



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105315357 A

(43) 申请公布日 2016.02.10

(21) 申请号 201510662800.4

A61P 13/08(2006.01)

(22) 申请日 2015.10.14

A61P 15/00(2006.01)

(71) 申请人 韩蕾

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道
639 号

(72) 发明人 韩蕾 周晓辉 周雨晏 周莉

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 蒋海军

(51) Int. Cl.

C07K 14/47(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书1页 说明书13页

序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

TRPM8 蛋白和相关多肽片段及其抗体的新用途

(57) 摘要

本发明公开了一种 TRPM8 相关多肽片段,氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。本发明还公开了 TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试剂中的应用,通过检测患者体液中的 TRPM8 蛋白分子或 TRPM8 相关多肽片段或其抗体的水平,有效的对慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征进行诊断,并且能够有效区别其它前列腺疾病。此外,通过静脉或皮下注射 1000 ~ 30000IU 的 TRPM8 蛋白或其相关多肽片段的单克隆或多克隆抗体,可以治愈或明显缓解慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征的临床表现。

1. 一种 TRPM8 相关多肽片段,其特征在于氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。

2. TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试剂中的应用,所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。

3. 如权利要求 2 所述的应用,其特征在于所述诊断试剂是免疫诊断试剂、生化诊断试剂。

4. 如权利要求 3 所述的应用,其特征在于所述应用通过免疫学方法利用 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段检测生物体体液中的 TRPM8 蛋白分子抗体或 TRPM8 相关多肽片段抗体的表达水平;

或者,利用任何种属动物制备或基因工程方法合成 TRPM8 蛋白或 TRPM8 相关多肽片段的多克隆或单克隆抗体,检测生物体体液中的 TRPM8 蛋白或 TRPM8 相关多肽片段的表达水平。

5. 如权利要求 4 所述的应用,其特征在于所述免疫学方法包括酶免疫分析,利用荧光免疫测定方法、电化学发光免疫测定方法或化学发光免疫方法进行测定的发光免疫分析、放射免疫分析,免疫浊度分析,时间分辨荧光免疫分析的技术方法。

6. 一种慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征 ELISA 诊断试剂盒,其特征在于试剂盒包括:

(1) 已包被 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段的固相载体和酶标记的抗 IgG 抗体,或者,已包被抗 IgG 抗体的固相载体和酶标记的 TRPM8 蛋白抗体或者 TRPM8 相关多肽片段的抗体,所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示;

(2) 酶的底物;

(3) 阴性对照品、阳性对照品和 / 或参考标准品和控制血清;

(4) 结合物及标本的稀释液;

(5) 洗涤液;

(6) 酶反应终止液。

7. 一种慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试纸,其特征在于所述试纸以固定有检测线 T 和控制线 C 的条状纤维层析材料为固定相,检测线 T 处以条带状包被有 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段,控制线 C 处以条带状包被有 IgG 抗体,待测样品中的 TRPM8 抗体在检测线 T 处发生特异性免疫反应,待测样品中的其它游离物在 C 线处发生免疫反应;

或者,所述试纸以固定有检测线 T 和控制线 C 的条状纤维层析材料为固定相,检测线 T 处以条带状包被有 TRPM8 蛋白抗体或者 TRPM8 相关多肽片段相应的抗体,控制线 C 处以条带状包被有 IgG 抗体,待测样品中的 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段在检测线 T 处发生特异性免疫反应,待测样品中的其它游离物在 C 线处发生免疫反应;

所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。

8. TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备治疗慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征药物中的应用,所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。

9. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于通过免疫学方法利用任何种属动物制备的或基因工程方法合成 TRPM8 蛋白或 TRPM8 相关多肽片段的多克隆或单克隆抗体;或者通过化学方法或基因工程方法合成 TRPM8 蛋白或 TRPM8 相关多肽片段。

TRPM8 蛋白和相关多肽片段及其抗体的新用途

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断试剂领域以及治疗药物领域,具体涉及一种 TRPM8 蛋白、相关多肽片段或其抗体在慢性前列腺炎 / 慢性骨盆疼痛综合征诊断中的应用以及针对该蛋白的单克隆或多克隆抗体在治疗慢性前列腺炎 / 慢性骨盆疼痛综合征中的应用。

背景技术

[0002] 前列腺炎是成年男性的常见疾病。我国前列腺炎症状的男性人群发生率为 8.4%, 就诊患者占泌尿外科门诊患者总量的 8 ~ 25%。有资料显示约有 50% 的男性在一生中的某个时期会受到前列腺炎的影响。

[0003] 前列腺炎目前分为四种类型,其中 III 型,即:慢性前列腺炎(III a 型)/慢性骨盆疼痛综合征(III b 型)(chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndromes, 慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征),相当于传统分类方法中的 CNP 和 PD,是前列腺炎中最常见的类型,约占慢性前列腺炎的 90% 以上。主要表现为长期、反复的骨盆区域疼痛或不适,持续时间超过 3 个月,可伴有不同程度的排尿症状和性功能障碍,严重影响患者的生活质量。同时,其庞大的患者人群和高昂的医疗费用给公共卫生事业造成了较大的经济负担。

[0004] 由于目前对慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征的病因、发病机制至今未能明确,病理生理学改变还不十分清楚,对前列腺炎的确诊、病情轻重的判断、治疗方法的选择以及疗效评价等诸多方面,国内外均无明确的标准可依,所以目前绝大多数临床医师在临床诊治前列腺炎过程中感到比较困难。

[0005] 2001 年, Tsavaler 等用人类前列腺特异性互补 DNA 文库的方法鉴别出了一种新型基因。这种基因编码分子量约为 130ku 的蛋白,与 TRP 通道蛋白有高度同源性,被命名为 TRPM8。人类编码 TRPM8 的基因位于染色体部位 2q37.1,全长 102.12kb,由 25 个外显子构成。它编码的 mRNA 可以翻译为含有 1104 个氨基酸的蛋白质。对已公布的基因组序列的分析说明 TRPM8 在所有被研究的恒温脊椎动物中均有表达。Julius 等发现 TRPM8 是一种冷激活的温度觉 TRP 通道。Tsavaler 等在一些原发肿瘤如乳腺、结肠、肺和皮肤来源的肿瘤中也有表达。随后的研究发现 TRPM8 mRNA 或蛋白还存在与背根神经节和三叉神经的感觉神经元,以及肠系膜迷走神经节,胃底、血管平滑肌、肝脏、膀胱上皮和男性生殖系统中。

发明内容

[0006] 本发明公开了 TRPM8 蛋白及抗体在制备慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试剂与治疗药物中的应用,运用“单克隆抗体”技术原理研制的抗 TRPM8 抗体酶联免疫诊断试剂盒或荧光免疫层析法 / 均相免疫荧光法诊断试剂,能快速、特异性的诊断出患者所患的疾病是否为慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征并评估出病情的进展情况或治疗效果,使慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征患者得到及时的治疗,有效提高患者的生活质量;或者通过给慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征患者以抗 TRPM8 抗体来治疗该疾病。

[0007] 本发明具体技术方案如下:

一种 TRPM8 相关多肽片段,其特征在于氨基酸序列片段如 SEQ ID No:1-6 所示。

[0008] 本发明所述的 TRPM8 相关多肽片段选自 TRPM8 蛋白全部氨基酸序列中的不同长度多肽片段,以人源的 TRPM8 蛋白为例,例如:1025-1104 段选择如下序列:TRPM8-1:KINTKANDTSEEMRHRFRQLDTKLND(SEQ ID:No 1), TRPM8-2:FKNEDNETLAWEGVMKENYL(SEQ ID:No 2),或者在 916-953 段选择如下序列:TRPM8-3:DGTTYDFAHCTFTGNESKPL(SEQ ID:No 3),或者在 1-692 段选择如下序列:TRPM8-4:VSRNLGPKIIMLQ(SEQ ID:No 4), TRPM8-5:DEVQRQWYVNGVNYFTD(SEQ ID:No 5), TRPM8-6:LTVIKMEEAGDEIVSNA(SEQ ID:No 6)。

[0009] 本发明还公开了 TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试剂中的应用。

[0010] 本发明所述 TRPM8 蛋白可选自任意动物来源的 TRPM8 蛋白,优选哺乳动物来源,更优选人源。以人源或鼠源为例,其信息如表 1 所示:

表 1

物种	人类	鼠类
Entrez	79054	171382
Ensembl	ENSG00000144481	ENSMUSG00000036251
UniProt	Q7Z2W7	Q148W9
mRNA 序列	NM_024080	NM_134252
蛋白序列	NP_076985	NP_599013
基因位置	Chr 2:234.49 - 234.59Mb	Chr 1:90.15 - 90.22Mb

本发明所述的应用,所述诊断试剂可以但不限于免疫诊断试剂、生化诊断试剂、荧光免疫层析法诊断试剂或者均相免疫荧光法诊断试剂。

[0011] 本发明所述的应用的一种优选方案为通过免疫学方法利用 TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段,检测生物体,例如人,包括但不限于血清、血浆、前列腺液等体液中的 TRPM8 蛋白分子或 TRPM8 相关多肽片段的抗体,或者利用由任何种属动物制备的或基因工程方法合成的 TRPM8 蛋白或 TRPM8 相关多肽片段的多克隆或单克隆抗体检测人包括但不限于血清、血浆、前列腺液等体液中的 TRPM8 蛋白分子或 TRPM8 相关多肽片段的水平。

[0012] 上述免疫学方法包括但不限于酶免疫分析(包括非均相酶免疫测定方法、均相酶免疫测定方法),利用荧光免疫测定方法、电化学发光免疫测定方法或化学发光免疫方法进行测定的发光免疫分析(包括酶促化学发光、非酶促化学发光),放射免疫分析(包括放射免疫分析方法、免疫放射分析或免疫放射度量分析方法),免疫浊度分析(包括免疫透射比浊法、免疫散射比浊法),时间分辨荧光免疫分析等技术方法。

[0013] 以 ELISA 方法为例,具体方法为:用纯化的人 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段通过包被缓冲液稀释后包被在酶标版上的微孔内制成固相抗原,加入封闭液;将标准品与待测血清样品用样品稀释液稀释后加入各自的抗原测定孔中,每孔加入含有辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体的酶标试剂,形成 TRPM8-抗体-酶标二抗复合物,经洗涤液彻底洗

涤后加酶底物溶液显色,酶底物溶液反应时间到后加入酸性终止液,所述酶底物溶液在辣根过氧化物酶催化下变色,并在酸作用下转化为最终的颜色,利用颜色深浅来检测样品中 TRPM8 蛋白抗体的水平。

[0014] 或者,用纯化的抗人 IgG 抗体通过包被缓冲液稀释后包被在酶标版上的微孔内制成固相抗体,加入封闭液;将标准品与待测血清样品用样品稀释液稀释后加入各自的抗体测定孔中,每孔加入含有辣根过氧化物酶标记的人 TRPM8 蛋白抗体或者 TRPM8 相关多肽片段抗体的酶标试剂,形成 TRPM8-抗体-酶标二抗复合物,经洗涤液彻底洗涤后加酶底物溶液显色,酶底物溶液反应时间到后加入酸性终止液,所述酶底物溶液在辣根过氧化物酶催化下变色,并在酸作用下转化为最终的颜色,利用颜色深浅来检测样品中 TRPM8 蛋白的水平。

[0015] 以免疫均相法为例,具体方法为:在支撑板上依次贴上 NC 膜、吸水垫、喷涂有荧光标记抗体的结合垫及已于展开剂中浸润并烘干的玻璃纤维,组装好免疫层析试纸条。在三维喷点平台上,用非接触式微量喷头,均匀平行地将 TRPM8 蛋白或 TRPM8 蛋白相关多肽片段作为包被抗原(T 线)和羊抗人或鼠 IgG(C 线)在 NC 膜上喷洒成粗细适中的 2 条线。置于 37℃控温箱烘干 1h 后取出,切条机切成 $4\text{mm} \pm 2\text{mm}$ 等宽试纸条,与干燥剂一起装入铝箔袋中密封保存。然后取待检品滴加于试纸条样品垫适宜位置,层析后在特征激发(320nm)、发射(620nm)波长下拍照检测。按照上述方法分别进行灵敏度、特异性及模拟阳性样品检测。当待检品沿试纸条通过毛细作用从下向上虹吸时,根据层析原理,在层析移动过程中,经试纸条检测端,向另一端移动,先后依次经过结合垫、NC 膜上 T 线和 C 线到达吸水垫。层析后,若 C 线不显色,则试纸条视为无效;若 C 线显色,则试纸条视为有效。若 C 线显色而 T 线不显色,则测试结果为阳性;若 C、T 线均显色,则测试结果为阴性。

[0016] 以通过荧光法检测进行的酶免疫均相法为例,具体方法为:将 0.1ml 的标准液或血清与 0.01ml 抗体试剂或空白抗体试剂于 30℃孵育 30min。然后加入酶试剂(0.04ml),混合物于 30℃孵育 15min。最后加入 0.45ml 底物,于 30℃孵育 1h 后,加入 13g/L 十二烷基硫酸钠 0.05ml 中止反应,用荧光法测定形成的 NADPH。

[0017] 本发明公开了慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征和人体内包括但不限于血清、血浆、前列腺液等体液中的 TRPM8 或其抗体含量的关联性。慢性前列腺炎(CP)和慢性骨盆疼痛综合征(CPPS)是自身免疫系统对体内的 TRPM8 蛋白耐受性降低转而攻击表达有该蛋白的细胞所导致的一种自身免疫疾病。因此可以通过检测人体内包括但不限于血清、血浆、前列腺液等体液中的 TRPM8 或其抗体含量水平来明确慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征的临床诊断并评估出病情的进展情况或治疗效果。

[0018] 根据临床慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征患者发病情况,经过统计分析,慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征发病与 TRPM8 或其抗体表达量或者检测量的关系如表 2 所示:

表 2

发病情况	TRPM8 蛋白血液表达量或者检测量 (ng/ml)	TRPM8 抗体血液表达量或者检测量 (ng/ml)
慢性前列腺炎或慢性 骨盆疼痛综合征重度	$\geq 50; < 200$	$\geq 250; < 500$
慢性前列腺炎或慢性 骨盆疼痛综合征中度	$\geq 30; < 50$	$\geq 15; < 25$
慢性前列腺炎或慢性 骨盆疼痛综合征轻度	$\geq 10; < 30$	$\geq 5; < 15$
正常人群	< 10	< 5
细菌性前列腺炎	< 10	< 5
前列腺癌	≥ 500	≥ 2000

本发明所述 TRPM8 蛋白或其相关多肽片段的单克隆抗体,可采用本领域常规方法制备而成。

[0019] 本发明还公开了一种慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征 ELISA 诊断试剂盒,其特征在于试剂盒包括:

(1) 已包被 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段的固相载体(免疫吸附剂)和酶标记的抗 IgG 抗体(结合物),优选抗人 IgG 抗体;或者,已包被抗 IgG 抗体的固相载体(免疫吸附剂),优选抗人 IgG 抗体,和酶标记的 TRPM8 蛋白抗体或者 TRPM8 相关多肽片段的抗体(结合物),所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示;

(2) 酶的底物;

(3) 阴性对照品和阳性对照品(定性测定中),参考标准品和控制血清(定量测定中);

(4) 结合物及标本的稀释液;

(5) 洗涤液,在板式 ELISA 中,常用的稀释液为含 0.05%吐温 20 磷酸缓冲盐水;

(6) 酶反应终止液,常用的 HRP 反应终止液为硫酸,其浓度按加量及比色液的最终体积而异,在板式 ELISA 中一般采用 2mol/L。

[0020] 本发明还公开了一种慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试纸,其特征在于所述试纸以固定有检测线 T 和控制线 C 的条状纤维层析材料为固定相,检测线 T 处以条带状包被有 TRPM8 蛋白或者 TRPM8 相关多肽片段,控制线 C 处以条带状包被有 IgG 抗体,待测样品中的 TRPM8 抗体在检测线 T 处发生特异性免疫反应,待测样品中的其它游离物在 C 线处发生免疫反应;

或者,所述试纸以固定有检测线 T 和控制线 C 的条状纤维层析材料为固定相,检测线 T 处以条带状包被有 TRPM8 蛋白抗体或者 TRPM8 相关多肽片段相应的抗体,控制线 C 处以条带状包被有 IgG 抗体,待测样品中的 TRPM8 蛋白在检测线 T 处发生特异性免疫反应,待测样品中的其它游离物在 C 线处发生免疫反应;所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。

[0021] 本发明还公开了 TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备治疗慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征药物中的应用,所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID No:1-6 所示。可通过免疫学方法利用任何种属动物制备的或基因工程方法合成 TRPM8 蛋白或 TRPM8 相关多肽片段的多克隆或单克隆抗体。

[0022] 具体的,通过静脉或皮下注射 1000 ~ 30000IU 的 TRPM8 蛋白或其相关多肽片段的单克隆或多克隆抗体,可以治愈或明显缓解慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征的临床表现。

[0023] 本发明有益效果:

1. 本发明公开了 TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试剂中的应用,通过检测患者体液中的 TRPM8 蛋白分子或 TRPM8 相关多肽片段或其抗体的水平,有效的对慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征进行诊断,并且能够有效区别其它前列腺疾病;

2. 本发明还公开了 TRPM8 蛋白、TRPM8 相关多肽片段及其相应抗体在制备治疗慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征药物中的应用,通过静脉或皮下注射 1000 ~ 30000IU 的 TRPM8 蛋白或其相关多肽片段的单克隆或多克隆抗体,可以治愈或明显缓解慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征的临床表现。

附图说明

[0024] 图 1 为各组前列腺病理切片 HE 染色结果。

[0025] 图 2 为各组前列腺组织病理评分结果 (**p < 0.01VS 空白对照组)。

[0026] 图 3 为各组前列腺组织 CD3 免疫荧光染色结果。

[0027] 图 4 为 TRPM8 相关的多肽片段各组前列腺病理切片 HE 染色结果。

[0028] 图 5 为 TRPM8 相关的多肽片段各组前列腺组织病理评分结果 (**p < 0.01VS 空白对照组)。

具体实施方式

实施例 1 TRPM8 相关多肽片段的制备

从 TRPM8 的跨膜分析来看:处于膜外的有如下几段:1-692,758-796,849-862,916-953,1025-1104。综合各种软件分析,最终选择了以下 6 个跨膜蛋白的胞外段,选择的氨基酸序列基本上全覆盖了胞外段。即:

T-1:KINTKANDTSEEMRHRFRQLDTKLND(26AA);

T-2:FKNEDNETLAWEGVMKENYL(20AA);

T-3:DGTTYDFAHCTFTGNESKPL(20AA);

T-4:VSRNLGPKIIMLQ(13AA);

T-5:DEVQRQWYVNGVNYFTD(16AA);

T-6:LTVIKMEEAGDEIVSNA(17AA)。

[0029] 以上肽段,委托武汉百意欣生物技术有限公司合成得到。TRPM8 蛋白购自于 ProteinTech Group 公司。

[0030] 实施例 2 TRPM8 蛋白以及 TRPM8 相关多肽片段抗原性的检测

为了证明 TRPM8 蛋白是 CP/CPPS 诱发的关键以及 TRPM8 相关多肽片段的抗原致病性,进行了如下实验,基本的实验设计如下:首次使用纯 TRPM8 蛋白联合完全弗氏佐剂(Complete Freund's adjuvant, CFA)来建立 CP/CPPS 的动物模型,并与前列腺蛋白匀浆造模方法相比较。与此同时,使用免疫磁珠法将前列腺蛋白匀浆内的 TRPM8 去除,用之造模作为阴性对照。采用 HE 染色方法来评价各造模组动物前列腺组织内的炎症严重程度,并对前列腺内的炎症严重程度进行病理评分;采用 CD3 免疫荧光的方法来观察造模动物前列腺内 T 淋巴细胞的浸润情况。

[0031] 取 40 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 $250 \pm 20\text{g}$ (购于上海杰思捷实验动物有限公司,许可证号码:SCXK(沪)2012-0006)。无菌条件下摘取 SD 大鼠前列腺,制备前列腺匀浆蛋白以及去 TRPM8 蛋白匀浆。免疫动物。实验分组:40 只 8 周龄 SD 大鼠随机分成 4 组,即蛋白匀浆组、去 TRPM8 蛋白匀浆组、纯 TRPM8 蛋白组和空白对照组,每组 10 只。免疫 8 周后,按 $0.3\text{ml}/100\text{g}$ 比例腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉各组实验动物,分别收集各组动物的血浆、前列腺。制备前列腺病理切片,将各实验组动物的前列腺切片放入烘箱内, 60°C 烤片 30min,然后按照常规方法,依次将病理切片放入各染色缸内。经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素和伊红染色、梯度乙醇脱水和二甲苯透明后,用中性树脂封片,镜下观察和拍照,封片后的病理切片 4°C 保存。

[0032] 另外取各各组待检测动物的前列腺组织切片,烘箱内 60°C 烤片 30min,然后进行 CD3 免疫荧光,最后滴加抗荧光猝灭剂封片,镜下观察,拍照。

[0033] 参考上述方法,使用 TRPM8 蛋白相关多肽片段免疫大鼠,制得相应的前列腺组织切片。

[0034] T-1 组:对应 TRPM8 相关多肽片段 KINTKANDTSEEMRHRFRQLDTKLND(SEQ ID:No 1);
T-2 组:对应 TRPM8 相关多肽片段 FKNEDETLAWEGVMKENYL(SEQ ID:No2);
T-3 组:对应 TRPM8 相关多肽片段 DGTTYDFAHCTFTGNESKPL(SEQ ID:No3);
T-4 组:对应 TRPM8 相关多肽片段 VSRNLGPKIIMLQ(SEQ ID:No 4) 组;
T-5 组:对应 TRPM8 相关多肽片段 DEVRQWYVNGVNYFTD(SEQ ID:No 5) 组;
T-6 组:对应 TRPM8 相关多肽片段 LTVIKMEEAGDEIVSNA(SEQ ID:No 6);Control 组:空白对照组;

根据 HE 染色的结果,对各组动物前列腺炎症程度进行病理评分。0 分:无任何炎性细胞浸润,无任何炎症迹象;1 分:有少量上皮腺泡萎缩;2 分:有大量上皮腺泡萎缩且有轻微的炎性细胞浸润;3:上皮腺泡萎缩严重、腺体内严重充血且有大量炎性细胞浸润。每张前列腺切片均经三名病理学副教授根据上述标准按照随机、双盲原则进行评分,将最后计算得到的平均值作为该动物前列腺炎症程度的病理评分。

[0035] 采用 SPSS19.0 进行统计学分析,对各组动物前列腺组织炎症严重程度的病理评分均值进行方差齐性检验和单因素方差分析(One-Way ANOVA), $p < 0.05$ 有显著性差异, $p < 0.01$ 有极显著性差异。

[0036] 1. HE 染色和病理评分结果

由图 1(1 为 10 倍物镜;2 为 20 倍物镜;3 为 40 倍物镜,A:空白对照组;B:蛋白匀浆组;C:纯 TRPM8 蛋白组;D:去 TRPM8 蛋白匀浆组)和图 2 可知,所有蛋白匀浆组动物的前列腺间质内都可见大量的炎性细胞浸润,腺体内可见严重充血;病理评分的均值为

2.7778 $\pm$ 0.4410(M $\pm$ SD)。而空白对照组动物的前列腺间质以及血管周围未发现有炎性细胞浸润,病理评分(0.4000 $\pm$ 0.5164)也远低于蛋白匀浆造模组。

[0037] 为了研究是否是前列腺蛋白匀浆内的 TRPM8 在诱导 CP/CPPS 发病中的作用,采用免疫磁珠法将 TRPM8 蛋白从蛋白匀浆中去除。结果显示,去 TRPM8 蛋白匀浆联合 CFA 造模组动物前列腺内病理形态学改变、炎性细胞浸润都大大降低;病理评分(0.8000 $\pm$ 0.9190)提示,去 TRPM8 蛋白匀浆组动物前列腺内的炎症程度与空白对照组无显著性差异。

[0038] 同时,用纯 TRPM8 蛋白联合 CFA 来免疫 SD 大鼠,来进一步验证 TRPM8 蛋白在 CP/CPPS 发病中的作用。由图 1 可知,TRPM8 蛋白成功诱导了 CP/CPPS 的产生:前列腺充血严重、间质内特别是血管周围有大量炎性细胞浸润,病理评分(2.7000 $\pm$ 0.4830)也与蛋白匀浆组非常接近。

[0039] 2. CD3 免疫荧光染色结果

由 HE 染色结果可知,蛋白匀浆组和纯 TRPM8 蛋白组大鼠前列腺组织内有大量炎性细胞浸润。为了证明这些浸润的细胞含有大量的 T 淋巴细胞,对 CD3 分子进行免疫荧光染色。结果如图 3(A:空白对照组;B:蛋白匀浆组;C:纯 TRPM8 蛋白组;D:去 TRPM8 蛋白匀浆组)所示,在前列腺间质内可见大片红色荧光标记的 CD3 分子,表明这些浸润的炎性细胞中绝大多数为 T 淋巴细胞,而不是中性粒细胞或巨噬细胞等固有免疫细胞。而空白对照组和去 TRPM8 蛋白匀浆组中,本来前列腺间质内几乎就没有炎性细胞浸润,而 CD3 免疫荧光染色又呈阴性,表明其内没有出现 T 淋巴细胞。

[0040] 3. TRPM8 相关多肽片段的抗原致病性的检测结果,如图 4 和图 5 所示,在 TRPM8 相关多肽片段抗原致病性研究中的实验结果显示:TRPM8 相关的多个多肽片段均显示出较强的导致 CP/CPPS 的致病性。

[0041] 综上所述,无论 TRPM8 蛋白本身还是 TRPM8 相关多肽片段均具有较强的导致 CP/CPPS 发生的抗原致病性。

[0042] 实施例 3 TRPM8 蛋白以及 TRPM8 相关多肽片段抗体的制备

(一) 动物的选择与免疫

1. 动物的选择:纯种 BALB/C 小鼠。

[0043] 2. 免疫方案:选择合适的免疫方案对于细胞融合杂交的成功,获得高质量的 McAb 至关重要。一般在融合前两个月左右根据确立免疫方案开始初次免疫,免疫方案应根据抗原的特性不同而定。

[0044] 选择人源 TRPM8 蛋白全序列以及 SEQ ID No:1-6 所示的多肽片段为作为抗原,使用福氏完全佐剂,分别免疫小鼠。

[0045] 初次免疫抗原 1~50 μ g 加福氏完全佐剂皮下多点注射或脾内注射(一般 0.8~1ml, 0.2ml/点)。3 周后,第二次免疫剂量同上,加福氏不完全佐剂皮下或 ip(腹腔内注射)(ip 剂量不宜超过 0.5ml)。3 周后,第三次免疫剂量同一,不加佐剂,ip(5~7 天后采血测其效价)。2~3 周后,加强免疫,剂量 50~500 μ g 为宜,ip 或 iv(静脉内注射)。3 天后,取脾融合。

[0046] (二) 细胞融合

1. 细胞融合前准备

(1) 骨髓瘤细胞系的选择:

骨髓瘤细胞源自小鼠,接种杂交瘤在同一品系小鼠腹腔内产生大量 McAb。

[0047] (2) 饲养细胞:在组织培养中,加饲养细胞有:小鼠腹腔巨噬细胞。饲养细胞的量为 2×10^4 或 10^5 细胞/孔。

[0048] 2. 细胞融合的步骤

(1) 制备饲养细胞层:选用小鼠腹腔巨噬细胞。与免疫小鼠相同品系的小鼠,用 BALB/C 小鼠,6 ~ 10 周。拉颈处死,浸泡在 75% 酒精内,3 ~ 5min,用无菌剪刀剪开皮肤,暴露腹膜,用无菌注射器注入 5 ~ 6ml 预冷的培养液(严禁刺破肠管),反复冲洗,吸出冲洗液。冲洗液放入 10ml 离心管,1200rpm/ 分离 5 ~ 6min,用 20% 小牛血清(NCS) 或胎牛血清(FCS) 的培养液混悬,调整细胞数至 1×10^5 /ml,加入 96 孔板,100 μ l/ 孔,放入 37°C CO₂ 孵箱培养。

[0049] (2) 制备免疫脾细胞

最后一次加强免疫 3 天后小鼠拉颈处死。无菌取脾脏,培养液洗一次。脾脏研碎,过细胞筛,离心,细胞用培养液洗 2 次。计数,取 10^8 脾淋巴细胞悬液备用。

[0050] (3) 制备骨髓瘤细胞

取对数生长骨髓瘤细胞离心。用无血清培养液洗 2 次,计数,取得 $\times 10^7$ 细胞备用。

[0051] (4) 融合

①将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:10 或 1:5 的比例混合在一起,在 50ml 离心管中用无血清不完全培养液洗 1 次,离心,1200rpm,8min;弃上清,用吸管吸净残留液体,以免影响聚乙二醇(PEG) 浓度。轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略松动。

[0052] ②90s 内加入 37°C 预温的 1ml 45% PEG(分子量 4000) 溶液,边加边轻微摇动。37°C 水浴作用 90s。

[0053] ③加 37°C 预温的不完全培养液以终止 PEG 作用,每隔 2min 分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 6ml。

[0054] ④离心,800rpm,6min。

[0055] ⑤充上清,用含 20% 小牛血清 HAT 选择培养液重悬。

[0056] ⑥将上述细胞,加到已有饲养细胞层的 96 孔板内,每孔加 100 μ l。一般一个免疫脾脏可接种 4 块 96 孔板。

[0057] ⑦将培养板置 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

[0058] (三) 选择杂交瘤细胞及抗体检测

1. HAT 选择杂交瘤细胞:脾细胞和骨髓瘤细胞经 PEG 处理后,形成多种细胞的混合体,只有脾细胞与骨髓细胞形成的杂交瘤细胞才有意义。在 HAT 选择培养液中培养时,由于骨髓瘤细胞缺乏胸苷激酶或次黄嘌呤鸟嘌呤核糖转移酶,故不能生长繁殖,而杂交瘤细胞具有上述两种酶,在 HAT 选择培养液可以生长繁殖。

[0059] 在用 HAT 选择培养 1 ~ 2 天内,将有大量瘤细胞死亡,3 ~ 4 天后瘤细胞消失,杂交细胞形成小集落,HAT 选择培养液维持 7 ~ 10 天后应换用 HT 培养液,再维持 2 周,改用一般培养液。在上述选择培养期间,杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时,即可开始检测特异性抗体,筛选出所需要的杂交瘤细胞系。在选择培养期间,一般每 2 ~ 3 天换一半培养液。

[0060] 2. TRPM8 抗体的检测:采用放射免疫测定(RIA) 的方法进行。

[0061] (四) 杂交瘤的克隆化

本发明采用的是有限稀释法克隆:

(1) 克隆前 1 天制备饲养细胞层 (同细胞融合)。

[0062] (2) 将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹干, 计数。

[0063] (3) 调整细胞为 3 ~ 10 个细胞 /ml。

[0064] (4) 取头天准备的饲养细胞层的细胞培养板, 每孔加入稀释细胞 100 μ l。孵育于 37℃、5% CO₂ 孵箱中。

[0065] (5) 在第 7 天换液, 以后每 2 ~ 3 天换液 1 次。

[0066] (6) 8 ~ 9 天可见细胞克隆形成, 及时检测抗体活性。

[0067] (7) 将阳性孔的细胞移至 24 孔板中扩大培养。

[0068] (8) 每个克隆应尽快冻存。

[0069] (五) 杂交瘤细胞的冻存与复苏。

[0070] 1. 杂交瘤细胞的冻存细胞冻存液: 50% 小牛血清; 40% 不完全培养液; 10% DMSO (二甲基亚砷)。冻存液最好预冷, 操作动作轻柔、迅速。冻存时从室温可立即降至 0℃ 后放入 -70℃ 超低温冰箱, 次日转入液氮中。

[0071] 2. 细胞复苏方法将玻璃安瓿自液氮中小心取出, 放 37℃ 水浴中, 在 1min 内使冻存的细胞解冻, 将细胞用完全培养液洗涤两次, 然后移入头天已制备好的饲养层细胞的培养瓶内, 置 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养, 当细胞形成集落时, 检测抗体活性。

[0072] (六) 单克隆抗体的大量生产

本发明应用实体瘤法: 对数生长期的杂交瘤细胞按 $1 \sim 3 \times 10^7$ /ml 接种于小鼠背部皮下, 每处注射 0.2ml, 共 2 ~ 4 点。待肿瘤达到一定大小后 (一般 10 ~ 20 天) 则可采血, 从血清中获得单克隆抗体的含量可达到 1 ~ 10mg/ml。

[0073] (七) 抗体的鉴定

表 3

	用量	特异性	亲和力	效价
TRPM8	1 μ g	强	10^{12} L/mol	1:128
T-1	35ng	强	10^{12} L/mol	1:128
T-2	35ng	强	10^{12} L/mol	1:128
T-3	35ng	强	10^{12} L/mol	1:128
T-4	35ng	强	10^{12} L/mol	1:128
T-5	35ng	强	10^{12} L/mol	1:128
T-6	35ng	强	10^{12} L/mol	1:128

实施例 4 一种慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征 ELISA 诊断试剂盒

(1) 已包被 TRPM8 蛋白 (1 μ g) 或者 TRPM8 相关多肽片段 (35ng) 的固相载体和酶标记的抗人 IgG 抗体; 或者, 已包被抗人 IgG 抗体 (1 μ g) 的固相载体和酶标记的 TRPM8 蛋白抗体或者 TRPM8 相关多肽片段的抗体 (1 μ g), 所述 TRPM8 相关多肽片段氨基酸序列如 SEQ ID

No:1-6 所示；

- (2) 酶的底物；
- (3) 阴性对照品、阳性对照品和 / 或参考标准品和控制血清各 0.5 毫升；
- (4) 结合物及标本的稀释液各 1.0 毫升；
- (5) 洗涤液 5 毫升；
- (6) 酶反应终止液 2 毫升。

[0074] 选取 60 例临床检测者,使用本发明所述试剂盒 (TRPM8 和 TRPM8 相关多肽片段的试剂盒) 对检测者血浆进行检测,包括 15 例健康人,15 例临床上已经确诊为 CP/CPPS 的患者,15 例细菌性前列腺炎患者,15 例前列腺癌患者,验证本发明所述试剂盒的检测准确率。结果如表 5 所示。其中 15 例细菌性前列腺炎患者中有 12 例的检测值小于 10ng/ml,排除率为 80%,15 例前列腺癌患者的检测值均大于 500ng/ml,排除率为 100%。说明本发明所述试剂盒能够有效的对 CP/CPPS 患者进行诊断,并且能够有效鉴别 CP/CPPS 与其它前列腺疾病,如细菌性前列腺炎和前列腺癌。

[0075] 表 4 诊断标准

检测人群	TRPM8 蛋白或者相关多肽的检测值 (ng/ml)	TRPM8 或者相关多肽的抗体检测值 (ng/ml)
慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征	10≤检测值<200, 判断为 CP/CPPS 阳性	250≤检测值<500, 判断为 CP/CPPS 阳性
正常人群	检测值 < 10, 判断为 CP/CPPS 阴性。	检测值<5,判断为 CP/CPPS 阴性。
细菌性前列腺炎	<10	<5
前列腺癌	≥500	≥2000

表 5

		血浆样本	
		TRPM8 蛋白检测准确率	TRPM8 抗体检测准确率
TRPM8	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)
T-1	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)
T-2	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)
T-3	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)
T-4	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)
T-5	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)
T-6	正常人	100% (15 人阴性)	100% (15 人阴性)
	CP/CPPS 患者	86.67% (13 人检出阳性)	86.67% (13 人检出阳性)

[0076] 实施例 5 一种慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试纸

在支撑板上依次贴上 NC 膜、吸水垫、喷涂有荧光标记抗体的结合垫及已于展开剂中浸润并烘干的玻璃纤维, 组装好免疫层析试纸条。在三维喷点平台上, 用非接触式微量喷头, 均匀平行地将 TRPM8 蛋白或 TRPM8 蛋白相关肽段, 浓度 10ng/kg, 用量 100u1 作为包被抗原 (T 线) 和羊抗人或鼠 IgG, 浓度 10ng/kg, 用量 100u1 (C 线) 在 NC 膜上喷洒成粗细适中的 2 条线。置于 37℃ 控温箱烘干 1h 后取出, 切条机切成 4mm±2mm 等宽试纸条, 与干燥剂一起装入铝箔袋中密封保存。然后取待检品滴加于试纸条样品垫适宜位置, 层析后在特征激发 (320nm)、发射 (620nm) 波长下拍照检测。按照上述方法分别进行灵敏度、特异性及模拟阳性样品检测。当待检品沿试纸条通过毛细作用从下向上虹吸时, 根据层析原理, 在层析移动过程中, 经试纸条检测端, 向另一端移动, 先后依次经过结合垫、NC 膜上 T 线和 C 线到达吸水垫。层析后, 若 C 线不显色, 则试纸条视为无效; 若 C 线显色, 则试纸条视为有效。若 C 线显色而 T 线不显色, 则测试结果为阳性; 若 C、T 线均显色, 则测试结果为阴性。

[0077] 表 6

发病情况	TRPM8 蛋白体液检测结果	TRPM8 抗体体液检测结果
慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征患者	阳性 (C 线、T 线均显色)	阳性 (C 线、T 线均显色)
正常人群	阴性 (C 线显色、T 线不显色)	阴性 (C 线显色、T 线不显色)

无效：质控区 (C) 未出现色带，表明不正确的操作过程或试剂条已变质损坏，重新进行检测。

[0078] 注意：试剂条质控线与测试线的色带可因体液中 TRPM8 或 TRPM8 抗体含量多少而显现出颜色深浅，结果判定按上述标准进行。为保险起见，可以在 3 天后再测一次。

[0079] 实施例 6 TRPM8 蛋白以及 TRPM8 相关多肽抗体对慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征患者的治疗作用分别制备 TRPM8 蛋白以及 TRPM8 相关多肽的单克隆抗体，静脉或皮下注射 1000 ~ 30000 单位，日一次，每疗程 14 天，使用剂量与临床表现之间的关系如表 7 所示。

[0080] 表 7

慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征病情	TRPM8 以及 TRPM8 相关多肽的单克隆抗体用法用量 (IU)	患者临床好转指标
轻度	1000~10000IU，日一次，	患者症状好转；TRPM8 抗体体液检
	静脉注射	测值 < 5 ng/ml；TRPM8 蛋白体液检
中度	2000~20000IU，日一次，静脉注射	测值 < 10 ng/ml；前列腺液中白细胞 < 5 个/高倍视野；B 超显示前列腺体积及结构正常。
重度	3000~30000IU 或以上，日一次，静脉注射	

结果如表 8 所示，结果表明 TRPM8 以及 TRPM8 相关多肽的单克隆抗体可以有效治愈或减轻慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征。

[0081] 表 8

	药物用法用量	入组患者 数 (人)	治 愈 率 (%)	显 效 率 (%)	有 效 率 (%)	无 效 率 (%)
阴 性 对 照 药物: 肝素	2000IU, 日一 次, 静脉注射	100	0	0	0	100
阳 性 对 照 药物: 前列 康片	一次4片, 一日 3 次, 口服	100	60	10	70	30
TRPM8 单 克隆抗体	10000 IU, 日 一次, 静脉注 射	100	62	10	72	28
T-1 单克隆 抗体	15000 IU, 日 一次, 静脉注 射	100	61	20	82	18
T-2 单克隆 抗体	13000 IU, 日 一次, 静脉注 射	100	62	30	92	8
T-3 单克隆 抗体	6000 IU, 日一 次, 静脉注射	100	92	5	97	3
T-4 单克隆 抗体	8000 IU, 日一 次, 静脉注射	100	83	12	95	5
T-5 单克隆	9000 IU, 日一	100	81	10	91	9

抗体	次, 静脉注射					
T-6 单克隆 抗体	9600 IU, 日一 次, 静脉注射	100	88	5	93	7

[0001]

<110> 韩蕾

<120> TRPM8 蛋白和相关多肽片段及其抗体的新用途

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

KINTKANDTSEEMRHRFRQLDTKLND

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

FKNEDNETLAWEGVMKENYL

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

[0002]

<400> 3

DGTTYDFAHCTFTGNESKPL

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

VSRNLGPKIIMLQ

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

DEVQRQWYVNGVNYFTD

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

LTVIKMEEAGDEIVSNA

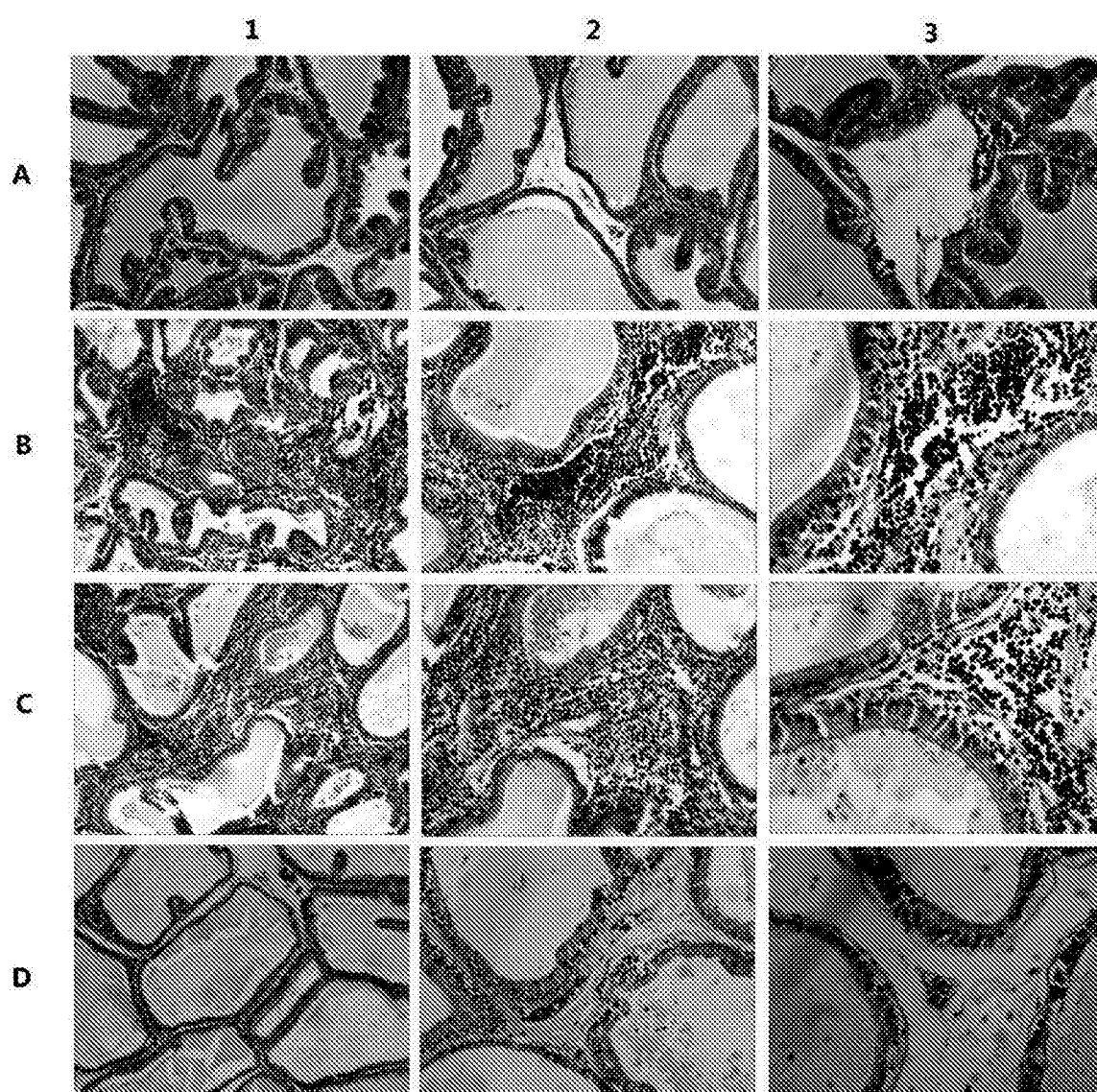


图 1

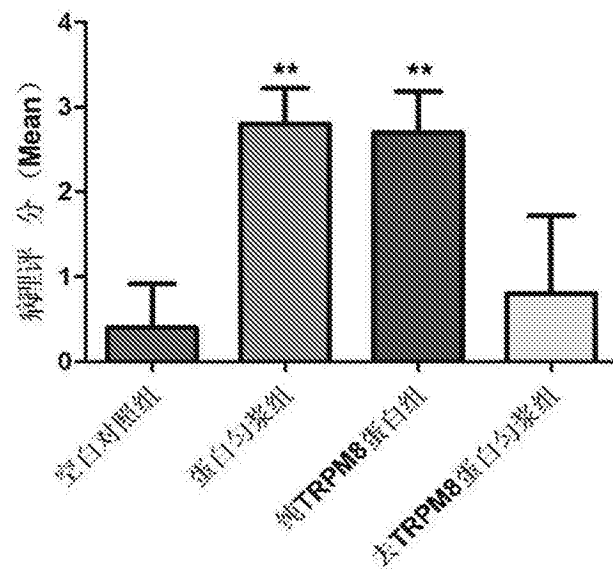


图 2

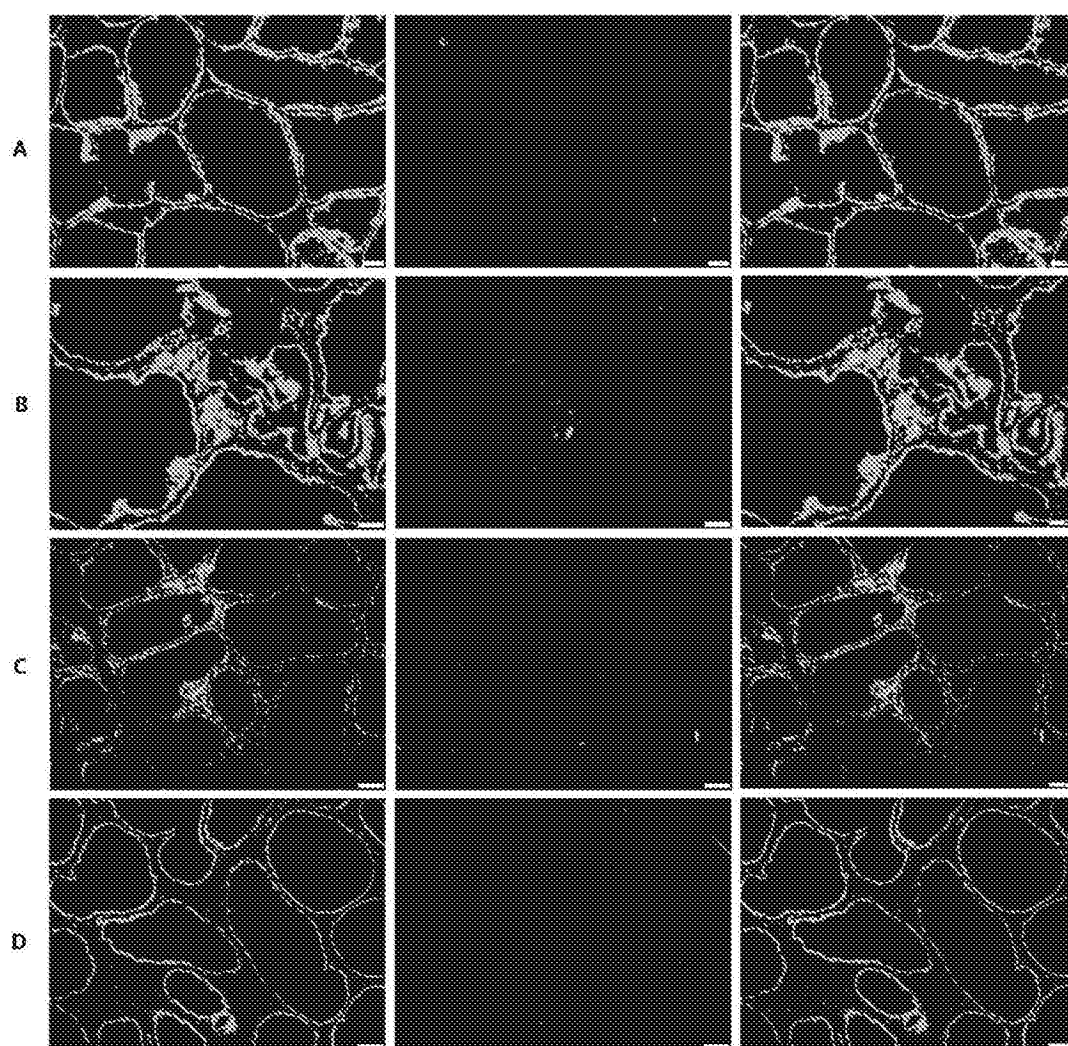


图 3

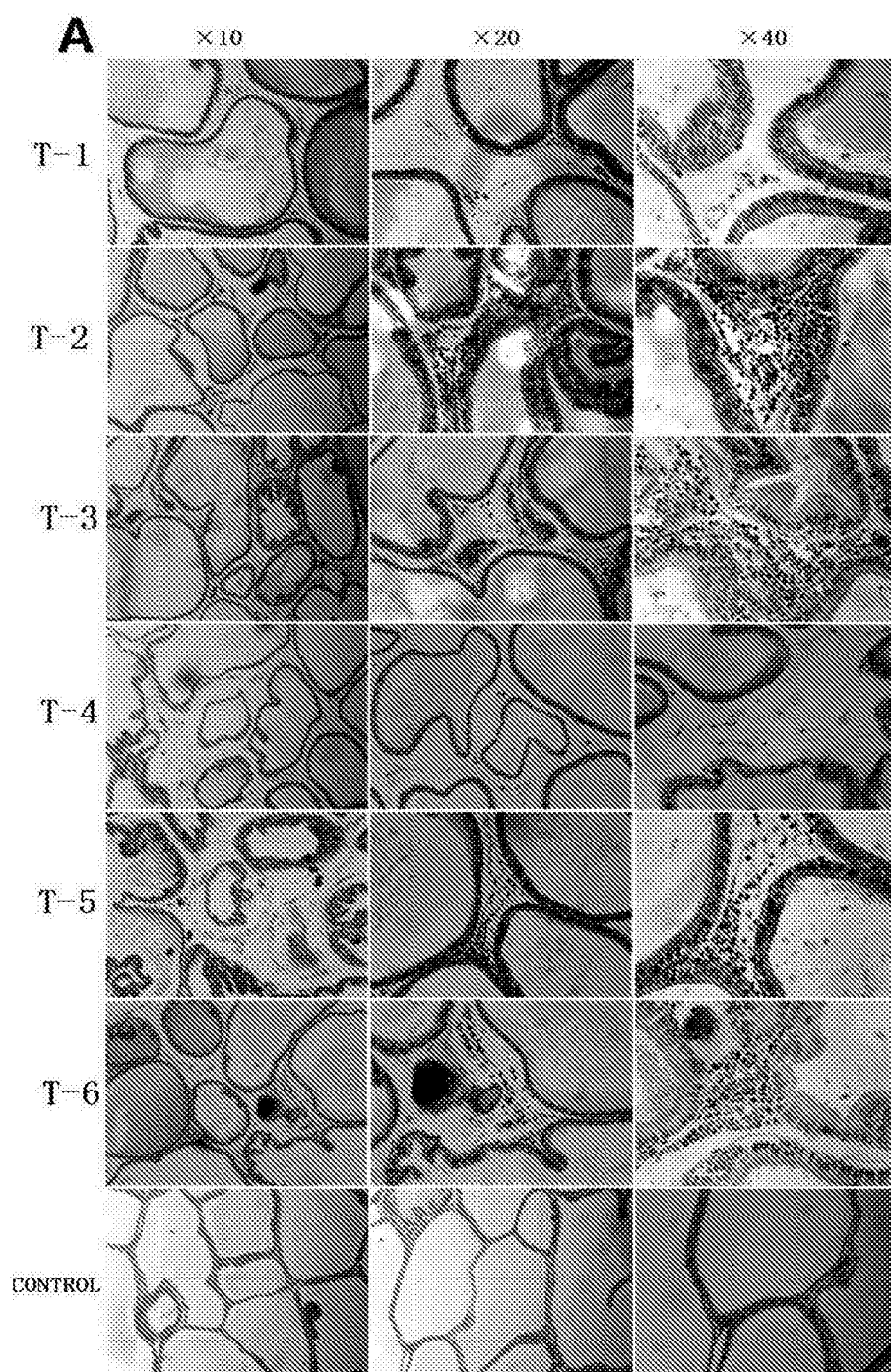


图 4

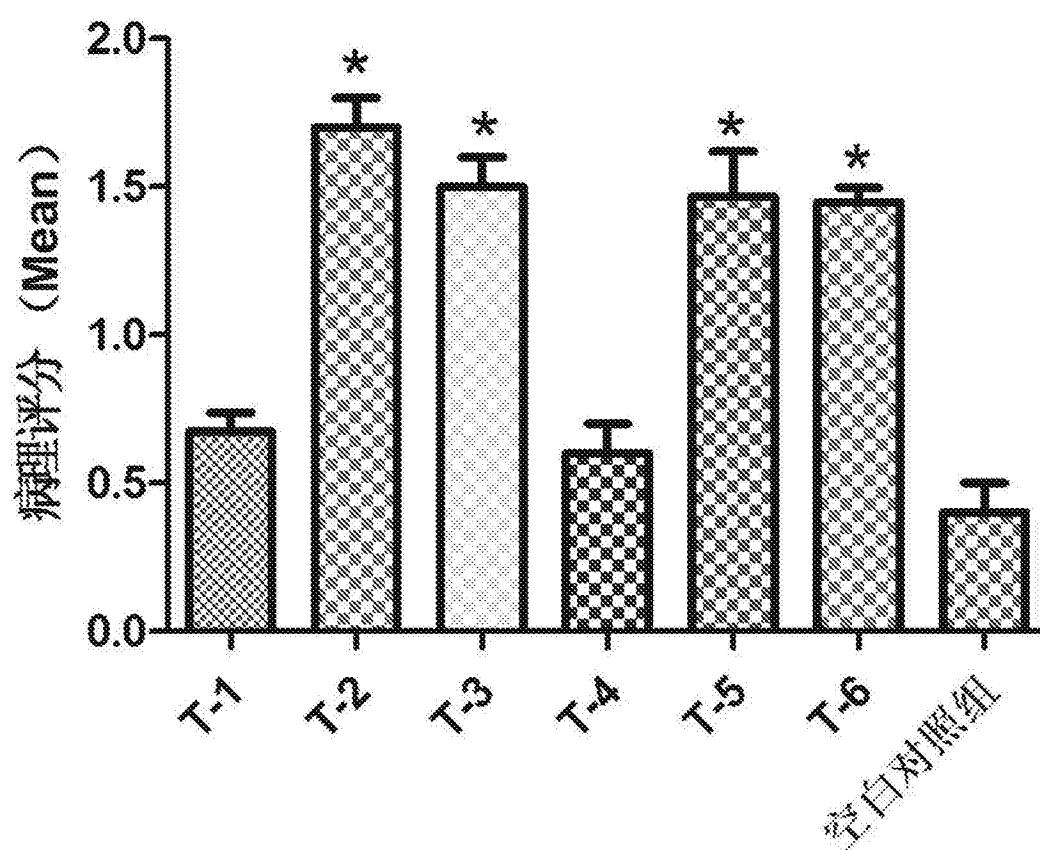


图 5

专利名称(译)	TRPM8蛋白和相关多肽片段及其抗体的新用途		
公开(公告)号	CN105315357A	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201510662800.4	申请日	2015-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	韩蕾		
申请(专利权)人(译)	韩蕾		
当前申请(专利权)人(译)	韩蕾		
[标]发明人	韩蕾 周晓辉 周雨晏 周莉		
发明人	韩蕾 周晓辉 周雨晏 周莉		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/535 A61K39/395 A61P13/08 A61P15/00		
CPC分类号	C07K14/4713 A61K2039/505 C07K16/18 G01N33/535 G01N33/54306 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/6893		
代理人(译)	蒋海军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种TRPM8相关多肽片段，氨基酸序列如SEQ ID No: 1-6所示。本发明还公开了TRPM8蛋白、TRPM8相关多肽片段及其相应抗体在制备慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征诊断试剂中的应用，通过检测患者体液中的TRPM8蛋白分子或TRPM8相关多肽片段或其抗体的水平，有效的对慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征进行诊断，并且能够有效区别其它前列腺疾病。此外，通过静脉或皮下注射1000~30000IU的TRPM8蛋白或其相关多肽片段的单克隆或多克隆抗体，可以治愈或明显缓解慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征的临床表现。

发病情况	TRPM8 蛋白血液表达量或者检测量 (ng/ml)	TRPM8 抗体血液表达量或者检测量 (ng/ml)
慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征重度	≥50;<200	≥250;<500
慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征中度	≥30;<50	≥15;<25
慢性前列腺炎或慢性骨盆疼痛综合征轻度	≥10;<30	≥5;<15
正常人群	<10	<5
细菌性前列腺炎	<10	<5
前列腺癌	≥500	≥2000