

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/574

G01N 33/68

C07K 16/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03810791.0

[43] 公开日 2005 年 8 月 10 日

[11] 公开号 CN 1653336A

[22] 申请日 2003.5.22 [21] 申请号 03810791.0

[30] 优先权

[32] 2002.5.23 [33] US [31] 60/382,340

[86] 国际申请 PCT/CA2003/000752 2003.5.22

[87] 国际公布 WO2003/100429 英 2003.12.4

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.12

[71] 申请人 阳光溪流女子学院健康科学中心

地址 加拿大安大略省多伦多市

[72] 发明人 乔治·菲尔姆斯 玛丽安娜·卡普罗

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

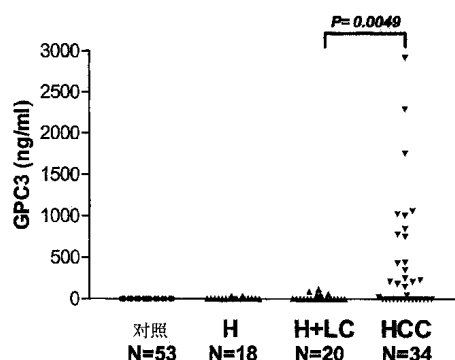
代理人 王达佐 刘玉华

权利要求书 5 页 说明书 23 页 附图 5 页

[54] 发明名称 肝细胞癌的诊断

[57] 摘要

本发明公开了一种用于筛查个体是否患有肝细胞癌的方法，该方法通过测定所述个体体液样本中的 glypican-3 (GPC3) 水平来实现。本发明还公开了通过检测肝组织样本中的 GPC3 来诊断肝细胞癌的方法。此外还提供了能够与 GPC3 特异结合的抗体。



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

1. 一种筛查个体是否患有肝细胞癌(HCC)的方法, 包括:
从所述个体获得体液样本; 及
5 测定所述样本中的 glypican-3 (GPC3)水平;
其中所述样本中存在可检测水平的 GPC3 则提示所述个体患有 HCC.
2. 如权利要求 1 所述的方法, 还包括
测定所述样本中甲胎球蛋白(AFP)的水平,
10 其中发现下列两种情况中至少一种则提示所述个体患有 HCC: 所述
样本中 GPC3 达到可检测水平; 所述样本中 AFP 水平高于正常对照个体
的 AFP 水平.
3. 如权利要求 2 所述的方法, 其中所述样本中 AFP 水平高于
15 20ng/ml.
4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中所述样本中 AFP 水平高于
100ng/ml.
- 20 5. 如权利要求 1-4 中任一权利要求所述的方法, 其中通过免疫学方
法测定所述样本中 GPC3 的水平.
6. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述方法使用能够与 GPC3 或其
片段特异结合的抗体或抗体片段.
- 25 7. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述抗体或片段能够与人 GPC3
的 70 个连续羧基末端氨基酸中的抗原决定簇特异结合.
8. 如权利要求 6 或 7 所述的方法, 其中所述抗体或片段为多克隆抗
30 体.

9. 如权利要求 6 或 7 所述的方法, 其中所述抗体或片段为单克隆抗体。

5 10. 如权利要求 6 或 7 所述的方法, 其中所述抗体或片段选自 Fab、
F(ab')₂ 和 F_v。

11. 如权利要求 6-10 中任一权利要求所述的方法, 其中所述抗体或
抗体片段携带可检测的标记。

10

12. 如权利要求 6-10 中任一权利要求所述的方法, 其中通过与抗
GPC3 抗体或抗体片段特异结合且含有信号产生系统成分的第二抗体来
检测所述抗体或抗体片段。

15 13. 如权利要求 6-10 中任一权利要求所述的方法, 其中所述抗 GPC3
抗体或片段附加在固体基质上, 所述样本与所述固体基质接触使所述样
本中的 GPC3 与所述附加的抗 GPC3 抗体或片段结合, 洗涤所述固体基质
并使用与抗 GPC3 抗体或抗体片段特异结合且含有信号产生系统成分
的第二抗体来测定所述结合的 GPC3。

20

14. 如权利要求 12 或 13 所述的方法, 其中所述第二抗体连接有辣根
过氧化物酶。

15. 如权利要求 2-14 中任一权利要求所述的方法, 其中通过 ELISA
25 分析测定所述 AFP 水平。

16. 如权利要求 1-15 中任一权利要求所述的方法, 其中所述体液是
血清或血浆。

30 17. 如权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法, 其中所述个体是

人类个体。

18. 基本纯化的抗体或其片段，其中所述抗体或其片段与 GPC3 或 GPC3 片段特异结合。

5

19. 如权利要求 18 所述的抗体，其中所述抗体或片段为多克隆抗体。

20. 如权利要求 18 所述的抗体或片段，其中所述抗体或片段为单克隆抗体。

10

21. 如权利要求 18 所述的抗体或片段，其中所述抗体或片段选自单链抗体分子、Fab 片段、F(ab)₂ 片段、F_v 片段及嵌合分子。

22. 如权利要求 18-21 中任一权利要求所述的抗体或片段，其中所述
15 抗体选自 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 抗体及其任意亚型。

23. 如权利要求 18-21 中任一权利要求所述的抗体或片段，其中所述抗体片段与 GPC3 或其片段特异结合。

20 24. 一种杂交瘤细胞，其中所述杂交瘤细胞产生如权利要求 18-23 中任一项所述的抗体。

25. 一种在个体中诊断 HCC 的方法，包括：
从所述个体获得肝脏组织样本；及
25 测定所述组织样本中 GPC3 的存在；
其中在所述样本中检测到 GPC3 则提示患有 HCC。

26. 如权利要求 25 所述的方法，其中通过将所述组织切片与特异结合人 GPC3 的抗体或抗体片段结合，并检测与所述组织切片结合的所述抗
30 GPC3 抗体或片段，来测定所述组织样本中 GPC3 的存在。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中通过与所述抗 GPC3 抗体或片段特异结合且含有信号产生系统成分的第二抗体检测所述结合的抗 GPC3 抗体或片段。

5

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述第二抗体是生物素化的。

29. 一种检测样本中 GPC3 存在的方法，所述方法包括：

将样本与特异结合 GPC3 或 GPC3 片段的抗体或其片段接触，形成抗
10 体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物；及
检测所述抗体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物。

30. 一种测定样本中 GPC3 水平的方法，包括：

将样本与特异结合 GPC3 或 GPC3 片段的抗体或其片段接触，形成抗
15 体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物；及
测定所述抗体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物。

31. 检测或测定样本中 GPC3 水平的试剂盒，包括：

与 GPC3 或其片段特异结合的基本纯化的抗体或其片段。

20

32. 如权利要求 31 所述试剂盒，其中所述抗体或其片段与人 GPC3 或其片段特异结合。

33. 如权利要求 31 或 32 所述的试剂盒，其中所述抗体或其片段与人

25 GPC3 的 70 个连续羧基末端氨基酸中的抗原决定簇特异结合。

34. 如权利要求 33 所述的试剂盒，其中所述抗体或片段是多克隆抗体。

30 35. 如权利要求 33 所述的试剂盒，其中所述抗体或片段是单克隆抗

体。

36. 如权利要求 33 所述的试剂盒，其中所述抗体或片段选自 Fab、 $F(ab')_2$ 及 F_v 片段。

5

37. 如权利要求 31-36 中任一权利要求所述的试剂盒，还包括用于检测或测定 GPC3-抗体复合物或 GPC3-抗体片段复合物含量的装置。

肝细胞癌的诊断

5 发明领域

本发明涉及肝细胞癌的诊断。特别地，本发明涉及用于测定作为肝细胞癌标志物(marker)的 glypican-3 的水平 的抗体和方法。

背景技术

10 在本申请的全部内容中，所引用的各种文献是为了更加全面地说明本发明所属技术领域的状态。本文引用这些文献中公开的内容作为本发明公开的参考。

肝细胞癌(HCC)是世界上最常见的实体器官肿瘤，每年因此死亡的人数超过 1 百万(Parkin, et al., (1999) *CA. Cancer J. Clin.*, 49:33-64, 及
15 Okuda, et al., (1993), *Neoplasms of the Liver in Diseases of the Liver*, 7th edition 1236)。

在大多数西方国家，HCC 的发病率不断增加(Deuffic, et al., (1998), *Lancet* 351:214-215)。尽管还没有确切的流行病学研究结果，但来自加拿大卫生部的资料显示男性 HCC 的死亡率在近 15 年中几乎翻了一番。
20 肝炎病毒携带者的人口统计表明在未来 10 年 HCC 的发病率还将翻番(Zou, et al., (2000), *Can. J. Gastroenterol.*, 14:575-580)。

早期 HCC(甚至是较小的原发肿瘤)通常没有症状，其主要倾向于血管内和胆管内侵入(Fong, et al., (2001), *Cancer of the Liver and Biliary Tree. in Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 6th Edition,
25 1162-1199)。其结果是，当发现时 HCC 通常已处于晚期阶段。既往调查，在确诊时只有 10-20%的原发 HCCs 能被切除(Fong, et al., (2001), *Cancer of the Liver and Biliary Tree in Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 1162-1199)。虽然大多数病人在确诊时仍然不能治愈，但最近随着 HCC 筛查计划的实施，潜在的可治愈的肿瘤比例不断增加。

30 HCC 伴随有慢性肝损伤，主要是慢性病毒性肝炎和酒精肝疾病

(Rustgi, (1987), *Gastroenterol. Clin. North AM.*, 16:545-551)。在乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)流行的地区 HCC 的发病率最高。在 HBV 感染病例中,已证明慢性感染的个体发展为 HCC 的相对风险比未感染个体高 50 ~ 100 倍(Beasley, et al., (1994), *Epidemiology of*
5 *hepatocellular carcinoma in Viral hepatitis and liver disease*, 209)。与 HCC 的其它病因不同,慢性乙型肝炎肝硬化并不是发展为 HCC 的必要先决条件。虽然没有对慢性 HCV 发展为 HCC 的相对风险进行评估,但患肝硬化的 HCV 携带者的 HCC 发病率每年高达 5%,与之相对 HBV 携带者的发病率却为 0.5% (Di Bisceglie, (1995), *Semin. Liver Dis.*,
10 15:64-69)。在日本,70%的 HCC 病例是由持续性 HCV 感染引起的,而且在北美 HCC 发病率持续上升最有可能是由 HCV 感染在当地人群中不断扩散引起的(Hasan, et al., (1990), *Hepatology*, 12:589-591 and EI-Serag, et al., (1999), *N. Engl. J. Med.*, 340:745-750)。

某些化学物质与 HCC 的发病有关。其中最主要的是乙醇,且 HCC
15 与滥用酒精有关(Schiff, (1997), *Hepatology*, 26:39S-42S 及 Nalpas, et al., (1995), *Alcohol*, 12:17-120)。乙醇被认为是通过引发肝硬化或者与其它物质(如 HBV 和 HCV)形成共致癌物从而导致 HCC。某些真菌产生的黄曲霉毒素也与 HCC 有关(Yu, (1995), *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10:674-682)。这些真菌一般生长在谷类、花生和其它食品上,是导致食
20 物变质的最常见的原因。

超声波检查或计算机断层扫描术(CT)对空间占位病变的检查结果,结合血清甲胎球蛋白(AFP)水平高于 500ng/ml 的检测结果,可相对直接地诊断出病人患有 HCC(Fong, et al., (2001), in *Cancer of the Liver and Biliary Tree in Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 6th Edition,
25 1162-1199)。但是,由于 AFP 水平经常不会表现出确诊性的升高,因此当这些条件都符合时,通常 HCC 已不能治疗。

无论是超声波检查、CT 扫描还是 MRI,对小病灶影像的诊断都是相对不准确的(Fong, et AL., (2001), in *Cancer of the Liver and Biliary Tree in Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 6th Edition, 1162-1199;
30 及 Murakami, et al., (1995), *Detectability of hypervascular hepatocellular*

carcinoma by arterial phase images of MR and spiral CT. *Acta Radiol.*, 36:372-376)。特别地，肝硬化结节与非塑型性结节(dysplastic nodules)是两个与 HCC 放射影像非常相似的病灶。

小病灶的肝组织活检同样没有足够的敏感性和特异性(Levy, et AL., (2001), *Ann. SURG.*, 234:206-209)。甚至利用针刺活检时，因该方法获得的物质量通常很有限，所以很难将分化较好的癌症与良性病灶区分开(Fong, et AL., (2001), in *Cancer of the Liver and Biliary Tree in Cancer: Principles & Practice Of Oncology* 6th Edition, 1162-1199)。因此，尽管影像技术取得了巨大的进步，仍需要适合的分子标志物，从而在较难区分的病例中将良性病灶与 HCC 区分开。

肿瘤的大小是 HCC 肝内扩散和转移的显著风险因子(Yuki, et al., (1990), *Cancer*, 66:2174-2179)。而且，对肿瘤较小的病人，有更多的治疗手段。有症状的肿瘤通常较大且难以进行治疗干预。另一方面，对 HCC 敏感和特异的标志物可用于筛查可能患病的病人，如 HBV 慢性携带者和肝硬化 HCV 患者。尽管此种筛查已广泛应用，但仍没有资料显示其对降低发病率是有效的 (Collier, et AL., (1998), *Hepatology*, 27:273-278)。这种筛查方法无效的原因之一是目前使用的名为 sequential AFP 分析的血清学检查的敏感性和特异性较低(Collier, et al., (1998), *Viral hepatitis Reviews*, 4:31-41)。因此，需要对检测系统进行改进从而改善 HCC 的筛查。

唯一的现已广泛用于筛查和诊断 HCC 的分子标志物是甲胎球蛋白 (AFP)。在胚胎发育阶段，此蛋白由卵黄囊和肝脏大量合成(Chan, et al., (1999), in *Tumor Markers. in Tietz textbook of clinical chemistry*, 3rd, 722-749, Taketa, K (1990), *Hepatology*, 12:1420-1432)。出生后，在 12-18 个月内，AFP 含量逐渐降低到<10ng/ml。

在妊娠期间，AFP 重新出现在母体血清中。HCC、胃癌、肺癌、胰腺癌、胆管癌、睾丸癌可引起循环中 AFP 的增加(Chan, et al., (1999), in *Tumor Markers. in Tietz textbook of clinical chemistry*, 3rd, 722-749)。

如果 AFP 水平为 20ng/ml 或更高视为确诊时，则可检测出 60%~80% 的 HCC 病例，但在肿瘤较小的病例中，其敏感性显著降低(40%)

(Trevisani, et al., (2001), *J. Hepatol.*, 34:570-575)。

使用 AFP 作为 HCC 标志物的另一个问题是其缺乏特异性;在相当数量的慢性肝病患者中,其 AFP 含量也显著增加(20-200ng/ml)(Collier, et AL., (1998), *Viral hepatitis Reviews*, 4:31-41)。据报道,15%-58%的慢性肝炎患者和 11%-47%的肝硬化患者的血清 AFP 增加(Taketa, (1990), *Hepatology*, 12:1420-1432)。所以,HCC 患者与肝硬化患者血清 AFP 水平相互重叠的情况很常见,混淆了对 AFP 检测结果的解释。因此,应用 AFP 检测作为可能患 HCC 的病人的监测手段受到了质疑(Sherman, (2001), *J. Hepatol.*, 34:603-605)。因此,建议只有在验证根据影像技术做出的最初诊断时,才能使用 AFP 检测结果进行判定(Sherman, (2001), *J. Hepatol.*, 34:603-605)。

由于 AFP 水平的不可靠性,大多数筛查方案中包括了对肝肿物高度灵敏的超声波检测法。然而超声波检查缺乏特异性,且当病灶小于约 2cm 时,不能可靠地区分 HCC、肝硬化结节和非塑型性结节。

近年来,对一些新的潜在 HCC 标志物进行了研究,但还没有发现任何能明显超过 AFP 的标志物(Seow, et al., (2001), *Proteomics*, 1:1249-1263)。例如,脱- γ -羧基凝血酶原(des-gamma-carboxy prothrombin)曾被视为潜在的标志物。然而与 AFP 类似,该分子对检测较小的肿瘤没有作用(Nomura, et al., (1999), *Am. J. Gastroenterol.*, 94: 650-654)。

Hsu 等人报道(1997 年),通过对正常肝脏和 HCC 进行 mRNA 差异显示分析,识别出了在 HCC 中表达上调的转录产物(Hsu, et AL., (1997), *Cancer Res.*, 57: 5179-5184)。这种他们命名为 MXR7 的转录产物,后来发现是 Glypican-3 (GPC3)。GPC3 是一种类肝素硫酸蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan),其通过脂质末端与细胞表面结合(Duenas Gonzales, et al., (1998), *J. Cell. Biol.*, 141:1407-1414)。Hsu 等人发现在 191 例原发和复发 HCCs 中,有 143 例(74.8%)表达了 GPC3 mRNA,但在 154 例正常肝脏中只有 5 例(3.2%)表达。

后续研究发现,在 75% HCC 病例中存在 GPC3 mRNA 过表达,在局灶性增生集中和肝硬化肝脏中并没有检测到 GPC3 mRNA 过表达(Zhu et al., (2001), *Gut*, 48, 558-564)。

这些研究只分析了 mRNA 水平,但众所周知 mRNA 水平与蛋白的表达和分泌并不完全对应。此外,通常只有有限数量的肝脏蛋白可分泌进入血液循环。

虽然这些结果表明肝脏组织中的 GPC3 mRNA 分析可用于 HCC 的检测,但由于其需要分离肿瘤组织,因此这类分析是侵入性的。此外, mRNA 分析较费时,作为常规分析较困难。

因此,需要一种能够用于筛查的血清标志物(即: HCC 较小的无症状病人中其呈阳性的比例较高)。对超声波检查已检测出存在较小肿物病灶的病人,该检查也应该能可靠地将 HCC 病人与那些非恶性病灶的病人区分开。

总之,仍然需要更好的 HCC 分子标志物,特别是用于监测高危人群(如已出现肝硬化的 HCV 患者)的标志物。由于 HCCs 具有高度异源性特征(Thorgeirsson, et al., (2002), *Nature Genet.*, 31: 339-346), 因此寻找这样的标志物是非常困难的。

发明概述

本发明的发明者发现了一种新的 HCC 的血清标志物,即 glypican-3 (GPC3),在其基础上开发了新的、快速、方便、非侵入性的分析方法,该方法提高了 HCC 诊断的特异性。

根据本发明的一个实施方案,本发明提供了筛查个体是否患有肝细胞癌(HCC)的方法,包括:

从该个体获得体液样本; 和

检测该样本中的 glypican-3(GPC3)水平;

其中该样本中存在可检测水平的 GPC3,则提示该个体患有 HCC。

根据本发明的另一个实施方案,本发明提供了能够特异结合 GPC3 或其片段的基本纯化的抗体或其片段。

根据本发明的另一个实施方案,本发明提供了诊断个体是否患有 HCC 的方法,包括:

从该个体获得肝脏组织样本; 和

检测该组织样本中 GPC3 的存在; 及

其中在该样本检测到 GPC3 则提示患有 HCC。

根据本发明的另一个实施方案，本发明提供了一种检测样本中 GPC3 存在的方法，该方法包括：

将样本与抗体或其片段接触，该抗体或其片段特异地结合到 GPC3 或其片段上，并形成抗体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物；及
5 检测该抗体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物。

根据本发明的另一个实施方案，本发明提供了一种检测样本中 GPC3 水平的方法，包括：

将样本与抗体或其片段接触，该抗体或其片段特异地结合到 GPC3 或其片段上，并形成抗体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物；及
10 测定该抗体-GPC3 复合物或抗体-GPC3 片段复合物。

根据本发明的另一个实施方案，本发明提供了用于检测或测定样本 GPC3 水平的试剂盒，包括：

能与 GPC3 或其片段特异结合的基本纯化的抗体或其片段。

15

附图的简要说明

结合附图对本发明的优选实施方案进行说明，其中：

图 1 所示为 GPC3 转染 293 细胞(照片 C 和 D)显微照片和只用载体转染的对照细胞(照片 A 和 B)的显微照片，其中细胞均用抗 GPC3 单克隆抗体 1G12 标记。照片 A 和 C 为相差显微照片，而照片 B 和 D 为荧光显微照片。
20

图 2 所示为只用载体(EF)或用 HA-标签 GPC3(GPC3)转染的 293 细胞中蛋白的 Western 印记分析(WB)。通过抗 GPC3 单克隆抗体 1G12 或抗 HA 抗体(12CA5)孵育印记膜。实心箭头：GPC3 核心蛋白；开放箭头：GPC3 的糖基化(glycanated)形式；箭头的头部：含 GPC3 N-末端的降解产物，其不含能用 1G12 检测的抗原决定簇。右边的数字对应分子量标准。
25

图 3 所示为通过抗单克隆抗体 1G12 免疫组化标记的肝细胞癌切片的显微镜照片。照片 A：16×放大的高度 GPC3-阳性 HCC(T)的全景照片，其周围为未标记的非肿瘤肝组织(N)；照片 B：相同组织的 400×放
30

大照片，显示标记的细胞浆颗粒和胞膜。

图 4 所示为 GPC3 的 ELISA 分析中，GPC3 含量与光密度的关系。

图 5 所示为 ELISA 分析测定的对照个体、肝炎患者(H)、肝炎合并肝硬化患者(H+LC)和肝细胞癌患者(HCC)血清中 GPC3 的水平，所示结果 5 为四份的平均值。图的顶端显示了 HCC 患者与肝硬化患者 GPC3 平均值的显著性差异。

发明的详细描述

本发明提供了一种新的筛查哺乳动物个体是否患有肝细胞癌(HCC) 10 的方法。本发明的发明者已经证明能够检测患有 HCC 病人循环中、血清或血浆中的细胞表面蛋白多糖 GPC3，但在正常个体的血清或血浆中，使用本文所述的具有显著性的标准检测方法没有出现可检测的水平，即显著高于本底的水平。同时还显示，肝炎病人或肝炎合并肝硬化病人的血清或血浆中几乎没有或没有 GPC3 可检测到。

15 因此，本发明提供了一种通过检测个体体液中的 GPC3 水平来筛查该个体是否患有 HCC 的方便、非侵入性的方法。用于测定的适合的体液包括：血清、血浆和全血。优选筛查血清或血浆。

可以通过任何适合的分析该蛋白的方法来测定体液中的 GPC3 水平。测定 GPC3 水平的免疫学方法是非常方便和适合的方法类型，此类 20 方法是本领域所属技术人员公知的，并在本文中做了进一步描述。

例如，特异结合人体 GPC3 的抗体或抗体片段为多种用于测定 GPC3 的以抗体为基础的分析方法提供了基础。HCC 可通过下列步骤诊断：将个体体液与抗体或抗体片段接触；在允许的条件下，该抗体或抗体片段与 GPC3 特异结合并形成抗体-GPC3 复合物；然后检测和/或测 25 定该复合物的水平。抗体-GPC3 复合物的含量与样本中 GPC3 的水平对应。

本文所用术语“抗体”，如果没有特别说明，应包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体及单链抗体。

文中术语“抗体片段”指能够表现其母抗体特异结合性的抗体的一部分，还包括 Fab、F(ab')₂ 及 F_v 片段。 30

本文中,如果抗体或抗体片段识别并结合靶分子,但基本不识别和结合含有靶分子的样本中的其它分子,则称该抗体或抗体片段与该靶分子“特异结合”。

嵌合抗体是一类抗体,其含有来自不同物种的抗体部分。例如,嵌合抗体可含有人不变区和其它物种的可变区。嵌合抗体可通过公知的重组方法制备,如美国专利第 5,354,847 和 5,500,362 号,以及科学文献 (Couto et al., (1993), *Hybridoma*, 12:485-489)中所述。

人源化抗体是一类抗体,其中只有负责抗原结合和特异性的补体决定区是非人来源的,而抗体分子的其余部分基本上是人源的。人源化抗体及其制备同样是本领域所属技术人员公知的,参见例如美国专利第 5,225,539、5,585,089、5,693,761 和 5,693,762 号。

单链抗体是能够与肽或抗原决定簇特异结合的多肽序列,其中该单链抗体衍生自单克隆抗体或多克隆抗体的轻链或重链。单链抗体包括衍生自人源化抗体、嵌合抗体或完整人抗体的多肽,其中该单链抗体衍生自这些抗体的轻链或重链。

抗体

多克隆抗体

为制备多克隆抗体,应获得纯化的人或非人的 GPC3。

利用常规的方法,例如 Bonneh-Barkay et al., (1997), *J. Biol. Chem.*, v. 272, pp. 12415-12421 中所述的方法,可从如人胎盘中纯化出 GPC3。

如果需要,如本领域所属技术人员公知的,可将该纯化蛋白结合到诸如钥孔(虫威)血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)的载体蛋白上,然后与 Freund 氏佐剂混合,并注入家兔或其它适合的实验动物体内。

可选择地,通过对插入到适合的克隆载体中的适当的 DNA 序列进行表达,可在诸如细菌的适合宿主中重组合成全部或部分该 GPC3 蛋白。使用以往报道的方法(Filmus et al., (1988), *Molec. & Cell Biol.*, v. 8, pp. 4243-4249; Linsley et al., (1993), *Ann. Rev. Immunol.*, v. 11, pp. 191-212; Peach et al., (1994), *J. Exp. Med.*, v. 180, pp. 2049-2058),可克隆编码 GPC3 的 DNA。使用相似的方法能以融合蛋白的形式表达 GPC3

或其部分。

用于在大肠杆菌 *E. coli* 中产生融合蛋白的两种广泛应用的表达系统是使用 pUR 系列载体的谷胱甘肽转移酶(glutathione-S-transferase)或麦芽糖结合蛋白融合体, 以及使用 pATH 载体的 trpE 融合体。

- 5 然后, 可例如使用谷胱甘肽柱纯化表达的 GPC3 蛋白, 如果需要可将其结合到载体蛋白上, 并与 Freund 氏佐剂(辅助刺激动物的抗原反应)混合, 并注入家兔或其它适合的实验动物体内。每过一周进行加强注射, 采集家兔或其它实验动物的血液并分离血清。该血清可直接使用, 或者在使用前通过各种方法(包括使用蛋白-A-Sepharose、抗原琼脂糖
- 10 (Sepharose)或抗小鼠-Ig-琼脂糖的亲合层析)进行纯化。

- 使用 GPC3 的片段作为抗原可制备其多克隆抗体。可使用源自 GPC3 氨基酸序列的含 3 个或更多个连续氨基酸的片段。优选的抗原是含有 70 个氨基酸的羧基末端氨基酸序列的 GPC3 片段或其部分。如本文所述, 可选择地将片段重组生成融合蛋白。可将这种肽抗原与钥孔(虫
- 15 威)血蓝蛋白连接来增强体内的免疫原性。

单克隆抗体

- 通过常规的方法, 向小鼠体内注射纯化的 GPC3 或其片段(可选为融合蛋白)后, 可制备单克隆抗-GPC3 抗体, 所述 GPC3 蛋白或其片段
- 20 可通过如上述多克隆抗体制备中所述的方法获得。

简单说来, 向小鼠体内注射与 Freund 佐剂混合的该纯化的蛋白或肽, 例如 3 周的时间注射 9 次。取该小鼠的脾脏, 并重悬于磷酸盐缓冲液(PBS)中。

- 将脾细胞作为淋巴细胞的来源, 其中一些淋巴细胞可产生具有适当特异性的抗体。随后将这些细胞与永生的骨髓瘤伙伴细胞融合, 将融合产物杂交瘤细胞接种到一定数量的存在有诸如 HAT 的选择试剂的组织培养孔中。使用 ELISA 进行筛选, 以识别含有能产生 GPC3 特异性抗体的细胞的小孔。再次接种这些细胞, 培养一段时间后, 再次筛选这些小孔, 来识别产生抗体的细胞。进行多个克隆的步骤, 直到超过 90%
- 25
- 30 小孔中包含能够产生抗体的单克隆。通过此步骤, 建立了能够产生抗体

的稳定的克隆细胞株。然后,使用蛋白 A 琼脂糖亲和层析或离子交换层析以及这些技术的变化和组合,来纯化该单克隆抗体。

在进一步的实施方案中,从 GPC3 特异单克隆抗体中制备抗体片段,该片段包括但不限于 $F(ab)_2$ 、 $F(ab^1)_2$ 及 F_v 片段或单链成分。使用完整抗 GPC3 抗体的蛋白水解产物(如 Lin et al., (1978), *PNAS*, 5 75(6);2649-2653 中所述),或对编码这些片段的基因进行遗传学处理,以及对能够分泌这些抗 GPC3 抗体片段的转染生成系统进行发酵可生成这样的片段。

优选抗原亲和性至少为 1×10^8 的抗 GPC3 抗体。

10 可使用各种类型的分析方法来分析样本中的 GPC3。这些方法包括夹心 ELISA、放射免疫分析、荧光免疫分析、斑点杂交(dot-blot)、试纸条法(dip-stick)及 Western 印记。

在优选的实施方案中,使用特异结合 GPC3 或其片段并携带可检测标记的抗体,并通过测量该可检测标记对生成的 GPC3-抗体复合物进行测定,从而测定样本中 GPC3 的水平。可选择地,使用对 GPC3 或其片 15 段有特异性的第一抗体,然后使用对第一抗体有特异性并携带标记的第二抗体,该标记可以是可直接检测的标记或是信号产生系统的成分。此标记抗体和系统是本领域所属技术人员公知的。

将所述标记和信号产生系统所产生信号的检测或测定结果,与适当的校准标准比较,可确定样本中存在 GPC3-抗体复合物并以此确定存在 GPC3。 20

所述第二抗体携带的标记是任意适合的可直接检测的标记或任意适合的信号产生系统的成分。

许多这种例子是免疫分析领域所公知的。

25 可通过本领域所属技术人员公知的技术,使用可检测的标记物(label)或是信号产生系统的成分对第二抗体进行标记。可用于使抗体变为可检测的标记物的例子包括放射性同位素、酶、荧光素及化学发光物质。例如,可使用放射性元素作为可直接检测的标记物;放射性标记物的例子包括 γ 射线发射物质(^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{128}I 及 ^{131}I)。还可使用荧光标记 30 物作为可直接检测的标记;例如适合的荧光物质包括 coumarine、稀土

金属离子、螯合物或螯合复合物、荧光素、若丹明(rhodamine)及若丹明衍生物。

适合的标记物还包括金属复合物、稳定的自由基、囊泡(vesicles)、脂质体、胶质颗粒(colloidal particles)、乳胶颗粒(latex particles)、spin
5 标记物(spin labels)、生物素/抗生物素蛋白(biotin/avidin)以及它们的衍生物。

可使用酶联信号产生系统,包括碱性磷酸酶、淀粉酶、荧光素酶、过氧化氢酶(catalase)、 β 半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、己糖激酶、辣根过氧化物酶、内酰胺酶(lactamase)、尿素酶及苹果酸脱氢酶。用适当的底物与所述酶反应,然后通过测量吸光度、荧光
10 或发光密度来检测酶的活性。当使用酶作为标记物时,可通过诸如戊二醛、过碘酸(periodic acid)及马来酰亚胺(maleimide)的常规方法实现酶与抗体的连接。

固体基质可作为适用于固化抗体的固体支持物,其包括各种微滴定
15 板(microtitre plates),如从Falcon Plastics, Oxnard, Calif.获得的微滴定板,或例如常规的ELISA微滴定板(Immulon II、Dynax、Chantilly、VA)和链霉亲和素(Streptavidin)-包被的ELISA微滴定板(Reacti-Bind、Pierce、Rockford、IL),以及诸如从Dynatech、Alexandria、VA获得的微滴定条(microtitre strips)。这些微滴定条或微滴定板的小孔由洁净的
20 塑料材料制作,优选聚氯乙烯、聚苯乙烯。其它用于固化抗体的固体基质包括任何适合尺寸的聚苯乙烯小管、杆或桨,或者聚苯乙烯小珠或聚丙烯酰胺基质。

通过本领域所属技术人员公知的常规方法可在固体支持物上进行抗体的固化,例如,美国专利第5,352,583号中所述。

25 根据本发明优选的实施方案,将体液样本与可与GPC3特异结合形成复合物的第一抗体接触,该第一抗体固化在固体支持物上。通过足够长的时间来使样本中的GPC3与该固化的抗体结合。随后洗涤该固体支持物,然后将其与第二抗体接触,该第二抗体能够与第一抗体特异结合,并已标记了可检测的标记或附加了信号产生系统。通过测定结合到固体
30 支持物上的标记或产生的信号,测量该样本中存在的复合物,从而测定

该样本中 GPC3 的水平。

根据进一步的实施方案,该样本同时与固体支持物上的固化第一抗体和标记的第二抗体接触。

5 在进一步的实施方案中,该第二抗体可缺乏标记和信号产生系统成分,而通过第三抗体的方法来测定该与固体支持物结合的第二抗体,所述第三抗体结合有检测标记或信号产生系统成分,并选择性地与该第二抗体结合。

10 根据进一步的实施方案,将该样本同时或分步与特异结合 GPC3 并附加有捕获对成员之一的第一抗体,及已标记的可与第一抗体结合的第二抗体接触。生成的混合物随后与固化了捕获对其它成员的固体支持物接触。在充分的反应时间后,通过捕获对成员间的相互作用,使标记复合物能够结合到固体支持物上,洗涤该固体支持物并测定其上结合的标记物含量,从而确定样本中 GPC3 的水平。适合的捕获对包括生物素/抗生物素蛋白。其它适合的捕获对是本领域所属技术人员公知的。可颠倒抗体的特异性,该第一抗体可特异结合该复合物而标记的第二抗体可特异结合 GPC3。

本文所述的筛查方法对 HCC 具有较高的特异性,该方法检测不到正常个体和肝炎患者样本中的 GPC3,而在偶发性肝炎合并肝硬化的患者中检测到 GPC3 表现为可忽略的水平。

20 在确诊为 HCC 的个体的试验中,53%~55%的个体具有可检测的血清 GPC3 水平,其范围为 151ng/ml~2924ng/ml。

25 当使用血清 AFP 作为相同的病人样本中的 HCC 标志物时,以 20ng/ml 为异常的阈值,可检测到 59%的 HCC 病人。如果将提示患病的阈值水平提高到 100ng/ml,只能检测到 32%的 HCC 病例。然而,因为除 HCC 外许多慢性肝病的 AFP 水平也会高于 20ng/ml,因此使用 20ng/ml 作为 AFP 的阈值时,会包括一定数量的假阳性。

30 本发明者发现,HCC 病人 GPC3 水平的升高与其 AFP 水平并没有较强的相关性(表 4)。因此本发明方法提供了有用的附加手段,其可不通过 AFP 筛查而识别 HCC 病例。本发明的方法可单独使用,或通过常规方法与 APF 筛查结合,从而提高识别早期和可治疗阶段的 HCC 的能

力。

在本发明进一步的实施方案中，将 GPC3 与 AFP 筛查结合使用，从而提供了将高水平 AFP 筛查的特异性与增强的 GPC3 筛查的敏感性相结合的检测方法。例如，如表 4 中的数据显示，如果测定 AFP 与 GPC3 血清水平，并使用 100ng/ml AFP 作为显著性阈值，则 70% 的 HCC 病人显示 5 出 AFP 和 GPC3 中至少一种升高，而单独使用 100ng/ml AFP 作为 HCC 标志时只有 32%，单独使用 GPC3 时只有 53%。如果同时考虑 AFP 和 GPC3 并使用 20ng/ml AFP 作为阈值，则 82% 的病人显示出 AFP 和 GPC3 中至少一种升高。

10 本发明的血清学 GPC3 分析对进一步评价显示肝肿物临床症状的个体特别有作用。该分析也可用于筛查 HCC 高危人群，例如慢性乙型肝炎和丙型肝炎患者或携带者。

在进一步的实施方案中，本发明提供了诊断 HCC 的免疫组化方法，该方法通过检查出现肝肿物的病人的肝活检样本进行诊断。通过活检获得的肝组织样本常发生形态学变形，导致难以进行常规的组织学诊断。15 通过抗 GPC3 抗体标记此活检的组织切片，如本文实施例所述，在该切片中检测到 GPC3 即提示该活检肿物为 HCC。该抗 GPC3 抗体可自身携带诸如荧光标记的可检测标记，或者该第一抗 GPC3 抗体可通过带可检测标记的第二抗体来检测。

20 本发明还提供可特异结合 GPC-3 的抗体。与这些抗体结合相同抗原决定簇的抗体同样属于本发明的范围。所述抗体可以是包括 IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD 及其任意亚型在内的任意免疫球蛋白类抗体。

在进一步的实施方案中，本发明提供了包括基本纯化的抗体或其片段的试剂盒，该抗体或其片段可与 GPC3 或其片段特异结合。

25 在进一步的实施方案中，该试剂盒可用于常规的二-抗体夹心分析，其中第一 GPC3 特异抗体捕获液体样本中的 GPC3，第二抗体检测被捕获的 GPC3 的存在。该捕获抗体通常固化在固体支持物上，该固体支持物如 ELISA 板、硝化纤维素膜、小珠或任何其它本领域所属技术人员公知的支持物。该检测抗体可直接用比色标记或放射性同位素标记，或者 30 通过对该检测抗体的同型抗体具有特异性的第二标记抗体来对其进

行检测。

实施例

下列实施例的描述是为了说明目的，而不意于限制本发明的范围。

- 5 在本说明书和实施例中所参考的但没有清楚说明的化学、分子生物学、蛋白和肽生物化学及免疫学方法已在科学文献中报道，并且是本领域所属技术人员公知的。

方法

- 10 病人组织：从多伦多总医院病理科(Department of Pathology, Toronto General Hospital)获得肝组织样本。所有肝组织样本均是手术切除的肿瘤及邻近软组织的大块样本。所有组织用 10%福尔马林固定并用石蜡包埋，从而用于常规组织检查。

- 病人血清：血液样本来自签订同意书的 34 例 HCC 患者(患者特征如表 3 所示)、20 例肝炎合并肝硬化患者(12 例 HCV 和 8 例 HBV)、18 例肝炎患者(12 例 HCV、1 例 HCV 合并 HIV、1 例 HCV 合并 Thalesemia、1 例 HCV 与 HBV 共感染及 3 例 HBV)(多伦多总医院)、以及 53 例健康血液捐献者(Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre, Toronto, Canada)。根据肝病研究欧洲委员会²⁰(European Association for Study of Liver Disease²⁰)的指南，通过肝活检对 HCC 进行组织学诊断或通过临床资料对 HCC 进行诊断。通过离心立即分离该血清并在-20℃冻存。已诊断为非恶性肝病(肝炎合并肝硬化和肝炎)的病人血清，只有在收集后 6 个月没有恶性疾病指征的情况下，才纳入本研究。
- 15 20 25 30

- 细胞株：含 10%胎牛血清(FBS)的 MEM(minimum essential medium)培养液(Gibco BRL)中对 HCC 细胞株(HepG2、Hep3B 及 PLC-PRF-5)进行培养，并补充非必需氨基酸溶液和丙酮酸钠(1mM)。用含 10% FBS 的 DMEM 培养 293 细胞株。所有细胞株均从 American Type Culture Collection 获得，并在 37℃ 下保持在含 5%CO₂ 的饱和湿度空气中。为收集条件培养液，将该细胞株在无血清条件下以高密度生长过夜。通过 Centricon YM-10,000 过滤器(Millipore)浓缩该收集培养液。

GPC3 的转染: 使用诱导进入 pEF 载体(或以空载体作为对照)的血球凝集素 A (HA)-标签-GPC3 cDNA²¹ 来转染 293 细胞株, 并用 800 μ g/ml G418(Gibco BRL)来筛选转染的细胞。在通过抗 HA 12CA5 单克隆抗体和 FITC-连接的第二抗体对 G418 选择的细胞进行标记后, 通过 FACS

5 分选高水平表达 GPC3 的细胞。随后通过组织培养扩增分选的细胞。

抗 GPC3 小鼠单克隆抗体制备: 通过给 Balb/C 雌性小鼠单剂量腹腔(i.p.)注射 50 μ g 含核心蛋白末端 70 个氨基酸的 His 标签 GPC3 片段, 使其免疫。该免疫原通过 Titermax Gold(Cedarlane)佐剂乳化。21 天后, 用 50 μ g 不含佐剂的相同免疫原对该小鼠进行强化。2 天后, 从尾静脉收集血液

10 样本, 并获得相应的血清。通过 ELISA, 并用来自同一小鼠的免疫前血清作为阴性对照, 来评估该血清样本中抗 GPC3 的滴定度。使用常规的方法, 在聚乙二醇 4000 (Sigma)存在的情况下, 将具有最高滴定度的 2 只小鼠的脾细胞与 SP2/0 Ag14 小鼠的骨髓瘤细胞(比例 6:1)融合。将融合细胞接种于 96 孔培养板并在加有 Nutridoma-CS (Roche)及次黄嘌呤、

15 氨喋呤和胸腺嘧啶核苷(HAT 补充剂, Gibco BRL)的 α -MEM、10mM Hepes、50 μ M 2-巯基乙醇及含 20% FBS 的培养液中扩增。为选择产生的杂交瘤, 使用每孔加载 0.05 μ g GPC3 免疫原的 96 孔板进行 ELISA, 来筛选扩增的克隆。用溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中的 1%牛血清白蛋白(BSA)将该培养板封闭 2h, 并加入来源于每个克隆的条件培养液。以

20 O-苯二胺(Sigma)和过氧化氢为底物, 使用辣根过氧化物酶连接的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗小鼠 IgM(StressGen), 来检测结合抗原的抗 GPC3 抗体的存在。随后进一步扩增阳性克隆, 并用免疫荧光来检测其标记 GPC3 转染 293 细胞的能力。将名为 1G12 和 8H5 的该阳性杂交瘤再克隆 2 次, 并使用 Isostrip (Roche)测定其同型性(IgG1, K)。使用蛋白 A

25 柱(Affi-Gel Protein A MAPS II kit, Bio-Rad)从条件培养液上清中纯化抗体。

免疫荧光: 将 GPC3-或载体单独转染的 293 细胞接种在用多聚 L 赖氨酸处理的玻片上, 并用含 4%多聚甲醛的 PBS 来固定。以抗 GPC3 单克隆抗体或普通的小鼠 IgG(Santa Cruz Biotechnology)(15 μ g/ml)孵育 1 小

30 时后, 用 PBS 洗涤该玻片 3 次, 然后用 FITC 连接的绵羊抗小鼠 IgG

F(ab')₂ 片段(StressGen)来检测结合的第一抗体。

Westem 印记分析: 在冰上通过含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液(2mM PMSF、10μg/ml leupeptin、10μg/ml aprotinin)将细胞裂解 30 分钟。将该蛋白样本在 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 并转移至 PVDF 膜
5 (Pall Corporation)上。室温下, 将该膜在封闭缓冲液(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl 0.1% Tween20, 5%脱脂奶粉)中封闭 1 小时, 随后在 4°C 用 1μg/ml 1G12 或 12CA5 单克隆抗体孵育过夜。在使用辣根过氧化物酶抗小鼠 IgG 第二抗体孵育 1 小时后, 用化学发光 ECL 试剂(DuPont NEN)来检测蛋白带。

10 *免疫组织化学:* 石蜡包埋的组织切片通过二甲苯脱蜡, 并用一系列梯度乙醇溶液再水化。将该玻片在 10mM pH6 的柠檬酸缓冲液中通过 Kenmore 微波炉加热(功率水平 10、2 分钟, 功率水平 6、1.5 分钟, 及功率水平 9、2.5 分钟, 并重复此 3 个步骤 2 次)进行抗原修复。使用蒸馏水洗涤该玻片, 并用一系列梯度乙醇脱水, 并浸入溶于甲醇的 10%
15 过氧化氢中, 来阻断内源性过氧化氢酶。再水化该玻片, 然后根据 Histostain-SP 试剂盒(Zymed Laboratories) 和 TSATM 生物素系统(NEN Life Science Products)的说明书, 用 20μg/ml 的抗 GPC3 单克隆抗体(或用普通的小鼠 IgG 和 PBS 作为阴性对照)进行免疫标记。用 1/400 稀释的抗 AFP 的家兔多克隆抗体(Dako, A008)标记连续切片。通过过氧化氢水溶液来阻断内源性过氧化物酶, 并通过 Ultra HRP 系统(ID Labs)检测抗体的结合。

夹心 ELISA: 每孔用溶于 50μl PBS 的 0.5μg 抗 GPC3 单克隆抗体 1G12 来包被 96 孔 ELISA 培养板。用含 1% BSA 的 PBS 将该培养板封闭 2 小时, 加入 50μl 稀释的血清样本(用 PBS 以 1:3 稀释)并在 4°C 孵育过
25 夜。用含 1%BSA 的 PBS 洗涤未结合的物质后, 使用抗 GPC3 绵羊多克隆抗体²² 来检测结合的 GPC3, 随后以 O-苯二胺(Sigma)和过氧化氢为底物, 用辣根过氧化物酶连接的驴抗绵羊 IgG(Sigma)孵育。为量化血清中的 GPC3, 通过向一组相同稀释度的正常血清中平行加入纯化的 GPC3 得到校准曲线。为测定正常血清中 GPC3 的含量, 在 PBS 中制作
30 GPC3 校准曲线。每个样本分成 4 份, 测量 3 次。

统计学分析: 用 Mann-Whitney 检验测定各组间的显著性差异。

AFP 的血清浓度: 使用商业销售的 ELISA 试剂盒(Axsym, Abbott)测定平行血清样本中的 AFP 水平。

5 实施例 1: 抗 GPC3 多克隆抗体的纯化及特性

编码人 GPC3 的 70 个连续 C 末端氨基酸的 GPC3 cDNA 克隆(如上文的 Filmus et al.所述)的一部分以谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白形式在常规的 *E coli* 表达系统中表达。

使用谷胱甘肽柱纯化的上述融合蛋白,可通过常规的方法使绵羊免
10 疫。如"Antibody, a Laboratory Manual", (1988), Ed. Harlow et al., Cold Spring Harbor 中所述, 可通过常规的方法来对抗此 70 个氨基酸免疫原的多克隆抗体进行亲和纯化。该多克隆抗体可用于 Western 印记和免疫共沉淀的研究。

15 实施例 2: 产生抗 GPC3 单克隆抗体的杂交瘤的制备

使用相同的免疫原, 即使用包括人 GPC3 的 C 末端 70 个氨基酸的 GST 融合蛋白来制备单克隆抗体。此 70 个氨基酸区域是物种间最少的保守序列, 因此能够用于产生人 GPC3 特异抗体。如 Kohler and Milstein, Nature, 256:495-497, (1975)中所述, 使用本领域所属技术人员公知的方法产生杂交瘤细胞。
20

简单说来, 通过给 Balb/C 雌性小鼠单剂量腹腔(i.p.)注射 50 μ g His 标签的含羧基末端 70 个氨基酸的人 GPC3 片段, 使其免疫, 其中该免疫原通过 Titermax GoldTM(Cedarlane)佐剂乳化。21 天后, 该小鼠用 50 μ g 不含佐剂的相同免疫原进行强化。2 天后, 从其尾静脉收集血液样本, 25 并获得相应的血清。通过酶联免疫吸附实验(ELISA), 并用来自同一小鼠的免疫前血清作为阴性对照, 来检测该血清样本中抗 GPC3 的滴定度。使用常规的方法¹(Parkin, D. M., Pisani, P. & Ferlay, J., Global cancer statistics. CA. Cancer J. Clin., 49, 33-64, 1, (1999)), 在聚乙二醇 4000 (Sigma)存在的情况下, 将具有最高滴定度的 2 只小鼠的脾细胞与 SP2/0 Ag14 小鼠骨髓瘤细胞(比例 6:1)融合。将融合的细胞接种于 96 孔培养
30

板并在加有作为生长因子来源的 Nutridoma-CSTM (Roche)及用于杂交选择的次黄嘌呤、氨嘌呤和胸腺嘧啶核苷的 α -MEM、10mM Hepes、50 μ M 2-巯基乙醇及含 20% FBS 的培养液中扩增。通过 ELISA, 用加载了 0.05 μ g 羧基末端 GPC3 片段/每孔的 96 孔板来筛选获得的克隆。用溶于

5 PBS 中的 1% BSA 将该培养板封闭 2h, 并在所述条件培养液上清中孵育。以 O-苯二胺(Sigma)和过氧化氢作底物, 通过辣根过氧化物酶连接的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗小鼠 IgM(StressGenTM), 来检测第一抗体的结合。使用 GPC3 转染的细胞通过免疫荧光再次筛选该阳性克隆。将所选择的杂交瘤(1G12 和 8H5)克隆 2 次, 并通过 IsostripTM(Roche)测定其

10 同型性(IgG1, K), 使用蛋白 A 柱层析 Affi-Gel Protein A MAPS II 试剂盒 (Bio-RadTM)从条件培养液上清中纯化该杂交瘤。

使用 ELISA 筛选该杂交瘤细胞产生的抗体对 70 个氨基酸 GPC3 片段的抗性。随后检测阳性克隆特异标记 GPC3 转染细胞的能力。两株杂交瘤细胞(1G12 和 8H5)所产生的抗体显示了较强地和特异地免疫标记

15 GPC3 转染细胞的能力。图 1 所示为用 1G12 抗体标记 293 细胞, 随后用荧光第二抗体标记。照片 A 和 C 为相差显微照片而照片 B 和 D 为荧光显微照片。照片 A 和 B 所示为只用载体转染的 293 细胞显微照片, 而照片 C 和 D 所示为含 GPC3 的载体转染的 293 细胞照片。在此实施例中, 细胞用 10 μ g/ml 单克隆抗体(mAb)1G12 来标记。照片 D 清楚地

20 显示 mAb 1G12 的特异性标记。在只有载体转染的细胞中未见标记(照片 B)。

实施例 3: 单克隆抗体的特性

通过对 HA-标签-GPC3-转染细胞来源的蛋白裂解液进行 Western 印

25 记分析, 确认由 1G12 和 8H5 杂交瘤产生的两种单克隆抗体的特异性。如图 2 所示, 抗体 1G12 检测的条带对应此 GPC3 核心蛋白, 该 smear 对应 GPC3 的糖基化形式。作为对照, 用抗 HA 抗体(12CA5)进行了平行 Western 印记分析。

30 实施例 4: 组织切片中的 GPC3

利用上述抗 GPC3 单克隆抗体 1G12 对 HCC 肿瘤与其周围的非恶性细胞的石蜡切片进行免疫组织化学标记。利用生物素化的抗小鼠免疫球蛋白第二抗体来检测该抗 GPC3 抗体，并用 streptavidin 连接的辣根过氧化物来检测该结合的第二抗体。

5 如图 3 所示，该抗 GPC3 单克隆抗体 1G12，较强地结合到肿瘤细胞上，而却完全没有与正常肝细胞结合。除预计的细胞膜上存在的 GPC3 外，还观察到细胞浆中有明显标记。该细胞浆标记多数为颗粒状并靠近细胞表面。偶而观察到核周围的标记。除巨噬细胞外，非实质细胞 (Non-parenchymal cells) 通常为阴性。这些结果表明通过检测 GPC3，抗
10 GPC3 单克隆抗体可用来从肝组织切片中诊断 HCC。

实施例 5：恶性与良性病灶中 GPC3 表达的离体测定

表 1 总结了抗 GPC3 单克隆抗体与 15 例不同肝细胞癌反应的免疫组织化学研究结果。这些 HCC 中的 12 例(80%)与抗 GPC3 单克隆抗体
15 反应。在每种肿瘤中，与该抗 GPC3 单克隆抗体反应的标记细胞数量有所不同。阳性细胞通常集簇在集落样(clone-like)区域。在所有病例中，环绕在肿瘤周围的非恶性细胞为阴性。

表 1. 在 HCC 中的 GPC3 表达

HCC 的 Acc.编号	单克隆抗体 1G12	单克隆抗体 8H5	阳性细胞的%
2188-96I	3	3	70
21914-	3	3	80
4865-99	3	3	90
7530-93A	3	3	100
7590-98B	3	2	90
28828-99A	3	-	100
12056-97	2	2	40-60
19626-98A	1	1	1-5
18891-96	1	1	5
6301-99B	1	1	20

2978-97B	1	1	1
5940-96	1	1	5-10
21424-98A	0	0	-
10355-97D	0	0	-
10865-01C	0	0	-

表 2 所示为抗 GPC3 单克隆抗体与恶性及良性肝组织反应结果的总结。6 例肝脏腺瘤与 9 例肝脏发育不良对 GPC3 反应阴性。

5

表 2. 在非恶性肝脏组织中的 GPC3 表达

肝组织类型	检测的肝组织类型的数量	GPC3 表达(%)
HCC	23	19(83%)
高度发育不良	3	0(0%)
低度发育不良	6	0(0%)
肝细胞腺瘤	6	0(0%)
正常肝脏	34	0(0%)

这些数据表明，在正常肝脏和良性病灶中，不表达 GPC3，而多数 HCCs 表达可检测水平的 glypican-3。

10 **实施例 6: GPC3 检测的免疫学分析**

通过夹心 ELISA 来测定确诊为 HCC 的病人血清中的 GPC3。在此 ELISA 中，用抗 GPC3 单克隆抗体 1G12 来包被 96 孔培养板，并加入一份待测血清。通过洗涤除去未结合的物质，利用如实施例 1 制备的抗 GPC3 绵羊多克隆抗体来检测结合的 GPC3，使用直接或间接复合的检测试剂检测该免疫复合物的存在。测量该样本的光密度并与标准曲线进行比较。图 4 显示了用于分析的标准曲线。在检测的范围内将分析结果线性化。

建立收集病人血清的试验方案，这些病人正在多伦多总医院接受 HHC 治疗，并签署了同意书。在初始研究中，收集了 9 例 HCC 患者的

血清。同样从血液捐献者和储存库中收集了 38 例正常血清。通过夹心 ELISA 分析,使用 1:3(血清:PBS)稀释的样本测定 GPC3 水平。每个样本分析重复 4 次。通过比较每个样本与标准曲线的 OD 值得出 GPC3 的浓度,该标准曲线是通过在一组相同稀释度的正常血清中加入不同剂量的 GPC3 而产生的。

表 3 总结了该研究的结果。9 例 HCC 病人中的 5 例(55%)表现出 GPC3 值明显升高。没有病人的 AFP 水平显著增加。在任意正常样本中没有检测到 GPC3。

表 3.

病人编号#	GPC3 水平(ng/ml)	标准误差	P 值
1	100.6	17.7	0.0027(*)
2	292.4	16.7	<0.0001(*)
4	84.9	19.3	0.0081(*)
5	0	9.6	NS
6	75.4	9.0	0.0014(*)
7	14.9	3.5	NS
8	44.4	54.3	NS
9	102.6	12.9	0.0001(*)
10	0	12.9	NS
储存的正常血清	0	10.1	

*与正常血清比较具有显著性差异

通过使用夹心 ELISA 测量 53 例健康者、18 例肝炎患者、20 肝炎合并肝硬化患者、34 肝细胞癌患者(HCC)血清中 GPC3 的水平进行了额外的研究。发现在所有健康者中没有检测到 GPC3,并且 34 例 HCC 患者中有 18 例(53%敏感性)表现出血清 GPC3 水平显著升高,其 GPC3 值的范围为 151~2924ng/ml(图 5 和表 4)。此外,在所有肝炎病人中没有检测到 GPC3,而在 20 例肝炎合并肝硬化患者中只有 1 例(5%)检测到 GPC3,其水平为 117ng/ml(95%特异性)。使用 Mann-Whitney 检验进行

统计学分析显示, HCC 患者的血清 GPC3 平均水平(ng/ml)显著高于肝炎合并肝硬化患者、肝炎患者和健康捐献者, 而在后三组中没有显著性差异。

5 实施例 7: GPC3 与 AFP 水平的比较

使用商业销售的 ELISA 试剂盒(Axsym, Abbott), 对与实施例 6 中所述相同的 34 例 HCC 患者进行了血清 AFP 水平的测量。表 4 显示了测得的 AFP 与 GPC3 值的比较。

10

表 4. HCC 患者血清中 GPC3 与 AFP 的含量

病人编号#	GPC3(ng/ml)	AFP (ng/ml)	病因学
1	2924	133	HBV
2	2295	12	HCV
3	1758	<5	HBV
4	1065	34	HCV
5	1026	14	HCV
6	1006	30	HBV
7	849	14	HCV
8	783	23	HBV&HCV
9	755	<5	HBV
10	445	14428	未知
11	433	10	HBV
12	351	7809	HCV
13	252	8629	HCV
14	235	1628	HCV
15	214	78	酗酒者
16	211	<5	酗酒者
17	184	5	HBV
18	151	40	酗酒者

19	47	52000	酗酒者
20	26	1516	HCV
21	0	8	HBV
22	0	30	HBV
23	0	<5	HBV
24	0	15	HBV
25	0	<5	HBV
26	0	488	未知
27	0	5	酗酒者
28	0	2603	未知
29	0	194	HBV
30	0	13	HBV, HIV
31	0	67	HCV
32	0	27	HBV
33	0	74	HCV
34	0	1900	HCV

本发明并不限于本文描述的实施方案的特征,还包括在本发明权利要求范围内的所有变化或修改。

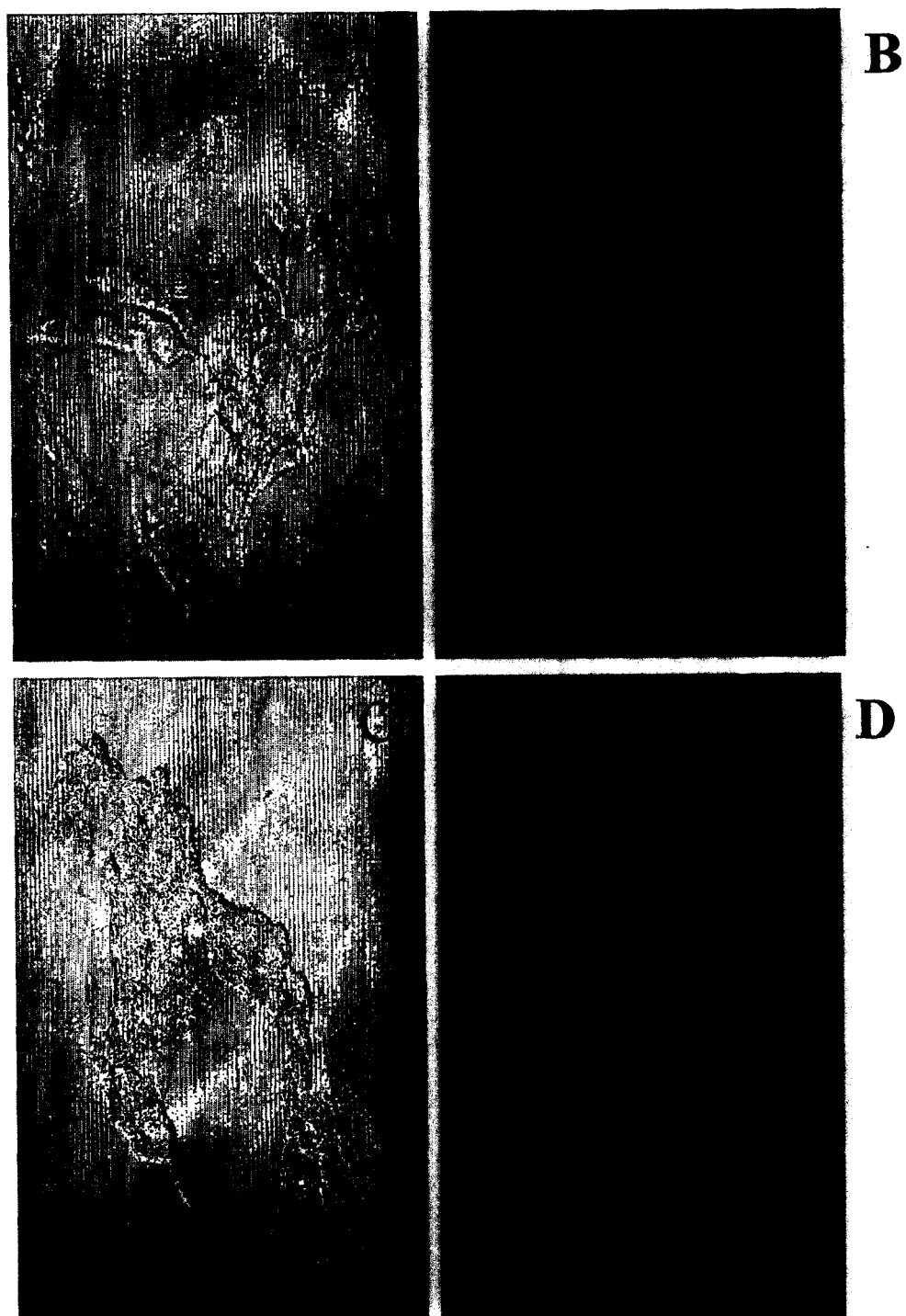


图 1

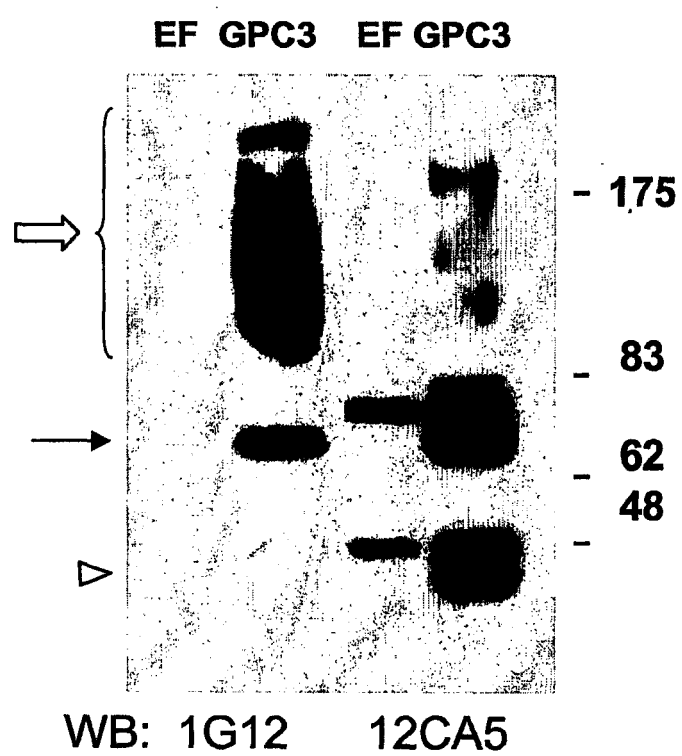


图 2

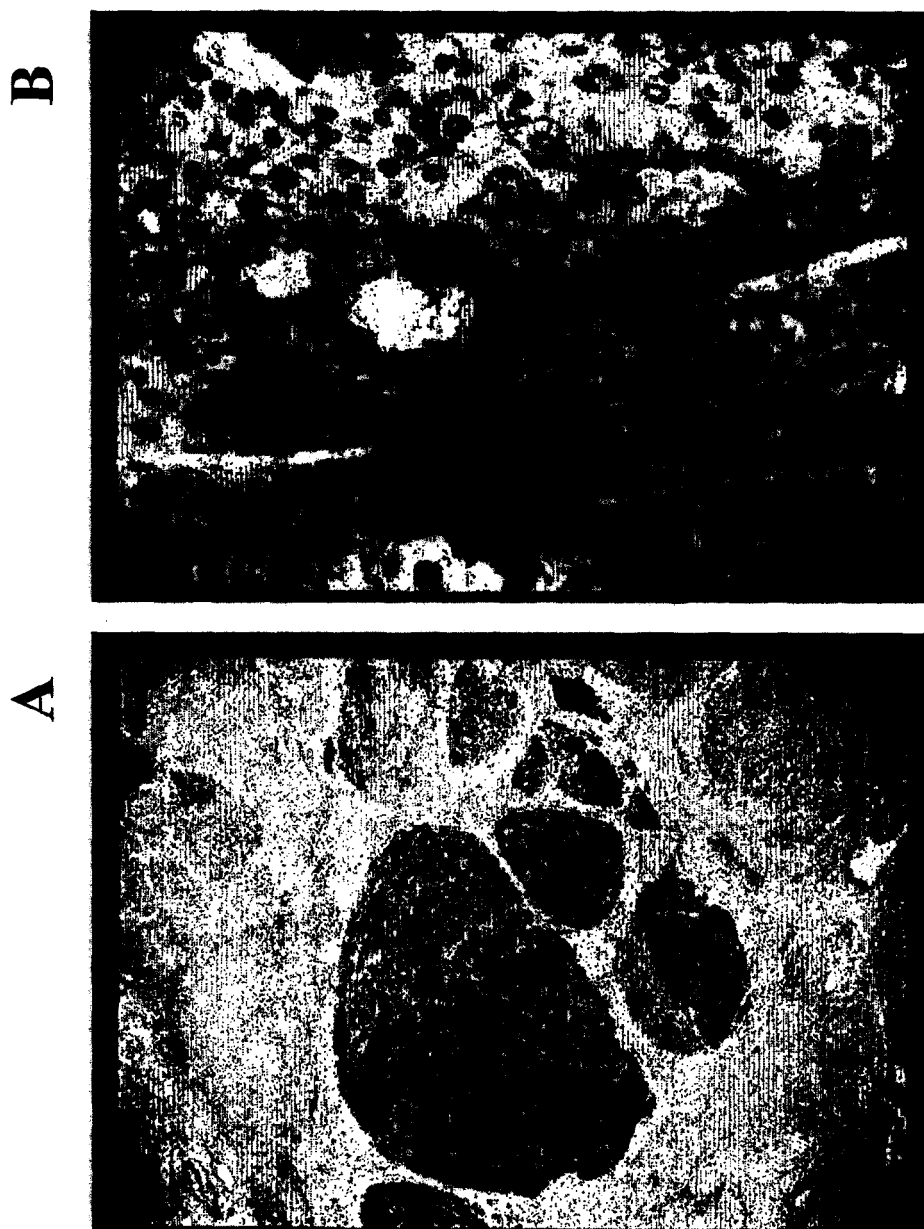


图 3

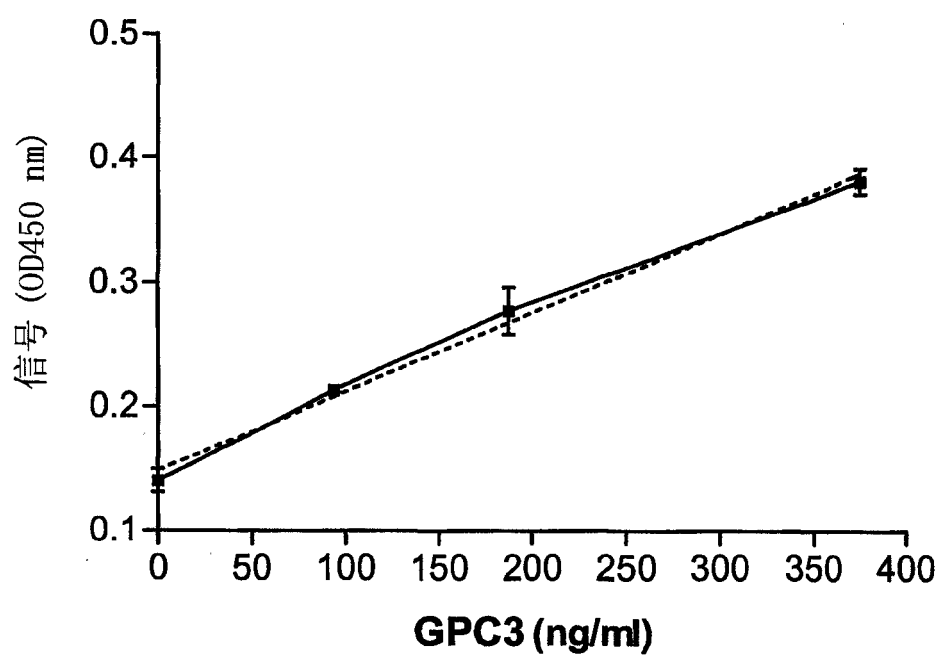


图 4

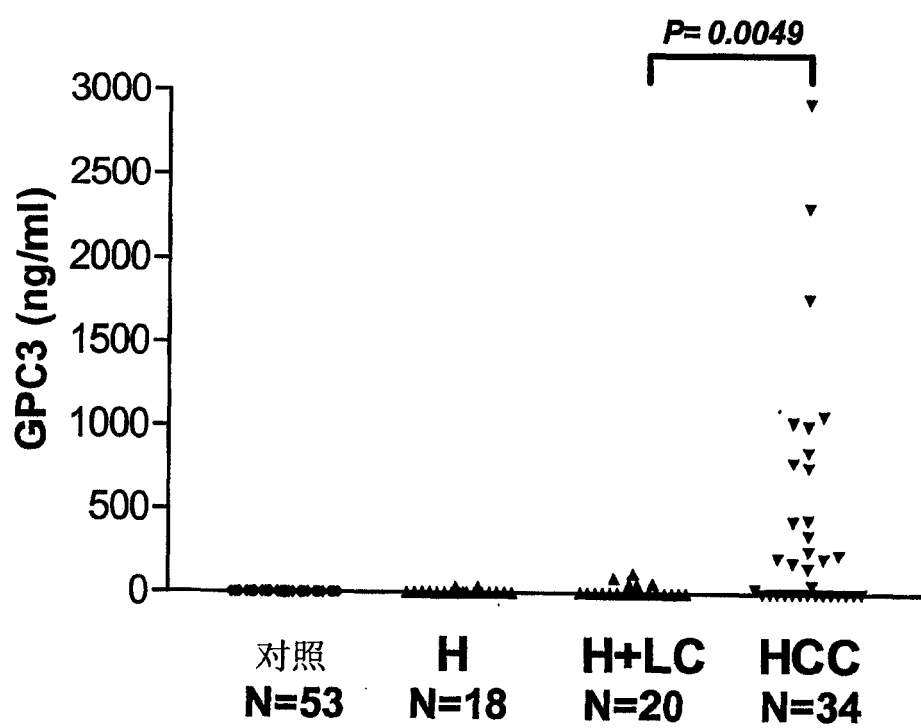


图 5

专利名称(译)	肝细胞癌的诊断		
公开(公告)号	CN1653336A	公开(公告)日	2005-08-10
申请号	CN03810791.0	申请日	2003-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	阳光溪流女子学院健康科学中心		
申请(专利权)人(译)	阳光溪流女子学院健康科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	阳光溪流女子学院健康科学中心		
[标]发明人	乔治菲尔姆斯 玛丽安娜卡普罗		
发明人	乔治·菲尔姆斯 玛丽安娜·卡普罗		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/30 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/57438 C07K16/303		
代理人(译)	刘玉华		
优先权	60/382340 2002-05-23 US		
其他公开文献	CN100401068C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于筛查个体是否患有肝细胞癌的方法，该方法通过测定所述个体体液样本中的glypican - 3(GPC3)水平来实现。本发明还公开了通过检测肝组织样本中的GPC3来诊断肝细胞癌的方法。此外还提供了能够与GPC3特异结合的抗体。

