



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104673762 B

(45)授权公告日 2017.10.20

(21)申请号 201510024630.7

(22)申请日 2015.01.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104673762 A

(43)申请公布日 2015.06.03

(73)专利权人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区东郊学府路301号

(72)发明人 林琼 杨万年

(74)专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51)Int.Cl.

C12N 9/00(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

(56)对比文件

US US8586006 ,2013.11.19,权利要求47、说明书0107段, TABLE14, SEQUENCE16523.

CN 1668762 A,2005.09.14,全文.

CN 102174550 A,2011.09.07,全文.

江星.E3泛素连接酶Nedd4-1在肿瘤发生与发展过程中的双重作用.《厦门大学学报》.2014,第53卷(第4期),全文.

周洁等.泛素连接酶 Nedd4 调控人前列腺癌细胞的增殖与凋亡.《天津科技大学学报》.2014,第29卷(第5期),

审查员 朱晓冬

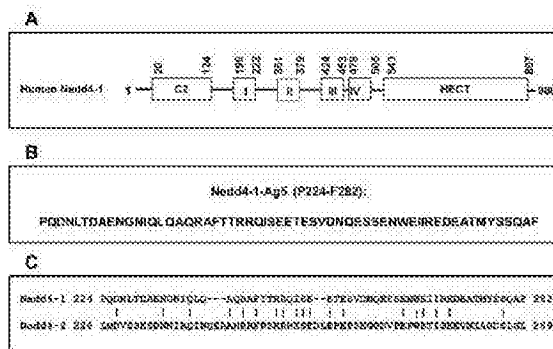
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

抗泛素连接酶Nedd4-1的特异性抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及抗泛素连接酶Nedd4-1的特异性抗体及其应用。本发明公开了一种泛素连接酶Nedd4-1的特异抗原Ag5,它的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。还公开了抗Ag5的特异性抗体。进一步提供了一种检测泛素连接酶Nedd4-1的试剂盒,是由抗Nedd4-1 Ag5抗体、二甲苯溶液、0.5M柠檬酸盐缓冲液、30%过氧化氢溶液和山羊血清组成。本发明提供了抗泛素连接酶Nedd4-1的特异性抗体并应用该抗体制成试剂盒,可用于去测定Nedd4-1在病理组织中的表达,建立了一个诊断、治疗和预后效果的分子指标。



1. Ag5作为泛素连接酶Nedd4-1的特异抗原的应用,所述Ag5的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 一种抗Nedd4-1Ag5的特异性抗体,其特征在于,是抗Ag5的多克隆IgG抗体,所述Ag5的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 一种检测泛素连接酶Nedd4-1的试剂盒,它包括下列成分:权利要求2所述的抗Nedd4-1Ag5的特异性抗体、二甲苯溶液、0.5M柠檬酸盐缓冲液、30%过氧化氢溶液和山羊血清。

抗泛素连接酶Nedd4-1的特异性抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗泛素连接酶Nedd4-1的特异性抗体并应用于检测泛素连接酶Nedd4-1在癌症病人肿瘤中的表达,癌症的病理诊断和治疗预后结果的估测。

背景技术

[0002] 泛素连接酶Nedd4-1,亦称Nedd4,是Nedd4泛素连接酶家族中的成员之一。其分子结构含有氨基端一个C2结构域,羧基端一个HECT结构域(泛素连接酶活性结构域)。在这两个结构域之间,含有3至4个WW结构域。WW结构域是Nedd4-1与底物结合的重要位点。

[0003] 最初的研究发现Nedd4-1调节表面细胞钠离子通道的降解[1]。后来在筛选Nedd4-1的泛素化底物时发现Nedd4-1倾向于泛素化酪氨酸激酶及内吞体转运分类(sorting)蛋白[2]。在病毒发芽(viral budding)过程中,病毒挟持Nedd4-1泛素化ESCRT(Endosomal Sorting Complex Required for Transport)蛋白,从而组装ESCRT复合体,使病毒进入膜泡形成病毒颗粒,从寄生细胞分离出去[3]。此过程类似于多泡体的形成,均由ESCRT复合体控制调节。这些结果表明Nedd4-1在ESCRT复合体的形成中起重要作用。

[0004] 近几年Nedd4-1在肿瘤发生发展中的作用受到关注。研究发现Nedd4-1泛素化并降解肿瘤抑制蛋白PTEN,从而具有促癌变活性[4]。肿瘤组织的组化染色结果表明Nedd4-1在肺癌和结肠癌中过表达[5-7]。我们近期的研究发现Nedd4-1在肺癌细胞中与激活的EGFR结合并调节其内吞转运过程[8]。RNAi敲除Nedd4-1抑制EGFR从内吞体到溶酶体的转运,从而抑制EGFR的降解,但同时消除了EGFR的促肺癌细胞迁移的作用。这一结果表明Nedd4-1在癌细胞的转移中可能起重要作用。

[0005] 因而Nedd4-1的检测对癌症的诊断、治疗和预测具有重要的应用意义。目前还未有高度特异的抗Nedd4-1的抗体。现有的抗Nedd4-1的抗体与Nedd4-2(亦称Nedd4L,系Nedd4-1的同族分子)有交叉反应。基于这一现状,我们设计和制造了特异的抗Nedd4-1的抗体,并应用这一抗体对贲门癌的肿瘤样品进行了检测。

[0006] 参考文献:

[0007] 1.Staub O,Gautschi I,Ishikawa T,Breitschopf K,Ciechanover A,Schild L, Rotin D.Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺channel (ENaC) by ubiquitination.EMBO J.1997;16(21):6325-36.

[0008] 2.Persaud A,Alberts P,Amsen EM,Xiong X,Wasmuth J,Saadon Z,Fladd C, Parkinson J,Rotin D.Comparison of substrate specificity of the ubiquitin ligases Nedd4and Nedd4-2using proteome arrays.Mol Syst Biol.2009;5:333.

[0009] 3.Blot V,Perugi F,Gay B,Prévost MC,Briant L,Tangy F,Abriel H,Staub O, Dokh elar MC,Pique C.Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101ensure HTLV-1Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding.J Cell Sci.2004;117(Pt 11):2357-67.

[0010] 4.Wang X,Trotman LC,Koppie T,Alimonti A,Chen Z,Gao Z,Wang J,

Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP, Jiang X. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*. 2007;128:129-39.

[0011] 5. Amodio N, Scrima M, Palaia L, Salman AN, Quintiero A, Franco R, Botti G, Pirozzi P, Rocco G, De Rosa N, Viglietto G. Oncogenic role of the E3 ubiquitin ligase NEDD4-1, a PTEN negative regulator, in non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol*. 2010;177(5):2622-34.

[0012] 6. Kim SS, Yoo NJ, Jeong EG, Kim MS, Lee SH. (2008) Expression of NEDD4-1, a PTEN regulator, in gastric and colorectal carcinomas. *APMIS*. 116(9):779-84.

[0013] 7. Eide PW, Cekaite L, Danielsen SA, Eilertsen IA, Kjenseth A, Fykerud TA, Ågesen TH, Bruun J, Rivedal E, Lothe RA, Leithe E. NEDD4 is overexpressed in colorectal cancer and promotes colonic cell growth independently of the PI3K/PTEN/AKT pathway. *Cell Signal*. 2013;25(1):12-8.

[0014] 8. Lin Q, Wang J, Childress C, Sudol M, Carey DJ, Yang W. HECT E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 ubiquitinates ACK and regulates EGF-induced degradation of EGFR and ACK. *Mol Cell Biol*. 2010;30:1541-1554.

发明内容

[0015] 本发明提供了一种抗泛素连接酶 Nedd4-1 特异性抗体的抗原及其制备成的试剂盒。并应用该抗体检测 Nedd4-1 在肿瘤中的表达，建立癌症诊断和生存预测的一个新的分子指标。

[0016] 本发明公开了一种泛素连接酶 Nedd4-1 的特异抗原 Ag5，它的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0017] Nedd4-1 抗原 Ag5 序列包括人和其他生物的 Nedd4 同源序列；

[0018] Nedd4-1 抗原 Ag5 包括不影响其抗原性的序列改变，如序列点突变、剪切和添加等；

[0019] Nedd4-1 抗原 Ag5 序列包括相似的人工合成序列；

[0020] 本发明还公开了一种抗 Ag5 的特异性抗体，它是抗 Ag5 的多克隆 IgG 抗体。是以 Ag5 为抗原，通过动物免疫而制得。

[0021] 本发明还提供了一种检测泛素连接酶 Nedd4-1 的试剂盒，它包括下列成分：1、抗 Nedd4-1 Ag5 抗体；2、二甲苯溶液；3、0.5M 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0)；4、30% 过氧化氢溶液；5、山羊血清。

附图说明

[0022] 图1是 Nedd4-1 抗原 Ag5。(A) Nedd4-1 结构示意图。图中 I、II、III、IV 指 WW 结构域 I、II、III、IV。(B) Ag5 氨基酸序列。(C) Ag5 与 Nedd4-2 中相应序列的相似性比较。

[0023] 图2是抗 Ag5 抗体的特异性测定。HA 标签标记的 Nedd4-1 或 Nedd4-2 在 HEK293 细胞中表达后，其细胞裂解液用抗 HA 标签的抗体或抗 Ag5 的兔血清进行免疫印迹测定。

[0024] 图3是应用抗 Ag5 通过免疫染色检测肺癌组织中 Nedd4-1 的表达。

[0025] 图4是应用抗 Ag5 通过免疫染色检测贲门癌组织中 Nedd4-1 的表达。

具体实施方式

[0026] 实施例一:Nedd4-1抗原Ag5的设计、表达及其抗体的生产。

[0027] 1.抗Nedd4-1抗体的特异性抗原选择。Nedd4泛素连接酶家族中的Nedd4-1和Nedd4-2在其氨基酸序列具有很高的相似度,约70%的序列完全相同。现有的抗Nedd4-1抗体也能与Nedd4-2反应。为了设计高度特异的抗Nedd4-1抗体,我们对Nedd4-1和Nedd4-2的序列进行了分析,选择了一段Nedd4-1与Nedd4-2相似性最低的序列P224-F282:PQDNLTAENGNIQLQAQRAFTTRR QISEETESVDNQESSENWEI IREDEATMYSSQAF (SEQ ID NO.1) (见图1),我们将这一Nedd4-1的特异抗原命名为Ag5。

[0028] 2.Nedd4-1抗原Ag5的表达与纯化:

[0029] Ag5的cDNA被克隆到GST融合蛋白的大肠杆菌表达载体pGEX4T3 (GE Healthcare Life Sciences,Piscataway,NJ,USA),获得质粒pGEX4T3-GST-Ag5。经DNA测序证实了Ag5cDNA质粒的序列。将pGEX4T3-GST-Ag5转化到大肠杆菌JM109中以用于表达融合蛋白。转化后的细菌在37℃下用LB培养基培养到A600 (600nm的光吸收)为1.0的密度,然后加入1/1000 IPTG (0.5mM)去诱导融合蛋白表达3-5个小时。融合蛋白表达后的细菌则用离心机8000rpm离心10分钟沉淀收集。沉淀后的细菌重悬于细菌裂解液(40mM Tris-HCl,pH 8.0,100mM氯化钠,0.5%的Triton X-100,1mM EDTA,1mM EGTA,10微克/毫升亮肽素和抑肽酶)。每500毫升的细菌沉淀,用细菌裂解液10毫升重悬。然后加入溶菌酶(50微克/毫升)和DNase I (10微克/毫升),在4℃下旋转培育1小时。之后用超声仪在能量水平3.5下超声裂解3X30秒加2秒间隔。裂解液在4℃下15000rpm离心10分钟,将其上清液转移到15毫升锥形管。在上清液中加入谷胱甘肽琼脂糖珠(200μL 1:1),并在4℃下滚动培育2-3小时。琼脂糖珠用细菌裂解液清洗3次(每次10毫升裂解液),最终悬浮在300μL的细菌裂解液中以准备用于沉淀检测。取少量样品(10μl)用SDS-PAGE进行凝胶电泳分析,用考马斯亮蓝染色来确定琼脂糖珠上的GST-Ag5融合蛋白含量及纯度。

[0030] 用于表达抗原Ag5融合蛋白的亲亲和标签(Tag)不仅限于谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签,也包括其他的亲和标签,如麦芽糖结合蛋白(MBP)标签,hexahistidine(His标签),T7标签,泛素标签,Flag标签,Myc标签,HA标签,聚精氨酸标签,polycysteine标签,polyphenylalanine标签,BTag标签,半乳糖结合域标签,纤维素结合域(CBD)标签,thioredoxin标签,金黄色葡萄球菌蛋白标签,链球菌G蛋白标签,钙调蛋白标签,β-半乳糖苷酶标签,氯霉素乙酰转移酶标签,S-肽标签,生物素标签,avidin标签,streptavidin标签以及链球菌标签等。

[0031] 表达抗原Ag5不仅限于大肠杆菌,也包括其它的表达系统,如酵母细胞、植物细胞、动物细胞等。因而表达的载体不仅限于细菌表达载体,也包括酵母、植物、动物以及病毒表达载体。

[0032] 抗原Ag5不仅限于融合蛋白,也包括非融合蛋白和人工合成的多肽。

[0033] 3.抗Ag5抗体的生产:

[0034] 带有纯化的Ag5融合蛋白的琼脂糖珠作为抗原,采用皮下注射法在兔子体内产生抗Ag5多克隆IgG抗体。Ag5抗原通常注射三次,第一次抗原量为500微克,第二、三次各为250微克。为纯化血清中的抗Ag5抗体,首先用GST交联的琼脂糖珠将抗GST的IgG去除,然后用蛋

白A的Sepharose胶珠分离抗Ag5的IgG。抗Ag5抗体的效价则用免疫印迹法测定HEK293细胞外源HA标签标记的Nedd4-1的表达量来确定。抗Ag5抗体对Nedd4-1识别的特异性则通过测定外源表达的HA标签标记的Nedd4-1和Nedd4-2来比较确定。实验结果见图2。

[0035] 用抗原Ag5生产抗Nedd4-1抗体的方法不仅限于兔子皮下注射,也包括其它的抗体生产方法和技术,如用静脉、腹腔注射或用鼠类、羊、鸡等其它动物生产抗体或用杂交瘤技术生产单克隆抗体。

[0036] 4. 应用抗Ag5抗体来检测泛素连接酶Nedd4-1在癌症病人肿瘤中的表达,癌症的病理诊断及治疗预后结果的估测。我们用抗Ag5抗体通过组化染色检测了Nedd4-1在贲门癌肿瘤组织中的表达,并将Nedd4-1表达结果与贲门癌的临床数据进行统计分析,证明Nedd4-1是贲门癌发展恶化的一个可靠标志分子,对估测贲门癌术后的疗效具有重要意义。

[0037] 用抗Ag5抗体检测肿瘤组织或癌细胞的Nedd4-1的表达,不仅限于免疫组化染色,也包括其它的免疫检测技术和方法,如Elisa、免疫沉淀、免疫杂交、免疫荧光等技术和方法。检测的肿瘤组织和细胞不仅限于贲门癌,也包括其它的癌症,如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌等。

[0038] 用抗Ag5抗体检测Nedd4-1不仅限于肿瘤组织和细胞,也包括血液、尿液、淋巴液等。

[0039] 实施例二:应用抗Nedd4-1Ag5抗体试剂盒检测Nedd4-1在肺癌组织中的表达。

[0040] (i) 肺癌组织样品。71例肺癌组织及与癌组织相邻的正常组织样品来源于上海长征医院肿瘤科的肺癌组织样品库。

[0041] (ii) 免疫组化染色步骤。我们用抗Ag5抗体试剂盒和抗EGFR抗体对肺癌及其相邻正常组织的微阵列组织样品进行了免疫组化染色以检测Nedd4-1和EGFR在71例肺癌样品中的表达。具体步骤简述如下:首先将石蜡包埋的4 μ m切片组织微阵列用二甲苯和醇溶液进行脱石蜡和再水化。抗原修复则用0.01M柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)在98 $^{\circ}$ C下对切片处理5分钟(微波炉处理),然后将切片冷却至室温。为去除内源的过氧化物酶,用3%过氧化氢溶液处理切片10分钟,再用0.01M的PBS(pH 7.4)清洗。用正常山羊血清在室温下对切片处理10分钟后,再用抗Ag5抗体(稀释度1:100)在4 $^{\circ}$ C下孵育切片过夜。切片染色使用IHC S-P试剂盒(KIT-9710;Maixin Biology Corporation,福州,中国),染色步骤按试剂盒说明进行,并用苏木精复染。染色结果由两人在Olympus CX31显微镜下独立观察后来进行评估。

[0042] (iii) 免疫染色评分。选择至少5个X400放大倍数的显微镜视野(每个视野50-250个癌细胞)来计算肿瘤细胞中Nedd4-1染色的平均百分比。染色百分比范围为0到100。免疫染色强度评分如下:弱为1+;中为2+;强为3+。染色分数则为Nedd4-1阳性肿瘤细胞的百分比乘以染色强度。因而染色分数范围从0(肿瘤细胞染色百分比为0)至300(肿瘤细胞染色强度为3+,百分比为100)。为方便叙述和统计分析,染色程度分为四种,即阴性,弱,中和强染色,其对应染色分数如下:0分为阴性;低于75分为弱;75-150分为中;高于150分为强。我们定义Nedd4-1染色得分<75为低表达,而>75为高表达。

[0043] (iv) 检测结果。抗Nedd4-1Ag5抗体免疫染色结果表明,Nedd4-1在肺癌组织中过表达(见图3),其表达阳性比例达73.2%,比现有的著名肺癌标志分子EGFR的阳性比例32.4%高出一倍多。同时,在所有EGFR表达阳性的肺癌组织中,Nedd4-1均过表达。因此,Nedd4-1有可能是一个比EGFR更具普遍性的肺癌标志分子。

[0044] 实施例三:应用抗Nedd4-1Ag5抗体试剂盒检测Nedd4-1在贲门癌组织中的表达。

[0045] (i) 贲门癌组织样品。214例贲门癌组织样品来源于上海长征医院肿瘤科的胃癌组织样品库。贲门癌样品的临床资料如表一所示。贲门癌患者年龄分布:60岁以上106人,60或60岁以下108人。男性157人,女性57人。病理指标:6cm以上的肿瘤48例,6cm或6cm以下166例;分化程度高或中等的肿瘤130例,低或未分化的84例;浸润程度I/II级的63例,III/IV级的151例;无淋巴结转移的73例,有转移的141例;TNM I/II级的83例,III/IV级的131例。这些临床资料显示,样品中恶性贲门癌(即有转移和TNM III/IV级的)占多数。

[0046] (ii) 免疫组化染色步骤及免疫染色评分与例二相同。

[0047] (iii) 检测结果。

[0048] 如图4A所示,在214例贲门癌样品中,有177例检测到Nedd4-1的过表达,过表达率达83%。Kaplan-Meier生存图法分析发现,Nedd4-1阴性的贲门癌患者的5年生存率达96%,而Nedd4-1阳性的则为40%(图4B)。同时,Nedd4-1阴性与阳性的累积生存率差异非常显著,其 $\chi^2=26.098$, $p<0.001$ (图4B)。这一结果表明,Nedd4-1阴性可作为低风险贲门癌的临床诊断指标。

[0049] 表一、贲门癌标本病理简况

病理分类		病例数	病例百分比
年龄	≤60	108	50.5
	>60	106	49.5
性别	男	157	73.4
	女	57	26.6
肿瘤大小	≤6cm	166	77.6
	>6cm	48	22.4
肿瘤浸润	T1/T2	63	29.4
	T3/T4	151	70.6
淋巴结转移	N0	73	34.1
	N1-3	141	65.9
肿瘤分化	高、中	130	60.7
	低、未	84	39.3
TNM 级别	I/II	83	38.8
	III/IV	131	61.2

[0051] 我们用多变量回归分析来比较Nedd4-1过表达与各病理指标对贲门癌患者累积生存率的作用(表二)。Nedd4-1过表达的风险比(Hazard Ratio)最小,为0.070($p<0.009$),其次是淋巴结转移(N-category),HR为0.364($p<0.025$),然后为TNM级别,HR为0.617($p<0.049$)(见表二)。这表明Nedd4-1过表达的贲门癌患者生存几率最小,是最可靠的术后生存估测指标。

[0052] 我们进一步对Nedd4-1过表达与各病理指标的关联度进行了分析。如表三所示，Nedd4-1过表达与淋巴结转移、TNM级别和浸润程度的相关性最密切，对应的p值分别为 <0.001 ， <0.001 ，和 $=0.001$ 。这证明Nedd4-1过表达与贲门癌转移紧密相关。

[0053] 综上所述，Nedd4-1阴性是估测贲门癌患者术后生存的最好指标。Nedd4-1过表达是预测贲门癌术后效果差的可靠指标。Nedd4-1与贲门癌转移紧密相关。因而，Nedd4-1是贲门癌病理诊断和治疗预后效果的标志分子。

[0054] 表二、贲门癌多重病理指标的回归分析

类别	存活风险比 (Hazard Ratio) (95% 自信度)	P 值
TNM 级别	0.617 (0.382-0.998)	0.049
肿瘤浸润	0.513 (0.211-1.246)	0.140
淋巴结转移	0.364 (0.150-0.882)	0.025
肿瘤分化	0.819 (0.521-1.288)	0.388
肿瘤大小	0.932 (0.317-2.739)	0.899
Nedd4-1表达	0.070 (0.009-0.521)	0.009

[0056] 表三、贲门癌Nedd4-1表达与病理指标的相关性

病理指标		病例数	Nedd4-1 阳性病例 数	%	P 值
年龄	≤ 60	108	88	81.5	0.631
	> 60	106	89	84	
性别	男	157	128	81.5	0.448
	女	57	49	86	
肿瘤大小	$\leq 6\text{cm}$	166	135	81.3	0.319
	$> 6\text{cm}$	48	42	87.5	
肿瘤浸润	T1/T2	63	43	68.3	0.001
	T3/T4	151	134	88.7	
淋巴结转移	N0	73	50	68.5	< 0.001
	N1-3	141	127	90.1	
肿瘤分化	高、中	130	103	79.2	0.066
	低、未	84	74	88.1	
TNM 级别	I	44	28	63.6	I/II vs III/IV < 0.001
	II	39	28	71.8	
	III	98	89	90.8	
	IV	33	32	97.0	

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 江苏大学

[0003] <120> 抗泛素连接酶Nedd4-1的特异性抗体及其应用

[0004] <130>

[0005] <160> 1

[0006] <170> PatentIn version 3.3

[0007] <210> 1

[0008] <211> 59

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人

[0011] <400> 1

[0012] Pro Gln Asp Asn Leu Thr Asp Ala Glu Asn Gly Asn Ile Gln Leu Gln

[0013] 1 5 10 15

[0014] Ala Gln Arg Ala Phe Thr Thr Arg Arg Gln Ile Ser Glu Glu Thr Glu

[0015] 20 25 30

[0016] Ser Val Asp Asn Gln Glu Ser Ser Glu Asn Trp Glu Ile Ile Arg Glu

[0017] 35 40 45

[0018] Asp Glu Ala Thr Met Tyr Ser Ser Gln Ala Phe

[0019] 50 55

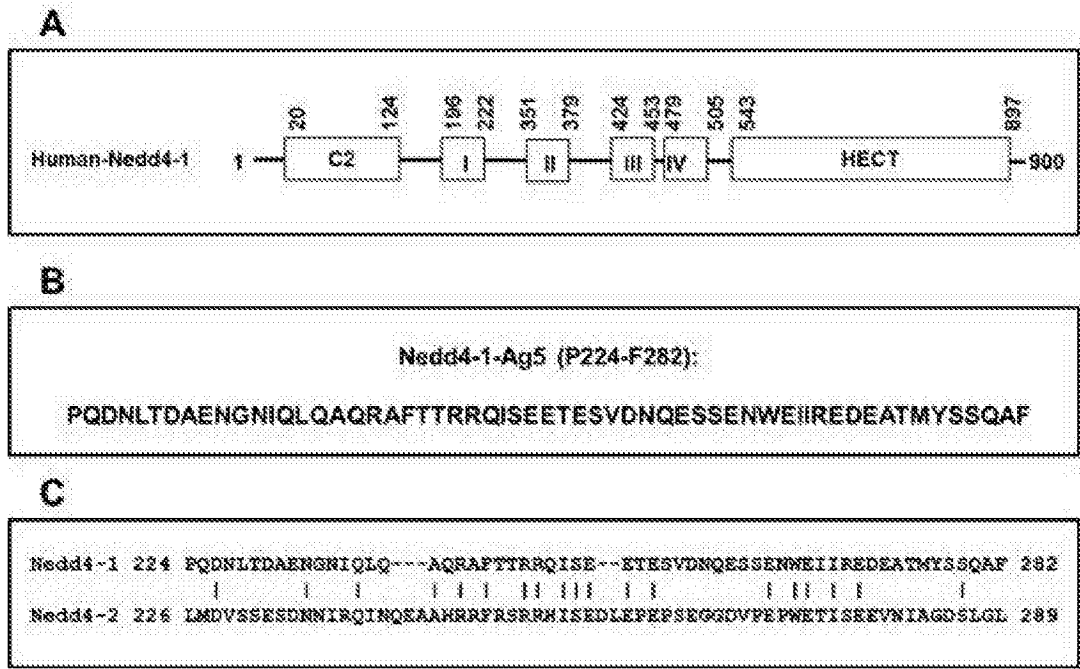


图1

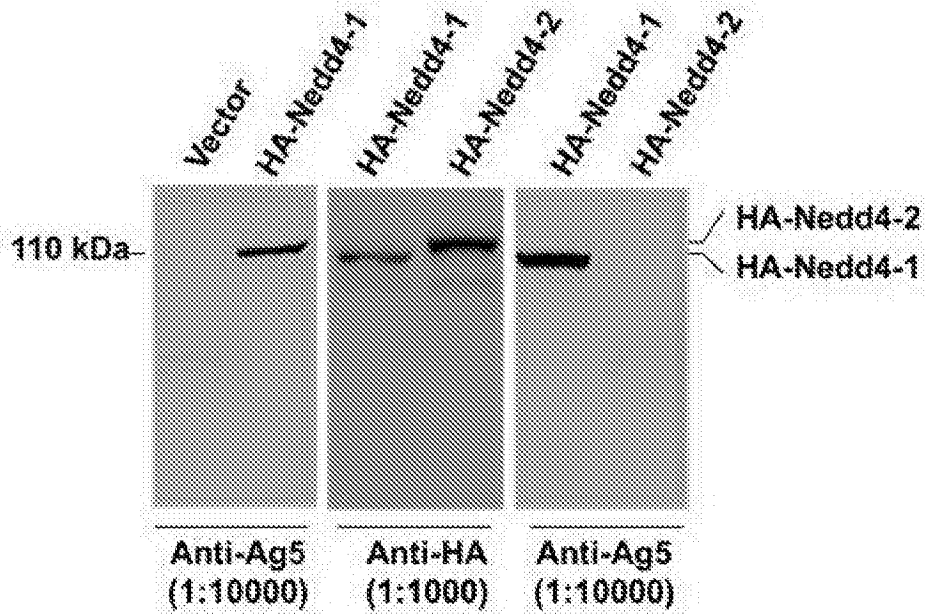


图2

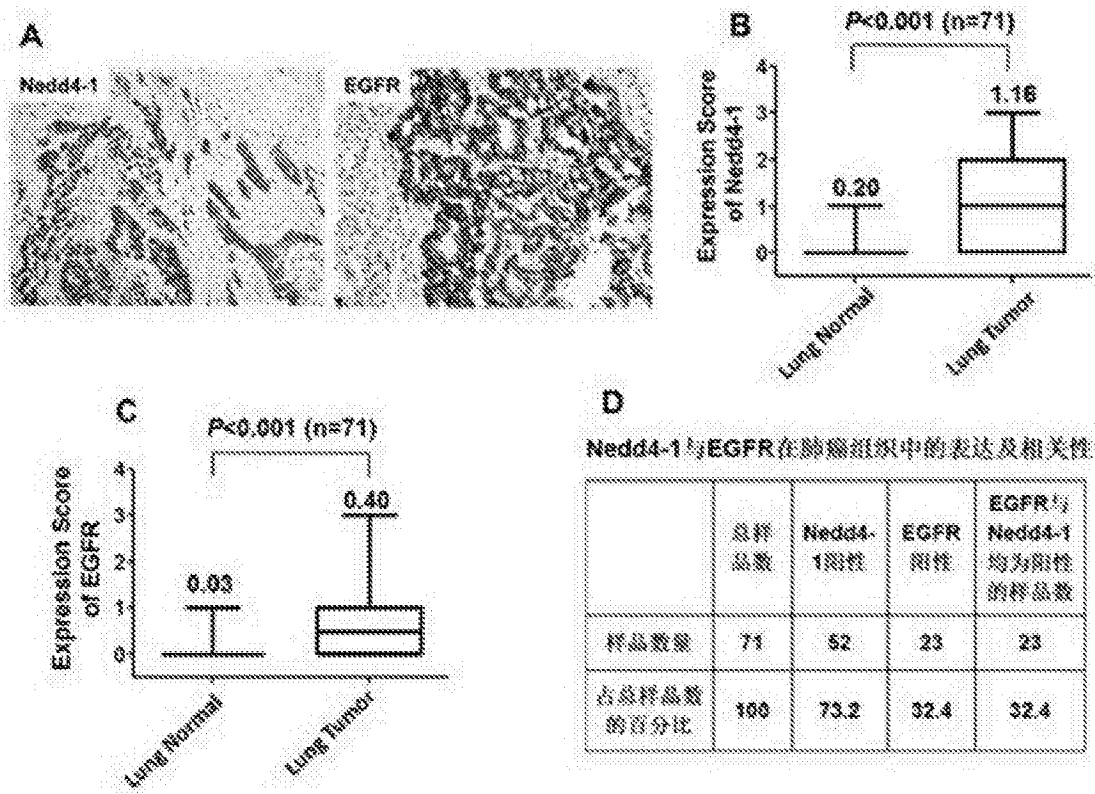


图3

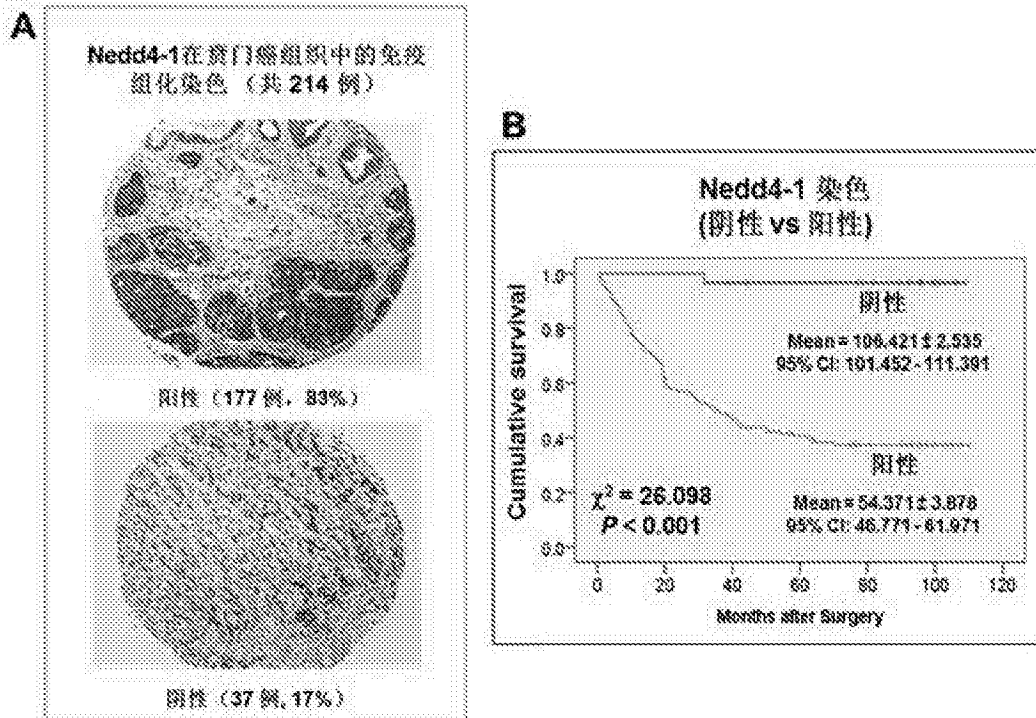


图4