



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102153625 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 201010206028.2

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2010.06.22

(71) 申请人 浙江天科高新技术发展有限公司

地址 310012 浙江省杭州市西湖区黄姑山路
9号

(72) 发明人 方序 陈敏 王轶雄 罗陈启
闻树群

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 张法高

(51) Int. Cl.

C07K 7/08(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

A61P 21/04(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位及其应用

(57) 摘要

本发明公开了抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位。它具有下列所示的氨基酸序列：位于抗原的 103-115 位点、76-187 位点、13211-13227 位点，多肽序氨基酸序列为：CEQWVDYNLKWNPD、IVTHFPFDEQNC、EIIVTHFPFDEQNCNSMK。抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位用于制备重症肌无力药物及诊断试剂盒。本发明通过微阵列和芯片诊断技术筛选有效性好的抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位，进而可以通过化学合成或基因工程表达重组的方法制备相应多肽，并用多肽制备抗体作为探针，开发重症肌无力药物及诊断试剂。上述方法克服了传统抗原抗体制备方法及药物筛选方法的繁琐，不仅大大减少了分别检测的人力和物力，而且同时分析时克服了实验室的检测误差，为重症肌无力相关疾病治疗和血清学诊断开辟了新路。

1. 抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位, 其特征在于具有下列所示的氨基酸序列 : 位于抗原的 103-115 位点、76-187 位点、13211-13227 位点, 多肽序氨基酸序列分别为 : CEQWVDYNLKWNPD、IVTHFPFDEQNC、EIIVTHFPFDEQNCSMK。

2. 如权利要求 1 所述的抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位的应用, 其特征在于用于制备重症肌无力药物及诊断试剂盒。

抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位及其应用。

背景技术

[0002] 重症肌无力个体中,约 85% 的患者体内存在针对 AChR 分子的自身抗体,致病性自身抗体的主要结合靶点位于 AChR 分子亚单位上的主要免疫原性区 (main immunogenic region, MIR)。依赖抗体的补体溶解作用是 AChR 分子破坏的主要原因;同时抗体介导的抗原调变作用也加速了 AChR 分子的内化和溶酶体的降解作用,使得 AChR 分子的半衰期由 7d 降至 2d,体内神经突触后膜上功能性 AChR 分子的数量急剧减少。在单纯眼外肌型患者体内,仅有 50% 的血清学阳性率,而这些患者自身性抗体的主要结合靶点是胎儿型 AChR 分子。胎儿型 AChR 分子与成人型 AChR 分子最大的区别是 AChR 五聚体分子中的亚单位替代了 τ 亚单位。胎儿型 AChR 分子主要分布于眼外肌,因此这类自身抗体导致了患者单纯眼外肌受累,而无其它相关临床症状出现。重症肌无力患者血清中除乙酰胆碱受体抗体 (AchRab) 外,还可以检测到其他自身抗体。如抗肌动蛋白 (actin) 抗体、肌球蛋白 (myosin) 抗体、辅肌动蛋白 (α -actinin) 抗体、肌联蛋白 (titin) 抗体、AChR 分子相关锚定蛋白 (mpsyn) 抗体和肌肉特异性酪氨酸激酶 (muscle specific tyrosine kinase Musk) 抗体等。在这些自身抗体中,尤其是 Titin 在重症肌无力伴胸腺瘤患者和重症肌无力晚期中与疾病进展密切相关 [5-7]。

[0003] 调节性 T(Treg) 细胞在自身免疫性疾病和肿瘤发生发展中起重要作用。现有研究已证实肿瘤组织局部表现为 Treg 细胞免疫功能抑制,激活 Treg 细胞可导致动物移植肿瘤消退;而在自身免疫性疾病中 Treg 细胞免疫功能过度激活。因而抑制 Treg 细胞功能可能是自身免疫性疾病治疗的新方法。筛选和鉴定抗原特异性 Treg 细胞是免疫治疗的前提和基础。重症肌无力中 95% 的患者外周血可检测到抗 Titin 抗体,表明 Titin 在重症肌无力患者中是优势识别抗原,提示重症肌无力患者中存在 Titin 特异性 Treg 细胞,可从 Titin 蛋白分子中筛选和鉴定抗原特异性 Treg 细胞识别的抗原线性表位。Titin 是个巨大的微丝状蛋白质,在横纹肌中单一的 Titin 跨越半个肌小节。Titin 从 Z- 盘状转变为 M- 线状在肌肉结构、功能和发育过程中起重要作用。

[0004] 微阵列和芯片诊断技术具有同时对几十个,乃至数万个基因或蛋白质进行分析,不仅大大减少了分别检测的人力和物力,而且同时分析时克服了实验室的检测误差。本研究采用生物信息学的手段,在微阵列检测的基础上,分别对单个表位抗体的诊断有效性进行评估,通过对其有效性的不断拟合,克服了单个检测得的不足。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位及其应用。

[0006] 抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位是具有下列所示的氨基酸序列:位于

抗原的 103-115 位点、76-187 位点、13211-13227 位点，多肽序氨基酸序列分别为：CEQWVDYNLKWNPD、IVTHFPFDEQNC、EIIIVTHFPFDEQNCSMK。

[0007] 抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位的应用用于制备重症肌无力药物及诊断试剂盒。

[0008] 本发明通过微阵列和芯片诊断技术筛选有效性好的抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位，进而可以通过化学合成或基因工程表达重组的方法制备相应多肽，并用多肽制备抗体作为探针，开发重症肌无力药物及诊断试剂。上述方法克服了传统抗原抗体制备方法及药物筛选方法的繁琐，不仅大大减少了分别检测的人力和物力，而且同时分析时克服了实验室的检测误差，本研究采用生物信息学的手段，在微阵列检测的基础上，分别对单个表位抗体的诊断有效性进行评估，通过对有效性的不断拟合，克服了单个检测得的不足，并筛选出 P5、P6、P9 优势抗原表位，为重症肌无力相关疾病治疗和血清学诊断开辟了新路。

[0009] 根据生物信息学方法设计 9 条针对 Titin 蛋白胞外区多肽序列，并与牛血清白蛋白 (BSA) 的氨基端偶联、点制蛋白质微阵列、检测蛋白质微阵列、对微阵列检测阳性结果分别用酶联免疫吸附 (ELISA) 法进行验证。

附图说明

[0010] 图 1 是重症肌无力患者血清针对 P1-P9 多肽自身抗体阳性例数；

[0011] 图 2 是本发明的 P5、P6 和 P9 识别表位交叉性鉴定；

[0012] 图 3 是本发明的酶联免疫吸附反应 (ELISA) 验证试验。

具体实施方式

[0013] 抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位是具有下列所示的氨基酸序列：位于抗原的 103-115 位点、76-187 位点、13211-13227 位点，多肽序氨基酸序列分别为：CEQWVDYNLKWNPD、IVTHFPFDEQNC、EIIIVTHFPFDEQNCSMK。

[0014] 抗 Titin 抗体识别的优势抗原表位的应用用于制备重症肌无力药物及诊断试剂盒。

[0015] 实施例 1：多肽设计和蛋白质偶联

[0016] 根据生物信息学方法设计 9 条针对 Titin 蛋白胞外区多肽序列见表 1。多肽合成采用固相合成法 (SPPS)，合成后的多肽再采用琥珀酰亚胺 4-[N- 甲基马来酸]-1- 羧环己烷 (SMCC) 双功能交联剂在多肽巯基端与牛血清白蛋白 (BSA) 的氨基端偶联。

[0017] 表 1. 合成多肽序列

号 NO.	氨基酸位置	氨基酸序列
	Amino acid sites	Amino acid sequence
[0018]	P1 aa14282-14295	CGLEKGNKYLYRVSA
	P2 aa14379-14392	CLVISPSERSDKGIY
	P3 aa14516-14529	CDPPENVKWRDRTA
	P4 aa75-89	N
	P5 aa103-115	RLKQGDMVDLPRPS
	P6 aa176-187	C
	P7 aa211-222	CEQWVDYNLKWNP
	P8 aa223-237	D IVTHFPFDEQNC
	P9 aa13211-13227	DLSNFMESGEWVC IKESRGWKHSVTYSC EIVTHFPFDEQNCSM K

[0019] 实施例 2 :蛋白质微阵列点制

[0020] 用 BCD 法调整各蛋白浓度后,用蛋白点样仪按 8×12 的方式将各多肽 -BSA 偶联蛋白点样于硝酸纤维膜 (100ng/ 点), 每个多肽检测重复 6 次, 同时设立 β - 肌动蛋白 (β -actin) 和甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 内参照, 待干燥后, 用 5% 小牛血清封闭后, 备用。

[0021] 实施例 3 :蛋白质微阵列检测

[0022] 将待检稀释血清 (1 : 100, 用 5% 小牛血清稀释) 与微阵列芯片反应室温 2h, 用含 0.5% Tween 20 的 0.01Mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 5 次, 再加入碱性磷酸酶标记的二抗室温 1h, 用含 0.5% Tween 20 的 0.01Mol/L, pH7.4 的 PBS 洗涤 4 次和无 Tween 20 的 0.01Mol/L, pH7.4 PBS 洗涤 1 次, 最后加入 CDP-star 发光底物, 曝光显色 1min。将微阵列检测结果转换成 TIFF 图片格式后, 用 Array2.0 version 软件分析, 凡反应信号与对照比较相差 1.5 倍以上者, 为阳性, 否则为阴性。

[0023] 实施例 4 :微阵列结果验证 :对微阵列检测阳性结果分别用酶联免疫吸附 (ELISA) 法进行验证。将各多肽 -BSA 偶联蛋白以 1 μ g/mL 浓度包被微孔, 过夜, 次日取出, 用含 0.5% Tween 20 的 0.01Mol/L, pH7.4 PBS 洗涤 3 次, 用 5% 小牛血清封闭后, 加入 100 μ L 用 5% 小牛血清 1 : 100 稀释的待检稀释血清, 37C 反应 2h, 洗涤 5 次, 再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温 1h, 洗涤 5 次, 最后加入邻苯二胺底物 100 μ L / 孔, 室温避光显色 5-10min。加入 50 μ L / 孔硫酸终止反应, 在 490nm 处测各孔吸光度 (A)。凡 A 值 \geq 对照 1.5 倍者, 判为阳性, 否则为阴性。

[0024] 在 84 例 MG 血清中, 51 例抗多肽自身抗体阳性, 阳性率为 60.71%。经蛋白质微阵列方法筛选, 结果表明, 在设计的 9 条多肽抗原中, 针对多肽 P5、P6 和 P9 的阳性例数高于其

他各多肽（见图 1）。经卡方检验， $P < 0.05$ 。说明 P5、P6 和 P9 是优势识别表位。

[0025] 为鉴定 P5、P6 和 P9 识别表位有无交叉性，我们分析了各样本之间的共同阳性情况。发现 P5 与 P9 多肽共同阳性有 8 例 (44.4%)，而 P5 与 P6 多肽、P6 与 P9 多肽间共同阳性例数明显低于 P5 与 P9 多肽间（见图 2）， $P < 0.05$ 。P5、P6 和 P9 均阳性的血清仅 2 例。结果表明，自身抗体识别的 P5 与 P9 多肽表位存在交叉性。

[0026] 将微阵列检测阳性结果分别用 ELISA 法进行验证，结果 100% 重复；并且均能被多肽抗原阻断，说明自身抗体与多肽结合呈特异性，蛋白质微阵列方法筛选有效性好，进一步就可以将其用于制备相关药物及诊断试剂。

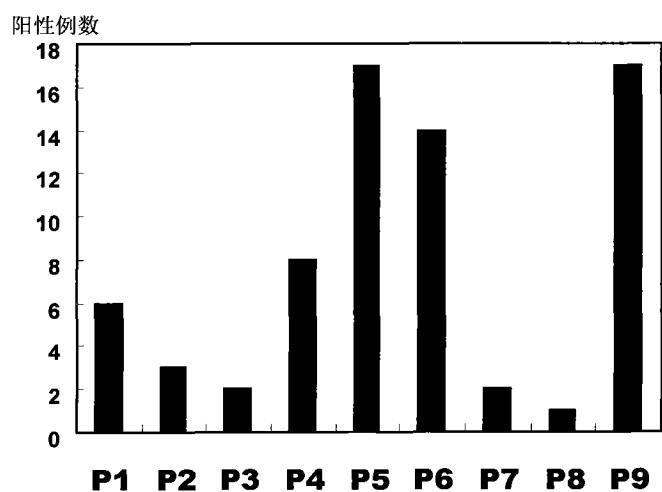


图 1

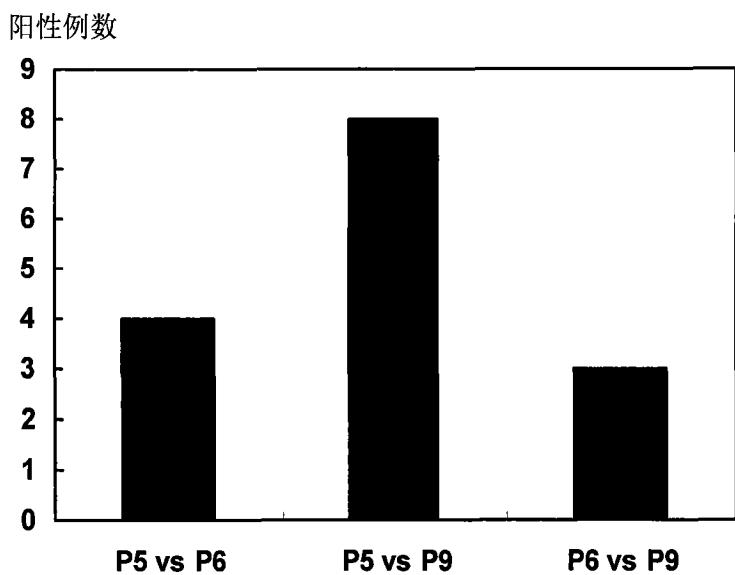


图 2

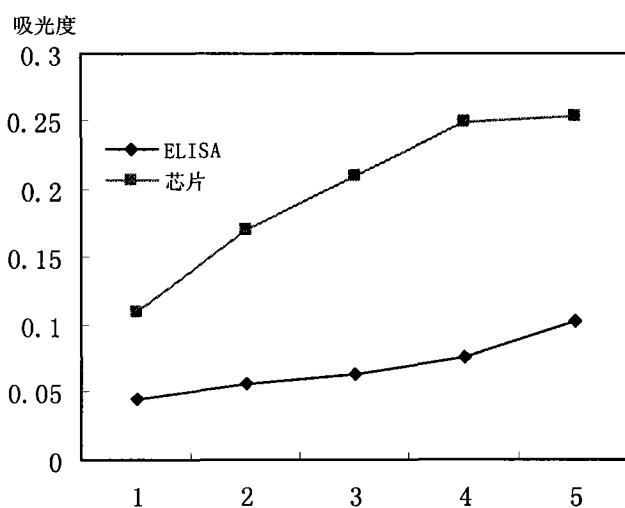


图 3

专利名称(译)	抗Titin抗体识别的优势抗原表位及其应用																																
公开(公告)号	CN102153625A	公开(公告)日	2011-08-17																														
申请号	CN201010206028.2	申请日	2010-06-22																														
[标]申请(专利权)人(译)	浙江天科高新技术发展有限公司																																
申请(专利权)人(译)	浙江天科高新技术发展有限公司																																
当前申请(专利权)人(译)	浙江天科高新技术发展有限公司																																
[标]发明人	方序 陈敏 王轶雄 罗陈启 闻树群																																
发明人	方序 陈敏 王轶雄 罗陈启 闻树群																																
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/53 A61K38/10 A61P21/04																																
外部链接	Espacenet Sipo																																
摘要(译)	<p>本发明公开了抗Titin抗体识别的优势抗原表位。它具有下列所示的氨基酸序列：位于抗原的103-115位点、76-187位点、13211-13227位点，多肽序氨基酸序列为：CEQWVDYNLKWNPD、IVTHFPFDEQNC、EIIVTHFPFDEQNCSMK。抗Titin抗体识别的优势抗原表位用于制备重症肌无力药物及诊断试剂盒。本发明通过微阵列和芯片诊断技术筛选有效性好的抗Titin抗体识别的优势抗原表位，进而可以通过化学合成或基因工程表达重组的方法制备相应多肽，并用多肽制备抗体作为探针，开发重症肌无力药物及诊断试剂。上述方法克服了传统抗原抗体制备方法及药物筛选方法的繁琐，不仅大大减少了分别检测的人力和物力，而且同时分析时克服了实验室的检测误差，为重症肌无力相关疾病治疗和血清学诊断开辟了新路。</p>																																
<table border="1"> <thead> <tr> <th>号 NO.</th> <th>氨基酸位置 Amino acid sites</th> <th>氨基酸序列 Amino acid sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P1</td> <td>aa14282-14295</td> <td>CGLEKGNKYLYRVSA</td> </tr> <tr> <td>P2</td> <td>aa14379-14392</td> <td>CLVISPERSDKGIY</td> </tr> <tr> <td>P3</td> <td>aa14516-14529</td> <td>CDPPENVKWRDRTA</td> </tr> <tr> <td>P4</td> <td>aa75-89</td> <td>N</td> </tr> <tr> <td>P5</td> <td>aa103-115</td> <td>RLKQGDMVDLPRPS</td> </tr> <tr> <td>P6</td> <td>aa176-187</td> <td>C</td> </tr> <tr> <td>P7</td> <td>aa211-222</td> <td>CEQWVDYNLKWNP</td> </tr> <tr> <td>P8</td> <td>aa223-237</td> <td>D IVTHFPFDEQNC</td> </tr> <tr> <td>P9</td> <td>aa13211-13227</td> <td>DLSNFMESGEWVC IKESRGWKHSVTYSC EIIVTHFPFDEQNCSM K</td> </tr> </tbody> </table>				号 NO.	氨基酸位置 Amino acid sites	氨基酸序列 Amino acid sequence	P1	aa14282-14295	CGLEKGNKYLYRVSA	P2	aa14379-14392	CLVISPERSDKGIY	P3	aa14516-14529	CDPPENVKWRDRTA	P4	aa75-89	N	P5	aa103-115	RLKQGDMVDLPRPS	P6	aa176-187	C	P7	aa211-222	CEQWVDYNLKWNP	P8	aa223-237	D IVTHFPFDEQNC	P9	aa13211-13227	DLSNFMESGEWVC IKESRGWKHSVTYSC EIIVTHFPFDEQNCSM K
号 NO.	氨基酸位置 Amino acid sites	氨基酸序列 Amino acid sequence																															
P1	aa14282-14295	CGLEKGNKYLYRVSA																															
P2	aa14379-14392	CLVISPERSDKGIY																															
P3	aa14516-14529	CDPPENVKWRDRTA																															
P4	aa75-89	N																															
P5	aa103-115	RLKQGDMVDLPRPS																															
P6	aa176-187	C																															
P7	aa211-222	CEQWVDYNLKWNP																															
P8	aa223-237	D IVTHFPFDEQNC																															
P9	aa13211-13227	DLSNFMESGEWVC IKESRGWKHSVTYSC EIIVTHFPFDEQNCSM K																															