

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07H 21/04



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/11 A61K 39/00

A61K 39/395 A61K 38/17

C07K 14/435 C07K 16/18

C12Q 1/68 G01N 33/531

A61P 29/00 A61P 19/02

[21] 申请号 200310120573. X

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1594348A

[22] 申请日 2003.12.12

[21] 申请号 200310120573. X

[30] 优先权

[32] 2003. 7. 2 [33] US [31] 10/612, 468

[71] 申请人 曼盛基因技术有限公司

地址 香港湾仔皇后大道东 213 号胡忠大厦
3802 室

[72] 发明人 臧敬五 何国强 张冬青 孙 玮

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 汪惠民

权利要求书 7 页 说明书 77 页 附图 6 页

[54] 发明名称 T 细胞受体 CDR3 的序列与类风湿
性关节炎的诊断及治疗方法

[57] 摘要

本发明提出了一种充分纯化和分离的具有如 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2 所示的序列的 DNA 片段与一种充分纯化的具有如 SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL and SEQ ID NO. 5 所示的序列多肽, 还提出了至少一种 DNA 和/或多肽衍生的疫苗、抗体和药物成分。同时还进一步提出了类风湿性关节炎的诊断方法, 本发明可用于治疗类风湿性关节炎。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种充分纯化和分离的DNA片段,其中包括如SEQ ID NO. 1所示的核酸序列。
2. 根据权利要求1所述的DNA片段,其特征在于该DNA片段至少包括源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体 β 链BV14基因的互补决定区-3 (CDR3)的部分基因。
3. 一种充分纯化和分离的DNA片段,其中包括如SEQ ID NO.2所示的核酸序列。
4. 根据权利要求3所述的DNA片段,其特征在于该DNA片段至少包括源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体 β 链BV16基因的互补决定区-3 (CDR3)的部分基因。
5. 一种疫苗,该疫苗至少从包括选自SEQ ID NO. 1和 SEQ ID NO. 2.的片段。
6. 根据权利要求5所述的疫苗,其特征在于所述DNA片段的浓度范围大约是 $10\mu\text{g/ml}$ 到 10mg/ml 。
7. 一种充分纯化和分离的多肽,该多肽的氨基酸序列选自SEQ ID NO. 3和SLS。
8. 根据权利要求7所述的多肽,其特征在于所述多肽具有一个氨基酸序列,此氨基酸序列源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体 β 链BV14基因的互补决定区-3 (CDR3)。
9. 一种针对权利要求8所述多肽的抗体。
10. 一种充分纯化和分离的多肽,该多肽的氨基酸序列选自SEQ ID

NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5

11. 根据权利要求10所述的多肽，其特征在于所述多肽具有一个氨基酸序列，此氨基酸序列源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体β链BV16基因的互补决定区-3 (CDR3)。

12. 一种针对权利要求11所述多肽的抗体。

13. 一种疫苗，该疫苗至少包含一种多肽，此多肽具有一个源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体基因BV14 或BV16的互补决定区-3 (CDR3)的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的疫苗，其特征在于所述疫苗包括至少包含一种多肽，该多肽的氨基酸序列选自SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5。

15. 一种用以检测可疑个体是否患有类风湿性关节炎的方法，其步骤包括：

(a)从可疑的个体获得一种组织样品；

(b)测量该组织样品中T细胞BV14和/或者BV16的表达水平； 并，

(c)在一个正常的个体上重复步骤(a ， b)；

(d)针对(b) 、 (c)比较。

16. 根据权利要求15所述用以检测可疑个体是否患有类风湿性关节炎的方法，其特征在于所述组织样品取自可疑个体和正常个体的滑膜液、滑膜损伤组织或外周血。

17. 一种在中国人群的可疑个体中检测类风湿性关节炎的方法，其步骤包括：

- (a)从可疑个体获得一种组织抽样；
- (b)测量组织抽样中的T细胞受体的BV16的表达水平； 同时，
- (c)在中国人口的一个正常的个体上重复步骤(a)、(b)；
- (d)针对(b)、(c)比较，可疑个体的BV16表达水平如果比正常个体的表达水平高。

18. 根据权利要求17所述的在中国人群的可疑个体中检测类风湿关节炎的方法，其特征在于所述组织样品可以取自中国人群的可疑个体和正常个体的滑膜液、滑膜损伤组织或外周血。

19. 一种检测可疑个体是否患有类风湿性关节炎的检测类风湿关节炎的方法，其步骤包括：

- (a)产生一个与DNA片段互补的探针，该DNA片段具有选自SEQ ID NO. 1和 SEQ ID NO. 2;的核酸序列；

- (b)从可疑个体获得一种组织样品； 同时，

- (c)把探针与组织抽样相混合，阳性的杂交信号表明可能会发现可疑个体患有类风湿性关节炎。

20. 根据权利要求19所述的检测可疑个体是否患有类风湿性关节炎的方法，其特征在于所述组织样品可以取自可疑个体和正常个体的滑膜液、滑膜损伤组织或外周血

21. 一种检测可疑个体是否患有类风湿性关节炎的方法，其步骤包括：

- (a)产生一种直接针对一种多肽的抗体，这种多肽具有选自SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5的氨基酸序列；

- (b)从可疑个体获得一种组织样品； 同时，

(c)把抗体与组织抽样相混合，阳性的信号表明可能会发现可疑个体患有类风湿性关节炎。

22. 根据权利要求21所述检测可疑个体是否患有类风湿性关节炎的方法，其特征在于所述组织样品可以取自可疑个体和正常个体的滑膜液、滑膜损伤组织或外周血。

23. 一种引起类风湿性关节炎个体免疫系统反应的方法，包括给予有效剂量的免疫原性T细胞受体肽，其中该肽或片断能引起免疫系统反应以调节介导类风湿性关节炎的T细胞，这些多肽的氨基酸序列选自自由 SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和 SEQ ID NO. 5.组成的组中。

24. 一种与类风湿性关节炎特异相关的T细胞接触的方法，其步骤包括：

提供有效剂量的针对多肽的抗体，这些多肽的氨基酸序列选自自由 SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL and SEQ ID NO. 5.组成的组中。

25. 一种在个体中防止或者减轻类风湿性关节炎的免疫方法，其步骤包括：

(a) 为个体注射含有连接了DNA片段的促进剂的表达载体，该DNA片段具有编码单链T细胞受体V β 16的肽的核酸序列，或者是其中的一部分，同时，

(b)在个体中表达DNA片段，该DNA片段表达达到一定程度水平就可以引发针对所编码肽的免疫反应。

26. 根据权利要求25所述的免疫方法，其特征在于所述核酸序列编码V β 16的CDR3。
27. 根据权利要求26所述免疫方法，其特征在于所述核酸序列包含如SEQ ID NO. 2所示序列。
28. 如权利要求26所述免疫方法，其特征在于V β 16的CDR3包含一个选自SEQ ID NO. 4, SQD, SLL 和 SEQ ID NO. 5的氨基酸序列。
29. 如权利要求25所述免疫方法，其特征在于所述促进剂为可诱导或基本的促进剂。
30. 如权利要求29免疫方法，其特征在于所述促进剂包括 β 肌动蛋白促进剂，SV40早期和晚期促进剂，免疫球蛋白促进剂，人类巨细胞病毒促进剂和和反转录LTR。
31. 根据权利要求25所述的免疫方法，其特征在于DNA表达载体的给药剂型可以是皮下、皮内、静脉注射或者口服剂中的一种。
32. 根据权利要求31所述免疫方法，DNA表达载体的给药制剂可以是肌肉组织注射剂。
33. 根据权利要求31所述免疫方法，DNA表达载体的给药剂型可以是脊髓液注射剂。
34. 一种针对风湿性关节炎个体所编码肽的免疫反应方法，其步骤包括：
- (a) 给予个体含有连接了DNA片段的促进剂的表达载体，该片段具有编码单链T细胞受体V β 14的肽的核酸序列，或者是其中的一部分，该核酸序列包括如SEQ ID NO. 1所示的序列，同时，

- (b) 个体中表达DNA片段，该DNA片段达到一定程度水平就可以引发针对所编码肽的免疫反应。
35. 根据权利要求34所述方法，其特征在于所述核酸序列编码V β 14的CDR3。
36. 根据权利要求35所述方法，其特征在于所述核酸序列包含如SEQ ID NO. 3 和 SLS所示序列。
37. 根据权利要求34所述方法，其特征在于所述促进剂为可诱导或基本的促进剂。
38. 根据权利要求37所述方法，其特征在于所述促进剂包括 β 肌动蛋白促进剂，SV40早期和晚期促进剂，免疫球蛋白促进剂，人类巨细胞病毒促进剂和和反转录LTR。
39. 根据权利要求34所述方法，其特征在于所述DNA表达载体的给药制剂可以是皮下、皮内、静脉注射或口服剂中的任何一种。
40. 根据权利要求39所述方法，DNA表达载体的给药制剂可以是肌肉组织注射剂。
41. 如权利要求39所述方法，DNA表达载体的给药制剂可以是脊髓液注射剂。
42. 一个可抑制源自类风湿性关节炎患者的病原性T细胞反应的药物成分，该成分包括源自单链T细胞受体V β 14 或V β 16的有效免疫剂量的多肽或多肽的一部分以及可接受的药物载体。
43. 根据权利要求42所述的药物，其特征在于药物成分中多肽的氨基酸序列来源于V β 14 或V β 16的CDR3。

44. 根据权利要求43所述的药物，其特征在于药物成分中多肽的氨基酸序列选自SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5。

T细胞受体CDR3的序列与类风湿性关节炎的诊断及治疗方法

技术领域

本发明涉及分子生物学与医药领域。更具体的说，本发明涉及T细胞特异性受体CDR3序列与类风湿性关节炎的诊断及治疗方法。

背景技术

位于成熟T淋巴细胞表面的抗原识别受体（T细胞抗原受体或TCRs）具有一种与免疫球蛋白结构相类似的结构。因此，它们含有 α 和 β 糖蛋白链或 γ 与 δ 糖蛋白链的异源二聚体结构。

T细胞受体必须能够反映抗原决定簇极大的多样性。这可以通过编码T细胞受体不同结构区的不同非连续基因片段的基因重组而达到。因此，基因包含可变区片断（Variable segment, V区片断），多样性区片断（diversity segment, D区片断），连接区片断（junction segment, J区片断）和恒定区片断（constant segment, C区片断）。在T细胞分化期间， β 与 δ 基因座的V, D, J区片段与 α 、 β 基因座的V、J区片段通过重组产生了特异的基因。这些特异性重组与双链配对一起产生了重组多样性。这种多样性被另外两个机制高度放大了，他们分别是V-D-J或V-J片段的非精确重组与位于N区的核酸叠加。编码T细胞受体（TCR）和链的基因分别由V, J和C与V, J, D和C区片段的重组产生。

在其编码区序列相似性的基础上，有超过70种V与V片段具有自己

的分子特征并且分别地被分成29和25个亚家族。这些不同层次的TCR多样性产生了巨大的及不同的T细胞 (T cell repertoire)，以适应结合到MHC分子上短肽的多样性。在V(D)J结合区内，高度可变的互补决定区-3 (complementary determining region 3, CDR3) 被认为是与抗原肽直接结合的位点。TCR多肽特征是准确分析T细胞反应的一种方式。

类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis, RA) 的病理表现为外关节滑膜的慢性炎症，T细胞被认为在其发病机制中起到重要的作用。这一观点被以下证据所支持：在高加索 (Caucasian) RA患者的关节滑膜组织中发现与MHC II基因具密切关联的Th1炎症因子细胞的明显浸润及聚集，其中包括DR4 (基因型B1*0404和DRB1*0401) 与DQ (DQB1*0302和DQB1*0301)。更进一步的支持证据包括在患者关节中发现支持T细胞介导炎症的细胞因子的环境改变，以及浸润性T细胞的克隆扩增。但是，在类风湿病患滑膜中的浸润性T细胞的抗原特异性是未知的。在RA患者中，基于T细胞对抗原的反应性，几种自身抗原包括骨II型胶原，热休克蛋白和其它的抗原相信与RA有关。微生物的抗原，诸如分支杆菌抗原和葡萄球菌超抗原，也可能促进RA中的T细胞激活反应。然而，仍没有证据证明T细胞与这些抗原的反应是与RA临床诊断相关的。

在缺乏引发的RA性抗原下，人们已经试图分析从RA患者关节滑膜液或组织提取的浸润性T细胞的T细胞受体 (TCR) 结构与特性，期望与类风湿病有关的T细胞的共同TCR结构或者特征克隆型能够对浸

润性T细胞如何在滑液中激活和永存的机制提供更好的解释，从而可能提出全新的治疗策略。当T细胞受体类型受个体的遗传背景和对自身或者环境的抗原的影响时，与MHC II类分子相似的抗原驱动的刺激作用导致利用普通的V-D-J片断的T细胞克隆扩增。另一方面，被超抗原（super antigen）刺激作用诱导的T细胞激活具有不同D-J片断的TCR BV基因家族的多克隆扩增特征。因此，描绘BV基因分布模式与类风湿病的互补决定区3（CDR3）的结构特征是重要的。

对高加索（Caucasian）RA患者的许多研究表明源自滑液（一些病例中来源于滑膜）T细胞的TCR中BV基因的使用倾向于某些特定的BV基因，包括BV14, BV17以及一些其它的基因。对超表达BV基因的CDR3的分析中发现某些克隆型仅存在于类风湿患者的滑膜组织中而不是外周T细胞中，这表明T细胞在受染关节中进行了克隆增生。但是，研究同时发现RA患者滑膜液及组织中浸润性T细胞的克隆型和TCR BV基因的使用是相对异源的，这使使用常规的或者半定量PCR进行BV基因的分析变得复杂了。这可能归因于在不同的研究中高表达BV基因和类风湿滑液中T细胞CDR3结构特征的检测的明显变化。此外，在RA中见到的浸润性T细胞多样的克隆型显著增加了识别共同的CDR3结构特征的困难。为了分析目标克隆型的特征，发现的RA滑膜典型的TCR转录物按大小排列有多个峰，再乘以BV和BJ基因的数目（25个BV基因和13 BJ基因）时，每个样品需要成百上千次的测量。

美国专利No. 6, 159, 470揭示了一种治疗类风湿性关节炎的方法：在具有V β 17 T细胞的人类个体中使用有效剂量的由V β 17特异激活

的细胞毒性或细胞增殖抑制剂来杀灭或抑制T细胞增殖，该方法中的药物是一种抗体。

美国专利No. 5, 985, 552提出了一种诊断或者预测类风湿性关节炎个体敏感性的方法。选择性的检测来自T细胞个体的T细胞受体表面上V β 14或者V β 17的水平，通过与正常个体的水平相比较，可以指示类风湿性关节炎或对其敏感性。

美国专利No. 6, 207, 645提出了一种在类风湿性关节炎患者中引发免疫反应的方法。将含有连接编码单链T细胞受体V β 3, 14或17的多肽或片段的促进剂的质粒直接注入该个体的肌肉组织，在该核酸序列表达达到一定浓度时就可以在个体中引发针对该核酸所编码的多肽的免疫反应。

美国专利（No. 6, 221, 352）提出一种防止表达V β 14T细胞在类风湿性关节炎患者体内增殖的方法。该方法是给患者注射或服用有效剂量的细胞毒性或细胞增殖抑制剂，其中含有可以选择性的结合由T细胞表达的V β 14的抗体。

Mima等报道他们发现了在V β 14+ T细胞中占支配地位的CDR3序列CASS-PRERAT-YEQ，该序列源自两个不同的类风湿性关节炎患者的关节。与类风湿相关的共同TCR结构特征或T细胞特异的克隆型也许能对浸润性T细胞如何在滑液中激活和永存的机制提供更好的解释，从而可能提出全新的治疗策略。因此，识别与类风湿患者相关的TCR序列的特点和对类风湿性关节炎诊断和治疗的有效的方法是长期的需要。本发明就是在技术上满足这种长期的需要。

发明内容

本发明的目的在于识别与类风湿患者相关的TCR序列的特点和对类风湿性关节炎诊断的有效方法及应用。

本发明指一种已经充分纯化和分离的DNA片段，该DNA片段包含的核酸序列如SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO. 2所示，它们分别是类风湿性关节炎患者的T细胞受体的V β 14家族 (BV14 基因) 和V β 16家族 (BV16 基因)的互补决定区3 (CDR3) 的一部分。

本发明指一种疫苗，其中至少一种DNA片段来自 SEQ ID NO. 1与SEQ ID NO. 2的片段。

本发明也指一种充分纯化和分离的肽，其氨基酸序列来自于由SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5组成的组中，这些氨基酸序列源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体 β 链BV14 (SEQ ID NO. 3与SLS)或BV16 (SEQ ID NO. 4, SQD, SLL与SEQ ID NO. 5)基因的互补决定区3 (CDR3)。

本发明也指针对上述肽的一种抗体。

本发明也指向一种疫苗，其中包括至少一种氨基酸序列来自于T细胞受体基因的CDR3的肽，该T细胞受体基因由来自类风湿性关节炎患者的BV14和BV16的组中选择。

本发明更进一步指向检测类风湿性关节炎的一种方法。该方法包括分别从可疑个体和正常个体获取组织样品；测量该样品中T细胞受体的BV14和/或BV16的表达水平，并比较可疑个体和正常个体的表达水平。如果BV14和/或者BV16在可疑个体中的表达水平比正常个体中

的表达水平足够高，那就表明该个体可能患有类风湿性关节炎。

本发明更进一步指向一种可用于中国人群检测类风湿性关节炎的方法。该方法包括分别从可疑个体和正常个体取组织样品；测量该样品中T细胞受体的BV16的表达水平，并比较可疑个体和正常个体的表达水平。如果BV16在可疑个体中的表达水平比正常个体中的表达水平足够高，那就表明来自中国人群的该个体可能患有类风湿性关节炎。

本发明更进一步指向一种类风湿性关节炎的检测方法。该方法包括合成与来自SEQ ID NO. 1和SEQ ID NO. 2所组成的组中的DNA片段互补的探针；从可疑个体取样；将探针与组织样本混合。在本法中阳性的杂交信号提示可疑个体可能患有类风湿性关节炎。

本发明指向一种检测类风湿性关节炎的方法。这方法包括合成一种针对多肽的抗体，该多肽的氨基酸序列来自于SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL与SEQ ID NO. 5组成的组中；从可疑个体中取组织样品；将该抗体与组织样品混合。在本法中阳性的信号提示可疑个体可能患有类风湿性关节炎。

本发明更进一步用于治疗类风湿性关节炎，该方法是给患者注射或服用有效剂量的免疫原性T细胞受体肽从而引发免疫反应。这些多肽的氨基酸序列选自自由SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和 SEQ ID NO. 5组成的组中。

本发明更进一步指向一种治疗类风湿性关节炎的方法，该方法是给患者注射或服用有效剂量的针对多肽的抗体，这些多肽的氨基酸序

列选自SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5组成的组中。

本发明进一步指向针对引发所编码肽的免疫反应,可用于治疗类风湿性关节炎。该方法包括给个体注射或服用含有促进剂的表达载体,该促进剂连接了DNA片段,该片段具有编码单链T细胞受体V β 16的肽的核酸序列,或者是其中的一部分。在本方法中,该DNA片段达到一定丰度水平就可以引发针对所编码肽的免疫反应,进而达到预防或治疗类风湿性关节炎的目的。

本发明指向一种引发针对所述编码肽的免疫反应,可用于治疗类风湿性关节炎。该方法包括给予个体含有连接了DNA片段的促进剂的表达载体,该片段具有编码单链T细胞受体V β 14的肽的核酸序列,或者是其中的一部分。在本方法中,该核酸序列包括如SEQ ID NO. 1所示的核酸序列。进入到人体后,该DNA片段达到一定丰度水平就可以引发针对所编码肽的免疫反应,进而达到预防或治疗类风湿性关节炎的目的。

本发明进一步指向一种可以抑制类风湿性关节炎患者的病原性T细胞反应的药物成分。该成分包括源自单链T细胞受体V β 14或V β 16的有效免疫剂量的多肽或多肽的一部分以及制药学上可接受的载体。

结合随后附图对本发明优点的详尽描述,本发明上述的及其它的优势在技术上是明显的。

以下附图构成了本发明说明的一部分,并对本发明某些方面作进一步证明。现在说明的部分被包括到更进一步显示现在发明的一定方

面。通过参考一张或更多这些图片并结合此处详尽的描述也许可以更好的理解本发明。

附图说明

图1A显示，用一组25 BV家族和BC基因特异的寡核苷酸引物进行的PCR扩增结果。图1B为分离自四个健康外周血单核细胞并在具有或缺乏中毒性休克毒素（toxic shock syndrome toxin）的条件下培养的实时PCR分析结果。

图2展示了在滑液损伤组织（ST）样品中BV偏向性的表达，非常明显的对BV14（平均的表达水平27%），BV16（平均的表达水平31%）和BV20（17%）较少的表达。

图3显示，当使用一对特异的5' BV14-3' BC引物分析位于BV14-BJ-3' BC之间的序列区时的BV14所展示的滑液和滑膜损伤组织中异源CDR3的长度图。

图4显示当使用一对特异的5' BV16-3' BC引物分析位于BV16-BJ-3' BC之间的序列区时的BV16所展示的滑液和滑液损伤组织中异源CDR3的长度图。

图5显示分别使用BV14或BV16的引物和一组13个个体BJ基因特异的引物时的BV14和BV16的CDR3的免疫电泳转录分析结果。

图6显示典型的克隆型模式，具有与类似CDR3的同样的BV和BJ结合性。

具体实施方式

下面对本发明作进一步的详描。

为有助于理解本发明，首先提出如下术语的定义。

“PCR”是聚合酶链反应，例如，如美国专利No. 4, 683, 202所述，PCR是一种核酸扩增技术，其中有选择性的寡核苷酸或引物在聚合试剂（如聚合酶）和四种三磷酸核苷酸存在时与核酸模板杂交，扩增产物就可以从引物处形成。然后这些产物被变性并作为循环反应中的模板，这样就可以扩增足够数量的现有核酸以便于随后的检测。有许多种PCR技术可以使用，而且根据本发明也许会用到这些方法。

“引物”是一段寡核苷酸，不论天然的还是合成的，与模板分子上特定的DNA序列互补，是DNA合成反应的起始点。

“超抗原（superantigen）”是可以优先结合到T细胞受体 β 链特异位点并刺激T细胞高效增殖的抗原或其片段。超抗原通过结合特异的V β s激活T细胞。超抗原结合到各种TCRs上的结合位点已经从TCRs中恒定高度可变互补决定区(CDRs)中分离出来。这些CDRs代表了曾被认为结合常规抗原的区域，常规抗原是与MHC形成复合物的。

"V β 14"指的是特定的人T细胞受体 β 链可变区。V β 14的氨基酸序列如下：
MGPQLLGYVVLCLLGGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKCLTVTCSQNMNHEYM
SWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSRRKEKRNFLILESPSPN
QTSLYFCASS (SEQ ID NO. 6)。

"V β 16"指的是特定的人T细胞受体 β 链可变区。V β 16的氨基酸序列如下：
IEAGVTQFPHSVIEKGQTV
TLRCDPISGHDNLYWYRRVMGKEIKFLLHFVKESKQDESGMPNNRFLAERTG
GTYSTLKVQPAELEDGSGVYFCASS (SEQ ID NO. 7)。

“片段”指TCRs中具有免疫效应的氨基酸序列。该术语规定为包括连接起来的片段或者与附加的序列或其一半结合的片段，例如，多

肽与其它氨基酸序列相连接或连到一个载体上。

“互补决定区3(CDR3)”也被称之为V(D)J区。由于V, D和J区基因的重组先于T细胞的成熟,跨越这些区的氨基酸序列对每一T细胞及其克隆实际上是唯一的。由于相应于此区的多肽引发的T细胞的免疫性预期可能对特定抗原具有高度特异性,所以CDR3或其片段在本发明作为疫苗使用。

本发明检测一群中国RA患者的滑液物质的浸润性T细胞的BV基因的使用模式,以确定BV基因分布与HLA的潜在联系,这些中国患者的人类白细胞抗原(HLA)与高加索(Caucasian)患者的起源背景不同。在通过源自不同RA患者滑液高表达T细胞的转录物中,识别到共同克隆型和共同CDR3结构特征。分析是通过进行滑液物质和患者血液的TCRs转录物的体外分析所得,因此不需要体内培养。那样可能会引起偏差。现在认为类风湿性关节炎中的浸润性T细胞是由上文中提到的RA相关的DR或DQ分子等自身或微生物抗原驱动形成的。已经发现这些T细胞在不同的个体中展示了共同的TCR结构特征。主要的方法是通过定量实时PCR首先确定类风湿性关节炎中的高表达的BV基因。这些分析在来自于确诊的RA患者组的外周血(PB)、滑液(SF)和滑液损伤组织(ST)中进行,同时设一个骨关节炎的对照组。系列CDR3长度分析在生成5' BV-3' BC区范围利用免疫电泳进行分析。个别V-D-J区内的多峰CDR3长度用BV和BJ特异性引物进行进一步分析以识别使用同一带有类似CDR3长度的BV和BJ基因的共同克隆型。这些克隆型通过DNA克隆和DNA测序来进行分析。

发现源自中国RA患者的滑液损伤组织的浸润性T细胞表现出明显的对BV14、BV16和更小范围的BV20的BV基因倾向性，并且当高表达的BV16在滑液中出现时，在滑膜中见到的BV14倾向的模式在配对的滑液中没有出现。这一结果表明RA滑液中BV14和BV16 T细胞是选择性激活和积累的。虽然以前BV14基因的超表达在来源于RA滑液和滑膜的T细胞中被报道过，但是BV16基因的高表达在来源于RA滑液和滑膜的T细胞中以前并没有被报道。BV17和其它BV的倾向性在中国RA患者中并没有像高加索患者中所描述的那样被检测到。这些观测资料表明，当BV14的偏移在中国患者和高加索患者中相同时，BV16的高表达和缺乏BV17和其它BV基因的偏移可能是中国RA患者的特性。这些在BV基因偏好上的差异也许可以归因于遗传背景（如HLA基因）地理意义上的环境因素。在这一方面，需要特别注意的是这群中国RA患者与DRB1*0405 (43%) 相关，这与高加索患者密切相关的另外两个基因型DR4 (DRB1*0404和DRB1*0401) 是不同的。本研究更进一步揭示了RA患者的滑液T细胞中BV16而不是BV14的高表达与DRB1*0405相互关系的趋势。在对照中，没有发现BV16和BV14的高表达与其它使用DR和DQ基因型的相互关系。这些结果支持HLA基因型和个体的种族背景也许会影响RA患者滑液浸润性T细胞的BV偏好性的观点，并且为本研究中这一中国RA人群的BV16的高表达特性提供了一个解释。

强调滑液浸润性T细胞BV14和BV16的超表达是否是由于自身抗原的刺激或由传染性试剂相关的超抗原造成是重要的。BV基因偏好的克隆性分析也许可以提供解释。典型的T细胞抗原性刺激会导致寡克隆，

向反超抗原诱导的BV基因偏好与多克隆增殖相关。这可以通过V-D-J连接区的免疫电泳进行区分。本研究中，高表达的BV14和BV16的克隆型似乎相对不同，一些受损组织表现出高度限制性寡克隆模式，而在其它组织则展示出多克隆的形式。这一结果支持在一些病例中BV的高表达是由自身抗原驱动的这一假设。然而，在其它一些病例中，很难区别是由自身抗原还是由超抗原驱动的，因为在这两种情况下都会导致V-D-J区的克隆型向多克隆方向转移。在该疾病的后期或慢性期，可能存在浸润性T细胞的克隆型模糊并且趋向多样性，原因是浸润性T细胞的异质性通过非特异的机制恢复了，这种机制包括类风湿性关节炎所产生的化学因子或细胞因子。

BV14或BV16的超表达可以通过定量(real-time)PCR的方法来确定，如待审查的专利60/439,096中所述的应用，在此作为引例。定量PCR的方法使用如表1所示，特异的促进(forward)和反向(reverse)套式寡核苷酸引物BV1-BV25 (SEQ ID NOs: 8-57)和BC (SEQ ID NOs: 58和59)，上面的几套引物以同样的效率扩增不同的TCRBV基因和TCRBC基因，这样在PCR扩增后原始样本可以被精确定量。

表1 应用于定量PCR分析的25对TCRBV基因和TCRBC基因特异的引物

基因	序列 5' → 3'	Amplicon (bp)
BV1	AAGCACCTGATCACAGCAACT (forward) (SEQ ID NO. 8) TAGTTCAGAGTGCAAGTCAGG (reverse) (SEQ ID NO. 9)	209
BV2	GGTTATCTGTAAGAGTGGAACCT (SEQ ID NO. 10) AGGATGGGCACTGGTCACTGT (SEQ ID NO. 11)	229
BV3	TCGAGATATCTAGTCAAAGGACG (SEQ ID NO. 12) GGTGCTGGCGGACTCCAGAAT (SEQ ID NO. 13)	228
BV4	AAGCAGGGATATCTGTCAACGT (SEQ ID NO. 14) TTCAGGGCTCATGTTGCTCAC (SEQ ID NO. 15)	235
BV5	GATCAAACGAGAGGACAGCA (SEQ ID NO. 16)	217

BV6	AGCACCAAGGCGCTCACATTCA (SEQ ID NO. 17) CTCAGGTGTGATCCAATTTCA (SEQ ID NO. 18) CCCCCGCTCTGTGCGCTGGAT (SEQ ID NO. 19)	195
BV7	CATGGGAATGACAAATAAGAAGTCT (SEQ ID NO. 20) TGGCTGCAGGGCGTGTAGGTG (SEQ ID NO. 21)	214
BV8	CCCCGCCATGAGGTGACAGAG (SEQ ID NO. 22) GAGTCCCTGGGTTCTGAGGGC (SEQ ID NO. 23)	239
BV9	CCAAAATACCTGGTCACACAG (SEQ ID NO. 24) CCAGGGAATTGATGTGAAGATT (SEQ ID NO. 25)	207
BV10	ACCTAGACTTCTGGTCAAAGCA (SEQ ID NO. 26) GGACTGGATCTCCAAGGTACA (SEQ ID NO. 27)	223
BV11	TTATAGGGACAGGAAAGAAGATC (SEQ ID NO. 28) ATGTGAGGGCCTGGCAGACTC (SEQ ID NO. 29)	224
BV12	CAAGACACAAGATCACAGAGACA (SEQ ID NO. 30) GGCAGCAGACTCCAGAGTGAG (SEQ ID NO. 31)	224
BV13	TGAAGACAGGACAGAGCATGACA (SEQ ID NO. 32) CACAGATGTCTGGGAGGGAGC (SEQ ID NO. 33)	227
BV14	ACCCAAGATACCTCATCACAGTG (SEQ ID NO. 34) AGAGGTCTGGTTGGGGCTGGG (SEQ ID NO. 35)	242
BV15	TCACAAAGACAGGAAAGAGGATT (SEQ ID NO. 36) GGGGATGGCAGACTCTAGGGA (SEQ ID NO. 37)	215
BV16	GTTCCCAGCCACAGCGTAATA (SEQ ID NO. 38) CAGTTCTGCAGGCTGCACCTT (SEQ ID NO. 39)	235
BV17	GTCCCCAAAGTACCTGTTTCAGA (SEQ ID NO. 40) AGCTGTCGGGTTCTTTTGGGC (SEQ ID NO. 41)	244
BV18	AGACACCTGGTCAGGAGGAGG (SEQ ID NO. 42) TGCCGAATCTCCTCGCACTAC (SEQ ID NO. 43)	240
BV19	CCAGGACATTTGGTCAAAGGAAAA (SEQ ID NO. 44) CAGTGCCGTGTCTCCCGGTTT (SEQ ID NO. 45)	246
BV20	GACCCTGGTGCAGCCTGTG (SEQ ID NO. 46) GAGGAGGAGCTTCTTAGAACT (SEQ ID NO. 47)	223
BV21	CCCAGATATAAGATTACAGAGAAA (SEQ ID NO. 48) CTGGATCTTGAGAGTGGAGTC (SEQ ID NO. 49)	219
BV22	CACAGATGGGACAGGAAGTGATC (SEQ ID NO. 50) GTCCTCCAGCTTTGTGGACCG (SEQ ID NO. 51)	221
BV23	AAGAGGGAAACAGCCACTCTG (SEQ ID NO. 52) CAGCTCCAAGGAGCTCATGTT (SEQ ID NO. 53)	207
BV24	CCAAGATACCAGGTTACCCAGTTT (SEQ ID NO. 54) CAGGCCTGGTGAGCGGATGTC (SEQ ID NO. 55)	228
BV25	AAAACATCTTGTCAGAGGGGAA (SEQ ID NO. 56) TGAATCCTCAAGCTTCGTAGC (SEQ ID NO. 57)	238
TCRBC	CAGCGCCCTTGTGTTGATG (SEQ ID NO. 58) AAGCGCTGGCAAAGAAGAA (SEQ ID NO. 59)	121

本发明也可识别类风湿性关节炎中代表超表达的BV14和BV16群的浸润性T细胞的特异CDR3序列和共同CDR3序列。如果BV14和BV16的滑液T细胞被一些于上文中提到的具有相似HLA背景的RA相关共同的自身抗原所驱动, 那不同的RA患者在疾病期间将形成独特的或共同的CDR3结构特征的T细胞群。但由于高表达的BV14和BV16的V-D-J区是

相对多样的，因此这种努力是非常困难的。本发明首先识别根据高表达BV14和BV16的普通和支配V-D-J区分组的相似克隆型。包含这些普通克隆型的转录物随后被克隆和分析CDR3序列。该研究表明在来源于不同RA患者的滑液损伤中，这些普通的克隆型具有同样的V-D-J序列。值得注意的是，在两个不同的RA损伤患者中检测到两个一样的CDR3序列。这一结果让人想起在T细胞识别髓磷脂碱性蛋白(MBP)的类似结果，髓磷脂碱性蛋白是多发性硬化病的候选自身抗原。其次，高表达BV14+ 和 BV16+的序列分析表明在不同RA患者的滑液T细胞中，多数CDR3序列是共有的。再次，这些结果支持高表达BV14和BV16的CDR3不是随机产生的，而是由于T细胞对共同但还未确定的某种RA相关的自身抗原的反应而产生的。因为免疫电泳的克隆型分析仅仅能选择性的检测样品大于20%的表达水平，而DNA克隆或测序仅仅能选择性的检测有代表性的克隆型，使用相应于识别CDR3序列的特异引物的进一步研究也许有助于评价中国大量RA人群滑液物质中CDR3结构特征的频度。

本发明指向充分纯化和分离的包含如SEQ ID NO. 1或SEQ ID NO. 2所示的核酸序列的DNA片段，它们分别是类风湿性关节炎患者的T细胞受体的V β 14家族(BV14基因)和V16家族(BV16基因)的互补决定区3(CDR3)的一部分。

本发明指向一种疫苗，该疫苗包含至少一种来自SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2，更可取的是，该DNA片段的浓度大约在10 μ g / ml到 10 mg / ml之间。

本发明指向一种完全纯化和分离的多肽，该多肽的氨基酸序列来自包括SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL 和 SEQ ID NO. 5 在内的组中，这些序列分别源自类风湿性关节炎患者的T细胞受体β链CDR3的BV14 (SEQ ID NO. 3 和SLS) 或BV16 (SEQ ID NO. 4, SQD, SLL 和 SEQ ID NO. 5) 基因。也包括对这些肽的一种抗体。

本发明指向一种疫苗，该疫苗至少包含一种肽，该肽的氨基酸序列源自RA患者的个体T细胞受体的CDR3基因，选自BV14 和 BV16组成的组中。

本发明更进一步指向检测类风湿性关节炎的一种方法。该方法包括分别从可疑个体和正常个体获取组织样品；测量该样品中T细胞受体的BV14和/或BV16的表达水平，并比较可疑个体和正常个体的表达水平。如果BV14和/或者BV16在可疑个体中的表达水平比正常个体中的表达水平足够高，那就表明该个体可能患有类风湿性关节炎。更适宜的是，该组织样品可以取自滑液、滑液损伤组织或外周血。

本发明更进一步指向一种可用于中国人群检测类风湿性关节炎的方法。该方法包括分别从可疑个体和正常个体取组织样品；测量该样品中T细胞受体的BV16的表达水平，并比较可疑个体和正常个体的表达水平。如果BV16在可疑个体中的表达水平比正常个体中的表达水平足够高，那就表明来自中国人群的该个体可能患有类风湿性关节炎。更适宜的是，该组织样品可以取自滑液、滑液损伤组织或外周血。由于发现中国的类风湿病患者与基因型HLA DRB1*0405相关，因此，本方法更适于检测HLA DRB1*0405个体的类风湿性关节炎。

本发明更进一步指向一种风湿性关节炎的检测方法。该方法包括合成与来自SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2所组成的组中的DNA片段互补的探针；从可疑个体取样；将探针与组织样本混合。在本法中阳性的杂交信号提示可疑个体可能患有类风湿性关节炎。该组织样品可以取自滑液、滑液损伤组织或外周血。

本发明指向一种检测类风湿性关节炎的方法。这方法包括合成一种针对多肽的抗体，该多肽的氨基酸序列来自于SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL与 SEQ ID NO. 5组成的组中；从可疑个体中取组织样品；将该抗体与组织样品混合。在本法中阳性的信号提示可疑个体可能患有类风湿性关节炎。该组织样品可以取自滑液、滑液损伤组织或外周血。

本发明更进一步指向一种治疗类风湿性关节炎的方法，该方法是给患者注射或服用有效剂量的免疫原性T细胞受体肽从而引发免疫反应。这些多肽的氨基酸序列选自由SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和 SEQ ID NO. 5.组成的组中。

为了加强该多肽的免疫原性，可以将该多肽配对或免疫时使用佐剂。

本发明更进一步指向一种治疗类风湿性关节炎的方法，该方法是给患者注射或服用有效剂量的针对多肽的抗体，这些多肽的氨基酸序列选自由SEQ ID NO. 3, SLS, SEQ ID NO. 4, SQD, SLL和SEQ ID NO. 5组成的组中。

本发明进一步指向治疗类风湿性关节炎的一种方法。该方法包括

给予个体含有连接了DNA片段促进剂的表达载体，该片段具有编码单链T细胞受体V β 16的肽的核酸序列或者是其中的一部分。在本方法中，该DNA片段表达达到一定水平就可以引发针对所编码肽的免疫反应，进而防止类风湿性关节炎的发生或者治疗类风湿性关节炎。

更可取的是，核酸序列编码V β 16的互补决定区3 (CDR3) 并包含SEQ ID NO. 2 所示的序列，更适合的是，V β 16的CDR3包含一种选自SEQ ID NO. 4、SQD、SLL和SEQ ID NO. 5组中的氨基酸序列。

促进剂最好是可诱导的或组成型的。具有代表性的例子包括 β 肌动蛋白促进剂、SV40早期和晚期促进剂、免疫球蛋白促进剂、人类巨细胞病毒促进剂和逆转录病毒LTRs等。

更可取的是，DNA表达载体的给药方式可以是皮下、皮内、静脉注射或口服，或更可取的是通过肌肉或脊髓液注射。

本发明指向一种治疗类风湿性关节炎的一种方法。该方法包括给个体注射或服用含有连接了DNA片段的促进剂的表达载体，该片段具有编码单链T细胞受体V β 14的肽的核酸序列或者是其中的一部分。在本方法中，该核酸序列包括如SEQ ID NO. 1所示的核酸序列。进入到人体后，该DNA片段表达达到一定丰度水平就可以引发针对所编码肽的免疫反应，进而防止类风湿性关节炎的发生或者治疗类风湿性关节炎。

更合适的是，核酸序列编码的V β 14的互补决定区3 (CDR3) 包含一种选自从包括SEQ ID NO. 3、SLS组中的氨基酸序列。

随着克隆技术的最新进展，可以有选择地关闭基因。治疗类风湿

性关节炎 (RA) 的一种可能的方法是合成可以特异结合目标基因的反义RNA或DNA分子,这样就可以中断表达基因成为蛋白的精确的分子机制。通过应用上述识别的如SEQ ID NO. 1 和 / 或 2 所示的寡核苷酸,这种反义技术也许可以用于治疗RA。

本发明进一步指向可以抑制类风湿性关节炎患者的病理性T细胞反应的药物成分。该成分包括来源于单链 T细胞受体 V β 14 或V β 16 的有效免疫剂量的多肽或多肽的一部分以及可接受的药物载体。更可取的是,该多肽的氨基酸序列选自来源于 V β 14 或 V β 16 的CDR3 的SEQ ID NO. 3、SLS、SEQ ID NO. 4、SQD、SLL和SEQ ID NO. 5等。

给出如下例子是为了说明本发明的各种具体目的,并不意味着对本发明任何形式的限制。

实施例1

患者和样品

本研究包括根据美国风湿症协会标准确诊患有RA的37名中国患者。患骨关节炎(OA)的七名患者作为对照组。包含标准之一是:选择患者的标准是试验前两个月内未接受含甾类化合物或者其它免疫抑制剂治疗。进行症状治疗的患者不被排除在外。外周血单核细胞从肝素化的样品中通过Ficoll-Hypaque梯度分离制备。通过离心并洗涤收集来自两组患者的滑液细胞。从肝素化的血液样品以Ficoll-Hypaque梯度制备外周血单核细胞(PBMC)。通过离心收集并洗涤取自两组患者的滑液细胞,在与本研究不相关的外科手术过程中取得来自RA和OA的滑液损伤细胞。组织样品切成小片并立即进行RNA提取处理。研究

方案经单位伦理检查委员会批准。

实施例2

RNA提取方案

使用 TRIZOL RNA 分离试剂盒(GIBCOBRL, Carlsbad, CA)从外围血(PB)滑液(SF)或者滑膜组织(ST)以及试验材料(PB, SF 和 ST 样品)中提取总RNA。在DEPC处理过的研钵中匀质处理 50-100 mg ST, 然后于 1ml TRIZOL 试剂研碎。来自 PB 和 SF 的细胞直接溶解在 1 ml TRIZOL 试剂中, 每 1 ml TRIZOL 中加入 0.2 ml 三氯甲烷并混合均匀。根据生产规程, 离心, 加入异丙醇混匀沉淀 RNA。

实施例3

HLA基因型分析

所有患者的PBMC样品要进行HLA DR和DQ基因型分析。简要说就是从经过EDTA处理的患者血中提取基因组DNA, 并通过特异序列引物的PCR使用高分辨率的SP UniTray (PEL-FREEZE Clinical SSstem, Brown Deer, WI)来确定HLA-DRB1和HLA-DQB1等位基因。扩增等位基因的引物组由世界卫生组织(WHO)国际命名委员会命名(<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>), HLA-DRB1 和 HLA-DQB1等位基因操作板的分析检测根据生产商提供的实验方案进行。

实施例4

通过定量PCR分析测定滑液和血液中T细胞BV基因的方案

根据生产商提供的实验方案, 用TA Cloning®试剂盒(Invitrogen, San

Diego, CA)和One Shot® TOP10 *E. coli* TOP10 结肠活性细胞

(Invitrogen, San Diego, CA) 克隆25个TCRBV和TCRBC基因片断。特异BV引物的寡核苷酸如表1所示, 在20 μ l反应体系中使用随机引物和Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA)通过RNA合成cDNA。用实时定量PCR分析TCR BV的基因表达。每次反应都设BV-BC扩增的内部参考对照和不含cDNA的无模板对照。在ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)的96孔PCR板上进行实时PCR分析。简而言之, 以一部分cDNA样品(0.7 μ l)与25对特异BV引物和1对BC引物(终极浓度为0.1mM)分别混合, 再与SSBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)一同混合, 最终反应体积为50 μ l。反应先在50 $^{\circ}$ C的温度下进行2分钟, 然后在95 $^{\circ}$ 的温度下进行10分钟, 作为热启动激活反应, 随后进行40个循环反应, 即在95 $^{\circ}$ C的温度下进行15秒, 在60 $^{\circ}$ C的温度下进行1分钟。基于PCR反应的信号强度, 可根据以下公式计算出个体BV基因的表达:

$$\text{TCR BVn (\%)} = [2^{-(\text{BVn Ct}-\text{BC Ct})} \times 100 / \sum (2^{-(\text{BV1-25-Ct}-\text{BC Ct})} \times 100)] \times 100.$$

(Ct指的是阈值周期(threshold cycle))。

实施例5

免疫电镜的分析方法

用1 μ l源自ST样品的cDNA在如下扩增剂中进行PCR反应: 5 μ l 10x PCR缓冲剂 (100 mM Tris-HCl, pH 8.3 and 500 mM 氯化钾), 3 μ l 25 mM氯化镁, 1 μ l 10 mM的dNTP混合物, 0.5 μ l的Taq 聚合酶 (5 U/ μ l)

(Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 pmol的引物(BV14或 BV16 促进引物和BC 引物)。PCR扩增在94°C的温度下经过30秒变性反应, 随之在57°C的温度下进行30秒复性反应, 然后在72°C的温度下经过30秒扩展反应, 反复进行40个循环。依照修正条约进行免疫电泳分析。用2 μl BV14-BC或BV16-BC PCR产物作为模板, 以单一内部荧光标记为每一个标以6FAM (扩充) 的BC或BJ引物进行径流反应 (表2)。反应的参数是在94°C的温度下进行30秒变性反应, 并重复下列反应15个循环, 94°C温度下45秒, 55°C温度下45秒, 72°C温度下1分钟, 然后在72°C温度下进行5分钟的扩展步骤。PCR终产物在甲酰胺中经过变性反应, 在Applied Biosystems 3100 Prism中用GeneScan 3.7软件 (Perkin-Elmer, Boston, MA). 进行分析, 标记产物用单色电子荧光图进行单独分析。对应CDR3长度的相对信号强度 (RIS) 表达为实验波峰下的分布区, 这一分布区被高斯分布值内的对照波峰下的分布区所分割。基于这些信号强度的分布, 可选择特异BJ引物作为CDR3的序列分析。

表2 标记反应的引物

引物	序列 5' → 3'	离密码子 (codon) 的距离 106, (bp)*
BC (Cb4)	CGA CCT CGG GTG GGA ACA (SEQ ID NO. 60)	
X-BC	X-CAC AGC GAC CTC GGG TGG G (SEQ ID NO. 61)	73
X-BJ1.1	X-ACT GTG AGT CTG GTG CCT TGT (SEQ ID NO. 62)	29
X-BJ1.2	X-ACA ACG GTT AAC TTG GTC CCC GAA (SEQ ID	32

	NO. 63)	
X-BJ1.3	X-GGT CCT CTA CAA CAG TGA GCC AAC (SEQ ID NO. 64)	40
X-BJ1.4	X-AAG AGA GAG AGC TGG GTT CCA CTG (SEQ ID NO. 65)	32
X-BJ1.5	X-GGA GAG TCG AGT TCC ATC A (SEQ ID NO. 66)	27
X-BJ1.6	X-TGT CAC AGT GAG CCT GGT CCC ATT (SEQ ID NO. 67)	33
X-BJ2.1	X-CCT GGC CCG AAG AAC TGC TCA (SEQ ID NO. 68)	14
X-BJ2.2	X-GTC CTC CAG TAC GCT CAG CCT AGA (SEQ ID NO. 69)	39
X-BJ2.3	X-TGC CTG GGC CAA AAT ACT GCG (SEQ ID NO. 70)	16
X-BJ2.4	X-TCC CCG CGC CGA AGT ACT GAA (SEQ ID NO. 71)	16
X-BJ2.5	X-TCG AGC ACC AGG AGC CGC (SEQ ID NO. 72)	35
X-BJ2.6	X-CTG CTG CCG GCC CCG AAA GTC (SEQ ID NO. 73)	20
X-BJ2.7	X-TGA CCG TGA GCC TGG TGC CCG (SEQ ID NO. 74)	31

X代表6FAM。* CDR3区为95-106残基以内。

实施例6

BV14和BV16转录物的DNA克隆与序列分析方案

以源自ST样本的BV14和BV16促进引物或BC下游引物扩增的PCR产物作为第二轮特异的未知BJ引物的PCR模板（表2）。第二次PCR产物被克隆至TA克隆载体pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。使用BV14或BV16促进引物与一个相应的BJ引物，从每个样品克隆挑选15个克隆体作为克隆PCR。选择那些经过PCR后显示显著扩增的阳性质粒。用QIAPrep mini plasmid kit (Qiagen, Valencia, CA)制备这些样品

的质粒DNA，用BV14或BV16促进引物对V-D-J区加以测序，以确定CDR3区的序列。

实施例7

限制性TCR V 基因在源自RA患者滑液或损伤组织的T细胞的使用

如例1中所述，该研究包括一组确诊为类风湿性关节炎（RA）的患者，并以一组骨关节炎（OA）患者作为对照组。临床特征以及HLA DR和DQ的基因型如表3所示。在这组RA中国患者中，DRB1*0405基因型代表大多数显性DR4（16/37，43%），对比另外两种DR4基因型，与RA高加索患者具有典型联系的DRB1*0401（8%）and DRB1*0404（3%）。另外，DRB1*09012（35%）和三个DQB1基因型（0301，0303 and 0401）在这组RA患者中也以较高频率表达（30% - 41%）。

表3. 患者的临床特征和HLA基因型

	RA		OA	
Total # of patients	37		7	
Age	56 ±15		64 ±17	
Sex (M / F)	11 / 26		2 / 5	
Disease duration (yrs)	9 ± 7		9 ± 4	
HLA DRB1*	# of total	%	# of total	%
0405	16/37	43	3/7	43
0401	3/37	8	0/7	-
0404	1/37	3	0/7	-
09012	13/37	35	5/7	71
08032	6/37	16	1/7	14
1202	7/37	19	1/7	14
0701	5/37	14	0/7	-
1501	5/37	14	1/7	14
1302	3/37	8	0/7	-
1001	3/37	8	0/7	-

1405	2/37	5	0/7	-
HLA DQB1*				
0303	15/37	41	4/7	57
0301	11/37	30	2/7	29
0401	12/37	32	3/7	43
0601	5/37	14	2/7	29
0201	4/37	11	0/7	-
0501	4/37	11	0/7	-
0602	4/37	11	0/7	-

首先检测源自RA滑液和滑液损伤的T细胞是否显示限制性TCR BV基因，并确定这种限制性BV基因是否与HLA基因型有关。之后，先用25个特异引物通过实时定量PCR对PB和滑液（SF和ST）样品进行TCR BV基因使用分析。用于本研究的实时PCR方法对检测基于BV表达模式的T细胞的选择性增殖是敏感和特异的。图1A和1B表明用于实时PCR分析的特异BV引物优化以及用超抗原刺激后外周T细胞的BV基因分析。图1A中，通过ABI 7000 Sequence Detection System测试了对于25个BV家族和BC基因特异的一套寡核苷酸引物的扩增效率，结果显示在周期数功能方面具有类似的荧光强度（ ΔR_n ）斜率，这表明在例4所描述的PCR试验条件下TCRBV和TCRBC引物具有类似的扩增效率。在图1B中，外周血单核细胞取自四个健康的个体并在存在/缺乏中毒性休克综合征毒素（TSST-1）（预先确定的浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）单独培养7天，离心收集细胞后洗涤，然后提取RNA，用25个BV基因特异引物进行实时PCR分析。PCR条件如上面例4所述。结果用相对于BC表达水平的BV基因的四种制备细胞的BV表达率来表示。如图1B所示，用中毒性休克综合征毒素（一种可以激活BV2⁺ T细胞的超抗原）刺激后，利

用实时PCR分析,在四种外周血单核细胞制剂中迅速检测到BV2的选择性增殖。

实施例8

RA患者的血液和滑液样品中BV基因分配与实时PCR分析的对照

当一些SF和PB样品不可供分析使用时,从37个ST样品和20个取自相同RA病人的PB和SF样品中提取RNA。应用25个BV基因的特异引物通过实时定量PCR对每一个转录物中的BV基因表达进行分析。7个OA患者的所有平行样品作为对照进行检测。BV基因分布以每个BV基因相对于BC基因表达水平的百分比作为Y轴表示,星号代表过表达的BV基因剩余的BV基因的表达具有显著性差异。图2揭示在源自RA的ST样品中,BV对BV14(27%的平均的表达水平),BV16(31%的平均的表达水平)和对于一种较少的表达,BV20(17%),偏移非常显著。同样地,可以观察到来自同样的RA患者SF样品(28%)中BV16的过表达,但平行的SF样品中BV14的偏移就不显著。相比之下,在源自RA的PB样品中和来源于OA患者的ST及SF样品一样,BV基因分配呈现出高度不同。BV14和BV16在这些来源于OA的滑液1样品中没有显示超表达。进一步分析表明在这群RA患者中这种相互关联的趋势不是在BV14而是在BV16的超表达与DRB1*0405的表达之间。在37名RA患者中分析了DR和DQ基因型和BV基因用法,BV16和BV14的表达在DRB1*0405阳性的个体($n = 16$)中分别是29%和11%,在DRB1*0405阴性的个体($n = 21$)分别是21%和20%。然而,这种差异没有达到统计学意义。相比之下,BV14和BV16的表达水平在其它经常地发现的遗传型的RA患者中稍低,包括

DRB1*09012和DQB1*0301, 0303和0401。

实施例9

在源自RA损伤的T细胞的超表达BV16和BV14转录物中BJ基因的优化使用和CDR3长度分析：

应用免疫电泳技术, 通过CDR3长度分析检测源自选择性滑液材料(这些样品中的相对表达水平>20%)的T细胞超表达BV14 和BV16的克隆性。由于BV14和BV16在OA患者的ST样品中没有超表达, 可以检测两种样品(OA2和OA3)作为对照。

通过免疫电泳应用5' BV14-3' BC特异引物, 对源自滑液原料(ST和SF)的超表达BV14转录物进行5' BV-BD-BJ-3' BC区克隆性分析。CDR3长度被表示为波峰分布区(X轴), Y轴代表任意荧光强度单位。对BV14转录物分析的选择是基于所选样品的BV表达水平 (>20%)。

通过免疫电泳应用5' BV16-3' BC特异引物, 对源自滑液材料(ST和SF)的过表达的BV16的转录物进行5' BV-BD-BJ-3' BC区克隆性分析。对BV16转录物分析的选择是基于所选样品的BV表达水平 (>20%)。BV16在患者RA2, RA17和RA32的ST样品中没有表达。

如图3和4所示, 当两对5' BV14-3' BC 和 5' BV16-3' BC特异引物被用于分析位于BV14/BV16-BJ-3' BC之间的序列区时, BV14和BV16基因在源自同一RA患者的SF和ST的样品中都表现出不同的CDR3长度图谱。当其它样品表现出多克隆模式时, 一些ST样品显示高度限制性的特性克隆型的克隆性(如BV14的RA2、RA17、RA23及RA28与BV16的RA21及RA18)。应用BV14或者BV16引物和一套13个个体BJ基因的特异

引物，通过免疫电泳，进一步分别分析BV14 和BV16转录物的CDR3长度图谱，以鉴定同各种BV和BJ结合时的显著克隆模式。以源自两个OA患者的ST样品的转录物作为对照。图5表明在OA患者ST样品的两种对照中，各种模式的克隆性均可检测到。

实施例10

以相似CDR3长度拥有相同BV和BJ化合物的典型克隆型模式

使用13个BJ基因的BV14或BV16促进引物和反义引物，通过免疫电泳，进一步分析和净化已检测的BV14和BV16的CDR3长度图谱。

源自所选的ST样品的超表达BV14和 / 或BV16的转录物共产生了689个CDR3长度图谱。分析揭示了若干种重要的研究结果。首先，三到四个BJ基因优先用于超表达BV14和BV16中。BJ1S4、BJ2S1和BJ2S7优先用于BV16，而BJ1S1、BJ2S1、BJ2S4与BJ2S7则与BV14关联。具有代表性的例子如图5所示。

此外，一些超表达BV14和BV16转录物中包含有普通和显著的克隆型，这些克隆型与CDR3长度具有BV和BJ相同的结构特点，这在不同RA患者的各种ST样品出现过。至少有三个分别带有15，21和24个碱基对的相同的CDR3克隆型在BV16的BJ2S1、BJ2S7和BJ1S1的转录物中被发现。类似的普通克隆型也出现在源自独立个体的ST样品的BJ2S1，BJ2S7，BJ1S4 and BJ1S1的BV14中。具有代表性的克隆型模式如图6中所示，它表明典型的克隆型是具有相似CDR3长度(高峰区域，对BV16和BV14而言，21、24个碱基对)的同样的BV和BJ结合体。使用TA cloning试剂盒克隆普通克隆型的TCR转录物，随后使用相应的BV和BJ

引物对所产生的DNA克隆进行CDR3序列分析。结果支持了这样一种可能性，那就是这些普通克隆型可能具有相同的CDR3序列或相同的CDR3序列基序。选择一些显性克隆型作进一步的分析。

实施例11

包含普通克隆型的TCR转录物的CDR3序列分析

为了确证拥有同样的V-D-J结构的特性在已经确定的克隆型不同患者中是否有同样CDR3序列或者普通CDR3序列图，将对出现在单独ST样品的TCR转录物的普通克隆型的特征进行描述。

选择一些显性的克隆型分析。所选择的普通克隆型的TCR转录物被克隆进TA载体，这样，DNA克隆就可以通过应用相应的BV和BJ引物进行CDR3序列分析，每一簇BV和BJ的化合物大约有15种被随机选作序列分析的单独的DNA克隆。总共490个DNA克隆被成功排序。结果表明同簇DNA克隆的大多数个体具有相同的选择性克隆型CDR3序列，这表明T细胞的体内克隆的增殖载有克隆型。大多数克隆型显示独立于各个个体的单独CDR3序列。在不同个体中发现的一些类似的克隆型具有相同CDR3序列。

使用TA克隆方法克隆包含三个类似克隆型

(BV16-2S1/2S7/1S1-CDR3长度分别为24bp/21bp/15bp)的超表达BV16的转录物。针对每一DNA克隆，使用BV和BJ的特异引物对所产生的10到15个DNA克隆进行V-D J序列测序。

使用TA克隆方法克隆包含四个类似的克隆型

(BV14-2S1/2S7/1S4/1S1-CDR3长度24bp/21bp/15bp)过表达BV14的

转录物。针对每一DNA克隆，使用BV和BJ的特异引物对所产生的10-15 DNA克隆进行V-D J序列测序。

在RA12和RA16的BV16-BJ2S7的转录物中发现了一个CDR3序列 (SEQ ID NO. 4) (表4)。另一个CDR3序列 (SEQ ID NO. 3) 出现在RA22和RA23的BV14-2S7的转录物中(表5)。如表4和表5所示，这些类似的克隆型表现出相同/普通的序列基序。BV16的SQD、SLL和SWGG基序在6/12个BV16个体中被发现，而SLS基序在5/14个BV14的个体中被找到。总的来说，SLS, SP- 和SS的序列模式在86%的BV14 克隆型找到，BV16克隆型的77%有SQ-, SLL and SWGG序列模式。

表4 源自RA的ST样品中BV16克隆型的CDR3序列

样品号	BV-BJ	CDR3 长度 (bp)	V-D-J 序列
RA-6	16-2S1	24	Y F C A S <u>S Q D</u> S G G G G E Q F F G P G (SEQ ID NO. 75) tatttctgtgccagcagccaagatagcggggggggagggtgagcagttcttcgggccagga (SEQ ID NO. 76)
RA-16	16-2S1	24	Y F C A S S R L G Q G Y N E Q F F G P G (SEQ ID NO. 77) Tatttctgtgccagcagccgactgggacagggctacaatgagcagttcttcgggccagga (SEQ ID NO. 78)
RA-21	16-2S1	24	Y F C A S <u>S Q D</u> L D S Y N E Q F F G P G (SEQ ID NO. 79) Tatttctgtgccagcagccaagatctggacagctacaatgagcagttcttcgggccagga (SEQ ID NO. 80)
RA-19	16-2S1	24	Y F C A S S Q G T S G I T E Q F F G P G (SEQ ID NO. 81) Tatttctgtgccagcagccaggggactagcgggatcactgagcagttcttcgggccagga (SEQ ID NO. 82)
RA-8	16-2S1	24	Y F C A S S Q L A G P Y N E Q F F G P G (SEQ ID NO. 83) tatttctgtgccagcagccagctagcgggaccctacaatgagcagttcttcgggccagga (SEQ ID NO. 84)
RA-1	16-2S1	24	Y F C A S <u>S L L</u> G T V S Y E Q F F G P G (SEQ ID NO. 85) tatttctgtgccagcagccttctcggcacagtatcctatgagcagttcttcgggccagga (SEQ ID NO. 86)
RA-10	16-2S7	21	Y F C A S P L G T A L S Y E Q F F G P G (SEQ ID NO. 87) tatttctgtgccagcccctigggacagcgctatcctacyagcagttcttcgggccagga

			(SEQ ID NO. 88)
RA-12	16-2S7	21	<u>YFCASSQADGTHYEQFFGPG</u> (SEQ ID NO. 89) tatttctgtgccagcagccaagctgacgggacccattacgagcagtacttcgggccgggc
RA-12	16-2S7	21	(SEQ ID NO. 90) YFCASS <u>QDKGH</u> FYEQFFGPG (SEQ ID NO. 91) tatttctgtgccagcagccaagataagggacacttctacgagcagtacttcgggccgggc
			(SEQ ID NO. 92)
RA-16	16-2S7	21	<u>YFCASSQADGTHYEQFFGPG</u> (SEQ ID NO. 93) Tatttctgtgccagcagccaagctgacgggacccattacgagcagtacttcgggccgggc
			(SEQ ID NO. 94)
RA-14	16-2S7	21	YFCASS <u>WGGT</u> DIYEQFFGPG (SEQ ID NO. 95) Tatttctgtgccagcagctggggcgggacagacatctacgagcagtacttcgggccgggc
			(SEQ ID NO. 96)
RA-1	16-2S7	21	YFCASS <u>LLGTVS</u> YEQFFGPG (SEQ ID NO. 97) Tatttctgtgccagcagccttctcggcacagtatcctacgagcagtacttcgggccgggc
			(SEQ ID NO. 98)
RA-17	16-1S1	15	YFCASS <u>QGLNTE</u> AFFGQG (SEQ ID NO. 99) Tatttctgtgccagcagccaagggccttaacactgaagcttctttggacaaggc (SEQ ID NO. 100)
RA-5	16-1S1	15	YFCAS <u>RASRYT</u> E AFFGQG (SEQ ID NO. 101) Tatttctgtgccagcagggcaagcaggtacactgaagcttctttggacaaggc (SEQ ID NO. 102)
RA-5	16-1S1	15	YFCAS <u>RASRYT</u> E AFFGQG (SEQ ID NO. 103) Tatttctgtgccagcagggcaagcaggtacactgaagcttctttggacaaggc (SEQ ID NO. 104)
RA-12	16-1S1	15	YFCAS <u>STGVNT</u> E AFFGQG (SEQ ID NO. 105) TatttctgtgccagcAgtacaggggtgaacactgaagcttctttggacaaggc (SEQ ID NO. 106)
RA-16	16-1S1	15	YFCASS <u>LTTNT</u> E AFFGQG (SEQ ID NO. 107) Tatttctgtgccagcagcctcacaacgaacactgaagcttctttggacaaggc (SEQ ID NO. 108)
RA-24	16-1S1	15	YFCASS <u>QDSY</u> TE AFFGQG (SEQ ID NO. 109) Tatttctgtgccagcagccaagattcgtacactgaagcttctttggacaaggc (SEQ ID NO. 110)

RA-1 16-1S1 15 Y F C A S S W G G N T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 111)
 Tatttctgtgccagcagctgggggggcaacactgaagcttcttggacaaggc (SEQ ID NO. 112)

表5 源自RA的ST样品中BV14克隆型的CDR3序列

样品号	BV-BJ	CDR3 长度 (bp)	CDR3 序列
RA-32	14-2S1	24	Y F C A S <u>S P T R D R G N E Q F F G</u> P G (SEQ ID NO. 113) tacttctgtgccagcagctcccacgcccgggaaataatgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 114)
RA-13	14-2S1	24	Y F C A S <u>S S P I A G S S Y N E Q F F</u> G P G (SEQ ID NO.115) Tacttctgtgccagcagttcccacatagcggggagctccaatgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 116)
RA-16	14-2S1	24	Y F C A S <u>S F W A P T D N E Q F F G P</u> G (SEQ ID NO. 117) Tacttctgtgccagcagttctgggcccctacggacaataatgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 118)
RA-23	14-2S1	24	Y F C A S <u>S S S S P T S Y N E Q F F</u> G P G (SEQ ID NO. 119) Tacttctgtgccagcagttctagcagccccacctcctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 120)
RA-27	14-2S1	24	Y F C A S <u>S P R E G L L N E Q F F G</u> P G (SEQ ID NO. 121) Tacttctgtgccagcagccctagggagggcctcctcaataatgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 122)
RA-1	14-2S1	24	Y F C A S <u>S P W T S G S G N E Q F F</u> G P G (SEQ ID NO. 123) tacttctgtgccagcagctccctggactagcgggagtggtgagcagttctcgggccagga_ (SEQ ID NO. 124)
RA-32	14-2S7	21	Y F C A S <u>S L R T R F Y E Q Y F G P</u> G (SEQ ID NO. 125) Tacttctgtgccagcagtttaaggacacgcttctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 126)
RA-8	14-2S7	21	Y F C A S <u>S L T S G R Q Y E Q Y F G</u>

RA-8	14-2S7	21	<p>P G (SEQ ID NO. 127)</p> <p>Tacttctgtgccagcagtttgaccagcgggctcagtagcagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 128)</p> <p><u>Y F C A S S S G G S L F Y E Q Y F G</u></p> <p><u>P G</u> (SEQ ID NO. 129)</p> <p>Tacttctgtgccagcagttccggggcagtcgttctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 130)</p>
RA-7	14-2S7	21	<p>Y F C A S <u>S L S</u> V G A T Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 131)</p>
RA-7	14-2S7	21	<p>Tacttctgtgccagcagttatcggtcgggctacctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 132)</p> <p><u>Y F C A S S S G G S L F Y E Q Y F G</u></p> <p><u>P G</u> (SEQ ID NO. 133)</p> <p>Tacttctgtgccagcagttccggggcagtcgttctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 134)</p>
RA-12	14-2S7	21	<p>Y F C A S S P S I S S H Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 135)</p> <p>Tacttctgtgccagcagccaagtattagttcccactacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 136)</p>
RA-13	14-2S7	21	<p>Y F C A S S R D G V S Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 137)</p> <p>Tacttctgtgccagcagtcgtgatgggtctcctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 138)</p>
RA-2	14-2S7	21	<p>Y F C A S <u>S L S</u> S T G R E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 139)</p> <p>Tacttctgtgccagcagttatctcgacagggaggagcagttctcgggccgggc (SEQ ID NO. 140)</p>
RA-17	14-2S7	21	<p>Y F C A S <u>S L S</u> F R L D Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 141)</p> <p>Tacttctgtgccagcagttatcgttagactagactacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 142)</p>
RA-23	14-2S7	21	<p>Y F C A S S P S G Q G S Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 143)</p> <p>Tacttctgtgccagcagtcctcgacaggggtcctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 144)</p>
RA-1	14-2S7	21	<p>Y F C A S S F G T V L S Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 145)</p> <p>Tacttctgtgccagcagtttgggacagtcctcctcctacgagcagttctcgggccagga (SEQ ID NO. 146)</p>
RA-34	14-2S7	21	<p>Y F C A S S P R L A G D K E Q Y F G</p>

RA-34	14-2S7	21	<p>P G (SEQ ID NO. 147)</p> <p>Tacttctgtgccagcag<u>tccccgactagccggagata</u>aaaggagcagtacttcgggccgggc (SEQ ID NO. 148)</p> <p>Y F C A S <u>S L S</u> A R T T Y E Q Y F G P G (SEQ ID NO. 149)</p> <p>Tacttctgtgccagcag<u>ttaagtgccaggacaacctacgagcagttcttcgggccagga</u> (SEQ ID NO. 150)</p>
RA-13	14-1S4	15	<p>Y F C A S <u>S L I G G</u> N E K L F L G S G (SEQ ID NO. 151)</p> <p>Tacttctgtgccagcag<u>ttgatagggggcaatgaaaaactgtttttggcagtgga</u> (SEQ ID NO. 152)</p>
RA-1	14-1S4	15	<p>Y F C A S <u>S L S</u> Q E T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 153)</p> <p>Tacttctgtgccagag<u>ttatcccaggaaactgaagctttctttggacaaggc</u> (SEQ ID NO. 154)</p>
RA-34	14-1S4	15	<p>Y F C A S R A G T G F E K L F F G S G (SEQ ID NO. 155)</p> <p>Tacttctgtgccagcag<u>gggccgggacagggttaaactgtttttggcagtgga</u> (SEQ ID NO. 156)</p>
RA-2	14-1S1	15	<p>Y F C A S <u>S L S</u> Q N T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 157)</p> <p>Tacttctgtgccagcag<u>tctgtcacagaacactgaagctttctttggacaaggc</u> (SEQ ID NO. 158)</p>
RA-23	14-1S1	15	<p>Y F C A S S P R V N T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 159)</p> <p>Tacttctgtgccagag<u>tccccgggtcaaacactgaagctttctttggacaaggc</u> (SEQ ID NO. 160)</p>
RA-1	14-1S1	15	<p>Y F C A S <u>S L S</u> Q E T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 161)</p> <p>Tacttctgtgccagag<u>ttatcccaggaaactgaagctttctttggacaaggc</u> (SEQ ID NO. 162)</p>
RA-34	14-1S1	15	<p>Y F C A S S L G R N T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 163)</p>
RA-34	14-1S1	15	<p>Tacttctgtgccagcag<u>ccctagggaggaacactgaagctttctttggacaaggc</u> (SEQ ID NO. 164)</p>
RA-34	14-1S1	15	<p>Y F C A S S S R G Y T E A F F G Q G (SEQ ID NO. 165)</p> <p>Tacttctgtgccagcag<u>ttccaggggatacactgaagctttctttggacaaggc</u> (SEQ ID NO. 166)</p> <p>Y F C A S S S L A T A E A F F G Q G</p>

(SEQ ID NO. 167)

Tacttctgtgccagcagttccctcgctactgctgaagctttcttggacaaggc (SEQ ID
NO. 168)

表中用粗体标出V-D-J结合区序列。相同的V-D- J序列(SSGGSLF)和序列主题(motif)(SLS)加了下划线。

在本说明书中被提及的任何专利或者出版物是用于表述本发明所达到的技术水平的, 尽管本发明描述时涉及了特定的细节, 但这并没有对本发明构成限制, 而是使本发明更易于接受各种不背离其基本原理的改变和修正。

序列表

- <110> 臧敬五 (Zhang, Jingwu Z.)
何国强 (Ho, Walter Kowk Keung)
张东青 (Zhang, Dongqing)
孙伟 (Sun, Wei)
- <120> T 细胞受体 CDR-3 序列及治疗与检测类风湿性关节炎的方法
- <130> 057186.000003
- <140>
- <151> 2002-07-02
- <160> 168
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> 合成的
- <220>
- <221>
- <223> 类风湿性关节炎(下称RA) 患者T细胞受体(下称TCR) 的V(14 家族(BV14基因)中互补决定区-3(CDR-3)的一部分
- <400> 1

agccaagctg acgggaccca t 21

- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> 合成的
- <220>
- <221>
- <223> RA患者TCR的V(16家族(BV16基因)中互补决定区-3(CDR-3)的一部分
- <400> 2

agttccgggg gcagtctgtt c 21

- <210> 3
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> 人类
- <220>
- <221> 多肽
- <223> 保存了源自RA患者TCR的(链BV14基因CDR-3的氨基酸序列
- <400> 3

Ser Gln Ala Asp Gly Thr His
5

<210> 4

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 多肽
 <223> 保存了源自RA患者TCR的(链BV16基因CDR-3的氨基酸序列
 <400> 4

Ser Ser Gly Gly Ser Leu Phe
5

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 基序
 <223> 源自RA患者TCR的(链BV16基因CDR-3的氨基酸序列基序
 <400> 5

Ser Trp Gly Gly

<210> 6
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> T细胞受体中人类(链可变区V(14的氨基酸序列
 <400> 6

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

<210> 7
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> T细胞受体中人类(链可变区V(16的氨基酸序列
 <400> 7

```

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

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV1基因的特异促进引物
 <400> 8

aagcacctga tcacagcaac t 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV1基因的特异反向引物
 <400> 9

tagttcagag tgcaagtcag g 21

<210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV2基因的特异促进引物
 <400> 10

ggttatctgt aagagtggaa cct 23

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV2基因的特异反向引物
 <400> 11

aggatgggca ctggtcactg t 21

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV3基因的特异促进引物
 <400> 12

tcgagatatc tagtcaaaag gacg 24

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV3基因的特异反向引物
 <400> 13

ggtgctggcg gactccagaa t 21

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>

<221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV4基因的特异促进引物
 <400> 14

aagcagggat atctgtcaac gt 22

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV4基因的特异反向引物
 <400> 15

ttcagggctc atgttgctca c 21

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV5基因的特异促进引物
 <400> 16

gatcaaaaacg agaggacagc a 21

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV5基因的特异反向引物
 <400> 17

agcaccaagg cgctcacatt ca 22

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV6基因的特异促进引物
 <400> 18

ctcaggtgtg atccaatttc a	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 合成的	
<220>	
<221> 结合引物	
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV6基因的特异反向引物	
<400> 19	
cccccgctct gtgcgctgga t	21
<210> 20	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 合成的	
<220>	
<221> 结合引物	
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV7基因的特异促进引物	
<400> 20	
catgggaatg acaaataaga agtct	25
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 合成的	
<220>	
<221> 结合引物	
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV7基因的特异反向引物	
<400> 21	
tggctgcagg gcgtgtaggt g	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 合成的	
<220>	
<221> 结合引物	
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV8基因的特异促进引物	
<400> 22	
ccccgcatg aggtgacaga g	21
<210> 23	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV8基因的特异反向引物
 <400> 23

gagtcacctgg gttctgaggg c 21

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV9基因的特异促进引物
 <400> 24

ccaaaatacc tggtcacaca g 21

<210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV9基因的特异反向引物
 <400> 25

ccaggaatt gatgtgaaga tt 22

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV10基因的特异促进引物
 <400> 26

acctagacit ctggtcaaag ca 22

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV10基因的特异反向引物

<400> 27

ggactggatc tccaaggtac a 21

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221> 结合引物

<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV11基因的特异促进引物

<400> 28

ttatagggac aggaaagaag atc 23

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221> 结合引物

<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV11基因的特异反向引物

<400> 29

atgtgagggc ctggcagact c 21

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221> 结合引物

<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV12基因的特异促进引物

<400> 30

caagacacaa gatcacagag aca 23

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221> 结合引物

<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV12基因的特异反向引物

<400> 31

ggcagcagac tccagagtga g 21

<210> 32

<211> 23
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV13基因的特异促进引物
 <400> 32

tgaagacagg acagagcatg aca 23

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV13基因的特异反向引物
 <400> 33

cacagatgtc tgggaggag c 21

<210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV14基因的特异促进引物
 <400> 34

acccaagata cctcatcaca gtg 23

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV14基因的特异反向引物
 <400> 35

agaggtctgg ttggggctgg g 21

<210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>

<221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV15基因的特异促进引物
 <400> 36

tcacaaagac aggaaagagg att 23

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV15基因的特异反向引物
 <400> 37

ggggatggca gactctaggg a 21

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV16基因的特异促进引物
 <400> 38

gttccccagc cacagcgtaa ta 22

<210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV16基因的特异反向引物
 <400> 39

cagttctgca ggctgcacct t 21

<210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV17基因的特异促进引物
 <400> 40

gtccccaag tacctgttca ga 22

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV17基因的特异反向引物
 <400> 41

agctgtcggg ttcttttggg c 21

<210> 42
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV18基因的特异促进引物
 <400> 42

agacacctgg tcaggaggag g 21

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV18基因的特异反向引物
 <400> 43

tgccgaatct cctcgcacta c 21

<210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV19基因的特异促进引物
 <400> 44

ccaggacatt tggtaaagg aaaa 24

<210> 45
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的

<220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV19基因的特异反向引物
 <400> 45

cagtgccgtg tctcccggtt c 21

<210> 46
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV20基因的特异促进引物
 <400> 46

gaccctggtg cagcctgtg 19

<210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV20基因的特异反向引物
 <400> 47

gaggaggagc ttcttagaac t 21

<210> 48
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV21基因的特异促进引物
 <400> 48

cccagatata agattacaga gaaa 24

<210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV21基因的特异反向引物
 <400> 49

- ctggatcttg agagtgaggat c 21
- <210> 50
<211> 23
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV22基因的特异促进引物
<400> 50
- cacagatggg acaggaagtg atc 23
- <210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV22基因的特异反向引物
<400> 51
- gtcctccagc tttgtggacc g 21
- <210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV23基因的特异促进引物
<400> 52
- aagagggaaa cagccactct g 21
- <210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于定量PCR分析的TCR BV23基因的特异反向引物
<400> 53
- cagctccaag gagctcatgt t 21
- <210> 54
<211> 24
<212> DNA

<213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV24基因的特异促进引物
 <400> 54

ccaagatacc aggttaccca gttt 24

<210> 55
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV24基因的特异反向引物
 <400> 55

caggcctggf gagcggatgt c 21

<210> 56
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV25基因的特异促进引物
 <400> 56

aaaacatctt gtcagagggg aa 22

<210> 57
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BV25基因的特异反向引物
 <400> 57

tgaatcctca agcttcgtag c 21

<210> 58
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BC基因的特异促进引物
 <400> 58

cagcgccctt ggttgatg 19

<210> 59
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于定量PCR分析的TCR BC基因的特异反向引物
 <400> 59

aagcgctggc aaaagaagaa 20

<210> 60
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的BC引物
 <400> 60

cgacctcggg tgggaaca 18

<210> 61
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BC引物
 <400> 61

cacagcgacc tcgggtggg 19

<210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 62

actgtgagtc tggtccttg t 21

<210> 63

<211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 63

acaacgggta acttgggtccc cgaa 24

<210> 64
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 64

ggtcctctac aacagtgagc caac 24

<210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 65

aagagagaga gctgggttcc actg 24

<210> 66
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 66

ggagagtcga gttccatca 19

<210> 67
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物

<223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
<400> 67

tgtcacagtg agcctggtcc catt 24

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
<400> 68

cctggcccga agaactgctc a 21

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
<400> 69

gtcctccagt acgctcagcc taga 24

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
<400> 70

tgccctgggcc aaaatactgc g 21

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> 合成的
<220>
<221> 结合引物
<223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
<400> 71

tccccgcgcc gaagtactga a 21

<210> 72
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 72

tcgagcacca ggagccgc 18

<210> 73
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 73

ctgctgccgg ccccgaaagt c 21

<210> 74
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221> 结合引物
 <223> 应用于决定性反应的已标记FAM (扩充) BJ引物
 <400> 74

tgaccgtgag cctggtgccc g 21

<210> 75
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者关节滑膜组织 (下称ST) 样本的BV16克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 75

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Gln Asp Ser Gly Gly Gly Gly Glu Gln
 5 10 15
 Phe Phe Gly Pro Gly
 20

Phe Phe Gly Pro Gly 5 10 15
 20
 <210> 80
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 80

 tatttctgtg ccagcagcca agatctggac agctacaatg agcagttcctt cgggccagga 60

<210> 81
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 81

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Gln Gly Thr Ser Gly Ile Thr Glu Gln
 5 10 15
 Phe Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 82
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 82

tatttctgtg ccagcagcca ggggactagc gggatcactg agcagttcctt cgggccagga 60

<210> 83
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>

<211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 95

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Trp Gly Gly Thr Asp Ile Tyr Glu Gln
 5 10 15
 Phe Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 96
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 96

tatttctgtg ccagcagctg gggcgggaca gacatctacg agcagtactt cgggccgggc 60

<210> 97
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 97

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Leu Gly Thr Val Ser Tyr Glu Gln
 5 10 15
 Phe Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 98
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 98

tatttctgtg ccagcagcct tctcggcaca gtatcctacg agcagtactt cgggccgggc 60

<223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3核酸序列

<400> 110

tatttctgtg ccagcagcca agattcgtac actgaagctt tctttggaca aggc 54

<210> 111

<211> 18

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 功能区

<223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3氨基酸序列

<400> 111

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Trp Gly Gly Asn Thr Glu Ala Phe Phe
5 10 15

Gly Gln Gly

<210> 112

<211> 54

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221>

<223> 源自RA患者ST样本的BV16克隆型的CDR3核酸序列

<400> 112

tatttctgtg ccagcagctg ggggggcaac actgaagctt tctttggaca aggc 54

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 功能区

<223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列

<400> 113

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro Thr Arg Asp Arg Gly Asn Glu Gln
5 10 15

Phe Phe Gly Pro Gly
20

<210> 114

<211> 63

<212> DNA

Phe Phe Gly Pro Gly
 5 10 15
 20
 <210> 122
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 122

 tacttctgtg ccagcagccc tagggagggc ctcctcaata atgagcagtt cttcgggcca 60
 gga

<210> 123
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 123

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro Trp Thr Ser Gly Ser Gly Asn Glu
 5 10 15
 Gln Phe Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 124
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 124

tacttctgtg ccagcagtc cttggactagc gggagtgggtg agcagttcctt cgggccagga 60

<210> 125
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区

<223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列
<400> 125

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Arg Thr Arg Phe Tyr Glu Gln Tyr
 5 10 15
Phe Gly Pro Gly

<210> 126

<211> 57

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221>

<223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列

<400> 126

tacttctgtg ccagcagttt aaggacacgc ttctacgagc agttcttcgg gccagga 57

<210> 127

<211> 20

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 功能区

<223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列

<400> 127

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Thr Ser Gly Arg Gln Tyr Glu Gln
 5 10 15
Tyr Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 128

<211> 60

<212> DNA

<213> 合成的

<220>

<221>

<223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列

<400> 128

tacttctgtg ccagcagttt gaccagcggg cgtcagtaag agcagttcctt cgggccagga 60

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> 人类

<212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 137

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Arg Asp Gly Val Ser Tyr Glu Gln Tyr
 5 10 15
 Phe Gly Pro Gly

<210> 138
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 138

tacttctgtg ccagcagtcg tgatggggtc tcctacgagc agttcttcgg gccagga 57

<210> 139
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 139

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Ser Ser Thr Gly Arg Glu Gln Tyr
 5 10 15
 Phe Gly Pro Gly

<210> 140
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 140

tacttctgtg ccagcagttt atcttcgaca gggagggagc agtacttcgg gccgggc 57

tacttctgtg ccagcagtcc gtcgggacag gggtcctacg agcagttcct cgggccagga 60

<210> 145
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 145

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Phe Gly Thr Val Leu Ser Tyr Glu Gln
 5 10 15
 Tyr Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 146
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3核酸序列
 <400> 146

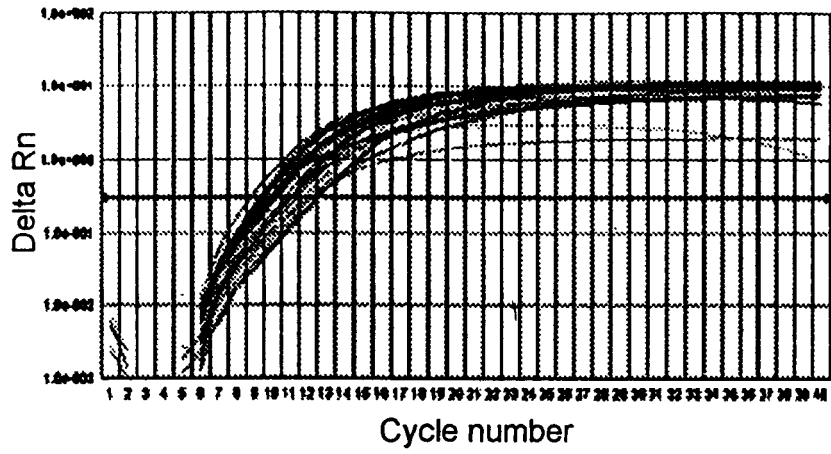
tacttctgtg ccagcagttt tgggacagtc ctctcctacg agcagttcct cgggccagga 60

<210> 147
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> 功能区
 <223> 源自RA患者ST样本的BV14克隆型的CDR3氨基酸序列
 <400> 147

Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro Arg Leu Ala Gly Asp Lys Glu Gln
 5 10 15
 Tyr Phe Gly Pro Gly
 20

<210> 148
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> 合成的
 <220>
 <221>

1A.



1B.

Unstimulated PBMC

Stimulation with TSST-1

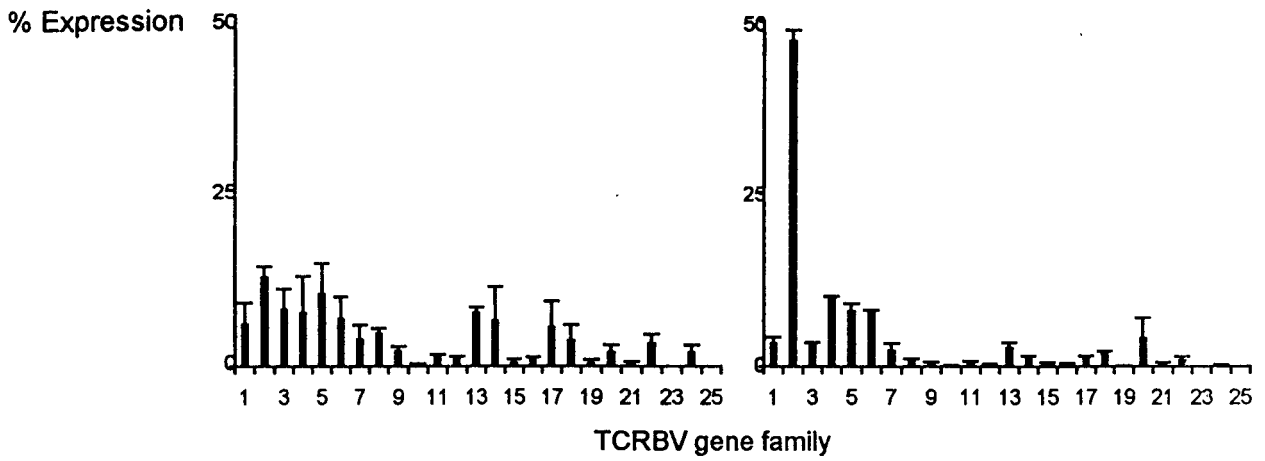
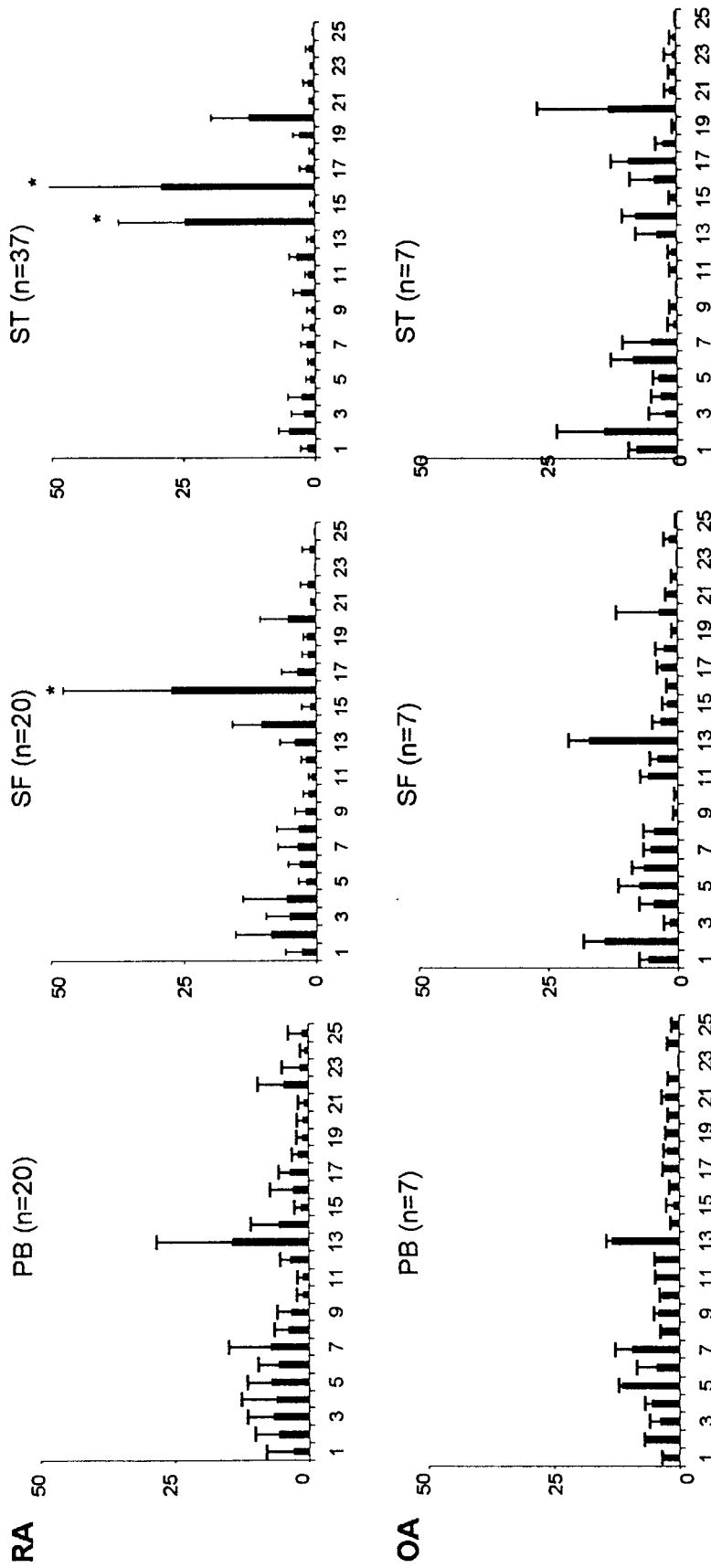
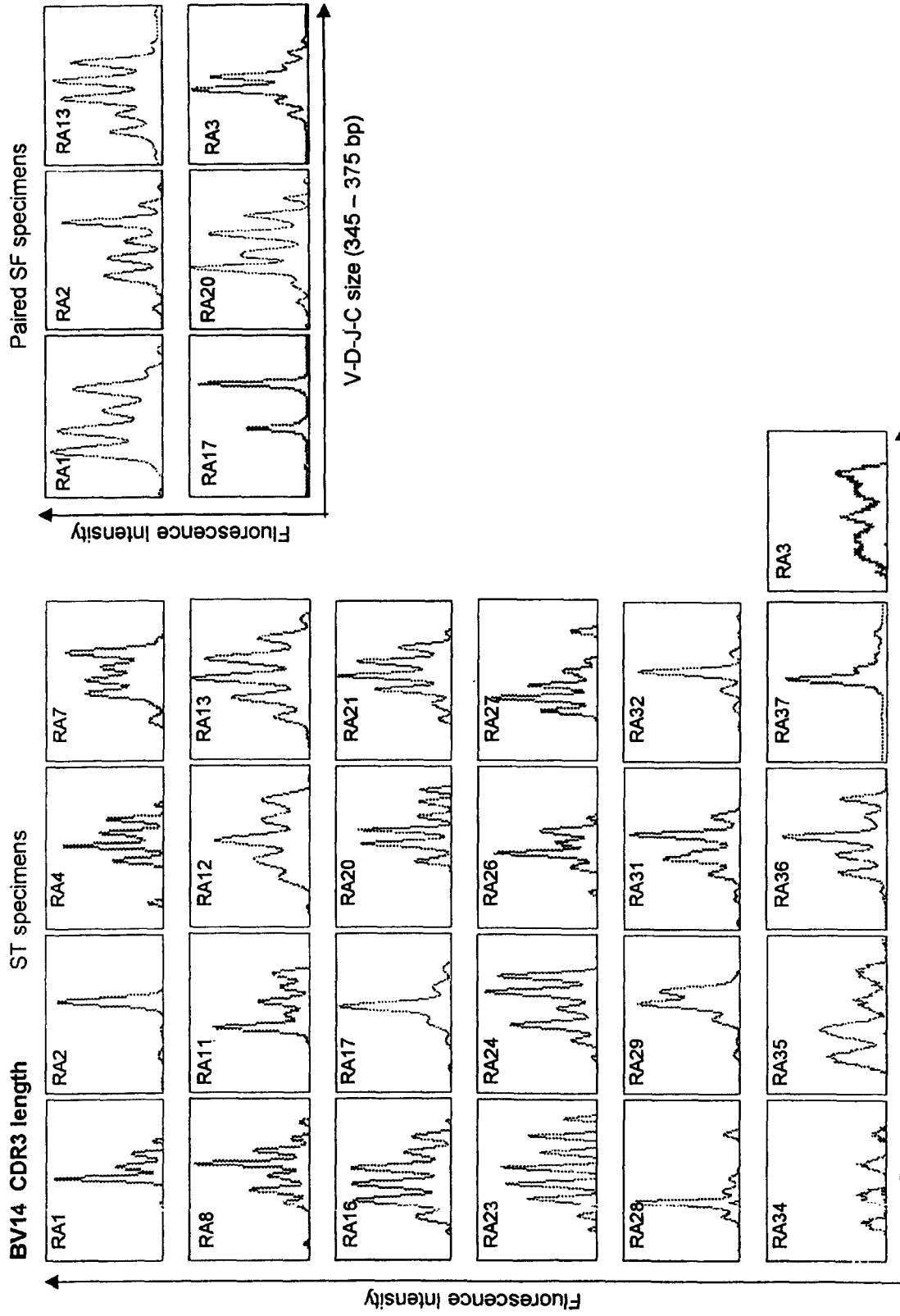


图 1



TCR BV gene family

图 2



V-D-J-C size (345 - 375 bp) 图 3

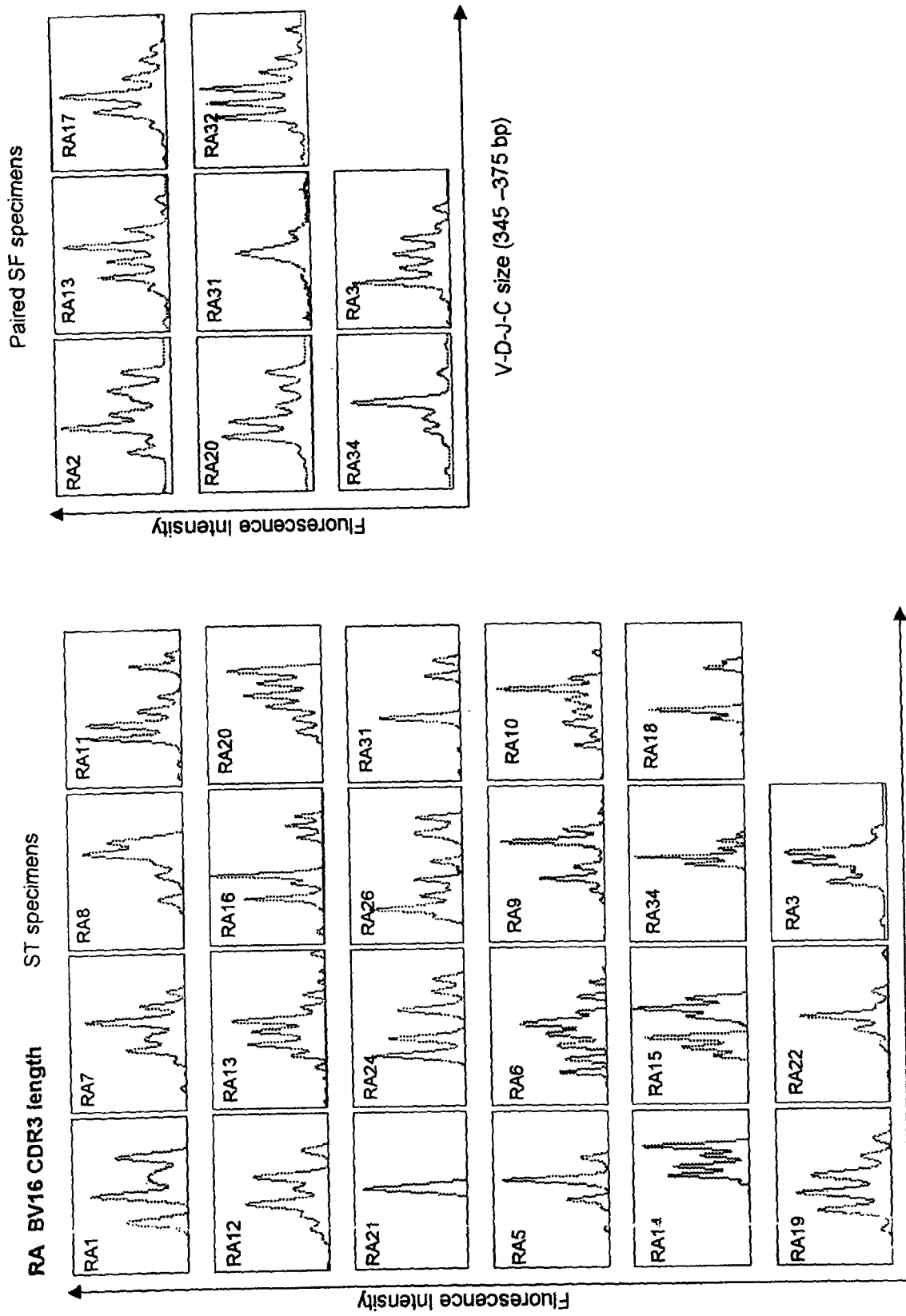


图 4

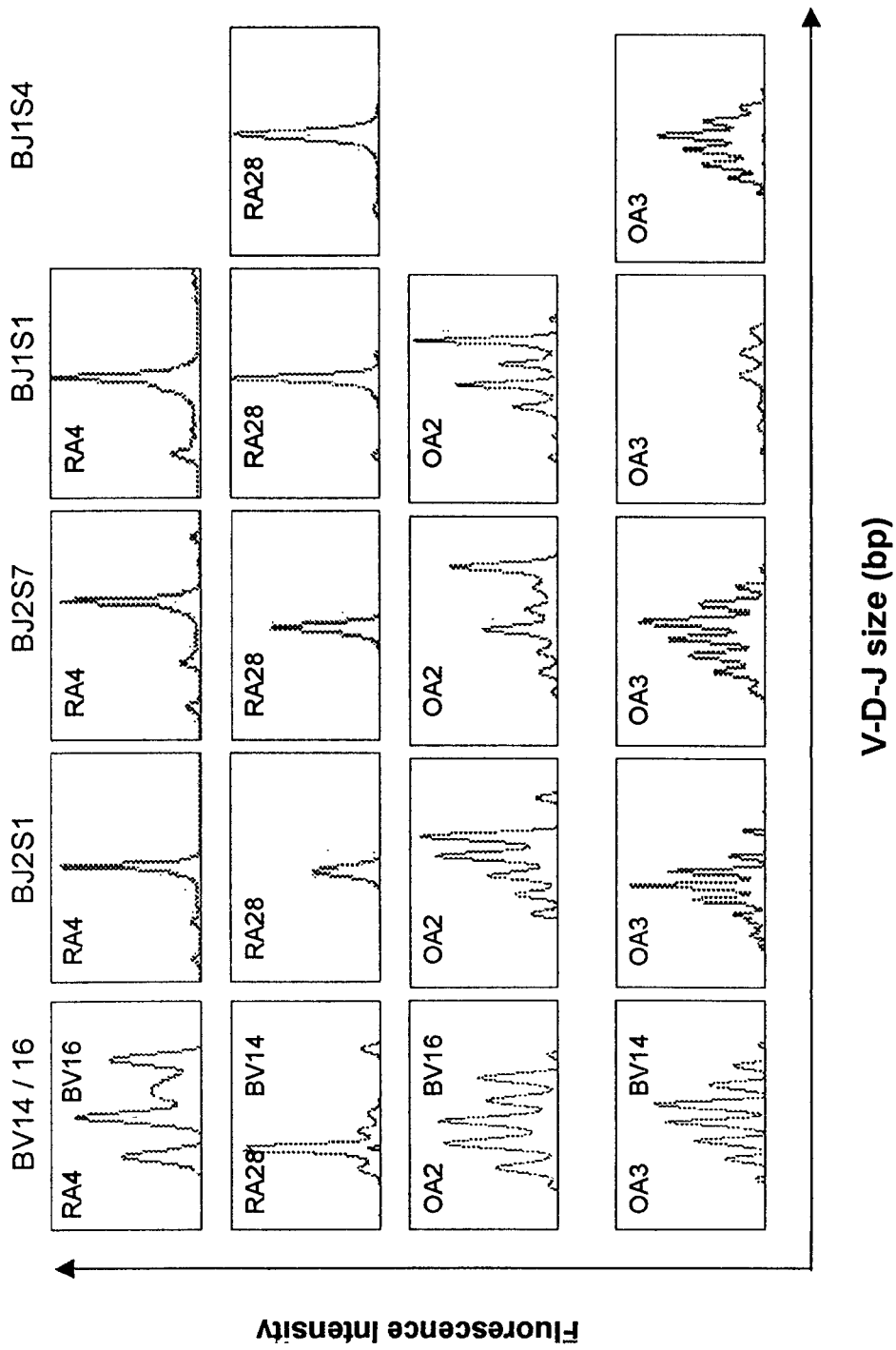
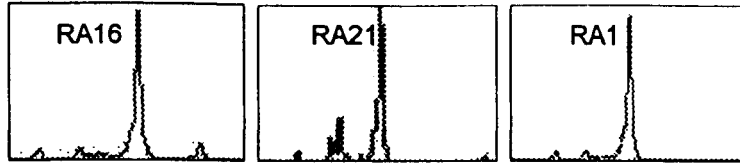


图 5

BV16

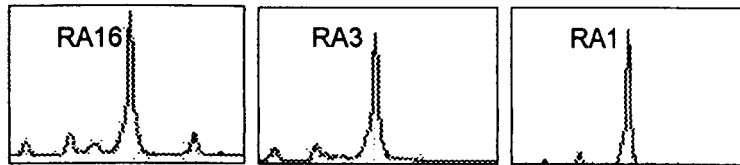
Clonotype 1

BV16 – BJ2S1
CDR3 length 24 bp



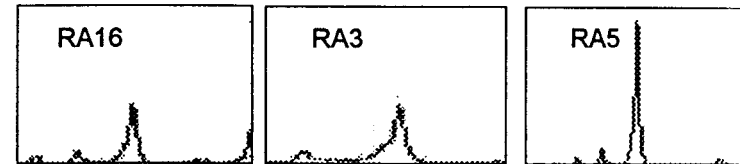
Clonotype 2

BV16 – BJ2S7
CDR3 length 21 bp



Clonotype 3

BV16 – BJ1S1
CDR3 length 15 bp

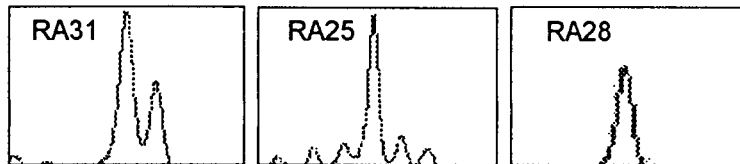


Fluorescence Intensity

BV14

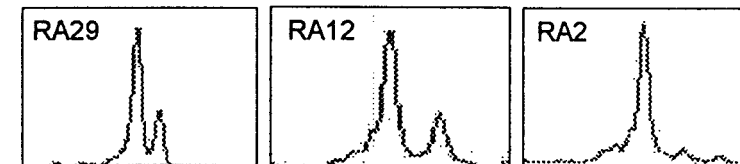
Clonotype 1

BV14 – BJ2S1
CDR3 length 24 bp



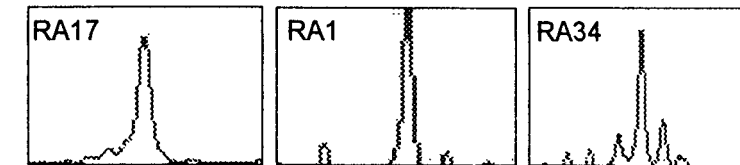
Clonotype 2

BV14 – BJ2S7
CDR3 length 21 bp



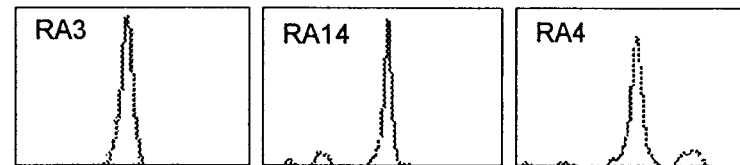
Clonotype 3

BV14 – BJ1S1
CDR3 length 15 bp



Clonotype 4

BV14 – BJ1S4
CDR3 length 15 bp



Fluorescence Intensity

V-D-J size (bp)

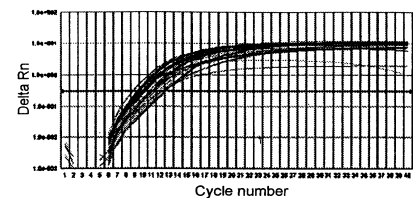
图 6

专利名称(译)	T细胞受体CDR3的序列与类风湿性关节炎的诊断及治疗方法		
公开(公告)号	CN1594348A	公开(公告)日	2005-03-16
申请号	CN200310120573.X	申请日	2003-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	曼盛基因技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	曼盛基因技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	曼盛基因技术有限公司		
[标]发明人	臧敬五 何国强 张冬青 孙玮		
发明人	臧敬五 何国强 张冬青 孙玮		
IPC分类号	A61K39/00 C07H21/04 C07K14/725 C12N15/11 A61K39/395 A61K38/17 C07K14/435 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/531 A61P29/00 A61P19/02		
CPC分类号	A61K39/0008 C07H21/04 A61K2039/54 A61K2039/53 C07K14/7051		
优先权	10/612468 2003-07-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了一种充分纯化和分离的具有如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的序列的DNA片段与一种充分纯化的具有如SEQ ID NO.3, SLS, SEQ ID NO.4, SQD, SLL and SEQ ID NO.5所示的序列多肽, 还提出了至少一种DNA和/或多肽衍生的疫苗、抗体和药物成分。同时还进一步提出了类风湿性关节炎的诊断方法, 本发明可用于治疗类风湿性关节炎。

1A.



1B.

