

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4455324号  
(P4455324)

(45) 発行日 平成22年4月21日(2010.4.21)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.		F I		
<b>GO 1 N 33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/574	B
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/574	E
		GO 1 N	33/53	S
		GO 1 N	33/53	U

請求項の数 21 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2004-507835 (P2004-507835)	(73) 特許権者	500576946
(86) (22) 出願日	平成15年5月22日(2003.5.22)		サニーブルック ヘルスサイエンス センター
(65) 公表番号	特表2005-526979 (P2005-526979A)		カナダ国オンタリオ州エム4エヌ 3エム5, トロント, ベイビュー・アヴェニュー 2075
(43) 公表日	平成17年9月8日(2005.9.8)	(74) 代理人	100099623
(86) 国際出願番号	PCT/CA2003/000752		弁理士 奥山 尚一
(87) 国際公開番号	W02003/100429	(74) 代理人	100096769
(87) 国際公開日	平成15年12月4日(2003.12.4)		弁理士 有原 幸一
審査請求日	平成17年8月3日(2005.8.3)	(74) 代理人	100107319
(31) 優先権主張番号	60/382, 340		弁理士 松島 鉄男
(32) 優先日	平成14年5月23日(2002.5.23)	(74) 代理人	100114591
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 河村 英文
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肝細胞癌の診断

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者を肝細胞癌(HCC)に関してスクリーニングする方法であって、  
被験者から得られた体液サンプル中のグリピカン-3(GPC3)レベルを決定するステップ  
を含み、

検出可能なレベルのGPC3がサンプル中に存在することにより、被験者のHCCが示唆されることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記サンプル中のフェトプロテイン(AFP)レベルを決定するステップをさらに含み、前記サンプル中の検出可能なレベルのGPC3および前記サンプル中の正常なコントロール被験者のAFPレベルより高いAFPレベルにより、被験者のHCCが示唆される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記サンプル中のAFPレベルが、20ng/mlより高い、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記サンプル中のAFPレベルが、100ng/mlより高い、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記サンプル中のGPC3レベルが、免疫学的方法で決定される、請求項1~4のいずれ

10

20

れか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

ヒト G P C 3 またはその断片に特異的に結合する抗体または抗体断片を使用する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗体または断片が、ヒト G P C 3 の 70 連続したカルボキシ末端アミノ酸内のエピトープに特異的に結合する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体または断片が、ポリクローナル抗体である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体または断片が、モノクローナル抗体である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体または断片が、F a b、F ( a b ' )<sub>2</sub> および F v からなる群から選択される断片である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗体または抗体断片が、検出可能な標識を担持する、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

抗 G P C 3 抗体または抗体断片に特異的に結合し、かつシグナル発生系の成分を含む、二次抗体を使用することにより、前記抗体または抗体断片が検出される、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗 G P C 3 抗体または断片が、固体の基剤に付着されており、前記サンプルを、前記固体基質と接触させて、前記サンプル中の G P C 3 を、付着している抗 G P C 3 抗体または断片に結合させ、前記固体基剤を洗浄し、結合した G P C 3 を、抗 G P C 3 抗体または抗体断片に特異的に結合しかつシグナル発生系の成分を含む二次抗体を使用して決定する、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記二次抗体が、セイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされている、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 A F P レベルが、E L I S A アッセイで決定される、請求項 2 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記体液が、血清または血漿である、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記被験者が、ヒト被験者である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

一本鎖抗体分子、F a b 断片、F ( a b )<sub>2</sub> 断片、F v 断片およびキメラ分子からなる群から選択される、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体が、I g G、I g M、I g A、I g E、I g D およびそれらのサブクラスからなる群から選択される抗体である、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記被験者が、肝疾患の臨床徴候を示す、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

被験者を肝細胞癌 ( H C C ) に関してスクリーニングする方法であって、

肝腫瘍、又は B 型若しくは C 型肝炎の臨床徴候を示す被験者から得られた、血清、血漿又は全血の体液サンプル中のグリピカン - 3 ( G P C 3 ) レベルを決定するステップ

10

20

30

40

50

を含み、

検出可能なレベルのGPC3がサンプル中に存在することにより、被験者のHCCが示唆されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

<発明の分野>

本発明は、肝細胞癌の診断に関する。特に、本発明は、肝細胞癌のマーカーとしてのグリピカン-3のレベルを決定するための抗体および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

<発明の背景>

本発明に係る技術水準を十分に記述するために、本出願の全体にわたって様々な参考文献を引用する。これらの参考文献の開示内容を、参照することにより本開示内容に組み込むものとする。

【0003】

肝細胞癌(HCC)は、世界中で最も多くみられる充実性臓器腫瘍であり、年間100万人を超える死亡原因である(パーキン(Parkin)ら、CA Cancer J. Clin., 49:33-64(1999年)およびオクダ(Okuda)ら著、Neoplasms of the Liver in Diseases of the Liver)、第7版1236(1993年))。

【0004】

HCCの発生率は、ほとんどの西洋諸国で増加している(デューフィック(Deuffic)ら、Lancet 351:214-215(1998年))。優れた疫学研究は入手できないが、カナダ保健省(Health Canada)のデータから、男性のHCCによる死亡率は、過去15年間で、ほぼ2倍になった。ウイルス性肝炎患者の人口統計データから、この発生率が、次の10年で、また2倍になったことが示唆される(ズー(Zou)ら、Can. J. Gastroenterol., 14:575-580(2000年))。

【0005】

HCCは、通常は、初期段階では無症候性であり、原発腫瘍が小さいときでさえも、血管内または胆管内を浸潤する傾向が大きい(フォング(Fong)ら著、肝癌および癌における2分木：原理および実践腫瘍学(Cancer of the Liver and Binary Tree in Cancer: Principles & Practice Oncology)、第6版、1162-1199(2001年))。結果として、HCCは、発見されたとき、概して、進行した段階である。組織学的には、診断時に、原発性HCCのわずか10~20%が切除可能であった(フォング(Fong)ら著、肝癌および癌における2分木：原理および実践腫瘍学(Cancer of the Liver and Binary Tree in Cancer: Principles & Practice Oncology)、1162-1199(2001年))。最近になって、HCCスクリーニングプログラムの出現により、潜在的に治癒可能な腫瘍の比率が増大しているものの、ほとんどの患者は、やはり診断時に不治の疾患を有する。

【0006】

HCCは、慢性肝障害、主として慢性ウイルス性肝炎およびアルコール性肝疾患と関係がある(ラストギ(Rustgi), Gastroenterol. Clin. North Am., 16:545-551(1987年))。HCCの最高の発生率は、B型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)が地方特有である地域で確認されている。HBVの場合には、HCCが発生する相対的リスクは、慢性感染の証拠がある患者では、非感染患者より50~100倍大きいことが証明されている(ピースレイ(

10

20

30

40

50

Beasley)ら、ウイルス性肝炎および肝疾患における肝細胞癌の疫学 (Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Viral hepatitis and liver disease) 209 (1994年)。HCCの他の原因とは違って、慢性B型肝炎性硬変は、HCC発生に必要な事前条件ではない。慢性HCVに伴う相対的リスクの推定値はないが、HCVの硬変キャリアーにおけるHCCの発生率は、1年に5%に上ると考えられるのに対して、HBVキャリアーでは0.5%である (ディ・ビシェリエ (Di Bisceglie), *Semin. Liver Dis.*, 15: 64 - 69 (1995年)。持続性HCV感染は、日本におけるHCCの原因の70%の原因であり、北米で上昇するHCC発生率の最も公算が高い原因は、全市民におけるHCV感染の蔓延増加である (ハッサン (Hasan)ら、*Hepatology*, 12: 589 - 591 (1990年)、およびEI・セラグ (EI-Serag)ら、*N. Engl. J. Med.*, 340: 745 - 750 (1999年))。

10

## 【0007】

幾つかの化学物質が、HCCの発生と関連がある。その中で最も重要なものはエタノールであり、アルコール乱用は、HCCと関連がある (シッフ (Schiff), *Hepatology*, 26: 39S - 42S (1997年)およびナルパス (Nalpas)ら、*Alcohol*, 12: 17 - 120 (1995年))。エタノールは、肝硬変の誘発を介して、またはHBVおよびHCV等の他の作因との共発癌物質として、HCCを引き起こす。数種の真菌類によって生成されるアフラトキシンも、HCCと関連付けられている (ユ (Yu), *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10: 674 - 682 (1995年))。これらの真菌は、穀類、ピーナッツ、および他の食品上で増殖する傾向があり、食品損傷の最多原因である。

20

## 【0008】

HCCの診断は、占拠性病変患者では、超音波検査法またはコンピューター断層撮影法 (CT)を用いて、また500ng/mlを超える血清フェトプロテイン (AFP)で、比較的確実である (フォング (Fong)ら著、*Cancer of the Liver and Binary Tree in Cancer: Principles & Practice Oncology*)、第6版、1162 - 1199 (2001年))。しかし、AFPは診断に役立つほど上昇していないことが非常に多いため、概して、こうした条件を満たすまでに、HCCは処置不能になる。

30

## 【0009】

超音波検査法であろうと、CTスキャンまたはMRIであろうと、画像法による小病変の診断は、比較的不正確である (フォング (Fong)ら著、*Cancer of the Liver and Binary Tree in Cancer: Principles & Practice Oncology*)、第6版、1162 - 1199 (2001年)；およびムラカミ (Murakami)ら著、*Detectability of hypervascular hepatocellular carcinoma by arterial phase images of MR and spiral CT*). *Acta Radiol.*, 36: 372 - 376 (1995年))。特に、放射線学的にHCCによく似ている可能性がある2病変は、硬変性小結節および異形成小結節である。小病変の肝生検もまた、感度または特異性が不十分である (レビー (Levy)ら、*Ann. Surg.*, 234: 206 - 209 (2001年))。針生検を用いても、この手技で通常得られる検体の量が限られているため、十分に分化した癌を、良性病変と識別することは困難かもしれない (フォング (Fong)ら著、*肝臓および癌における2分木：原理および実践腫瘍学 (Cancer of the Liver and Binary Tree in Cancer: Principles & Practice Oncology)*、第6版、1162 - 1199 (2001年))。したがって、画像技術の進歩にもかかわらず、難しい症例で、HCCを良性の肝病変と識別するための適当な分子マーカーが依然として必要である。

40

50

## 【0010】

腫瘍のサイズは、HCCの肝間拡大および転移の重大な危険因子である（ユキ（Yuki）ら、Cancer, 66:2174-2179（1990年））。加えて、小さい腫瘍を有する患者に、より多くの治療選択肢を利用することができる。症候性腫瘍は、概して大きく、治療的介入の域を越える。敏感でかつ特異的なHCCマーカーが有用であろう別の状況は、等の、危険にさらされている患者、たとえばHBVの慢性キャリアーおよび硬変性HCVを有する者のスクリーニングにおいてである。このスクリーニングは広く応用されているが、疾患の緩和に有効なことを示唆するデータは、今までのところほとんどない（コリヤー（Collier）ら、Hepatology, 27:273-278（1998年））。スクリーニングが有効であることが証明されていない理由の1つは、現在使用されている血清検査、すなわち逐次AFPアッセイの、感度および特異性が低いことである（コリヤー（Collier）ら、Viral Hepatitis Reviews, 4:31-41（1998年））。

10

## 【0011】

したがって、HCCスクリーニングを向上させるためには、改良されたテストシステムが必要である。HCCのスクリーニングおよび診断に広く使用されてきた唯一の分子マーカーは、フェトプロテイン（AFP）である。このタンパク質は、卵黄嚢および肝臓により、胚発生中に大量に合成される（チャン（Chan）ら著、ティエツ（Tietz）臨床化学教科書、3版、の中の、腫瘍マーカー（Tumor Markers.Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd）, 722-749（1999年）、K, タケタ（Taketa, K）, Hepatology, 12:1420-1432（1990年））。AFP濃度は、誕生後12~18ヶ月で、<10ng/mlに、徐々に減少する。AFPは、妊娠中に、母体血清中に再び現れる。循環AFP上昇は、HCC、胃癌、肺癌、膵癌、胆管癌、および精巣癌（チャン（Chan）ら著、ティエツ（Tietz）臨床化学教科書、3版、の中の、腫瘍マーカーに関する（Tumor Markers.Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd）, 722-749（1999年））。

20

## 【0012】

20ng/mlまたはそれ以上のAFPレベルが診断に役立つと考えるのであれば、HCC症例の60~80%が検出されるが、小さい腫瘍の場合には、感度が著しく低い（40%）（トレヴィザーニ（Trevisani）ら、J.Hepatol., 34:570-575（2001年））。HCCマーカーとしてのAFP使用に伴うもう1つの問題は、特異性に欠けることである；AFPの有意な上昇（20~200ng/ml）は、かなりの数の慢性肝疾患患者で見られる（コリヤー（Collier）ら、Viral Hepatitis Reviews, 4:31-41（1998年））。慢性肝炎患者の15~58%、および硬変患者の11~47%が、高い血清AFPを有することが報告されている（タケタ（Taketa）, Hepatology, 12:1420-1432（1990年））。したがって、HCC患者および硬変患者の血清AFPレベルが重複することは珍しくなく、これが、AFPアッセイの結果の解釈を混乱させる。結果として、HCCの危険に曝されている患者に関する調査ツールとしてのAFP測定の有用性は、疑問視されてきた（シャーマン（Sherman）, J.Hepatol., 34:603-605（2001年））。そこで、AFPの測定が正当であると判断される唯一の環境は、画像技術に基づいた初期診断の確認のためであることが提唱されてきた（シャーマン（Sherman）, J.Hepatol., 34:603-605（2001年））。

30

40

## 【0013】

AFPレベルの信頼性欠如を考慮して、ほとんどのスクリーニング方式は、肝腫瘍に極めて敏感である超音波検査法を含む。しかし、超音波検査法は特異性を欠き、したがって、病変が約2cmより小さいとき、HCC、硬変性小結節および異形成小結節を、確実に識別することができない。

## 【0014】

50

この数年間で、幾つかの新しい潜在的なHCC用マーカーが研究されたが、AFPより明らかに優れたものは発見されていない(スカウ(Scow)ら、Proteomics, 1:1249-1263(2001年))。たとえば、des- -カルボキシプロトロンビンが潜在的マーカーとして提案された。しかし、この分子は、AFPと同様に、小さい腫瘍の検出に有用ではない(ノムラ(Nomura)ら、Am. J. Gastroenterol., 94:650-654(1999年))。

【0015】

1997年に、スウ(Hsu)らは、正常肝およびHCCのmRNAディファレンシャルディスプレイ分析を実施することにより、HCCで、アップレギュレートされている転写物を同定したと報告した(スウ(Hsu)ら、Cancer Res., 57:5179-5184(1997年))。彼らがMXR7と名づけたこの転写物は、結局、グリピカン-3(GPC3)であることが分かった。GPC3は、脂質尾部により細胞表面に結合されているヘパラン硫酸プロテオグリカンである(ドゥエナス・ゴンザレス(Duenas Gonzales)ら、J. Cell. Biol., 141:1407-1414(1998年))。スウ(Hsu)らは、GPC3 mRNAは、原発性および再発性HCC 191のうち143(74.8%)で発現するが、正常肝では154のうち5(3.2%)で発現するにすぎないことを発見した。

10

【0016】

第2の研究は、HCC症例の75%でGPC3 mRNAの過剰発現を確認したが、限局性結節性過形成および硬変肝では、過剰発現は検出されなかった(ジユウ(Zhu)ら、Gut, 48, 558-564(2001年))。

20

【0017】

これらの研究は、mRNAレベルのみを分析しており、また、mRNAレベルは、タンパク質発現および分泌と常に相関関係があるとは限らないことが知られている。加えて、限られた数の肝タンパク質のみが、通常は循環に分泌される。

【0018】

これらの結果から、肝組織におけるGPC3のmRNA分析は、HCCの検出に有用かもしれないが、この種の分析は、腫瘍組織の単離を必要とするため、侵襲的である。さらに、mRNA分析は多くの時間を必要とし、日常的に実施することは困難である。

【0019】

したがって、スクリーニングに使用することができる(すなわち小さいHCCを有する無症候性患者の高い比率で陽性になる)血清マーカーが必要である。超音波で小さい塊病変が確認された患者では、このテストは、HCC患者と非悪性病変を有する患者とを、確実に分けることもできなければならない。

30

【0020】

最後に、特に確定された硬変を有するHCV患者等の、高リスク人口の調査のための、より優れたHCC用分子マーカーが依然として必要である。HCCの特徴をなす高度の異質性のため、このようなマーカーの探索は非常に困難である(トルゲイルソン(Thorgeirsson)ら、Nature Genet., 31:339-346(2002年))。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

<発明の概要>

本発明者は、HCCの診断において改良された特異性を提供する、新規で、速やかで、便利かつ非侵襲的なアッセイの基礎をもたらす、新規なHCC用血清マーカーである、グリピカン-3(GPC3)を発見した。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明の一実施形態によれば、

50

被験者から体液サンプルを得るステップと、  
該サンプル中のグリピカン - 3 (GPC3) レベルを決定するステップと、  
を含み、

該サンプル中に検出可能レベルのGPC3が存在することが、被験者の肝細胞癌(HCC)を示唆することを特徴とする、肝細胞癌(HCC)について被験者をスクリーニングする方法が提供される。

【0023】

本発明のもう1つの実施形態によれば、GPC3またはその断片に特異的に結合する、実質的に精製された抗体またはその断片が提供される。

【0024】

本発明のもう1つの実施形態によれば、  
被験者から肝組織サンプルを得るステップと、  
組織サンプル中のGPC3の存在を決定するステップと  
を含み、

該サンプル中にGPC3が検出されることが、HCCを示す、  
被験者におけるHCCを診断する方法が提供される。

【0025】

本発明のもう1つの実施形態によれば、サンプル中のGPC3の存在を決定する方法であって、

サンプルを、GPC3またはその断片に特異的に結合する抗体またはその断片と接触させて、抗体-GPC3複合体、または抗体-GPC3断片複合体の形成を可能にするステップと、

抗体-GPC3または抗体-GPC3断片複合体を検出するステップと  
を含む、方法を提供する。

【0026】

本発明のもう1つの実施形態によれば、  
サンプルを、GPC3またはその断片に特異的に結合する抗体またはその断片と接触させて、抗体-GPC3複合体または抗体-GPC3断片複合体の形成を可能にするステップと、

抗体-GPC3または抗体-GPC3断片複合体を測定するステップと  
を含む、サンプル中のGPC3のレベルを決定する方法が提供される。

【0027】

本発明のもう1つの実施形態によれば、GPC3またはその断片に特異的に結合する、実質的に精製された抗体またはその断片を含む、サンプル中のGPC3を検出するため、またはGPC3のレベルを決定するための、キットが提供される。

【0028】

本発明の好ましい実施形態を、図面に関して説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

<本発明の詳細な説明>

本発明は、肝細胞癌(HCC)について哺乳動物被験者を、スクリーニングする方法を提供する。本発明者は、HCCを有する被験者の、循環中、血清または血漿中で、細胞表面プロテオグリカンGPC3を検出できるが、健常な被験者の血清または血漿中には、検出可能レベル、すなわちバックグラウンドより有意に高いレベルで存在しないことを、本明細書に記載の標準有意性検定法を使用して実証していた。肝炎、または肝炎に加えて硬変に罹患している被験者の血清または血漿中では、GPC3は、ほとんどまたは全く検出できないことも証明されている。

【0030】

したがって、被験者の体液中のGPC3レベルを測定することにより、HCCについて、被験者をスクリーニングする便利な非侵襲的方法が提供される。テストに適当な体液は

10

20

30

40

50

、血清、血漿および全血を包含する。血清または血漿のスクリーニングが好ましい。

【0031】

体液中のGPC3レベルは、該タンパク質を測定するための任意の適当な方法で測定することが可能である。GPC3レベルを測定する免疫学的方法は非常に便利であり、適当なタイプの方法は、当業者に周知であり、本明細書でさらに説明する。

【0032】

たとえば、ヒトGPC3に特異的に結合する抗体または抗体断片は、GPC3を測定するための、様々な抗体に基づくアッセイ方法の基礎をもたす。抗体GPC3複合体の形成を可能にする条件で、被験者の体液を、GPC3に特異的に結合する抗体または断片と接触させ、次いで、該複合体を検出しおよび/または該複合体のレベルを測定することによって、HCCを診断することが可能である。抗体-GPC3複合体の量は、サンプル中のGPC3のレベルと相関関係がある。

10

【0033】

本明細書で使用されるとき、かつ特に明記されていなければ、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体を包含する。

【0034】

用語「抗体断片」は、親抗体の特異性を示す抗体の一部を意味し、またFab、F(ab')<sub>2</sub>およびFv断片を包含する。

【0035】

本明細書で使用されるとき、抗体または抗体断片が、標的分子を認識して結合するが、標的分子を含有するサンプル中に存在する他の分子は、実質的に認識せず、結合しなければ、抗体または抗体断片は、標的分子に「特異的に結合する」と言われる。

20

【0036】

キメラ抗体は、異なる種に由来する抗体の一部を含有する抗体である。たとえば、キメラ抗体は、ヒト定常部および別の種に由来する可変部を有してもよい。キメラ抗体は、米国特許第5,354,847および第5,500,362号、ならび科学文献(コート(Couto)ら、Hybridoma, 12:485-489(1993年))に記載の周知の組換え方法で、作ることが可能である。

【0037】

ヒト化抗体は、抗原結合および特異性に関与する相補性決定領域だけは非ヒト起源に由来するが、抗体分子の残りの実質的に全てが、ヒトである抗体である。ヒト化抗体およびそれらの作製もまた当該技術分野で周知である。たとえば、米国特許第5,225,539号;第5,585,089号;第5,693,761号および第5,693,762号の各明細書を参照されたい。

30

【0038】

一本鎖抗体は、ペプチドまたはエピトープに特異的に結合することができるポリペプチド配列であって、該一本鎖抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の軽鎖または重鎖のいずれかに由来する。一本鎖抗体は、ヒト化、キメラまたは全ヒト抗体に由来するポリペプチドを包含し、該一本鎖抗体は、その軽鎖または重鎖のいずれかに由来する。

40

【0039】

<抗体>

<ポリクローナル抗体>

ポリクローナル抗体を作製するために、精製GPC3、ヒトまたは非ヒトを得ることが可能である。

【0040】

GPC3は、たとえば、ヒト胎盤から、たとえばボナー-バークレー(Bonner-Barkay)ら、J.Biol.Chem., v.272, pp.12415-12421(1997年)に記載の従来の方法で、精製することが可能である。

50

## 【0041】

該精製タンパク質は、必要に応じて、当該技術分野で周知のキーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質に連結させ、次いでフロイントアジュバントと混合し、ウサギまたは他の適当な実験動物に注射することが可能である。あるいは、GPC3タンパク質の全部または一部を、細菌等の適当な宿主で、適当なクローニング媒体に挿入された適切なDNA配列の発現により、組み換え技術で合成することができる。GPC3をコード化するDNAは、既述の方法でクローニングすることが可能である（フィルムス（Filmus）ら、Molec. & Cell Biol., v. 8, pp. 4243 - 4249（1988年）；リンズレイ（Linsley）ら、Ann. Rev. Immunol., v. 11, pp. 191 - 212（1993年）；ピーチ（Peach）ら、J. Exp. Med., v. 180, pp. 2049 - 2058（1994年））。同様の方法で、GPC3またはその一部を融合タンパク質として発現させることも可能である。

10

## 【0042】

大腸菌（E. coli）で組換え融合タンパク質を産生させるために広く使用されている2つの発現システムは、pURシリーズのベクターを使用するグルタチオン-S-トランスフェラーゼまたはマルトース結合タンパク質融合、およびpATHベクターを使用するtrpE融合である。

## 【0043】

次いで、発現したGPC3タンパク質を、たとえば、グルタチオンカラムを使用して精製し、必要に応じて担体タンパク質に連結させ、フロイントアジュバントと混合し（動物の抗原性応答の刺激を助けるため）、ウサギまたは他の適切な実験動物に注射することができる。1週間間隔のブースター注射後、該ウサギまたは他の実験動物から採血し、血清を単離する。血清は、すぐに使用してもよく、または使用前に、プロテインA-セファロース、抗原セファロースまたは抗マウス-Ig-セファロースを使用するアフィニティクロマトグラフィーを含む様々な方法で、精製してもよい。

20

## 【0044】

ポリクローナル抗体は、GPC3の断片を抗原として使用して作製することも可能である。GPC3アミノ酸配列由来の3つ以上連続したアミノ酸の断片を使用してもよい。70アミノ酸カルボキシ末端アミノ酸配列、またはその一部を含むGPC3断片が、好ましい抗原である。断片は、場合により、本明細書に記載の融合タンパク質として作ることも可能である。このようなペプチド抗原をキーホールリンペットヘモシアニンとコンジュゲートさせて、in vivo抗原性を改良することが可能である。

30

## 【0045】

<モノクローナル抗体>

モノクローナル抗GPC3抗体もまた、ポリクローナル抗体の作製について上述した通りに得た、精製GPC3またはその断片を、場合により融合タンパク質として、マウスに注射した後、従来の方法で作ることが可能である。

## 【0046】

簡単に記載すると、フロイントアジュバント中の該精製タンパク質またはペプチドを、たとえば3週間にわたって9回、マウスに注射する。マウス脾臓を摘除し、リン酸緩衝食塩水（PBS）中に再懸濁させる。脾細胞は、リンパ球源の役割を果たし、その一部は、適切な特異性の抗体を産生する。次いで、これらを永久増殖骨髄腫パートナー細胞と融合させ、融合産物であるハイブリドーマを、HAT等の選択剤の存在下で、多数の組織培養ウェルにプレーティングする。次いで、このウェルをELISAでスクリーニングし、GPC3に特異的な抗体を作る細胞を含有するものを識別する。次いで、これらの細胞をプレーティングし、増殖期間の後、抗体産生細胞を識別するために、これらのウェルを再度スクリーニングする。ウェルの90%以上が、抗体産生陽性である単クローンを含むまで、クローニング手順を実施する。この手順により、抗体を産生する安定したクローン系が確立される。次いで、プロテインAセファロースを使用するアフィニティクロマトグラフィー、またはイオン交換クロマトグラフィー、ならびにこれらの技術の変形および組合

40

50

せで、該モノクローナル抗体を精製することができる。

【0047】

さらなる実施形態では、GPC3特異的モノクローナル抗体由来のF(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>およびFv断片または一本鎖成分を包含するが、これらに限定されない、抗体断片を作製する。このような断片は、たとえば、リン(Lin)ら、PNAS、75(6); 2649-2653(1978年)に記載の通りに、完全な抗GPC3抗体のタンパク質分解的切断を使用して、または、このような断片をコード化する遺伝子の遺伝子操作、およびこのような抗GPC3抗体断片を分泌することができるトランスフェクション産生系の発酵によって、作製することが可能である。

【0048】

少なくとも $1 \times 10^8$ の抗原アフィニティの抗GPC3抗体が好ましい。

【0049】

様々なタイプのアッセイ形式を使用して、サンプル中のGPC3をアッセイすることができる。これらの中には、サンドイッチELISA、ラジオイムノアッセイ、蛍光免疫測定法、ドットプロット、ディップスティックおよびウエスタンプロットが含まれる。

【0050】

好ましい実施形態では、GPC3またはその断片に特異的に結合し、かつ検出可能な標識を担持する抗体が使用され、結果として生じるGPC3-抗体複合体は、該検出可能な標識を測定することによって決定され、それによって、サンプル中のGPC3レベルを決定する。あるいは、GPC3またはその断片に特異的な一次抗体を使用し、続いて、かつ直接検出可能な標識であってもよく、またはシグナル発生系の成分であってもよい、一次抗体に特異的な標識を担持する、二次抗体を使用する。このような標識抗体および系は、当該技術分野で周知である。

【0051】

適当な較正標準と比較した、標識、またはシグナル発生系で発生したシグナルの検出および決定は、サンプル中に存在するGPC3-抗体複合体、したがってGPC3の決定を可能にする。

【0052】

二次抗体は、任意の適当な直接検出可能な標識であってもよく、または任意の適当なシグナル発生系の成分であってもよい、標識を担持する。

【0053】

これらの多くの例は、イムノアッセイの分野から周知である。検出可能な標識またはシグナル発生系の成分で、二次抗体を標識することは、当該技術分野で周知の技術で実施することが可能である。抗体を検出可能にするために使用することができる標識の例としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質および化学発光物質等が挙げられる。たとえば、放射性元素を直接検出可能な標識として使用することが可能である。典型的な放射性標識としては、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>128</sup>I、および<sup>131</sup>Iなどがある。蛍光標識もまた、直接検出可能な標識として使用することが可能である。たとえば、適当なフルオロフォアとしては、クマリン、希土類金属イオン類、キレート類またはキレート錯体、フルオレイン、ローダミンおよびローダミン誘導体などがある。

【0054】

適当な標識は、金属錯体、安定なフリラジカル類、小胞、リポソーム、コロイド粒子、ラテックス粒子、スピン標識、ビオチン/アビジンおよびそれらの誘導体も包含する。

【0055】

アルカリホスファターゼ、アミラーゼ、ルシフェラーゼ、カタラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ラクタマーゼ、ウレアーゼおよびリンゴ酸デヒドロゲナーゼを包含する、酵素連結シグナル発生系を使用することが可能である。酵素の活性は、酵素を適切な基質と反応させた後、吸光度、蛍光または発光強度を測定することにより、検出することができる。酵素を標識として使用するとき、酵素と抗体との間の

10

20

30

40

50

連結は、グルタルアルデヒド、過ヨウ素酸およびマレイミド方法等の従来の方法で達成することが可能である。

【0056】

抗体の固定化に適した固体担体の役割を果たす固体マトリックスとしては、マイクロタイタープレート、たとえば、カリフォルニア州オックスナードにあるファルコン・プラスチック(Falcon Plastics, Oxnard, Calif.)から入手できるもの等、または、たとえば、普通のELISAマイクロタイタープレート(バージニア州シャンティリーのダイネックスにあるイムロンII(Immulon II, Dynex, Chantilly, VA))およびストレプトアビジン被覆ELISAマイクロタイタープレート(イリノイ州ロックフォードのピアスにあるリアクチ・バインド(Reacti-Bind, Pierce, Rockford, IL))、ならびにマイクロタイターストリップ、たとえばバージニア州アレキサンドリアにあるダイナテック(Dynatech, Alexandria, VA)から入手できるものなどがある。該ストリップまたはマイクロタイタープレートのウェルは、透明なプラスチック材料、好ましくは塩化ポリビニルまたはポリスチレンでできている。抗体固定化に有用な他の固体マトリックスとしては、便利なサイズのポリスチレンチューブ、スティックもしくはパドル、あるいはポリスチレンビーズまたはポリアクリルアミドマトリックスなどがある。

10

【0057】

抗体は、たとえば米国特許第5,352,583号に記載の、当該技術分野で周知の従来の方法で、固体担体上に固定化することができる。

20

【0058】

本発明の好ましい実施形態によれば、GPC3と特異的に結合して複合体を形成する一次抗体であって、固体担体上に固定化されている一次抗体と、体液サンプルを接触させる。十分な時間を与えて、該サンプルのGPC3を、該固定化された抗体に結合させる。次いで、該固体担体を洗浄し、一次抗体に特異的に結合し、かつ検出可能な標識で標識されているか、またはシグナル発生系を結合した、二次抗体と接触させる。サンプル中に存在する複合体の量を与える、したがってサンプル中のGPC3のレベルを決定する、固体担体に結合した標識または発生シグナルを測定する。

【0059】

さらなる実施形態によれば、該サンプルを、該固体担体上に固定化された一次抗体および標識された二次抗体に、同時に接触させる。

30

【0060】

さらなる実施形態では、二次抗体は、標識またはシグナル-発生系成分がなくてもよく、該固体担体に結合した二次抗体は、検出可能な標識またはシグナル発生系成分を担持する三次抗体を用いて測定され、該三次抗体は、結合した二次抗体に選択的に結合する。

【0061】

さらなる実施形態によれば、GPC3に特異的に結合し、かつ捕獲対(capture pair)の一方のメンバーが結合されている一次抗体と、一次抗体に結合する標識された二次抗体とに、同時にまたは段階的に、該サンプルを接触させる。次いで、結果として得られる混合物を、捕獲対の他方のメンバーが上に固定化されている固体担体と接触させる。捕獲対のメンバーの相互作用によって、該標識された複合体を該固体担体に結合するのに十分な時間を与えた後、該固体担体を洗浄し、該固体担体に結合した標識の量を測定して、サンプル中のGPC3のレベルを決定する。適当な捕獲対としては、ビオチン/ストレプトアビジンなどがある。他の好適な対は、当該技術分野で周知である。該抗体の特異性は逆であってもよい、すなわち一次抗体が該複合体に特異的に結合し、標識された二次抗体がGPC3に特異的に結合してもよい。

40

【0062】

本明細書に記載のスクリーニング方法は、健常な被験者および肝炎罹患者からのサンプルでは、GPC3を検出できず、またたみにみられる肝炎に加えて硬変に罹患した者では、無視できるレベルで確認されたため、HCCに極めて特異的と考えられる。

50

## 【0063】

HCCが診断された被験者を使用した治験では、被験者の53～55%が、151～2924 ng/mlの範囲の、検出可能な血清GPC3レベルを有していた。

## 【0064】

同じ患者で、血清AFPをHCCマーカーとして使用し、また20 ng/mlを異常の閾値として使用して、HCC患者の59%が検出された。疾患を示すAFPの閾値レベルを100 ng/mlに上げると、HCC症例の32%のみが検出された。HCC以外の多くの慢性肝疾患で20 ng/mlより高いAFPレベルが見られるため、20 ng/ml AFPという閾値レベルは、多数の擬陽性を包含する。HCC患者における上昇したGPC3レベルは、AFPレベルと良好な相関関係がないことを、本発明者は発見した(表4)。

10

## 【0065】

したがって、本発明の方法は、AFPスクリーニングで検出されないHCCを同定するために有用なさらなるツールを提供する。本発明の方法は、単独で使用してもよく、または早期および治療可能な病期のHCCを同定する力を向上させるために、従来の方法によるAFPスクリーニングに加えて使用してもよい。

## 【0066】

本発明のさらなる実施形態では、GPC3およびAFPスクリーニングを使用して、スクリーニングの高レベルAFP特異性と、GPC3スクリーニングの改良された感度とを併せ持つテストを提供することが可能である。たとえば、表4のデータからわかるように、AFPおよびGPC3血清レベルが決定され、100 ng/ml AFPという閾値を、有意性の閾値として使用した場合、HCC患者の70%が、AFPおよびGPC3の少なくとも一方の上昇を示したのに対して、HCCマーカーとして100 ng/ml AFPを単独で使用した場合には32%が、またマーカーとしてGPC3を単独で使用した場合には53%が上昇を示した。AFPおよびGPC3の両者を考慮し、20 ng/ml AFPという閾値を使用した場合、患者の82%が、AFPおよびGPC3の少なくとも一方の上昇を示した。

20

## 【0067】

本発明の血清学的GPC3アッセイは、肝腫瘍の臨床徴候を示す被験者のさらなる評価に特に有用である。該アッセイは、HCCの危険にさらされている集団、たとえば慢性B型もしくはC型肝炎の患者またはキャリアーの、スクリーニングに使用することも可能である。

30

## 【0068】

さらなる実施形態で、本発明は、肝腫瘍を呈する被験者からの肝生検サンプルを検査することにより、HCCを診断するための免疫組織化学的方法を提供する。生検で得られる肝組織サンプルは、しばしば変形した形態を示し、従来組織学的診断を困難にする。このような生検からの組織切片を、本明細書の実施例に記載の通りに、抗GPC3抗体で染色し、該切片でGPC3が検出されることは、生検が行われた腫瘍がHCCであることを示す。抗GPC3抗体は、それ自体が蛍光標識等の検出可能な標識を担持していてもよく、あるいは抗GPC3の一次抗体は、検出可能に標識された二次抗体により検出されてもよい。

40

## 【0069】

本発明はまた、GPC-3に特異的に結合する抗体も提供する。これらの抗体と同じエピトープに結合する抗体もまた、本発明の中に含まれる。該抗体は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDならびにそれらのサブクラスを含む免疫グロブリンであってもよい。

## 【0070】

さらなる実施形態では、本発明は、GPC3またはその断片に特異的に結合する、実質的に精製された抗体またはその断片を含むキットを提供する。

## 【0071】

50

さらなる実施形態では、該キットは、GPC3特異的な一次抗体が、流体サンプル中に存在するGPC3を捕獲し、および二次抗体が、捕獲されたGPC3の存在を検出する、標準的な2抗体サンドイッチアッセイ用である。捕獲抗体は、一般的には、ELISAプレート、ニトロセルロース膜、ビーズまたは当該技術分野で周知の他の担体等の、固相上に固定化されている。検出抗体は、熱量測定用標識または放射性同位元素標識で直接されているか、またはそれ自体が、検出抗体の同位元素に特異的な、標識された二次抗体で検出されるかのいずれかである。

【実施例】

【0072】

実施例は、例示する目的のために記載されており、本発明の範囲を制限する意図はない。

10

【0073】

本開示および実施例で言及されているが明白に記載されていない、化学、分子生物学、タンパク質およびペプチド生化学および免疫学の方法は、科学文献に報告されており、また当業者に周知である。

【0074】

<方法>

患者組織：肝組織サンプルは、トロント総合病院病理学部門 (Department of Pathology, Toronto General Hospital) から入手した。全ての肝標本は、外科的に切除された腫瘍および隣接した実質由来の大きい塊であった。全ての組織を、10%ホルマリンで固定し、定型的な組織検査用にパラフィン中に包埋した。

20

【0075】

患者血清：血液サンプルは、患者からの署名付同意書のもとに、HCC患者34例（患者特徴については表3参照）、肝炎に加えて肝硬変を有する患者20例（HCV 12例およびHBV 8例）、肝炎患者18例（HCV 12例、HCVに加えてHIVを有する患者1例、HCVに加えてサラセミアを有する患者1例、HCVおよびHBVの同時感染者1例およびHBV 3例）（トロント総合病院 (Toronto General Hospital)）、および健常な血液ドナー53例（サニーブロック・アンド・ウィメンズ・カレッジ・ヘルス・サイエンス・センター (Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre, Toronto, Canada) から入手した。HCCは、欧州肝疾患研究協会 (European Association for Study of Liver Disease)<sup>20</sup>のガイドラインに従って、肝生検が入手できる場合は組織学的に、または臨床情報から、診断された。血清は、直ちに遠心分離で分離させ、-20℃で凍結した。血清採取時に非悪性肝疾患（肝硬変を伴う肝炎および肝炎）を有すると診断された患者の血清は、このような採取の6ヶ月後に悪性疾患の徴候がなければ、この試験のみに含めた。

30

【0076】

細胞株：HCC細胞株HepG2、Hep3BおよびPLC-PRF-5を、MEM非必須アミノ酸溶液およびピルビン酸ナトリウム（1mM）を加えた、10%ウシ胎仔血清（FBS）（Gibco BRL）を含む最小必須培地（MEM）で培養した。該293細胞株を、DMEMおよび10%FBSで培養した。全ての細胞株は、アメリカ培養コレクション（American Type Culture Collection）から入手し、加湿した、5%CO<sub>2</sub>を含む雰囲気中で、37℃で維持した。ならし培養液（conditioned media）を得るために、血清の非存在下で、該細胞株を高密度で一晩増殖させた。回収した培地を、セントリコン（Centricon）YM-10,000フィルター（ミリポア（Millipore））を使用して濃縮した。

40

【0077】

GPC3のトランスフェクション：該293細胞系に、pEFベクター（またはコントロールとしての空ベクター）に導入された赤血球凝集素A（HA）タグ付GPC3cDNA

50

<sup>21</sup>をトランスフェクションし、800 µg/ml G418 (ギブコBRL (Gibco BRL))を用いて、トランスフェクションされた細胞をスクリーニングした。G418で選択された細胞を抗HA12CA5 MabおよびFITC-コンジュゲート二次抗体で染色した後、高レベルのGPC3を発現している細胞を、FACSで保存した。次いで、分類された細胞を組織培養で増殖させた。

#### 【0078】

抗GPC3マウスモノクローナル抗体の産生：コアタンパク質の最後の70アミノ酸を含有するHisタグ付GPC3断片50 µgの単回腹腔内注射で、Balb/Cメスマウスを免疫化した。免疫源を、チターマックス・ゴールド (Titermax Gold) (セダレーン (Cedarlane)) アジュバントで乳化した。21日後、アジュバントを含まない同一免疫原50 µgで、該マウスを追加免疫した。2日後、尾静脈から血液サンプルを採取し、対応する血清を得た。同一マウスの免疫化前血清をネガティブコントロールとして使用して、血清サンプル中の抗GPC3抗体価を、ELISAで推定した。最高の抗体価を有していたマウス2匹から得た脾細胞を、ポリエチレングルコール4000 (シグマ (Sigma)) の存在下で標準手順を使用して、SP2/0Ag14マウス骨髄腫細胞と融合させた (6:1の関係)。該融合細胞を、96ウェルプレートに入れ、MEM、10 mM HEPES、50 µM 2-メルカプトエタノール、ヌトリドーマ (Nutridoma) - CS (ロシュ (Roche)) ならびにヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン (HATサプリメント、ギブコBRL (Gibco BRL)) を加えた20% FBS中で増殖させた。ハイブリドーマ産生に関して選択するために、ウェル当たり0.05 µgのGPC3免疫原を負荷した96ウェルプレートを使用して、増殖したクローンをELISAでスクリーニングした。プレートを、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中1%のウシ血清アルブミン (BSA) で2時間ブロックし、各クローンから得られたならし培養液を加えた。セイヨウワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートさせたヤギ抗マウスIgGおよびヤギ抗マウスIgM (ストレスジェン (Stress Gen)) を、基質としてのO-フェニレンジアミン (シグマ (Sigma)) および過酸化水素と共に使用して、抗原に結合した抗GPC3抗体の存在を検出した。次いで、陽性のクローンをさらに増殖させ、それらが、GPC3トランスフェクションした293細胞を染色する力を、免疫蛍光法でテストした。1G12および8H5と名付けられた陽性のハイブリドーマを2回クローニングし、アイソストリップ (Isostrip) (ロシュ (Roche)) を使用して、それらのアイソタイプ (IgG1, K) を決定した。プロテインAカラム (バイオ・ラドから販売されているアフィ・ゲル・プロテインA MAPS IIキット (Affi-Gel Protein A MAPS II kit, Bio-Rad)) を使用して、ならし培養液上澄から抗体を精製した。

#### 【0079】

免疫蛍光：GPC3またはベクターのみトランスフェクションした293細胞を、ポリ-L-リシン処理スライド上に播種し、PBS中4%のparaホルムアルデヒドで固定した。抗GPC3 Mabまたは正常マウスIgG (サンタ・クルツ・バイオテクノロジー (Santa Cruz Biotechnology)) (15 µg/ml) と共に1時間インキュベートした後、スライドをPBSで3回洗浄し、一次抗体の結合を、FITCコンジュゲートヒツジ抗マウスIgG F(ab')<sub>2</sub>断片 (ストレスジェン (Stress Gen)) で検出した。

#### 【0080】

ウエスタンブロット分析：氷上のプロテアーゼインヒビターを含有するRIPA緩衝液 (2 mM PMSF、10 µg/ml ロイペプチン、10 µg/ml アプロチニン) 中で、細胞を30分間溶解した。タンパク質サンプルを、6% SDS-ポリアクリルアミドゲルで泳動させ、PVDF膜 (ポール・コーポレーション (Pall Corporation)) に移した。この膜を、ブロッキング緩衝液 (10 mMのTris-HCl、pH 8.0、150 mMのNaCl、0.1% Tween 20、5% 脱脂粉乳) 中、室温で1時間ブロックし、次いで、1 g/ml 1G12 Mabまたは12CA5 Mabと共に、

10

20

30

40

50

4 で一晩インキュベートした。セイヨウワサビペルオキシダーゼ抗マウスIgG二次抗体と共に1時間インキュベートした後、化学発光ECL試薬(デュボン・NEN(DuPont NEN))を使用して、タンパク質バンドを検出した。

#### 【0081】

免疫組織化学：パラフィン包埋組織切片を、キシレンで脱パラフィン処理し、段階的な一連のエタノール溶液で再水和した。次いで、ケンモア(Kenmore)電子レンジで(出力10で2分、出力6で1.5分および出力9で2.5分、さらにこれらの3段階を2回繰り返す)、10mMクエン酸緩衝液pH6中のスライドを加熱して、抗原回復技術を実施した。このスライドを蒸留水ですすぎ、段階的な一連のエタノール溶液で脱水し、メタノール中10%の過酸化水素中に10分間浸漬して、内因性ペルオキシダーゼをブロッ

クした。このスライドを再水和し、ヒストステイン-SPキット(Histostain-SP kit)(ザイメッド・ラボラトリーズ(Zymed Laboratories))およびTSATMビオチン・システム(TSATM Biotin System)(NENライフ・サイエンス・プロダクツ(NEN Life Science Products))の説明書に従って、20µg/mlの抗GPC3 Mabを(またはネガティブコントロールとして正常マウスIgGおよびPBSを)を使用して、免疫染色を実施した。、1/400の希釈率の、AFPに対するウサギポリクローナル抗体(ダコ(Dako), A008)で連続切片を染色した。内因性ペルオキシダーゼを過酸化水素水でブロッ

クし、ウルトラHRPシステム(Ultra HRP system)(IDラズ(ID Labs))で抗体結合を検出した。

10

20

#### 【0082】

サンドイッチELISA：96ウェルELISAプレートを、ウェル当たり、0.5µgの抗GPC3 Mab 1G12を含むPBS 50µlで覆った。このプレートをPBS中1%のBSAで2時間ブロックし、希釈した血清サンプル(PBSで1:3)50µlを加え、4 で一晩インキュベートした。PBS中0.1%のBSAで未結合材料を洗浄した後、抗GPC3 ヒツジポリクローナル抗体<sup>22</sup>を使用して、結合したGPC3を検出し、続いて、O-フェニレンジアミン(シグマ(Sigma))および過酸化水素を基質として使用して、セイヨウワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートさせたロバ抗ヒツジIgG(シグマ(Sigma))と共にインキュベートした。血清中に存在するGPC3を定量化するために、同一希釈の正常血清のプールに加えた精製GPC3の検量線を、並行して実施した。正常な血清中におけるGPC3の存在を決定するために、PBSでGPC3検量線を作成した。各サンプルを3回×4倍測定した。

30

#### 【0083】

統計解析：群間差の有意性を、マン・ホイットニー(Mann-Whitney)検定で決定した。

#### 【0084】

血清学的AFP濃度：並行血清サンプル中のAFPレベルを、市販のELISAキット(アボットから販売されているアキシム(AxSYM, Abbott))で測定した。

#### 【0085】

<実施例1：GPC3に対するポリクローナル抗体の作製および特性決定>

ヒトGPC3の70個連続したC末端アミノ酸をコード化しているクローン化GPC3のcDNA(フィルムス(Filmus)ら、上掲)の一部を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質として、従来の大腸菌発現システムで発現させた。

40

#### 【0086】

標準プロトコールを使用してヒツジを免疫化するために、グルタチオンカラムで精製した、融合タンパク質を使用した。70アミノ酸免疫原に対するポリクローナル抗体を、「抗体、実験マニュアル」、ハーローら編、1988年コールド・スプリング・ハーバー発行、("Antibodies, a Laboratory Manual", (1988), Ed. Harlow et al., Cold Spring Harbor.)に記載の従来の方法で、アフィニティ精製した。該ポリクローナル抗体を、ウエスタンブロッ

50

トおよび免疫沈降試験に使用した。

【0087】

<実施例2：GPC3に対するモノクローナル抗体を生じるハイブリドーマの作製>

同一免疫原である、ヒトGPC3のC末端70アミノ酸を含むGST融合タンパク質を使用して、モノクローナル抗体を作った。この70アミノ酸領域は、生物種間で保存される最小のものであり、したがって、ヒトGPC3に特異的な抗体を生じさせるために使用される。ハイブリドーマは、たとえばケーラーおよびミルスタイン(Kohler and Milstein), Nature, 256:495-497, (1975年)に記載の、当業者に周知の方法を使用して生じさせる。

【0088】

簡単に記載すると、チターマックス・ゴールド(Titermax Gold(商標)) (セダレーン(Cedarlane)) アジュバントで乳化したヒスタグ付カルボキシル末端70アミノ酸ヒトGPC3断片50μgを含む単回腹腔内注射で、Balb/Cメスマウスを免疫化した。21日後、アジュバントを含まない同一免疫原50μgで、マウスを追加免疫した。2日後、尾静脈から血液サンプルを採取し、血清を得た。同一マウスの免疫化前血清をネガティブコントロールとして使用して、血清サンプル中の抗GPC3抗体価をテストした。酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)で推定した。標準手順(Parkin, D.M., ピサニ(Pisani), P. & フェーレイ(Ferlay), J.著、包括的癌統計学(Global Cancer statistics)。CA Cancer J. Clin., 49, 33-64, 1, (1999年))を使用し、ポリエチレングルコール4000(シグマ(Sigma))を用いて、最高の抗体価を有していたマウス2匹から得た脾細胞を、SP2/O Ag14マウス骨髄腫細胞と融合させた(6:1の関係)。該融合細胞を、96ウェルプレート中の、MEM、10mM Hepes、50μM 2-メルカプトエタノール、成長因子源としてのヌトリドーマ(Nutridoma)-CS(商標)(ロシュ(Roche))ならびにハイブリッドを選択するためのヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HATサプリメント、ギブコBRL(Gibco BRL))を加えた20%FBS中にプレATINGした。カルボキシル末端GPC3断片0.05μg/ウェルを負荷した96ウェルプレートを使用して、得られたクローンをELISAでスクリーニングした。このプレートを、リン酸緩衝食塩水(PBS)中1%のウシ血清アルブミン(BSA)で2時間ブロックし、ならし培地上澄と共にインキュベートした。セイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートさせたヤギ抗マウスIgGおよびヤギ抗マウスIgM(ストレスジェン(Stress Gen)(商標))を、基質としてのO-フェニレンジアミン(シグマ(Sigma))および過酸化水素と共に使用して、一次抗体の結合を検出した。GPC3をトランスフェクションした細胞を使用して、免疫蛍光により、陽性クローンを再スクリーニングした。選択されたハイブリドーマ(1G12および8H5)を2回クローニングし、アイソストリップ(Isostrip)(商標)(ロシュ(Roche))を使用して、それらのアイソタイプを決定し(IgG1、K)、プロテインAカラムクロマトグラフィー・アフィ・ゲル・プロテインA MAPS IIキット(Affi-Gel Protein A MAPS II kit)(バイオ・ラド(Bio-Rad)(商標))を使用して、ならし培地上澄からそれらを精製した。

【0089】

ハイブリドーマにより産生された、70アミノ酸GPC3断片に対する抗体を、ELISAを使用してスクリーニングした。次いで、GPC3をトランスフェクションした細胞を特異的に染色する能力について、陽性のクローンをテストした。2つのハイブリドーマ(1G12および8H5)が、GPC3をトランスフェクションした細胞の、強くかつ特異的な免疫染色を示す抗体を産生した。図1は、1G12抗体に続いて、蛍光性の二次抗体を用いた、293細胞の染色を示す。パネルAおよびCは、位相差顕微鏡写真であり、パネルBおよびDは、蛍光顕微鏡写真である。パネルAおよびBは、ベクターのみをトランスフェクションした293細胞を示し、パネルCおよびDは、GPC3含有ベクターに

10

20

30

40

50

よりトランスフェクションした細胞を示す。この実施例では、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のモノクローナル抗体 (mAb) 1G12の存在下で、細胞を染色した。パネルDは、mAb 1G12による特異的染色を明らかに示す。ベクターのみでトランスフェクションした細胞では、染色は見られない (パネルB)。

【0090】

<実施例3：モノクローナル抗体の特性決定>

1G12および8H5ハイブリドーマにより産生された2つのモノクローナル抗体の特異性を、HAタグ付GPC3をトランスフェクションした細胞からのタンパク質溶解物のウエスタンブロット分析で確認した。図2から分かる通り、抗体1G12は、GPC3コアタンパク質に相当するバンド、およびGPC3のグリカン化形に相当するスミアを検出した。コントロールとして、抗HA抗体 (12CA5) を用いて、ウエスタンブロットを並行実施した。

10

【0091】

<実施例4：組織切片におけるGPC3>

HCC腫瘍および周囲の非悪性細胞のパラフィン切片を、上述の通り、抗GPC3モノクローナル抗体1G12で免疫組織化学的に染色した。該抗GPC3抗体は、ビオチン化抗マウス免疫グロブリン二次抗体を使用して検出し、結合した二次抗体は、セイヨウワサビ過酸化物質にコンジュゲートしたストレプトアビジンを使用して検出した。図3は、抗GPC3モノクローナル抗体1G12は、腫瘍細胞に強く結合したが、正常な肝細胞とは全く結合しなかったことを示す。予想通り、細胞膜上にGPC3が存在したのに加えて、細胞質内の顕著な染色もみられた。細胞質の染色は、大部分は粒状であり、また細胞表面に近かった。時々、核周囲の染色が確認された。非実質細胞は、マクロファージ以外は、一般に陰性であった。以上の結果から、GPC3の検出により、肝組織切片におけるHCCを診断するために、抗GPC3モノクローナル抗体を使用できることが分かる。

20

【0092】

<実施例5：悪性病変および良性病変におけるGPC3発現の*in vitro*決定>

表1に、15の異なる肝細胞癌と反応するGPC3に対するモノクローナル抗体の免疫組織化学的研究の結果をまとめる。これらのHCCのうち12 (80%) は、GPC3に対するモノクローナル抗体と反応した。各腫瘍で、抗GPC3 mAbと反応した、染色された細胞の数には幾らかのばらつきがあった。陽性細胞は、通常はクローン様領域内に密集していた。全例で、腫瘍周囲の非悪性肝細胞は陰性であった。

30

【0093】

## 【表 1】

表 1. HCCにおけるGPC3発現

HCCの受入番号	mAb 1G12	mAb 8H5	陽性細胞率%
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	-

10

20

## 【0094】

表 2 に、抗 GPC3 モノクローナル抗体と悪性および非悪性肝組織との反応の結果をまとめる。6つの肝腺腫および9つの肝異形成は、GPC3陰性であった。

30

## 【0095】

## 【表 2】

表 2. 非悪性肝組織におけるGPC3発現

肝組織のタイプ	テストした組織タイプ数	GPC3発現 (%)
HCC	23	19 (83%)
高悪性度異形成	3	0 (0%)
低悪性度異形成	6	0 (0%)
肝細胞腺腫	6	0 (0%)
正常肝	34	0 (0%)

40

## 【0096】

データから、GPC3は、正常肝および良性病変で発現されないが、HCCの大半が検出可能なレベルのグリピカン-3を発現することが分かる。

## 【0097】

<実施例 6 : GPC3 検出用免疫学的アッセイ >

50

サンドイッチ E L I S A を使用して、H C C を有すると診断された患者の血清中 G P C 3 を決定した。E L I S A の場合、96 ウェルプレートに抗 G P C 3 モノクローナル抗体 1 G 1 2 で被覆し、被験血清のアリコートを加えた。未結合材料を洗浄により除去し、実施例 1 の場合と同様に調製して、免疫複合体の存在を検出するのに有用な検出試薬と直接または間接に複合体形成した抗 G P C 3 ヒツジポリクローナル抗体を使用して、結合した G P C 3 を検出した。サンプルの光学密度を測定し、標準曲線の結果と比較した。図 4 は、該アッセイ用の標準曲線を示す。アッセイの結果は、試験した範囲内で、直線状であった。

【 0 0 9 8 】

トロント総合病院 ( T o r o n t o G e n e r a l H o s p i t a l ) で H C C の治療を受けており、かつ書面による同意が得られた患者から、血清を得るためのプロトコルを確立した。予備研究で、確定された H C C 患者 9 例から血清を得た。血液ドナー 3 8 人から正常な血清も得て、プールした。サンプルの 1 : 3 ( 血清 : P B S ) 希釈物を使用して、サンドイッチ E L I S A アッセイで G P C 3 レベルを測定した。各サンプルを四重に分析した。各サンプルから得た O D を、正常な血清のプールの同一希釈液に様々な量の G P C 3 を加えることによって作成した標準曲線と比較することにより、G P C 3 濃度を得た。

【 0 0 9 9 】

表 3 に、研究結果をまとめる。H C C 患者 9 例中 5 例 ( 5 5 % ) が、有意に上昇した G P C 3 値を有していた。これらの患者の中で、有意に上昇した A F P レベルを有する者はいなかった。正常なサンプルのいずれでも、G P C 3 は検出できなかった。

【 0 1 0 0 】

【表 3】

表 3

患者番号	G P C 3 レベル (ng/ml)	標準誤差	p
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
プールした正常な血清	0	10.1	

\*正常な血清と有意に異なる

【 0 1 0 1 】

健常者 5 3 例、肝炎患者 1 8 例、肝炎に加えて硬変を有する患者 2 0 例、および H C C 患者 3 4 例における血清 G P C 3 レベル測定するために、サンドイッチ E L I S A を使用して、さらに研究を実施した。G P C 3 は、全ての健常者で検出できず、また H C C 患者 3 4 例中 1 8 例 ( 感度 5 3 % ) が有意に上昇した血清 G P C 3 レベルを有し、その値は 1 5 1 ~ 2 9 2 4 n g / m l の範囲であった ( 図 5 および表 4 ) 。加えて、G P C 3 は、全ての肝炎患者で検出できず、肝炎に加えて硬変を有する患者 2 0 例中 1 例 ( 5 % ) のみで検出され、そのレベルは 1 1 7 n g / m l であった ( 9 5 % 特異性 ) 。マン・ホイットニ

－ ( M a n n - W h i t n e y ) 検定を使用した統計解析は、HCC患者におけるGPC3の平均血清レベル ( n g / m l ) は、肝炎に加えて硬変を有する患者、肝炎患者および健常なドナーより有意に高く、また最後の3群間に有意差はなかった。

【 0 1 0 2 】

< 実施例 7 : G P C 3 レベルおよび A F P レベルの比較 >

市販の E L I S A ( アボットから販売されているアキシム ( A x s y m , A b b o t t ) ) を使用して、実施例 6 に記載の、同一セットの H C C 患者 3 4 例で、血清 A F P レベルを測定した。表 4 に、得られた A F P 値および G P C 3 値の比較を示す。

【 0 1 0 3 】

【表 4】

10

表 4 : H C C 患者における G P C 3 および A F P の血清濃度

患者番号	G P C 3 (ng/ml)	A F P (ng/ml)	病因
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およびHCV
9	755	<5	HBV
10	445	14428	不明
11	433	10	HBV
12	351	7809	HCV
13	252	8629	HCV
14	235	1628	HCV
15	214	78	アルコール性
16	211	<5	アルコール性
17	184	5	HBV
18	151	40	アルコール性
19	47	52000	アルコール性
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	不明
27	0	5	アルコール性
28	0	2603	不明
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

20

30

40

【 0 1 0 4 】

本発明は、本明細書に記載の実施形態の特徴に限定されるのではなく、特許請求の範囲の範囲内の全ての変更および修飾を含む。

【 図面の簡単な説明 】

50

【0105】

【図1】抗GPC3モノクローナル抗体1G12で染色した、GPC3をトランスフェクションした293細胞（パネルCおよびD）およびベクターのみでトランスフェクションしたコントロール細胞（パネルAおよびB）の顕微鏡写真を示す。パネルAおよびCは、位相差顕微鏡写真であり、パネルBおよびDは、蛍光顕微鏡写真である。

【図2】ベクターのみ（EF）またはHAタグ付GPC3（GPC3）によりトランスフェクションした293細胞由来のタンパク質のウエスタンブロット（WB）分析を示す図である。膜を、抗GPC3抗体1G12または抗HA抗体（12CA5）とインキュベートした。中実の矢印：GPC3コアタンパク質；アウトライン形の矢印：グリカン化形のGPC3；矢じり：1G12により検出される、エピトープを含まない、GPC3のN末端を含む切断生成物。右側の数字は、分子量マーカーに対応する。

10

【図3】モノクローナル抗体1G12を使用して、免疫組織化学的に染色された肝細胞癌の切片の顕微鏡写真を示す。パネルA：染色されていない非腫瘍肝組織（N）に包囲された、高度GPC3陽性のHCC（T）の、全体像（16倍）；パネルB：細胞質顆粒および膜染色を示す同一組織の全体像（400倍）。

【図4】GPC3用のELISAアッセイにおける、GPC3濃度と光学密度との間の関係を示す図である。

【図5】ELISAで測定された、コントロール、肝炎患者（H）、肝炎に加えて硬変を有する患者（H+LC）および肝細胞癌患者（HCC）の血清中GPC3レベルを示す図であり、示した結果は、4重の平均値を表す。HCC患者および硬変患者の平均GPC3値間の有意差を、図の上部に示す。

20

【図1】

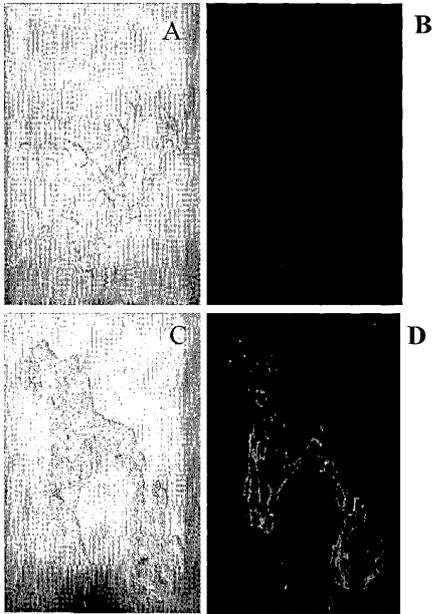


Figure 1

【図2】

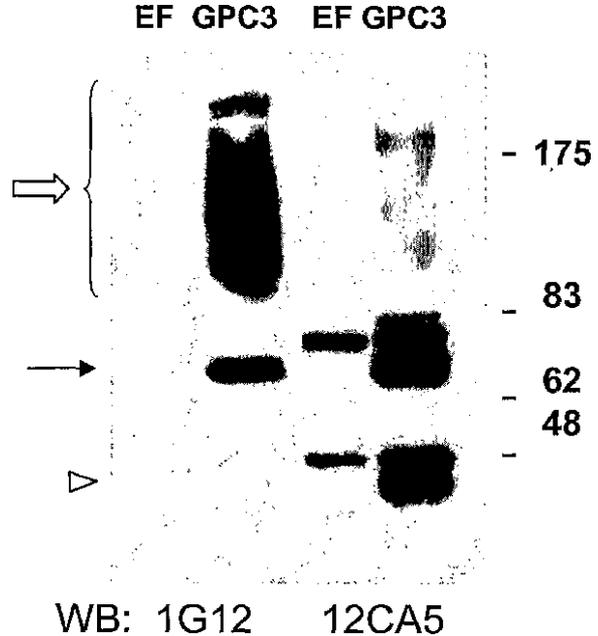


Figure 2

【 図 3 】

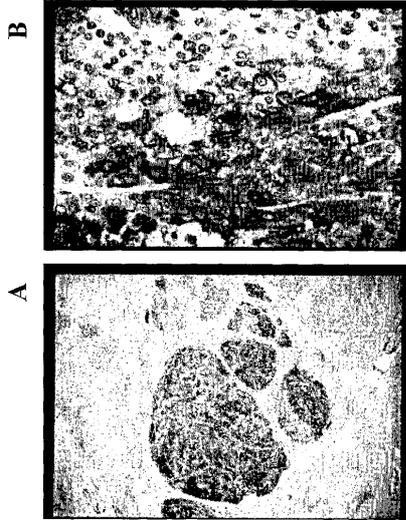


Figure 3

【 図 4 】

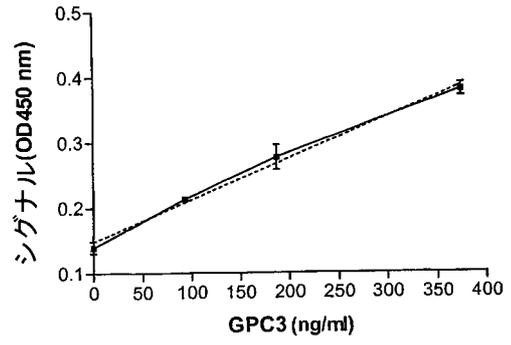


Figure 4

【 図 5 】

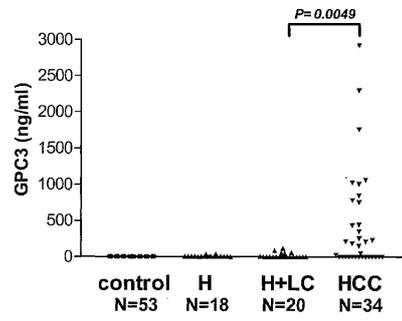


Figure 5

## フロントページの続き

- (74)代理人 100118407  
弁理士 吉田 尚美
- (74)代理人 100125380  
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100125036  
弁理士 深川 英里
- (74)代理人 100142996  
弁理士 森本 聡二
- (74)代理人 100154298  
弁理士 角田 恭子
- (74)代理人 100156443  
弁理士 松崎 隆
- (72)発明者 フィルムス, ホルヘ  
カナダ国オンタリオ州エム4エヌ 3エム5, トロント, ベイヴュー・アヴェニュー 2075,  
ルーム エス218, サニーブルック・アンド・ウィメンズ・カレッジ・ヘルス・サイエンシズ・  
センター内
- (72)発明者 カプーロ, マリアーナ  
カナダ国オンタリオ州エム4エヌ 3エム5, トロント, ベイヴュー・アヴェニュー 2075,  
ルーム エス218, サニーブルック・アンド・ウィメンズ・カレッジ・ヘルス・サイエンシズ・  
センター内

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開平03-043078(JP, A)  
国際公開第01/020333(WO, A1)  
国際公開第00/023109(WO, A1)  
国際公開第99/037764(WO, A1)  
国際公開第03/000883(WO, A1)  
特開2002-209591(JP, A)  
Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res, 2002年, Vol.43, Page.219 #1097  
Cancer Res, 1997年, Vol.57, No.22, Page.5179-5184  
Gut, 2001年, Vol.48, No.4, Page.558-564

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/574  
G01N 33/53  
CAPIus/BIOSIS/MEDLINE(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	HCC的诊断		
公开(公告)号	<a href="#">JP4455324B2</a>	公开(公告)日	2010-04-21
申请号	JP2004507835	申请日	2003-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	森尼布鲁克和女子学院健康科学中心		
申请(专利权)人(译)	森尼布鲁克和女子学院健康科学中心		
当前申请(专利权)人(译)	Sunnybrook健康科学中心		
[标]发明人	フィルムスホルヘ カプーロマリアーナ		
发明人	フィルムス,ホルヘ カプーロ,マリアーナ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 C07K16/18 C07K16/30 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/574.B G01N33/574.E G01N33/53.S G01N33/53.U		
代理人(译)	河村 英文 吉田直美 中村綾子 角田恭子 松崎隆		
审查员(译)	三木隆		
优先权	60/382340 2002-05-23 US		
其他公开文献	JP2005526979A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供了一种通过确定受试者的体液样品中glypican-3 ( GPC3 ) 的水平来筛选受试者的肝细胞癌的方法。通过检测肝组织样品中的GPC3，提供了诊断肝细胞癌的其他方法。还提供了与GPC3特异性结合的抗体。

肝組織のタイプ	テストした組織タイプ数	GPC3発現 (%)
HCC	23	19 (83%)
高悪性度異形成	3	0 (0%)
低悪性度異形成	6	0 (0%)
肝細胞腺腫	6	0 (0%)
正常肝	34	0 (0%)