



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110240647 A

(43)申请公布日 2019. 09. 17

(21)申请号 201910594974.X

(22)申请日 2019.07.03

(71)申请人 内蒙古民族大学附属医院

地址 028000 内蒙古自治区通辽市科尔沁
区霍林河大街东段1742号内蒙古民族
大学附属医院

(72)发明人 布仁巴图 王双连 乌日图那顺
龚翠琴 哈申高娃 额尔敦都楞
白海花 王彦博

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

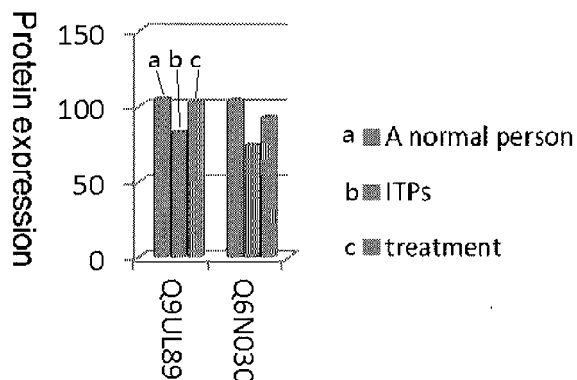
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白及其用于制备检测ITP试剂的应用

(57)摘要

本发明公开了肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区MRIgHV(uniprot登录号:Q9UL89)和一种未知蛋白(免疫球蛋白重链的恒定区 γ 3类似物,IHCG γ 3-like)(uniprot登录号:Q6N030)作为表征ITP疗效的生物标记物的应用。发明人研究发现,MRIgHV和IHCG γ 3-like蛋白含量与ITP存在相关性。其作用机理为:这两种蛋白属于免疫球蛋白,具有内肽酶活性,参与免疫应答,补体激活,蛋白激活级联和报告基因介导的内吞作用,这两种蛋白质与免疫反应高度相关,可以作为ITP诊断的标志物。



1. 一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白,其特征在于:
所述免疫球蛋白为:肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区,命名为MRIgHV,
其uniprot登录号为:Q9UL89。
2. 一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白,其特征在于:
所述免疫球蛋白为:免疫球蛋白重链的恒定区 γ 3类似物,命名为 IHCG γ 3-like;
其uniprot登录号为:Q6N030。
3. 根据权利要求1或2所述的一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白,其特征在于:
所述肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区和/或免疫球蛋白重链的恒定区 γ 3类似物作为非诊断目的中ITP生物标记物的应用。
4. 根据权利要求3所述的一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白用于制备检测ITP试剂的应用,其特征在于:
检测所述肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区和/或所述免疫球蛋白重链的恒定区 γ 3类似物的蛋白含量的试剂,该试剂在制备检测ITP试剂方面的应用。

一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白及其用于制备检测ITP试剂的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物标记物,具体地说,涉及肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白重链的恒定区 $\gamma 3$ 类似物两种蛋白作为ITP疗效评价的生物标记物的应用。

背景技术

[0002] 免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP),是一种自身免疫性出血性疾病,以血小板减少、骨髓巨核细胞数正常或增多伴成熟受阻,以及缺乏任何原因包括外源的或继发性因素为特征,是临床最常见的一种血小板减少性疾病。目前公认发病机制与体液免疫、细胞免疫功能异常有关,即由于患者体内的自身抗体与血小板结合,致敏的血小板被单核巨噬细胞系统过度破坏。除体液免疫机制外,细胞免疫和调节性细胞也在其中起着非常重要的作用。ITP发病率较低,但死亡率却较高,成人发病率为5/10 万~10/10万,育龄期女性发病率高于男性,60岁以上老年人是该病的高发群体。

[0003] ITP诊断没有“黄金指标”,主要依赖于排除其他血液学异常引起的自身血小板减少性疾病。其检验指标除作血常规外,需查血小板计数,观察血小板形态,促凝血时间,血块收缩时间,血小板表面相关免疫球蛋白(PAIg)测定,抗人免疫球蛋白试验,补体测定,毛细血管脆性试验,骨髓象检查等,操作繁琐,耗时费力。

[0004] 生物标记物(biomarker)是近年来随着免疫学和分子生物学技术的发展而提出的一类与细胞生长增殖有关的标志物。生物标记物不仅可从分子水平探讨发病机制,而且在准确、敏感地评价早期、低水平的损害方面有着独特的优势,可提供早期预警,很大程度上为临床医生提供了辅助诊断的依据。

[0005] 免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)指具有抗体(Antibody, Ab)活性或化学结构,与抗体分子相似的球蛋白。Ig是由两条相同的轻链和两条相同的重链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链又称H链,由可变区(VH)和恒定区(CH)组成。根据H链恒定区内氨基酸组成排列顺序的不同可将Ig的重链分为五种,即 γ 、 α 、 δ 、 μ 和 ϵ 链。相对于已知五种Ig来说,其分布对应关系如下:IgG(γ),IgA(α),IgD(δ),IgM(μ)和IgE(ϵ)。H链上可变区上有抗原结合点。而Ig恒定区既具有Ig分子骨架支撑功能,又是激活免疫反应的部位之一。Ig的主要功能是特异性地结合抗原,膜免疫球蛋白是B细胞膜上的抗原受体,能特异性识别抗原分子。Ig能激活补体;结合细胞表面的Fc受体,表现出不同的生物学作用,如调理作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用、介导I型超敏反应;对免疫应答有正调节和负调节作用。所有抗体的化学基础都是免疫球蛋白,但免疫球蛋白并不都具有抗体活性。

发明内容

[0006] 肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区(Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region, MR IgHV)属于参与抗原识别的免疫球蛋白重链可变结构域的V区。免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma 3$ 类似物(Immunoglobulin heavy constant gamma 3

like,IGHG γ 3-like)属于免疫球蛋白重链的恒定区。经Gene Ontology(GO)分析发现,这两种蛋白均具有免疫球蛋白典型结构,并具有内肽酶活性,参与免疫应答,补体激活,蛋白激活级联和报告基因介导的内吞作用,均与免疫反应高度相关。但与ITP发表是否相关未见报道,本发明人在ITP蛋白质数据挖掘中发现,MRIgHV和IGHG γ 3-like具有差异显著特性,因此可以作为ITP疗效评价的标志物。

[0007] 本发明的目的是提供一组ITP疗效评价的生物标记物。

[0008] 为了实现本发明目的,本发明首先提供MRIgHV和IGHG γ 3-like两种蛋白作为ITP生物标记物的应用。肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区MRIgHV(uniprot登录号:Q9UL89)和一种未知蛋白(免疫球蛋白重链的恒定区 γ 3类似物, IHC γ 3-like)(uniprot登录号:Q6N030)作为ITP疗效评价的生物标记物的应用。

[0009] 上述的发明目的是通过以下技术方案实现的:

发明人前期收集正常人对照组、ITP病人组和ITP病人有效治疗组的血清蛋白质组学数据,数据分析表明, MRIgHV和IGHG γ 3-like两种蛋白质含量在三组样本中差异显著,具体表现为在ITP病人组显著下调,在正常人对照组显著上调,ITP病人有效治疗组能够恢复到正常人对照组含量水平,这些结果表明这两种蛋白质的失调可能与导致ITP的疾病表型发生有关。因此,这两种蛋白质表达分析可用作ITP疗效评价的生物标志物。

[0010] 本发明的有益效果在于:

本发明发现MRIgHV和IGHG γ 3-like两种蛋白的含量与ITP存在相关性,这种在蛋白质含量水平上能够迅速有效的评价ITP的治疗效果,作为ITP疗效的生物标志物,能够免除ITP诊断的繁复的诊断过程。

附图说明

[0011] 图1为正常人组、ITP病人组和ITP病人有效治疗后组血清蛋白质组数据分析(一),有效病人治疗前 VS 有效病人治疗后差异表达蛋白火山图;

图2为正常人组、ITP病人组和ITP病人有效治疗后组血清蛋白质组数据分析(一),鉴定蛋白质Venn 图;

图3为正常人组、ITP病人组和ITP病人有效治疗后组血清蛋白质组数据分析(一),有效病人治疗前 VS 有效病人治疗后差异表达蛋白热图;

图4为 MRIgHV和IGHG γ 3-like在正常人组、ITP病人组和治疗后病人组的表达柱形图;

图5为 MRIgHV蛋白标记物(Q9UL89)的核酸序列及蛋白序列;

图6为IGHG γ 3-like蛋白标记物(Q6N030)的核酸序列及蛋白序列。

具体实施方式

[0012] 实施例1

发明人收集正常人对照组、ITP病人治疗前和ITP病人有效治疗组血清样本。如下表:

表1、ITP患者性别、年龄情况

组别	男	女	年龄
有效	5	4	39.56±9.9
无效	3	6	35.56±13.45

注：性别、年龄两组之间无统计学差异， $p>0.05$ ；

首先，患者纳入标准需符合以下几个条件：

1. 经骨穿明确诊断慢性免疫性血小板减少症患者；
2. 排除其它继发因素导致的血小板减少；
3. 血小板计数 $>10 \times 10^9/L$ ；无明显出血倾向；
4. 无肝肾功能不全患者；
5. 年龄 >18 周岁。

[0013] 其次，本组患者视为治疗有效的标准包括：

1. 血小板减少恢复正常或较治疗前升高 $30 \times 10^9/L$ 者；
2. 血小板计数无明显提高，但临床症状明显改善者。

[0014] 疗效统计如下表：

表2、ITP患者临床疗效

组别	治疗前	治疗后
有效	46.89±17.19	115.22±44.68
无效	40.11±25.58	39.22±23.42

注：有效组与无效组治疗前后行统计分析， $t=3.65$ ， $p<0.002$ ；

收集正常人组、ITP病人组和ITP病人有效治疗组的三组血清样本，每组样本设置3个生物学重复（样本具体情况见表1和表2）。送至上海吉凯基因化学技术有限公司，采用iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 技术进行蛋白质组学数据检测，共鉴定得到蛋白质982种，以符合表达差异倍数大于1.2倍（上下调）且P value (t test) 小于0.05作为筛选标准，在三组间共同存在的差异表达蛋白为20种。筛选到的差异表达蛋白如图1-3所示。

[0015] 实施例2

在上述实施例基础上，本实施例：蛋白质数据分析鉴定出肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区MRIgHV和IGHG γ 3-like两种蛋白含量在ITP患者组异常表达，比正常人对照组显著下调，但在有效治疗后能够恢复到对照组相似表达水平。该两种蛋白质在对照组、ITP病人组和有效治疗后组差异显著，如图2所示。对该两个蛋白进行基因本体富集分析，表明这两种蛋白主要参与内肽酶活性，免疫效应过程，免疫应答，补体激活，蛋白激活级联和报告基因介导的内吞作用，这一结果证实这两种蛋白质与免疫反应高度相关，使其成为ITP疗效评价的相关标志物，如图4所示。

[0016] 实施例3

在上述实施例基础上，本实施例：蛋白质数据分析发现，伴随MRIgHV和IGHG γ 3-like两种蛋白含量在各组样本的变化，其他与免疫相关的代谢通路的相关蛋白也有相应变化，如uniprot登录号为：Q9UL94、Q9UL75、Q9UL85、Q9UL82、Q9UL78等的MRIgHV蛋白家族。如肌球蛋白

白反应蛋白的重链可变区蛋白,轻链可变区蛋白等组成肌球蛋白反应蛋白的亚基蛋白均有相同趋势的改变,因此,可以猜测该几个亚基共同组成了免疫球蛋白,可能参与ITP的免疫过程。具体如下表:

表3、正常人、有效病人治疗前 VS 有效病人治疗后相关蛋白表达量

Accession	Average A	Average B	Average D	Average E
Q9UL89	105.0667	82.63333	102.8	106.4667
Q9UL75	89.3	78.3	109.4	118.15
AOA0S2Z4G4	231.7667	62	74.63333	74.1
Q15746	206.2	69.03333	81.36667	80
AOA0U4BW16	164.2667	80.9	92	84.3
Q5TCU3	269.05	60.5	67.15	55.5
Q9UL94	80.7	85.96667	95.23333	124.6
H7BYY1	278.65	55.45	53.8	51.35
P67936	317.2667	51.93333	45.46667	44

注:仅展示部分数据。

[0017] 实施例4

在上述实施例基础上,本实施例:以蛋白质组测序数据获取的MRIgHV蛋白序列在Uniprot数据库进行比对,获取其蛋白质序列(Q9UL89)及mRNA序列,如图5所示,分析表明,该蛋白为肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区,命名为MRIgHV。

[0018] 实施例5

在上述实施例基础上,本实施例:以蛋白质组测序数据获取的IGHG γ 3-like蛋白序列在Uniprot数据库进行比对,获取其蛋白质序列(Q6N030)及mRNA序列,如图6所示,为一种功能未知蛋白。利用Uniprot数据库BLAST比对工具,获得一条与Q6N030序列一致性达99.7%的蛋白(P01860)(Immunoglobulin heavy constant gamma 3 ,Homo sapiens), P01860是免疫球蛋白重链恒定区,由此判断Q6N030为IGHG γ 3类似物,命名为IGHG γ 3-like。

[0019] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

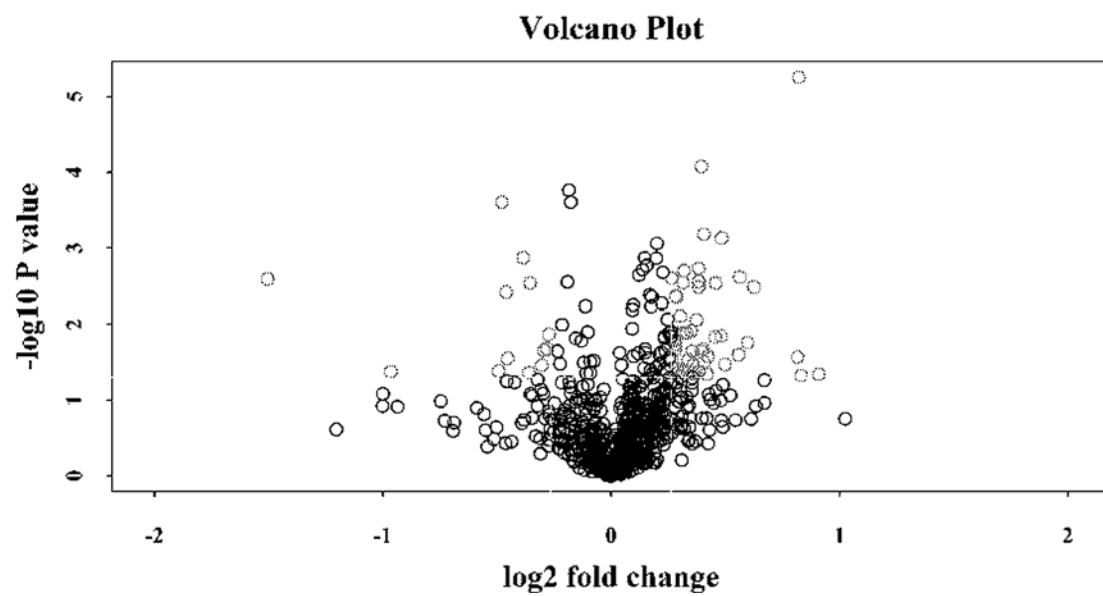


图 1

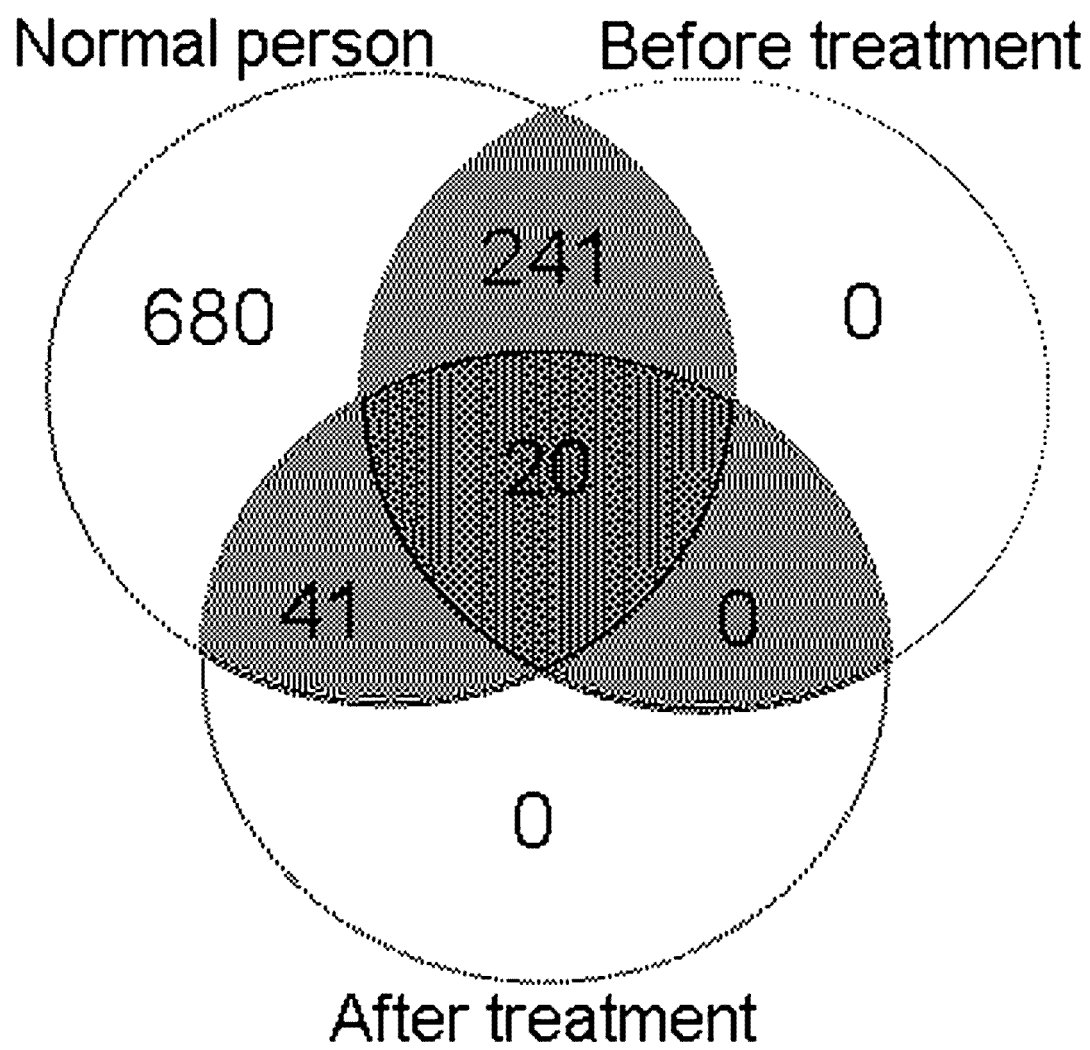


图 2

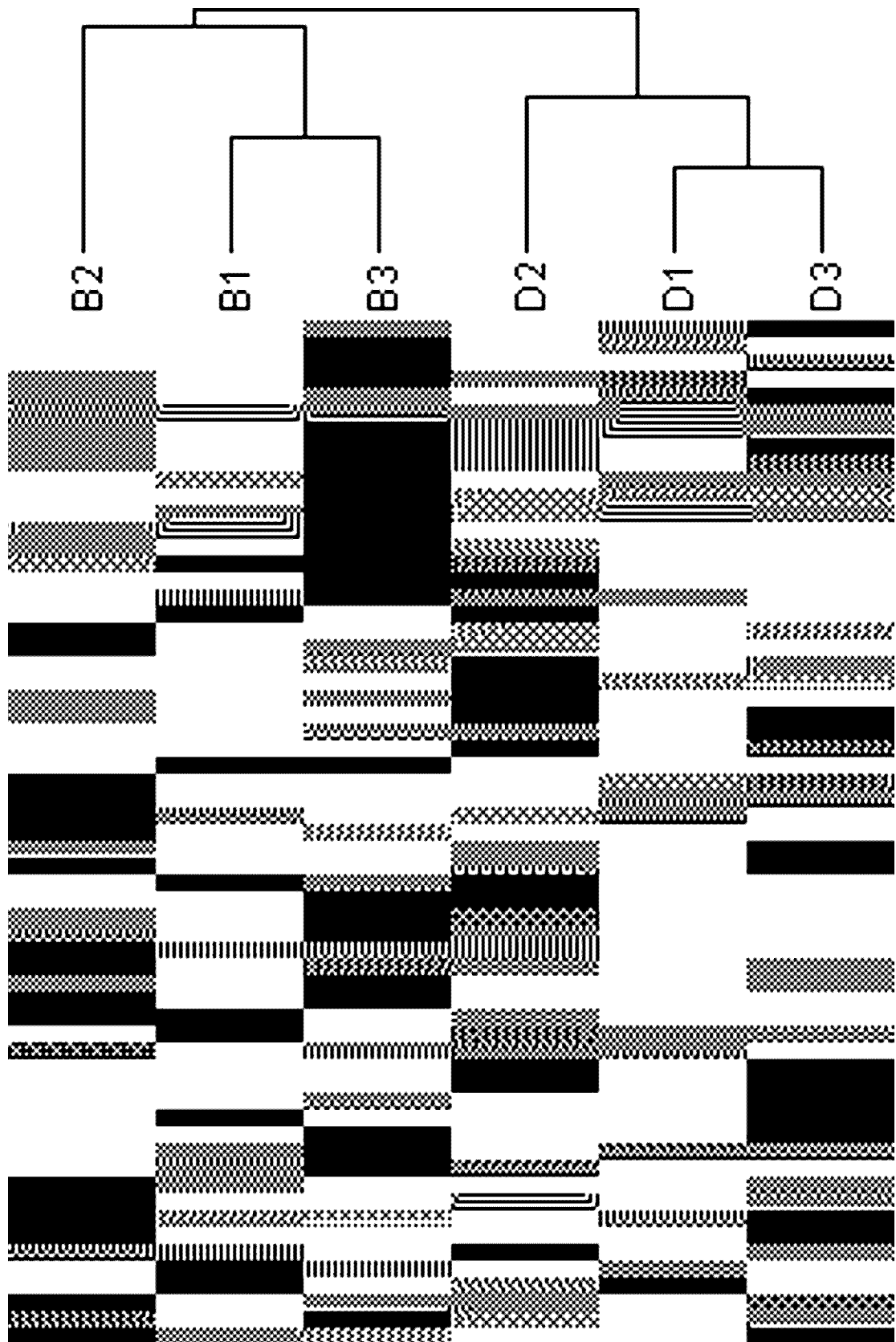


图 3

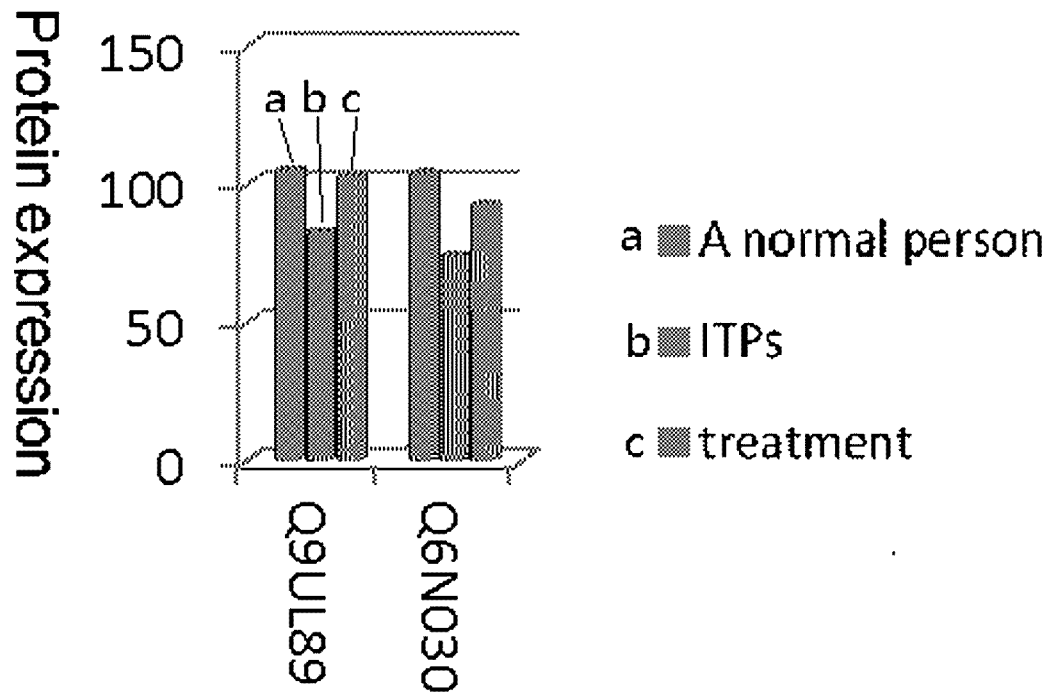


图 4

```

gtgcagtcctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaaggct
V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A
tctggaggcaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacaaggg
S G G T F S S Y A I S W V R Q A P G Q G
cttgagtggatgggaaggatcatccctatccttggtatagcaaactacgcacagaagttc
L E W M G R I I P I L G I A N Y A Q K F
cagggcagagtcacgattaccgcggaacaaatccacgagcacagcctacatggagctgagc
Q G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S
agcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagcagcaactggggcccttac
S L R S E D T A V Y Y C A S S N W G P Y
tggtacttcgatctctctggggccgtgggcaccctggtcactgtctcctca
W Y F D L W G R G T L V T V S S

```

图 5

atggactggacctggaggatcctcttttttggtgacagcagccacaggtgcccactcgcag
M D W T W R I L F L V T A A T G A H S Q
gtccaccttgtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcc
V H L V Q S G A E V K K P G A S V K V S
tgcacggcctctggatacccccttactaaccattttcataaattgggtgcgccaggccccc
C T A S G Y P F T N H F I N W V R Q A P
ggacagagccttgagtggatggatggatcaacactggcaatggcaacacaaaatattca
G Q S L E W M G W I N T G N G N T K Y S
cagaagttccagggcagagtcaccattaccagggaacacatggacgaccaccgcctacatg
Q K F Q G R V T I T R D T W T T T A Y M
gacctgagtagcctgagatctgaggacacggctgtgtattggtgtgagagatgcgccc
D L S S L R S E D T A V Y W C A R D A P
caaggagtgactaccacctactttgactactggggccagggcaccctggtcaccgtctcc
Q G V T T T Y F D Y W G Q G T L V T V S
tcagcttccaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctct
S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S
gggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtg
G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
tcatggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggtgtcctacagtcc
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S
tcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttggggacccag
S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
acctacacctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgag
T Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E
ctcaaaacccccacttgggtgacacaactcacacatgccacggtgccagagcccaaacct
L K T P L G D T T H T C P R C P E P K P
tgtgacacacctccccgtgccacggtgccagagcccaaacttgtgacacacctccc
C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P
ccatgccacggtgccagagcccaaacttgtgacacacctccccgtgcccaagggtgc
P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C
ccagcacctgaactcctgggaggaccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggat
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D
acccttatgatttcccgaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaa
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E
gaccccgaggtccagttcaagtggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
D P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T
aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg
K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L
caccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaagccctccca
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P
gcccccatcgagaaaaccatctccaaaaccaaaggacagccccgagaaccacaggtgtac
A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y
accctgcccccatcccgaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctggtc
T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V
aaaggcttctacccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcagcgggcagccggagaac
K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N
aactacaacaccacgcctcccatgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag
N Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacatcttctcatgctccgtgatgcat
L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H
gaggctctgcacaaccgcttcacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
E A L H N R F T Q K S L S L S P G K -

图 6

专利名称(译)	一种能够表征ITP疗效的免疫球蛋白及其用于制备检测ITP试剂的应用		
公开(公告)号	CN110240647A	公开(公告)日	2019-09-17
申请号	CN201910594974.X	申请日	2019-07-03
[标]发明人	布仁巴图 王双连 乌日图那顺 哈申高娃 额尔敦都楞 白海花 王彦博		
发明人	布仁巴图 王双连 乌日图那顺 龚翠琴 哈申高娃 额尔敦都楞 白海花 王彦博		
IPC分类号	C07K16/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/00 C07K2317/52 C07K2317/56 G01N33/53 G01N2800/222		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了肌球蛋白反应性免疫球蛋白重链可变区MRIgHV (uniprot 登录号: Q9UL89) 和一种未知蛋白 (免疫球蛋白重链的恒定区γ3类似物,IHCGγ3-like) (uniprot登录号: Q6N030) 作为表征ITP疗效的生物标记物的应用。发明人研究发现, MRIgHV和IHCGγ3-like蛋白含量与ITP存在相关性。其作用机理为: 这两种蛋白属于免疫球蛋白, 具有内肽酶活性, 参与免疫应答, 补体激活, 蛋白激活级联和报告基因介导的内吞作用, 这两种蛋白质与免疫反应高度相关, 可以作为ITP诊断的标志物。

