qui diffèrent par un ou deux nucléotides, elles correspondent à des variations que l'on a observé expérimentalement lors de la détermination de la séquence nucléotidique de plusieurs ADNc.

La présente invention a également pour objet les peptides codés par des séquences nucléotidiques selon l'invention ainsi que les allèles et les dérivés de ceux-ci qui possèdent la même fonction.

La présente invention a également pour objet les peptides constitués par ou comprenant une séquence peptidique codée par tout ou partie de la séquence 108 à 364 de SEQ ID N° 11.

D'une manière générale, la présente invention englobe les

peptides constitués par ou comprenant une séquence peptidique codée par les séquences nucléotidiques selon l'invention ainsi que les fragments de ces peptides. Elle englobe également les peptides qui diffèrent de ceux-ci d'un ou plusieurs amino-acides et qui possèdent la même fonction. Ces peptides peuvent correspondre à des modifications telles que celles connues avec les mutéines ou à des variations allèliques. Il a été en effet montré en particulier que certains segments géniques codant pour des régions variables de chaînes du récepteur T chez l'homme étaient soumis à un phénomène de polymorphisme génétique appelé variation allèlique (25). La présente invention englobe les peptides provenant de ce phénomène.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont été obtenues selon les étapes suivantes :

- isolement des ARN de lymphocytes périphériques d'un individu ;
- obtention de l'ADN complémentaire à l'aide de reverse transcriptase et d'une amorce A spécifique de la région Cα (SEQ ID N° 21) ;
- amplification génique (par Anchored Polymerase Chain Reaction ou A-PCR) à l'aide d'une ADN polymérase, d'une amorce poly C (SEQ ID N° 22) et d'une amorce B spécifique de la région Cα (SEQ ID N° 23) ;
- nouvelle amplification par A-PCR à l'aide de ADN polymérase et d'une amorce C spécifique de la région Cα (SEQ ID N° 24) ;
- insertion dans un vecteur plasmidique ;
- transformation d'un hote bactérien avec le vecteur recombinant ;
- criblage des colonies bactériennes recombinantes avec un oligonucléotide D spécifique de Cα (SEQ ID N° 25) marqué ;
- extraction des plasmides des colonies positives,
- et séquençage des fragments d'ADN contenant la région Cα.

La présente invention peut être reproduite notamment par amplification génique bispécifique (polymerase chain reaction ou PCR) en partant des lymphocytes périphériques expriment les

ARNm incluant les segments variables ou jonctionnels correspondant aux séquences ID N° 1 à 13 et 15 à 20 de l'invention ou alternativement en appliquant cette technique de PCR à de l'ADN génomique de toute cellule somatique d'un individu pris au hasard. L'invention peut aussi bien être reproduite en préparant les séquences géniques ci-dessus par synthèse chimique d'oligonucléotides.

Les peptides selon l'invention peuvent être obtenus par synthèse peptidique classique. Ils peuvent être également obtenus par application des techniques connues de génie génétique comprenant l'insertion d'une séquence d'ADN codant pour un peptide selon l'invention dans un vecteur d'expression tel qu'un plasmide et la transformation de cellules avec ce vecteur d'expression.

La présente invention a donc également pour objet des plasmides et des vecteurs d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour un peptide selon l'invention ainsi que des hotes transformés avec ce vecteur.

La présente invention a également pour objet des anticorps, et notamment des anticorps monoclonaux, dirigés contre un déterminant antigénique appartenant à ou comprenant un peptide selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par toutes les techniques qui permettent la production de molécules d'anticorps à partir de culture de lignée cellulaire. Ces techniques comprennent les différentes techniques utilisant des hybridomes.

La production d'anticorps peut être obtenue chez l'animal par immunisation des animaux par injection des peptides ou des fragments selon l'invention, qu'ils soient naturels, recombinants ou synthétiques, éventuellement après couplage à un agent immunogène tel que l'anatoxine tétanique, ou encore par injection des lymphocytes T humains exprimant les séquences correspondantes à leur surface, y compris des cellules recombinantes transfectées avec les séquences codantes correspondantes.

La présente invention a également pour objet des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre

les polypeptides selon l'invention.

La présente invention englobe également les fragments et les dérivés d'anticorps monoclonaux selon l'invention qui sont réactifs avec des régions variables définies des récepteurs des cellules T. Ces fragments sont notamment les fragments F(ab')2 qui peuvent être obtenus par clivage enzymatique des molécules d'anticorps avec la pepsine, les fragments Fab' qui peuvent être obtenus par réduction des ponts disulfure des fragments F(ab')2 et les fragments Fab qui peuvent être obtenus par clivage enzymatique des molécules d'anticorps avec la papaïne en présence d'un agent réducteur. Ces fragments peuvent être également obtenus par génie génétique.

Les dérivés d'anticorps monoclonaux sont par exemple des anticorps ou des fragments de ces anticorps auxquels sont liés des marqueurs tel qu'un radioisotope. Les dérivés d'anticorps monoclonaux sont également des anticorps ou des fragments de ces anticorps auxquels sont liées des molécules thérapeutiquement actives, notamment des composés cytotoxiques.

Les produits de l'invention trouvent plusieurs types d'application dans le domaine du diagnostic et dans le domaine de la thérapeutique.

1 - Les applications dans le domaine du diagnostic

Les oligonucléotides contenus dans les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisés pour constituer des sondes de détection (généralement au moins 10 nucléotides) capables de s'hybrider à une région variable de chaîne α ou des amorces pour l'amplification d'ADN (comportant généralement au moins 15 nucléotides et de préférence au moins 17 nucléotides) capables de se lier à une séquence à amplifier.

Les oligonucléotides trouvent ainsi une application dans le diagnostic des désordres immunitaires en détectant la présence de séquences d'acides nucléiques homologues d'un gène codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des cellules T dans l'ARNm d'un échantillon d'un patient. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour établir un lien entre l'expression des gènes des cellules T et une maladie. Ces méthodes comprennent :

a - la production et l'analyse de banques d'expressions

d'ADNc obtenu à partir de cellules T liées à la maladie pour déterminer la fréquence de gènes dominants ;

b - l'analyse d'échantillons d'ADN génomique par Southern blot pour déterminer s'il existe des polymorphismes génétiques ou des réarrangements des gènes codant pour les récepteurs des cellules T ;

c - l'analyse d'échantillons par obtention d'ADNc, amplification par PCR et hybridation avec des sondes marquées ;

d - l'hybridation in situ de cellules T sans culture préalable des cellules T.

Les amorces trouvent une application dans des réactions de PCR dans une méthode telle que celle définie sous c ci-dessus.

Les anticorps monoclonaux, les fragments ou les dérivés de ces anticorps selon l'invention, notamment les anticorps anti Vα, peuvent être utilisés pour étudier des réponses immunitaires de type T, par exemple dans le domaine des maladies auto-immunes de la cancérologie, de l'allergie, de la transplantation et des maladies infectieuses. En particulier, le répertoire des différents segments variables α du récepteur T peut être étudié, qu'il s'agisse de cellules T du sang ou des tissus. D'une manière générale, les techniques utilisées peuvent être des méthodes in vitro ou in vivo.

Dans les méthodes in vitro, les échantillons utilisés peuvent être des échantillons de fluides corporels ou des échantillons de tissus. Les techniques utilisées peuvent inclure notamment la cytofluorimétrie de flux pour analyser les lymphocytes T du sang ou des marquages par immunopéroxydase sur coupe anatomopathologique pour étudier les lymphocytes infiltrant les tissus.

Dans les méthodes in vivo, les anticorps, leurs fragments ou leurs dérivés sont administrés par les voies habituelles, par exemple par la voie intraveineuse, et l'on détecte les liaisons immunospécifiques. Ceci peut être obtenu par exemple dans le cas où l'on utilise un anticorps marqué par un radioisotope.

2 - Les applications dans le domaine thérapeutique

Les oligonucléotides contenus dans les séquences nucléo-

tidiques selon l'invention peuvent être utilisés en thérapeutique comme oligonucléotides antisens. On sait en effet qu'il est possible in vitro d'inhiber l'expression d'un gène transcrit dans des lymphocytes humains en incubant ces lymphocytes avec un oligonucléotide antisens spécifique du gène en question (26). Ces oligonucléotides antisens comprennent généralement au moins 10 et, de préférence, au moins 16 nucléotides. Ces oligonucléotides antisens peuvent être notamment les séquences inversées et complémentées correspondant aux 20 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction (ATG). L'intérêt d'une utilisation in vitro d'oligonucléotides antisens spécifique d'un segment génique Vα ou Jα est d'abolir (ou de diminuer fortement) l'expression d'un récepteur T comprenant ce segment Vα ou Jα et donc d'obtenir un phénomène de délétion clonale au niveau de la réactivité spécifique des lymphocytes T. Les oligonucléotides antisens peuvent non seulement être utilisés in vitro sur des lymphocytes T humains qui sont ensuite réinjectés, mais également in vivo par injection locale ou systémique de préférence après modifications pour augmenter la stabilité in vivo et la pénétration à l'intérieur des lymphocytes T de ces oligonucléotides.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention, notamment les anticorps anti Vα, peuvent être utilisés pour moduler le système immunitaire. C'est ainsi que les anticorps peuvent être administrés pour bloquer l'interaction des cellules T effectrices avec leur antigène spécifique. On peut également administrer des anticorps anti-récepteurs T liés par exemple à une molécule cytotoxique ou à un radioisotope de façon à obtenir une délétion clonale, grâce à la fixation spécifique sur une chaîne α d'un récepteur de cellule T. Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être utilisés en thérapeutique à des concentrations faiblement mitogéniques de façon à activer de façon spécifique certains sous-ensembles de cellules T ou peuvent être utilisés à des concentrations beaucoup plus élevées pour se fixer aux récepteurs concernés et ainsi marquer ces sous-ensembles en vue de leur élimination par le système réticulo-endothélial. Un critère important pour

le traitement d'une maladie est l'aptitude à moduler des sous-ensembles de cellules T liées à une maladie. La nature exacte de cette modulation thérapeutique, à savoir bloquer ou supprimer un sous-ensemble particulier de cellules T ou au contraire stimuler et activer un sous-ensemble particulier, dépendra de la maladie en question et du sous-ensemble spécifique de cellules T concerné.

Ce type de traitement présente un avantage par rapport aux traitements actuels utilisant des anticorps tels que le traitement par des anticorps anti CD3 chez des patients ayant subi une transplantation rénale et ayant un problème de rejet, étant donné que grâce à l'invention il n'y aura pas de modulation de la totalité de la population des cellules T mais seulement du sous-ensemble de cellules T exprimant la sous-famille α particulière de récepteurs de cellules T.

Par ailleurs, la réponse des cellules T étant souvent oligoclonale, il convient généralement d'utiliser en thérapeutique des "cocktails" de plusieurs anticorps.

On peut en outre utiliser les anticorps anti Vα pour sélectionner in vitro des lymphocytes T, par exemple par passage sur une colonne contenant des billes portant l'anticorps. Cette séparation de certains lymphocytes T peut être utilisée en vue d'une mise en culture de ces lymphocytes avant de les réinjecter au patient.

En outre, on peut utiliser en thérapeutique tout ou partie des séquences peptidiques selon l'invention, c'est-à-dire les séquences peptidiques codées par les séquences nucléotidiques selon l'invention ou les fragments de ces séquences (comprenant généralement au moins 8 à 10 amino-acides). Ces séquences ou ces fragments, administrés à l'homme ou à l'animal, peuvent agir en tant que leurre, c'est-à-dire qu'ils vont se fixer sur l'épitope porté par l'antigène néfaste et empêcher la réaction des cellules T normales avec l'antigène, en empêchant ainsi le développement d'une maladie agressive contre les déterminants du soi. Ils peuvent aussi être utilisés en tant qu'immunogènes dans la fabrication de vaccins (éventuellement après couplage à des porteurs protéiques).

On décrira ci-après plus en détail la présente invention, en se reportant aux Fig. annexées sur lesquelles :

- les Fig. 1 A à E donnent en alignement à la fois une séquence Vα connue et une séquence partielle d'une extension selon l'invention pour les séquences respectives SEQ ID N° 6 à 10, notées IGRa 08 à IGRa 12. Sur ces Figures, la numérotation des nucléotides commence au codon ATG d'initiation (qui est souligné). Les points indiquent les nucléotides identiques. Les séquences qui sont supposées être des séquences leader sont surlignées.

- La Fig. 2 donne en alignement les nouvelles séquences Jα (SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20) notées IGRJa 01, 02 et 04 à 09. Dans ces séquences les signaux de recombinaison de la lignée germinale sont soulignés. Les aminoacides correspondant aux codons hautement conservés sont marqués au-dessus des séquences. Les codons correspondant à une substitution en une position d'un aminoacide conservé sont doublement soulignés.

- La Fig. 3 donne les analyses par Southern blot de l'ADN génomique traité par une enzyme de restriction en utilisant des sondes spécifiques des séquences SEQ ID N° 1 à 5. Les enzymes de restriction utilisées sont EcoRI (colonne R), Hind III (colonne H) et Bam III (colonne B). Sur cette Figure, les triangles marquent la position des fragments d'ADN s'hybridant de façon spécifique avec Cα.

- La Fig. 4 représente la détection par autoradiographie des transcrits amplifiés des chaînes α du TCR exprimé par les lymphocytes périphériques d'un individu sain et du contrôle β-actine, co-amplifié.

I - <u>Obtention de l'ADNc et amplification par PCR</u>

On a utilisé comme source d'ARN des lymphocytes périphériques d'un individu. L'ARN total a été préparé selon la méthode à l'isothiocyanate de guanidinium et au chlorure de césium (Chirgwin (10)) ou selon la méthode en une seule étape par extraction avec de l'isothiocyanate de guanidinium, du phénol et du chloroforme (Chomczynski (11)).

Le premier brin d'ADNc a été synthétisé dans un volume

final de 50 microlitres à une température de 42°C pendant 1 heure en utilisant 5 microgrammes d'ARN total, la reverse transcriptase et une amorce A spécifique de la région Cα constituée par la séquence 5'-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG (SEQ ID N° 21). Ce matériau a été ensuite purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'acétate d'ammonium. Après sélection d'une fraction 0,45/1 kb sur gel d'agarose, on a réalisé l'addition d'une extrémité dG sur l'hétéro duplex ARN/ADNc dans un tampon d'addition CoCl2 avec 14 unités de terminal désoxynucléotidyl transférase (Tdt) pendant 30 mn à 37° C. La réaction a été stoppée par maintien à 70° C pendant 10 mn. NaOH 1N (1/3 de volume) a été ajouté et l'échantillon a été mis à incuber à 50° C pendant 1 heure pour hydrolyser l'ARN puis a été neutralisé avec du Tris HCl 2M pH 8 et HCl 1N. Après extraction par un mélange phénol/ chloroforme le premier brin d'ADNc à extrémité G a été précipité avec de l'éthanol et soumis à une amplification en utilisant la technique PCR (Polymerase Chain Reaction décrite par Saiki et al. (12)) dans un volume final de 100 microlitres contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-Cl pH 8.3, 1,5 mM de MgCl2, 0,1 % (poids/ volume) de gélatine, 200 micromoles de dNTP, 2,5 unités de Taq polymérase et 100 picomoles de deux amorces. Les deux amorces utilisées sont, d'une part, une amorce poly-C (5'-GCATGCGCGCGG CCGCGGAGG-14C) (SEQ ID N° 22) décrite par Loh et al. (13) ainsi qu'une amorce B spécifique de la région Cα (5'-GTCCATAGACCTC ATGTCCAGCACAG) (SEQ ID N° 23).

On effectue 25 cycles d'amplification suivis par une période de 15 mn d'élongation finale à 72° C. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 92° C pendant 1 minute, une étape d'hybridation à 55° C pendant 2 mn et une période d'élongation à 72° C pendant 4 mn. Les produits amplifiés sont ensuite précipités par de l'éthanol, remis en suspension dans de l'acétate de sodium 30 mM pH5, NaCl 50 mM, ZnCl2 1 mM, glycérol 5 % en volume, et 1/10 de ce matériau est purifié en fonction de la taille sur un gel d'agarose à bas point de fusion 1 %.

Une seconde phase d'amplification est ensuite réalisée directement sur approximativement 10 % de la bande contenant

l'agarose en suivant les mêmes conditions que précédemment, sauf qu'on utilise comme amorce C spécifique de la région Cα l'amorce 5'-ATACACATCAGAATTC TTACTTTG (SEQ ID N° 24). Le mélange de réaction est ensuite précipité par l'éthanol et remis en suspension dans 60 µl H2O.

II - Clonage et séquençage des ADNc

1/3 du produit de la seconde amplification est mis à digérer avec Sac II, séparé sur gel d'agarose 1 % et purifié par adsorption sur des billes de verre. Le matériau est inséré dans le vecteur Bluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, U.S.A.) et les recombinants obtenus sont utilisés pour transformer des souches XL1-bleu de E. Coli (Stratagene). Après dépôt en présence de X-gal et IPTG, on fait un test sur les colonies blanches en utilisant une technique "dot blot" et comme sonde un troisième oligonucléotide spécifique de la région Cα (5'-GTCACTGG ATTTAGAGTCT) (SEQ ID N° 25) marqué au ^{32}P. On extrait l'ADN plasmidique des colonies positives et on séquence sur les deux brins par le procédé par terminaison de chaîne didésoxy (Sanger et al. (14)) avec de la Sequenase 2,0 (United States Biochemicals, Cleveland, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fournisseur. Sauf pour la séquence SEQ ID N° 5, toutes les séquences nucléotidiques ont été déterminées sur les deux brins en utilisant au moins deux clones distincts d'ADNc.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences publiées Vα et Jα en utilisant la méthode développée par Lipman et Pearson (15). Les codons de départ présumés ont été identifiés en recherchant la présence de la séquence consensus Kozak pour les sites d'initiation des traductions dans les cellules eucaryotes (Kozak (16)). La présence de séquences leader hydrophobes du côté N-terminal a été décelée par analyse de l'hydrophobicité selon la méthode décrite par Kyte (17).

III - Analyse par Southern blot

L'ADN a été extrait de la lignée cellulaire érythroleucémique humaine K562 et mis à digérer avec l'une des enzymes de restriction suivantes : EcoR I, BamH I ou Hind III. L'ADN (15 microgrammes) a été soumis à une électrophorèse sur agarose 0,7 % et a été transféré sur des membranes de Nylon comme décrit par Triebel et al. (18). Les hybridations ont été réalisées à 65° C avec 6 x SSC, 0,5 % de SDS, 5 x Denhardt's et 100 microgrammes d'ADN de sperme de saumon dénaturé pendant 16 heures. Les membranes ont été lavées à 65° C avec 2 x SSC, 0,2 % de SDS.

On a utilisé comme sondes Vα spécifiques des sondes obtenues par amplification d'ADNc V-J-C (> 500 bp) comprenant des fragments Vα correspondant aux séquences SEQ ID N° 1 à 5 en utilisant comme amorce l'amorce poly-C et l'amorce C. Les sondes ont été purifiées sur gel d'agarose 1 %. Des sondes d'ADN marquées au ^{32}P ont été préparées à partir des fragments purifiés sur agarose par la méthode de Feinberg (19).

IV - Résultats

En utilisant la méthode A-PCR, 308 ADNc qui hybrident avec la sonde Cα ont été clonés, puis séquencés. Parmi ceux-ci, 172 ADNc correspondent à des régions variables V-J-Cα uniques.

Les séquences Vα et Jα de l'invention figurent dans la liste des séquences respectivement sous les SEQ ID N°1 à 11 et SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20. Les séquences SEQ ID N° 2 à 5 correspondent à des sous familles nouvelles (dénommées respectivement Vα 25, Vα 26, Vα 27 et Vα 29) tandis que les séquences SEQ ID N° 1 et 6 à 11 correspondent à des extensions de segments Vα connus.

1. Séquences Vα correspondant à des sous-familles nouvelles

Les analyses par Southern blot d'ADN de lignée germinale soumis à une digestion par les endonucléases, en utilisant des sondes V-J-Cα comprenant des fragments Vα correspondant aux séquences SEQ ID N° 2 à 5 ont été réalisées dans des conditions d'hybridation de "faible stringence" pour identifier le

nombre de segments géniques Vα appartenant à chaque famille et pour caractériser des fragments de restriction d'ADN portant ces segments géniques Vα. Des résultats représentatifs sont reportés sur la Figure 3.

Ces analyses montrent que la sous famille correspondant à la séquence SEQ ID N° 3 comprend au moins deux segments géniques alors que les autres séquences (SEQ ID N° 2, N° 4 et N° 5) correspondent probablement à des membres uniques.

Les tailles des fragments de restriction de l'ADN germinal sont les suivantes :

SEQ ID N° 2 : EcoR I 2,2 kb, Hind III 4,8 et 5,7 kb, BamH I 25 kb

SEQ ID N° 3 : EcoR I 4,6 et 7,5 kb, Hind III 4,2 et 6,4 kb, BamH I 23 et 4,5 kb

SEQ ID N° 4 : EcoR I 7,6 kb, Hind III 18 kb, BamH I 9 et 0,9 kb

SEQ ID N° 5 : ECOR I 5,9 et 4,8 kb, Hind III 6,6 kb, BamH I 6,5 kb.

2. Séquences correspondant à des extensions de séquences Vα connues

SEQ ID N° 1 (IGR a 02) correspond à une extension du côté 5' de la séquence LINV (171 bp)(Mengle-Gaw (20)) : Cette séquence définit la sous-famille dénommée provisoirement Vα w24.

SEQ ID N° 6 (IGR a 08) : Cette séquence correspond à une extension du côté 5' de la séquence du clone Vα1 AE11 (Klein et al. (21)). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Figure 1A.

SEQ ID N° 7 (IGR a 09) : Cette séquence correspond à une extension codant pour l'extrémité NH2 terminale de la séquence Vα2 AF110 (Klein déjà cité). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Fig. 1B. La séquence ID N° 7 correspond à une séquence consensus. On a observé en position 206 l'existence d'un T au lieu d'un C.

SEQ ID N° 8 (IGR a 010) : Cette séquence correspond à une extension de la région 5' du clone Vα HAP35 (Yoshikai (22)). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Fig. 1C. La séquence ID N° 8 correspond à une séquence consensus. On a

observé en position 307 l'existence d'un G au lieu d'un A et en position 360 l'existence d'un T au lieu d'un C.

SEQ ID N° 9 (IGR a 11) : Cette séquence correspond à une extension du côté 3' de la séquence Vα7 HAP12 (Yoshikai déjà cité). L'alignement des séquences est représenté sur la Fig. 1D. La séquence ID N° 9 correspond à une séquence consensus. On a observé en position 86 l'existence d'un C au lieu d'un T.

SEQ ID N° 10 (IGR a 12) : Cette séquence comprend la région codante complète d'un gène de la sous famille Vα 22 qui précédemment avait été identifié par la séquence partielle (113 bp) AC9 (Klein déjà cité). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Fig. 1E.

SEQ ID N° 11 (IGRa 13) : Cette séquence correspond pour une partie aux clones HAVT 32 et HAVT 35 (appartenant à la sous-famille Vα 16 (8) et qui ont été décrits comme des pseudo-gènes. En fait, par suite de l'addition d'un nucléotide en position 108, la SEQ ID N° 11 code pour une région variable originale d'un récepteur des lymphocytes T. Par ailleurs, cette séquence est homologue d'une séquence HSTCAYM (Klein et al. (21)) pour la partie codante. Toutefois la séquence SEQ ID N° 11 est la seule qui soit complète et codante.

3. Séquences Jα

On a représenté sur la Fig. 2 l'ensemble des nouvelles séquences Jα. Parmi les 8 segments Jα, la plupart d'entre eux présentent une séquence d'aminoacides hautement conservée FGXGT des segments Jα comme décrit par Yoshikai déjà cité. Cependant, pour le segment IGRJa 07 le résidu thréonine est remplacé par un résidu isoleucine.

De plus, à la place du résidu phénylalanine, on a trouvé un résidu cystéine dans IGRJa 02G.

La présente invention vise également à fournir des oligonucléotides spécifiques des différentes sous-familles Vα, qui sont utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à ces différentes sous-familles Vα, en vue par exemple d'une étude de l'expression de certaines sous-familles Vα chez un patient et finalement d'un diagnostic des désordres immunitaires, comme indiqué plus haut.

L'expression prédominante de certaines sous-familles de Vα a déjà été étudiée à l'aide d'une gamme incomplète d'oligonucléotides. Ainsi, Nitta et al. (29) ont décrit l'expression prédominante des gènes Vα 7 dans les lymphocytes infiltrant les tumeurs. Par ailleurs, Sottini et al. (30) ont décrit chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde l'étude du répertoire des Vα.

La présente invention vise à fournir une gamme complète d'oligonucléotides permettant l'étude à la fois des sous-familles Vα connues et des nouvelles sous- familles Vα de l'invention et qui soient tout-à-fait spécifiques de chaque sous-famille. Les oligonucléotides ont donc été choisis et synthétisés dans ce but et au besoin des modifications de un ou deux nucléotides ont été introduites par rapport aux séquences naturelles pour réduire les réactivités croisées entre sous-familles.

La présente invention a ainsi également pour objet des oligonucléotides, utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes α des récepteurs de cellules T, choisis parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54.

La présente invention a également pour objet l'utilisation, comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes α des récepteurs de cellules T, d'oligonucléotides choisis parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de séquences nucléotidiques codant pour des segments Vα des récepteurs T ou d'ADNc correspondant aux produits de transcription de celles-ci, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) l'amplification de l'ADN avec au moins une paire d'amorces formée par un oligonucléotide choisi parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54 et un oligonucléotide appartenant au segment Cα, et

b) la détection des séquences amplifiées avec une sonde Cα.

L'oligonucléotide appartenant au segment Cα utilisé pour l'amplification peut être notamment choisi parmi les séquences

SEQ ID N° 55 et 56.

Pour contrôler l'efficacité de l'amplification, on opère avantageusement en présence d'une paire d'amorces contrôle et on détecte la séquence contrôle correspondante amplifiée à l'aide d'une sonde contrôle correspondante.

Cette paire d'amorces contrôle peut correspondre à deux segments Cβ, par exemple les amorces CβF et CβK correspondant aux séquences SEQ ID N° 61 et 62. On utilise alors une sonde de détection Cβ (correspondant par exemple à la séquence SEQ ID N° 63). Mais cette paire d'amorces peut être également constituée par deux amorces appartenant à la β-actine, notamment celles correspondant aux séquences SEQ ID N° 58 et 59. On utilise alors une sonde de détection correspondant à une séquence de la β-actine, telle que la séquence SEQ ID N° 60.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic pour la mise en oeuvre du procédé précédemment défini, qui comprend :

a) au moins un oligonucléotide choisi parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54,

b) une amorce Cα,

c) une sonde Cα.

Un tel kit contient avantageusement en outre:

d) une paire d'amorces contrôle,

e) une sonde contrôle.

Ce kit peut notamment comprendre :

a) l'ensemble des 29 oligonucléotides correspondant aux séquences SEQ ID N° 26 à 54,

b) une amorce Cα choisis parmi les séquences correspondant aux séquences SEQ ID N° 55 et 56,

c) une paire d'amorces contrôle pour la β-actine ayant une séquence correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 58 et 59,

d) une sonde Cα correspondant à la séquence SEQ ID N° 57,

e) une sonde contrôle pour la β-actine correspondant à la séquence SEQ ID N° 60.

Dans l'information donnée dans la liste des séquences pour les séquences 26 à 60, les séquences SEQ ID N° 26 à 47 correspondent à des séquences appartenant à des clones de

sous-familles connues Vα1 à Vα 22 (accessibles dans la base de données EMBL) ou à des séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

Les séquences SEQ ID N° 49, 50, 51, 52 et 54 correspondant à des séquences appartenant à des clones de nouvelles sous-familles de l'invention, correspondent à des sous-familles dénommées provisoirement Vα w24, Vα w25, Vα w26, Vα w27 et Vα w29 (w indiquant que la désignation est dans l'attente d'une désignation définitive).

Les séquences SEQ ID N° 48 et 53 correspondent à des séquences appartenant à des clones respectivement IGRa01 et IGRa06 de sous-familles connues mais n'ayant pas encore reçu de désignation définitive (respectivement Vα w23 et Vα w28) dont un élément membre a déjà été décrit (respectivement Hinkkanen A. et al. (31) et Bernard O. et al. (32)). La séquence complète de IGRa06 n'a pas encore été publiée.

Les séquences SEQ ID N° 55 et 56 sont deux exemples d'oligonucléotides qui peuvent être utilisés comme amorces Cα pour l'amplification.

La séquence SEQ ID N° 57 est la séquence d'une sonde Cα qui peut être utilisée pour la détection des ADN amplifiés.

Les séquences SEQ ID N° 58, 59 et 60 sont respectivement les séquences d'une paire d'oligonucléotides appartenant à la séquence de la β-actine qui peuvent être utilisées pour le contrôle de l'amplification et la séquence d'une sonde pour détecter les ADN amplifiés correspondants.

Dans la liste des séquences, la position indiquée est la position de l'extrémité 5' à compter du site d'initiation prédictif de la traduction ATG. Dans le cas où les séquences sont incomplètes (région 5' inconnue), la position (marquée avec un astérisque) est donnée par rapport au premier nucléotide de la séquence. Les nucléotides soulignés correspondent aux mésappa-riements introduits par rapport à la séquence naturelle.

Les oligonucléotides ont été synthétisés sur un synthétiseur d'ADN automatisé Applied Biosystems 381 A en utilisant la méthode au β-cyanoéthylphosphoramidite (Sinha et al. (33)) et en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Les

oligonucléotides ont été détritylés dans l'appareil, clivés du support et déprotégés par l'ammoniac (à 60° C pendant 5 heures). Les produits bruts ont été purifiés par chromatographie haute pression en phase inversée sur une colonne de μ-bondapak C 18 en utilisant un gradient d'acétonitrile (9 à 15 %) dans un tampon acétate de triéthylammonium 0,01 M à pH 5,5.

L'amplification effectuée en utilisant les amorces selon l'invention peut être notamment la technique par PCR (Polymerase Chain Reaction) telle que décrite par Saiki et al. (12) et brevets US-A-4 683 195, 4 683 202, 4 889 818.

Pour la PCR, on peut utiliser un ADN double brin que l'on dénature ou un ADNc obtenu à partir d'ARN à l'aide de réverse transcriptase comme mentionné plus haut.

L'agent de polymérisation est une ADN polymérase, notamment la Taq polymérase.

Généralement, le cycle d'amplification est répété 25 à 40 fois.

Les sondes que l'on utilise pour la détection des séquences amplifiées peuvent être obtenues par marquage d'oligonucléotides avec un isotope radioactif, ce qui conduit à une détection par autoradiographie, ou par couplage avec une enzyme telle que la peroxydase (système ECL Amersham), la phosphatase alcaline ou la β-galactosidase (système Tropix Ozyme), ce qui conduit à une détection par chimioluminescence.

L'exemple suivant illustre la mise en oeuvre du procédé de détection selon l'invention.

Les lymphocytes périphériques d'un individu sain ont été préparés par centrifugation sur un gradient de densité. L'ARN total a été extrait selon la méthode en une seule étape par extraction avec de l'isothiocyanate de guanidium, du phénol et du chloroforme (Chomczynski, 11). L'ADN complémentaire a été synthétisé dans un volume final de 20 μl à 42° C durant 1 heure en utilisant 1 à 5 μg d'ARN total, la réverse transcriptase et l'amorce Cα B (1,25 μM).

Le matériel obtenu a ensuite été chauffé à 95° C durant 3 minutes avant d'être soumis à une amplification selon la technique PCR en utilisant en parallèle chacune des amorces Vα

spécifique correspondant aux séquences SEQ ID N° 26 à 54 et l'amorce Cα B spécifique de la région Cα (SEQ ID N° 56). Cette amplification a été réalisée dans un volume final de 10 µl par tube contenant 50 mM de KCl, 10 mM de tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM de MgCl2 0,1 % (poids/ volume) de gélatine, 200 µM de dNTP, 0,25 unités de Taq polymérase et 0,25 µM de chaque amorce. Dans chaque tube, une amplification contrôle a été réalisée à partir de 25 mM d'un fragment d'ADN de β-actine de 877 paires de bases préparé par PCR et des amorces Act 1 et Act 2 (SEQ ID N° 58 et 59) spécifiques de l'actine. 30 cycles d'amplification ont été effectués suivis d'une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72° C. Chaque cycle comprenait une étape de dénaturation à 94° C pendant 1 minute, une étape d'hybridation à 65° C pendant 1 minute et une période d'élongation à 72° C pendant 1 minute.

Les produits obtenus ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %, transférés sur des membranes de nylon dans un tampon alcalin et hybridés simultanément avec les sondes oligonucléotides Cα C (SEQ ID N° 57) et Act 3 (SEQ ID N° 60) marquées au 32P par l'enzyme polynucléotidyl T4 kinase. L'hybridation a été réalisée à 42° C pendant 16 heures dans un tampon contenant 6 x SSC, 0,5 % SDS, 5 x Denhart's, 0,05 % PO4H2Na et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Les membranes ont ensuite été lavées avec du 6 x SSC, 20mM PO4H2Na, deux fois à température ambiante pendant 5 minutes et une fois à 50° C pendant 30 minutes puis autoradiographiées.

Les résultats sont montrés sur la figure 4.

Le contrôle d'actine (bande de 877 paires de bases) permet de vérifier l'amplification dans tous les puits. Il apparaît en-dessous de cette bande un signal spécifique dont la taille correspond à la taille des fragments amplifiés correspondants, chaque fragment ayant une longueur correspondant à la distance entre l'emplacement de l'oligonucléotide spécifique Vα et l'amorce Cα.

Chez l'individu testé, la Figure 4 met en évidence l'expression préférentielle de certains segments géniques définis par rapport à d'autres. Par exemple, les sous-familles

Vα 27, 28 et 29 sont moins bien représentées que les sous-familles Vα 2, 3 et 6.

REFERENCES :

1. Meuer, S.C., et al., J. Exp. Med. 1983. 157:705.
2. Moingeon, P., et al., Nature 1986a. 323:638.
3. Brenner, M.B., et al., Nature 1986. 322:145.
4. Bank, I., et al., Nature 1986. 322:179.
5. Davis, M.M., et al., Nature 1988.334:395.
6. Crews, S., et al., Cell 1981. 25:59.
7. Concannon, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986. 83:6598.
8. Kimura, N., et al., Eur. J. Immunol. 1987. 17:375.
9. Wilson, R.K., et al., Immunological Reviews 1988c. 101:149.
10. Chirgwin, J.M., et al., Biochemistry 1979. 18:5294.
11. Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 1987, 162:156.
12. Saiki, R.K., et al., Science 1988. 239:487.
13. Loh, E.Y., et al., Science 1989. 243:217.
14. Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977. 74:5463.
15. Lipman, D.J., et al., Science 1985. 227:1435.
16. Kozak, M., Nucl. Acids Res. 1984. 12:857.
17. Kyte, J., et al., R.F., J. Mol. Biol. 1982. 157:105.
18. Triebel, F., et al., J. Immun. 1988. 140:300.
19. Feinberg, A.P., et al., Anal. Biochem. 1983. 132:6.
20. Mengle-Gaw, L., et al., The EMBO Journal, 1987. 6:2273.
21. Klein, M.H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987. 84:6884.
22. Yoshikai, Y., et al., J. Exp. med. 1986. 164:90.
23. Naudenbark A., et al., Nature, 341, 541.
24. Janeway C., Nature, 341, 482.
25. Lin Y., J. Exp. Med., 171, 221.
26. Acha-Orbea H., EMBO Journal, 1990,9, 12, 3815.
27. Kappler J., Science, 244, 811
28. Choi, Y., PNAS, 86, 8941.

29. Nitta T. et al., Science 1990, 249, 672.

30. Sottini A. et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21, 461.

31. Hinkkanen A. et al., Immunogenetics, 1989, 29, 131.

32. Bernard O. et al., Oncogene, 1988, 2, 195.

33. Sinha N. et al., Nucleic Acids Res. 1984, 12, 4539.

LISTE DES SEQUENCES

I - INFORMATION GENERALE

(1) DEMANDEUR : Société dite ROUSSEL UCLAF

(2) TITRE DE L'INVENTION :

Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.

(3) NOMBRE DE SEQUENCES : 62

II - INFORMATION POUR SEQ ID N° 1

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 371 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 02

SEQUENCE Vα w24

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
        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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 2

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 400 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 03

SEQUENCE Vα w25

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                                                    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 CTC                                  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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 3

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 339 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 04

SEQUENCE Vα w26

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 4

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 335 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 05

SEQUENCE Vα w27

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 5

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 361 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 07

SEQUENCE Vα w29

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 6

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 569 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 08

SEQUENCE Vα 1

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                                                                TCAGTTTCTT  10

CTTCCTGCAG CTGGTTGAGT TCTTTCCAGA 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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 7

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 330 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

SEQUENCE CONSENSUS

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 09

SEQUENCE Vα 2

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 8

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 400 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

SEQUENCE CONSENSUS

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 10

SEQUENCE Vα 5

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                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
                110
```

X - INFORMATION POUR SEQ ID N° 9

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 386 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

SEQUENCE CONSENSUS

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 11

SEQUENCE Vα 7

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 10

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 383 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 12

SEQUENCE Vα 22

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 11

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 364 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 13

SEQUENCE Vα 16

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                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 GCC 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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 12

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 264 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 01

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 13

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 277 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 02

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 15

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 60 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 04

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 16

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 59 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 05

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 17

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 60 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 06

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 18

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 56 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 07

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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
                -                                              56
AGA CCA GA
Arg Pro
```

XX - INFORMATION POUR SEQ ID N° 19

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 57 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 08

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
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 - INFORMATION POUR SEQ ID N° 20

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 50 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULES : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 09

SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

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

                                                              50
TCC T
Ser
```

XXII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 21 à 25

TYPE OLIGONUCLEOTIDES

DESCRIPTION DES SEQUENCES

N° 21 A (5'-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG)

N° 22 poly C (5'-GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG-14C)

N° 23 B (5'-GTCCATAGACCTCATGTCCAGCACAG)

N° 24 C (5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG)

N° 25 D (5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT)

XXIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 26 à 63

TYPE OLIGONUCLEOTIDES

DESCRIPTION DES SEQUENCES

SEQ ID N°	Sequence	Type	Clone	Position
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	V12MA483	213
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'-TGGTTGTGCACGAGCGAGACACTG-3'	VαW28	IGRa06	95
54	5'-GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCG-3'	VαW29	IGRa07	210
55	5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG-3'	CαA		129

SEQ ID N°	Sequence	Type	Clone	Position
56	5'-GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT-3'	CαB		201
57	5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT-3'	CαC		57
58	5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGC-3'	Act 1	β-actine	1161
59	5'-GGCATCGTCACCAACTGGGACGAC-3'	Act 2	β-actine	261
60	5'-ACCACCACGGCGGAGCGGG-3'	Act 3	β-actine	642
61	5'-CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG-3'	CβF		135
62	5'-CCCACCCGAGGTCGCTGTG-3'	CβK		20
63	5'-TCTGCTTCTGATGGCTCAA-3'	CβC		58

REVENDICATIONS

1. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque :

a - des segments Vα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 11, et

b - des segments Jα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20

et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

2. Séquences selon la revendication 1 codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, corespondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 10,
et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

3. Séquences selon la revendication 1 codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Jα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20,
et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

4. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspon-dant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5,
et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

5. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspon-dant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vα correspondant à l'une des séquences

1 à 200 de SEQ ID N° 1
1 à 467 de SEQ ID N° 6
1 à 77 de SEQ ID N° 7
1 à 151 de SEQ ID N° 8
291 à 386 de SEQ ID N° 9
1 à 260 de SEQ ID N° 10

et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

6. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie de la séquence nucléotidique correspondant à la SEQ ID N° 11 et qui comprennent le nucléotide 108.

7. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléoti-diques choisies parmi l'un quelconque des segments Jα correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20 et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

8. Peptides codés par l'une quelconque des séquences nucléotidiques telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 7, ainsi que les allèles et les dérivés de ceux-ci qui possèdent la même fonction.

9. Peptides constitués par ou comprenant une séquence peptidique codée par tout ou partie de la séquence 108 à 364 de SEQ ID N° 11.

10. Vecteurs d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour l'un des peptides tel que défini à la revendication 8 ou à la revendication 9.

11. Hotes transformés avec un vecteur selon la revendication 10.

12. Anticorps dirigés contre un déterminant antigénique d'un des peptides définis à la revendication 8 ou à la revendication 9.

13. Anticorps selon la revendication 11 qui est un anticorps monoclonal ou un fragment de celui-ci.

14. Fragment Fab, Fab' ou F(ab')2 d'un anticorps monoclonal selon la revendication 13 et dérivés de celui-ci.

15. Dérivés d'un anticorps monoclonal ou d'un fragment de celui-ci selon la revendication 13 ou 14 auxquels sont liés un marqueur détectable et/ou au moins une molécule thérapeutique.

16. Hybridomes produisant un anticorps selon la revendication 13.

17. Composition de diagnostic comprenant un ou plusieurs anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de ceux-ci tels que définis à l'une quelconque des revendications 13 à 15.

18. Composition thérapeutique comprenant un ou plusieurs anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de ceux-ci tels que définis à l'une des revendications 13 à 15.

19. Composition selon la revendication 18 comprenant des dérivés contenant une molécule cytotoxique ou un radioisotope.

20. Composition thérapeutique comprenant au moins l'un des peptides définis à la revendication 8 ou à la revendication 9.

21. Composition thérapeutique comprenant des oligonucléotides antisens correspondant à l'une quelconque des séquences d'un segment Vα ou dans l'une quelconque des séquences d'un segment Jα telles que définies à l'une quelconque des revendications 4 à 7.

22. Utilisation, en tant qu'amorces pour l'amplification d'ADN, de séquences nucléotidiques d'environ au moins 17 nucléotides comprises dans l'une quelconque des séquences d'un segment Vα ou dans l'une quelconque des séquences d'un segment Jα telles que définies à l'une quelconque des revendications 4 à 7.

23. Utilisation, en tant que sonde de détection, de séquences nucléotidiques d'environ au moins 10 nucléotides comprises dans l'une quelconque des séquences d'un segment Vα ou dans l'une quelconque des séquences d'un segment Jα telles que définies à l'une quelconque des revendications 4 à 7.

24. Oligonucléotides, utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes α des récepteurs de cellules T, choisis parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54.

25. Utilisation, comme amorces pour l'amplification d'ADN

correspondant à des régions variables de chaînes α des récepteurs de cellules T, d'oligonucléotides selon la revendication 24.

26. Utilisation selon la revendication 25 d'oligonucléotides choisis parmi les séquences SEQ ID N° 49, 50, 51, 52 et 54.

27. Procédé de détection de séquences nucléotidiques codant pour des segments Vα des récepteurs T ou d'ADNc correspondant aux produits de transcription de celles-ci, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) l'amplification de l'ADN avec au moins une paire d'amorces formée par l'un des oligonucléotides selon la revendication 24 et un oligonucléotide appartenant au segment Cα, et

b) la détection des séquences amplifiées avec une sonde Cα.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'on effectue l'amplification en présence d'une paire d'amorces contrôle et la détection à l'aide d'une sonde contrôle.

29. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) au moins un oligonucléotide selon la revendication 24,

b) une amorce Cα,

c) une sonde Cα.

30. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) au moins un oligonucléotide selon la revendication 24,

b) une amorce Cα,

c) une paire d'amorce contrôle,

d) une sonde Cα,

e) une sonde contrôle.

31. Kit selon la revendication 29 ou la revendication 30 comprenant :

a) l'ensemble des 29 oligonucléotides selon la revendication 24,

b) une amorce Cα choisie parmi les séquences correspondant aux séquences SEQ ID N° 55 et 56,

c) une paire d'amorces contrôle pour la β-actine ayant une séquence correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 58 et 59,

d) une sonde Cα correspondant à la séquence SEQ ID N° 57,

e) une sonde contrôle pour la β-actine correspondant à la séquence SEQ ID N° 60.

Vα1

```
                                  1
IGRa08 AGTGTTTCCCTTGCTCAGCCATGCTCCTGGAGCTTATCCCACTGCTGGGGATAC

IGRa08 ATTTTGTCCTGAGAACTGCCAGAGCCCAGTCAGTGACCCAGCCTGACATCCACA

IGRa08 TCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCACTGGAGTTGAGATGTAACTATTCCTATGGGG

IGRa08 CAACACCTTATCTCTTCTGGTATGTCCAGTCCCCCGGCCAAGGCCTCCAGCTGC

IGRa08 TCCTGAAGTACTTTTCAGGAGACACTCTGGTTCAAGGCATTAAAGGCTTTGAGG
AE11                                                .................

IGRa08 CTGAATTTAAGAGGAGTCAATCTTCCTTCAACCTGAGGAAACCCTCTGTGCATT
AE11   ..............................T.....................

IGRa08 GGAGTGATGCTGCTGAGTACTTCTGTGCT 333
AE11   ............................. 102
```

FIG. 1A

Vα2

```
IGRa09                                AAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGC

IGRa09 TTCAGCTGAGCCGGGTTTGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGAC
AF110                                                ...........

IGRa09 CCCTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACC
AF110  ..................................................

IGRa09 GAGGTTCCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGT
AF110  ..................................................

IGRa09 TGATAATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCAC
AF110  ..................................................

IGRa09 AGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCCA
AF110  ..................................................

IGRa09 GTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCC 330
AF110  ........................... 252
```

FIG. 1B

Vα5

```
                                1
IGRa10 GGCCACATTTGGGGAGACGAATGGAGTCATCCCTGGGAGGTGTTTTGCTGATTT

IGRa10 TGTGGCTTCAAGTGGACTGGGTGAAGAGCCAAAAGATAGAACAGAATTCCGAGG
HAP35                                                    ....

IGRa10 CCCTGAACATTCAGGAGGGTAAAACGGCCACCCTGACCTGCAACTATACAAACT
HAP35  ..................................................

IGRa10 ATTCTCCAGCATACTTACAGTGGTACCGACAAGATCCAGGAAGAGGCCCTGTTT
HAP35  ..................................................

IGRa10 TCTTGCTACTCATACGTGAAAATGAGAAAGAAAAAAGGAAAGAAAGACTGAAGG
HAP35  ..................................................

IGRa10 TCACCTTTGATACCACCCTTAAACAGAGTTTGTTTCATATCACAGCCTCCCAGC
HAP35  ..................................................

IGRa10 CTGCAGACTCAGCTACCTACCTCTGTGCT 333
HAP35  ............................. 249
```

FIG. 1C

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
```

FIG. 1D

Vα22

```
                                  1
IGRa12 ATTTGGGTAACACACTAAAGATGAACTATTCTCCAGGCTTAGTATCTCTGATAC

IGRa12 TCTTACTGCTTGGAAGAACCCGTGGAGATTCAGTGACCCAGATGGAAGGGCCAG

IGRa12 TGACTCTCTCAGAAGAGGCCTTCCTGACTATAAACTGCACGTACACAGCCACAG

IGRa12 GATACCCTTCCCTTTTCTGGTATGTCCAATATCCTGGAGAAGGTCTACAGCTCC

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

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

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

FIG. 1E

```
                                                                                F  G     G  T
IGRJa01G GGTTATTGCAATAGCACTAAAGACTGTGTAACACCAATGCAGGCAAATCAACCTTTGGGGATGGGACTACGCTCACTGTGAAGCCA
IGRJa02G GGTTTTTGTAAAAGAATGAGCCATTGTGGATAGGCTTTGGGAATGTGCTGCATTGCGGGTCCGGCACTCAAGTGATTGTTTTACCA

IGRJa04                                TAGATACTGGAGGCTTCAAAACTATCTTTGGAGCAGGAACAAGACTATTTGTTAAAGCA
IGRJa05                                 CCTAACTGGGGCAAACAACGTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTCTTCCC
IGRJa06                                ATGGAGGAAGCCAAGGAAATCTCATCTTTGGAAAAGGCACTAAACTCTCTGTTAAACCA
IGRJa07                                     GGAGCCAATAGTAAGCTGACATTTGGAAAAGGAATAACTCTGAGTGTTAGACCA
IGRJa08                                   CTGGTGGCTACAATAAGCTGATTTTTGGAGCAGGGACCAGGCTGGCTGTACACCCA
IGRJa09                                          TGGAAACAAGCTGGTCTTTGGCGCAGGAACCATTCTGAGAGTCAAGTCC
```

FIG. 2

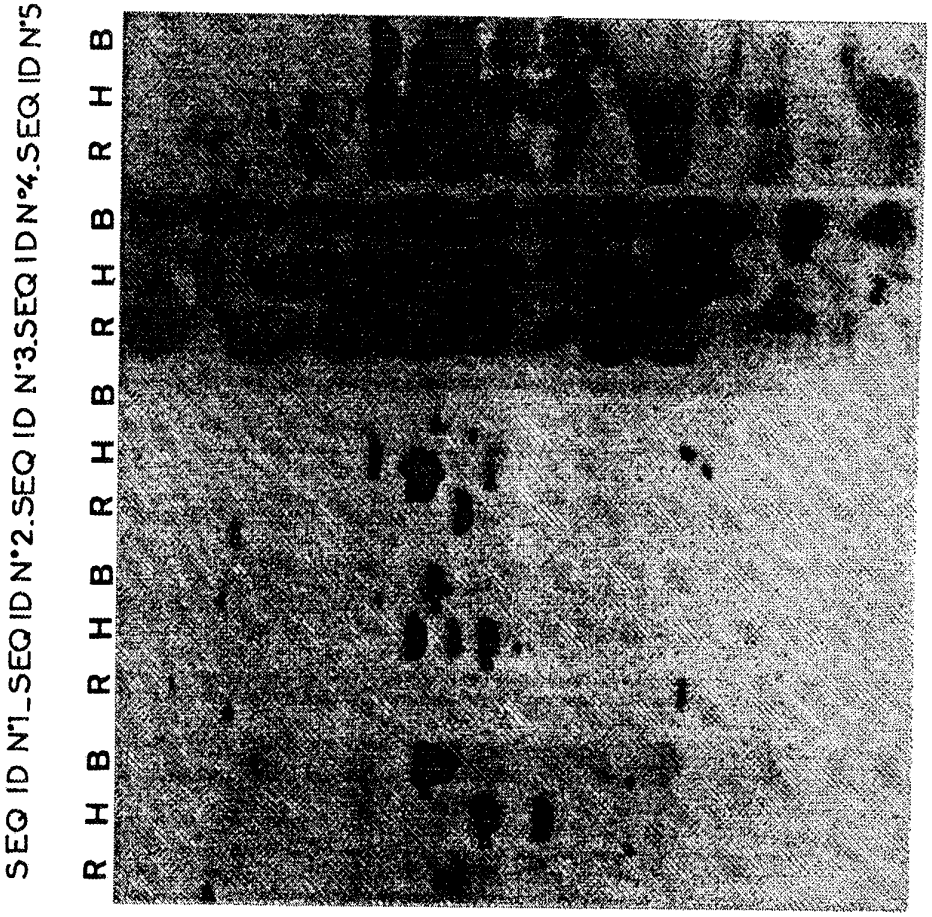
SEQ ID N°1_SEQ ID N°2.SEQ ID N°3.SEQ ID N°4.SEQ ID N°5 -
R H B R H B R H B R H B R H B

FIG.3

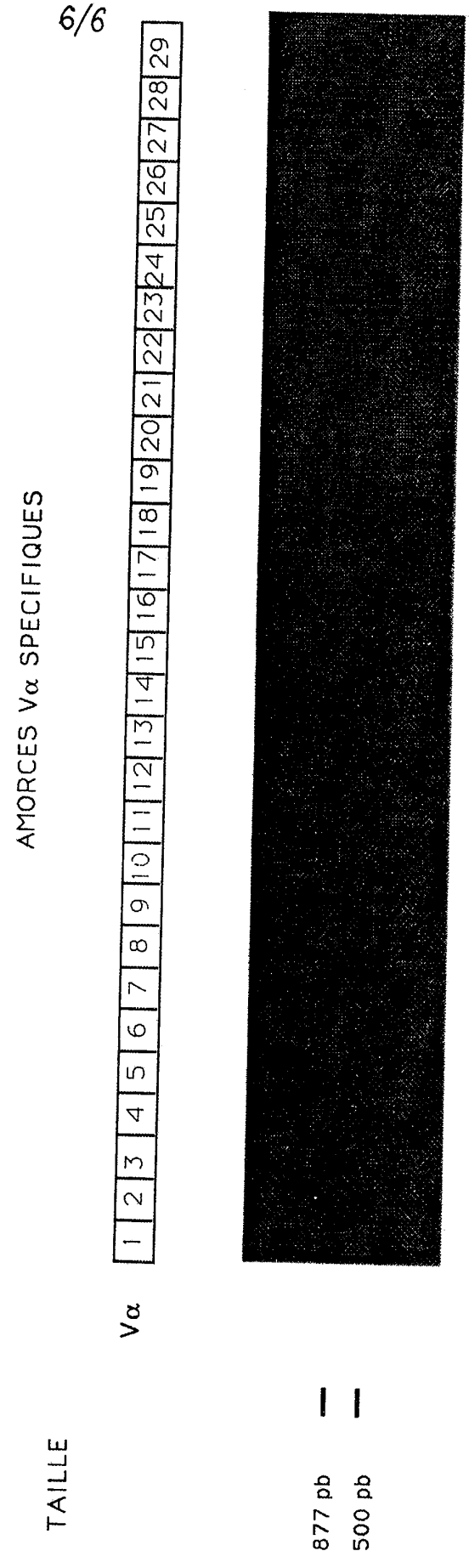
AMORCES Vα SPECIFIQUES
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
Vα
TAILLE
877 pb
500 pb

FIG.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 92/00111

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl. C12N15/12; C12N15/63; C12P21/08; A61K37/02
A61K39/395; G01N33/577; C12Q1/68; C07K15/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.[5]	C07K

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category [10]	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
P,X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 21, No. 4, 9 April 1991, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, DEUTSCHLAND pages 927 - 933; Roman-Roman, S. et al.: 'Studies on the human T cell receptor alpha/beta variable region genes. I. Identification of 7 additional Valpha subfamilies and 14 J alpha gene segments.' see the whole document	1-29
X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 17, 1987, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, DEUTSCHLAND pages 375 - 383; Kimura, N. et al.: 'Sequences and repertoire of the human T cell receptor alpha and beta chain variable region genes in thymocytes.' see the whole document	1,2,5,8, 10-23

./.

* Special categories of cited documents: [10]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
6 May 1992 (06.05.92)	13 May 1992 (13.05.92)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
EUROPEAN PATENT OFFICE	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 164, No. 1, 1 July 1986, THE ROCKEFELLER UNIV. PRESS pages 90 - 103; Yoshika, Y. et al.: 'Sequences and repertoire of human T cell receptor alpha chain variable region genes in mature T lymphocytes.' see the whole document	1,2,5
X	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 164, No. 6, 1 December 1986, THE ROCKEFELLER UNIV. PRESS pages 1940 - 1957; Calman, A.F. et al.: 'Expression of T cell receptor genes in human B cells.' see the whole document	1,3,7,8, 10,11-23
X	EMBO JOURNAL. vol. 7, No. 6, 1988, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1661 - 1668; Baer, R. et al.: 'Complex rearrangements within the human Jdelta-Cdelta /Jalpha-Calpha locus and aberrant recombination between Jalpha segments.' see the whole document	1,2,5,8, 10,11-14
Y		15-23
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, 1989, WASHINGTON US pages 602 - 606; Russo. G. et al.: 'Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemie T-cells of an ataxia telangiectasia patient.' see the whole document	1,2,4
Y	US,A,4 874 845 (HARUO SAITO ET AL.) 17 October 1989 see the whole document	15-23
Y	WO,A,9 006 758 (T CELL SCIENCES, INC. (USA)) 28 June 1990 cited in the application see claims	16-18
Y	EP,A,0 261 671 (PASTAN, I. ET AL.) 30 March 1988 see claim 7	18
Y	WO,A,8 703 600 (T CELL SCIENCES, INC. (USA)) 18 June 1987 see abstract	20

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. FR 9200111 SA 57201

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 06/05/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4874845	17-10-89	US-A- 4970296	13-11-90
		US-A- 4873190	10-10-89
WO-A-9006758	28-06-90	AU-A- 4838290	10-07-90
		CA-A- 2005121	15-06-90
		EP-A- 0404912	02-01-91
		JP-T- 3502762	27-06-91
EP-A-0261671	30-03-88	US-A- 4892827	09-01-90
		AU-B- 618722	09-01-92
		AU-A- 8021187	21-04-88
		JP-T- 2502063	12-07-90
		WO-A- 8802401	07-04-88
		US-A- 5082927	21-01-92
WO-A-8703600	18-06-87	US-A- 4845026	04-07-89
		AU-B- 617980	12-12-91
		AU-A- 6772587	30-06-87
		EP-A- 0248887	16-12-87
		JP-T- 63501721	14-07-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No PCT/FR 92/00111

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) [7]

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N15/12; C12N15/63; C12P21/08; A61K37/02
A61K39/395; G01N33/577; C12Q1/68; C07K15/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée[8]

Système de classification	Symboles de classification
CIB 5	C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté[9]

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS[10]

Catégorie °	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire,[12] des passages pertinents [13]	No. des revendications visées [14]
P,X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 21, no. 4, 9 Avril 1991, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, DEUTSCHLAND pages 927 - 933; Roman-Roman, S. et al.: 'Studies on the human T cell receptor alpha/beta variable region genes. I. Identification of 7 additional Valpha subfamilies and 14 J alpha gene segments.' voir le document en entier	1-29
X	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY vol. 17, 1987, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, DEUTSCHLAND pages 375 - 383; Kimura, N. et al.: 'Sequences and repertoire of the human T cell receptor alpha and beta chain variable region genes in thymocytes.' voir le document en entier	1,2,5,8, 10-23

-/--

° Catégories spéciales de documents cités:[11]

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
06 MAI 1992	13 MAY 1992
Administration chargée de la recherche internationale	**Signature du fonctionnaire autorisé**
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	NAUCHE S.A.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS[14] (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie[o]	Identification des documents cités,[16] avec indication, si nécessaire des passages pertinents[17]	No. des revendications visées[18]
X	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDECINE vol. 164, no. 1, 1 Juillet 1986, THE ROCKEFELLER UNIV. PRESS pages 90 - 103; Yoshika, Y. et al.: 'Sequences and repertoire of human T cell receptor alpha chain variable region genes in mature T lymphocytes.' voir le document en entier	1,2,5
X	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDECINE vol. 164, no. 6, 1 Décembre 1986, THE ROCKEFELLER UNIV. PRESS pages 1940 - 1957; Calman, A.F. et al.: 'Expression of T cell receptor genes in human B cells.' voir le document en entier	1,3,7,8, 10,11-23
X	EMBO JOURNAL. vol. 7, no. 6, 1988, EYNSHAM, OXFORD GB pages 1661 - 1668; Baer, R. et al.: 'Complex rearrangements within the human Jdelta-Cdelta /Jalpah-Calpha locus and aberrant recombination between Jalpha segments.' voir le document en entier	1,2,5,8, 10,11-14
Y		15-23
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, 1989, WASHINGTON US pages 602 - 606; Russo. G. et al.: 'Molecular analysis of a t(14;14) translocation in leukemie T-cells of an ataxia telangiectasia patient.' voir le document en entier	1,2,4
Y	US,A,4 874 845 (HARUO SAITO ET AL.) 17 Octobre 1989 voir le document en entier	15-23
Y	WO,A,9 006 758 (T CELL SCIENCES, INC. (USA)) 28 Juin 1990 cité dans la demande voir les revendications	16-18
Y	EP,A,0 261 671 (PASTAN, I. ET AL.) 30 Mars 1988 voir revendication 7	18
Y	WO,A,8 703 600 (T CELL SCIENCES, INC. (USA)) 18 Juin 1987 voir le résumé	20

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9200111
SA 57201

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 06/05/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US-A-4874845	17-10-89	US-A-	4970296	13-11-90
		US-A-	4873190	10-10-89
WO-A-9006758	28-06-90	AU-A-	4838290	10-07-90
		CA-A-	2005121	15-06-90
		EP-A-	0404912	02-01-91
		JP-T-	3502762	27-06-91
EP-A-0261671	30-03-88	US-A-	4892827	09-01-90
		AU-B-	618722	09-01-92
		AU-A-	8021187	21-04-88
		JP-T-	2502063	12-07-90
		WO-A-	8802401	07-04-88
		US-A-	5082927	21-01-92
WO-A-8703600	18-06-87	US-A-	4845026	04-07-89
		AU-B-	617980	12-12-91
		AU-A-	6772587	30-06-87
		EP-A-	0248887	16-12-87
		JP-T-	63501721	14-07-88

EPO FORM P0472