

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780040670.4

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101553728A

[22] 申请日 2007.11.28

[21] 申请号 200780040670.4

[30] 优先权

[32] 2006.11.28 [33] US [31] 60/861,318

[86] 国际申请 PCT/CN2007/003354 2007.11.28

[87] 国际公布 WO2008/064570 英 2008.6.5

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.30

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 张兆恬 何颂怡 范上达

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋 付 磊

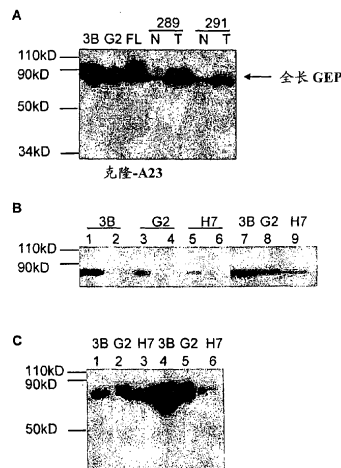
权利要求书 3 页 说明书 26 页 序列表 5 页
附图 11 页

[54] 发明名称

颗粒体蛋白 - 上皮素前体 (GEP) 抗体用于检测
和抑制肝细胞癌 (HCC) 的用途

[57] 摘要

本发明提供检测血清 GEP 水平的方法。本发明进一步提供通过检测血清 GEP 水平确定患者是否患有肝细胞癌 (HCC) 的方法。在另一个实施方案中, 本发明提供用抗 - GEP 单克隆抗体 A23 治疗患者从而在体外和体内均抑制 HCC 生长和发展的方法。



1. 一种检测生物样品中的 GEP 蛋白的方法，包括以下步骤：
在包被抗-GEP 单克隆抗体的 ELISA 板中温育所述样品；
将所述板与抗-GEP 多克隆抗体温育；和
将所述板与缀合辣根过氧化物酶的抗兔 IgG 温育；
与 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)温育；和
记录样品的光密度。
2. 权利要求 1 的方法，其中抗-GEP 单克隆抗体由 GEP 特异性肽在小鼠中产生。
3. 权利要求 1 的方法，其中抗-GEP 单克隆抗体由 SEQ ID No. 3 所示的 GEP 特异性肽产生。
4. 权利要求 1 的方法，其中抗-GEP 多克隆抗体由 GEP 特异性肽在兔中产生。
5. 权利要求 1 的方法，其中抗-GEP 多克隆抗体由 SEQ ID No. 4 所示的 GEP 特异性肽产生。
6. 一种确定患者是否患有肝细胞癌(HCC)的方法，包括以下步骤：
由所述患者收集生物样品；
在包被抗-GEP 单克隆抗体的 ELISA 板中温育所述样品；
将所述板与抗-GEP 多克隆抗体温育；
将所述板与缀合辣根过氧化物酶的抗兔 IgG 温育；
将所述板与 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)温育；
记录所述样品的光密度，
相对于纯化的 GEP 的校准曲线确定 GEP 水平；和
将 GEP 水平与已知标准品比较确定所述样品的 HCC 风险。
7. 权利要求 6 的方法，其中抗-GEP 单克隆抗体在小鼠或兔中由 GEP 特异性肽产生。

8. 权利要求6的方法,其中抗-GEP单克隆抗体由SEQ ID No. 3所示的GEP特异性肽产生。

9. 权利要求6的方法,其中抗-GEP多克隆抗体由在兔中免疫接种的GEP特异性肽产生。

10. 权利要求6的方法,其中抗-GEP多克隆抗体由SEQ ID No. 4所示的GEP特异性肽产生。

11. 一种在患有肝细胞癌的患者中抑制肝细胞癌生长的方法,包括给予所述患者在药学上有效的溶媒中的有效量的抗-GEP抗体。

12. 权利要求11的方法,其中所述抗-GEP抗体可以腹膜内、静脉内或肿瘤内给予。

13. 权利要求1的方法,其中所述抗-GEP单克隆抗体由SEQ ID No. 2中的GEP特异性肽产生,所述GEP特异性肽位于SEQ ID No. 4、5、6、7、8、9、10、11、12或13所示的区域或所述区域周围。

14. 权利要求1的方法,其中所述抗-GEP多克隆抗体由SEQ ID No. 2中的GEP特异性肽产生,所述GEP特异性肽位于SEQ ID No. 3、5、6、7、8、9、10、11、12或13所示的区域或所述区域周围。

15. 权利要求6的方法,其中所述抗-GEP单克隆抗体由SEQ ID No. 2中的GEP特异性肽产生,所述GEP特异性肽位于SEQ ID No. 4、5、6、7、8、9、10、11、12或13所示的区域或所述区域周围。

16. 权利要求6的方法,其中所述抗-GEP多克隆抗体由SEQ ID No. 2中的GEP特异性肽产生,所述GEP特异性肽位于SEQ ID No. 3、5、6、7、8、9、10、11、12或13所示的区域或所述区域周围。

17. 一种抑制患者肝细胞癌(HCC)生长的方法,包括给予所述患者有效量的权利要求15所述的抗-GEP单克隆抗体以抑制HCC生长。

18. 权利要求17的方法,其中所述抗-GEP单克隆抗体可以通过腹膜内、静脉内或肿瘤内给予。

19. 一种使用权利要求16所述的抗-GEP多克隆抗体抑制患者肝细胞癌生长的方法。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述抗-GEP 多克隆抗体可以腹膜内、静脉内或肿瘤内给予。

21. 一种药物组合物，其在药学上可接受的溶媒中含有有效量的抗-GEP 单克隆抗体 A23 以抑制 HCC 细胞增殖或生长。

22. 一种抑制患有 HCC 的哺乳动物的 HCC 细胞增殖或生长的方法，包括给予所述哺乳动物有效量的抗-GEP 单克隆抗体以抑制 HCC 细胞增殖或生长。

23. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样品可以为血液、血清、血浆或尿。

24. 权利要求 6 的方法，其中所述生物样品可以为血液、血清、血浆或尿。

25. 权利要求 1 的方法，其中所述抗-GEP 抗体由涉及 SEQ ID No. 1 中的 GEP 特异性区域的试剂产生，所述 GEP 特异性区域位于 SEQ ID No. 3a、4a、5a、6a、7a、8a、9a、10a、11a、12a 或 13a 中所示的区域或所述区域周围。

26. 权利要求 6 的方法，其中所述抗-GEP 抗体由涉及 SEQ ID No. 1 中的 GEP 特异性区域的试剂产生，所述 GEP 特异性区域位于 SEQ ID No. 3a、4a、5a、6a、7a、8a、9a、10a、11a、12a 或 13a 中所示的区域或所述区域周围。

27. 权利要求 11 的方法，其中所述抗-GEP 抗体由涉及 SEQ ID No. 1 中的特异性区域的试剂产生，所述特异性区域位于 SEQ ID No. 3a、4a、5a、6a、7a、8a、9a、10a、11a、12a 或 13a 中所示的区域或所述区域周围。

颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)抗体 用于检测和抑制肝细胞癌(HCC)的用途

相关申请的交叉参考

本申请为 2004 年 4 月 29 日提交的美国专利申请序号 10/836,390 的部分继续申请。本申请还要求 2006 年 11 月 28 日提交的美国临时专利申请号 60/861,318 的优先权。前述每个申请的全部内容均通过引用加入到本申请中。

发明领域

本发明涉及颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)及影响 GEP 在肝细胞癌(HCC)中的表达、翻译和生物活性的方法。本发明的另一方面涉及 GEP 的检测方法，其是诊断和治疗 HCC 的可能方法。

本文以括注阿拉伯数字提到了若干出版物。这些参考文献的完整引用可见于权利要求书之前的说明书结尾处。这些出版物的全部内容通过引用加入到本申请中。

发明背景

肝癌是全世界第五大常见癌症并且是第三大癌症杀手，每年大约有 50 万新病例和几乎同样多的死亡人数(1,2)。肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌的主要组织学类型。在亚洲发生 HCC 的主要风险因素是乙型肝炎病毒(HBV)感染，而在西方国家和日本丙型肝炎病毒(HCV)感染是主要的风险因素。患有肝细胞癌的 HCC 患者的预后一般较差，中位存活时间不足 1 年，因为多数肝细胞癌是不可切除的，不适于新的治疗形式，化疗有效率低。手术切除（如部分肝切除术或肝移植）对于肝细胞癌是有疗效的治疗(3-5)。然而，仅 20%的患者适合手术，因

为大部分患者在肝内和/或肝外转移的晚期才被诊断出来。在治疗性手术之后常见复发，第一年的复发率为约 50% (6)。因此，HCC 的早期检测是改善存活所必需的。开发可在无症状患者中检测出早期癌症的血清学诊断检验应是一个重要努力方向。

目前，血清甲胎蛋白(AFP)已广泛用于 HCC 诊断(7)。然而，用于共存肝病患者检测 HCC 的血清 AFP 截取值还没有达成一致，所述值的范围为 10-500 ng/ml (8-10)。血清 AFP 检验在以常规的 500 ng/ml 较高截取值使用时，在共存肝病患者中检测 HCC 的存在情况方面显示出约 50%的灵敏度和 90%以上的特异性(9)。在以 10-19 ng/ml 之间的较低截取值使用时，血清 AFP 检验的灵敏度为 45%-100%，特异性为 70%-95% (10)。因此，为了更好地诊断 HCC，迫切需要鉴定具有更好的灵敏度和特异性的新生物标记。

颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)(核苷酸序列 SEQ ID No. 1 和氨基酸序列 SEQ ID No. 2)是自分泌生长因子，属于非典型性生长因子家族。在我们较早前的 cDNA 微阵列研究中报道了 HCC 组织中的 GEP mRNA 水平明显升高(11)。本发明人已在不同患者中进一步证实了该观察结果，并证实 GEP 蛋白在 HCC 组织中被上调，但在它们的邻接非肿瘤肝组织(肝炎和硬化肝)和正常肝中没有被上调(12)。在我们的较早前的研究中，功能性研究表明，GEP 控制 HCC 细胞增殖速率、侵袭和转移(12)。由于 GEP 在 HCC 中特有过表达且是重要的生长因子，所以本发明人推测，GEP 在 HCC 肿瘤组织中的上调应当还导致 HCC 患者的血清 GEP 蛋白水平升高。就本发明人了解，不存在检测血清 GEP 的测定试剂盒，因此，迄今尚未研究血清 GEP 水平是否具有诊断意义。

GEP 在 HCC 中的显著升高及其增强癌细胞增殖的功能使 GEP 成为引人注目的抗体治疗靶。实际上，靶向癌症治疗相比于化疗药物的优势在于限制了非特异性毒性并且提高了疗效，化疗药物的主要缺点是缺乏选择性、具有严重的副作用、疗效有限和出现/选择产生耐药

性(13)。随着杂交瘤技术在人源化和鼠-人嵌合单克隆抗体生产方面的进步,可使用单克隆抗体实现靶向癌症治疗(14)。单克隆抗体(mAb)治疗已在临床癌症治疗中被证实是有效的,例如用于B细胞淋巴瘤的抗-CD20 mAb (利妥昔单抗(Rituximab))(15)、用于转移性乳腺癌的抗-Her2 neu mAb (赫赛汀(Herceptin))(16-17)以及用于转移性结肠直肠癌的抗-EGFR 和 VEGF (18,19)。然而,开发包括抗体疗法在内的用于HCC的靶向治疗法是有限的,因此,迫切需要新的治疗靶。

迄今为止还没有报道血清 GEP 在任何人类癌症中的诊断意义。在本研究中,本发明人已测定了HCC患者、HBV慢性携带者和健康个体中的血清 GEP 水平,以利用 GEP 作为 HCC 的新诊断标记。而且,本发明人还研究了新近分离的抗-GEP mAb 对小鼠异种移植模型的人 HCC 的抗肿瘤效力。已证实抗-GEP mAb 在体外和体内均能够延迟所建立的肿瘤的生长。这些结果表明了抗-GEP mAb 在 HCC 治疗中的潜在适用性。

发明概述

本发明人已发现,相比于肝细胞癌(HCC)患者的周围正常肝组织和健康个体的正常肝组织,一种蛋白质:即颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)在HCC中丰富而且独特地表达。

本发明的一个目标是提供检测血清中的 GEP 基因产物的药剂和方法。本发明的又一个目标是提供用于诊断目的的灵敏检测 HCC 患者血清中的 GEP 基因产物的药剂和方法。本发明的又一个目标是提供用特异性 GEP 肽生产 GEP 单克隆和多克隆抗体的方法。本发明的又一个目标是提供生产抗-GEP 单克隆抗体(例如 A23)的方法。本发明的再一个目标是利用抗-GEP 单克隆抗体(例如 A23)抑制 HCC 发展。

本发明进一步提供测定 HCC 患者、乙型肝炎携带者和健康个体的 GEP 水平的方法和策略。

为实现上述目标并且按照本发明的目的,正如本文具体表达并适

当描述的一样，本发明提供针对其中表现出 GEP 表达改变或 GEP 生物活性改变的 HCC 的药剂、组合物和治疗。

本文使用的术语“改变的表达或者表达改变”是指相比于相应的正常细胞或周围的正常外周细胞，GEP 的表达增加或过表达或 GEP 蛋白上调。术语“表达改变”还指表达不受调节，或变成组成型的而不一定升高。本文使用的术语“改变的生物活性”是指 GEP 活性的改变，其可能是或不是 GEP 表达依赖性的。术语“改变的生物活性”还指这样的情况：其中 GEP 所赋予的任何生物功能(例如增殖、分化、转移)的改变导致与改变的 GEP 表达相同或等同的状况。

本文使用的术语“GEP”是指在 HCC 患者的 HCC 细胞提取物或正常肝细胞提取物或 HCC 患者细胞外液体、慢性乙型肝炎携带者的肝细胞提取物或细胞外液体、健康个体的肝细胞提取物或细胞外液体中的颗粒体蛋白-上皮素前体。

本文使用的术语“中和”是指使用抗-GEP 抗体抵消 GEP 的活性或作用。

本文描述的“免疫组织化学”是指使用免疫组织化学方法检测所述 HCC 或正常肝或邻接的正常肝组织样品中的 GEP 存在情况。本文描述的术语“免疫组织化学”还指使用兔或小鼠抗人 GEP 多克隆抗体和缀合辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗以及二氨基苯(DAB)和过氧化氢的显色检测方法。

本文描述的“蛋白质印迹分析”是指这样的方法：通过凝胶电泳由 HCC 样品分离提取蛋白；将分离的蛋白样品转移到膜上；用兔或小鼠抗人 GEP 抗体和缀合辣根过氧化物酶(HRP)的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗检测 GEP；并用化学发光技术显色检测 GEP。

本文描述的“接受者操作特征(ROC)曲线(receiver operating characteristic curve)”用于检验在其范围内的 GEP 性能特征。曲线下面积(AUC)用作整体测试性能的指标，低于 0.5 的参比 AUC 表示没有区别能力。

本文描述的所有数据都通过 SPSS (用于 Windows 的 11.0 版, SPSS Inc., Chicago, IL) 分析。适宜的情况下使用卡方检验或 Fisher 精确检验比较分类变量。Student t-检验用于 2 组连续变量之间的统计学比较。通过 Pearson 关联分析相关性。P < 0.05 时认为差异具有显著性。

本申请给出的具体实施例提供了优选实施方案的描述, 尤其是抗-GEP 抗体的检测用途以及中和抗-GEP 抗体用于在体外和体内抑制 HCC 的 GEP 活性的用途。

附图简述

图 1 显示了蛋白质印迹分析的 GEP 抗体特异性。(A) 单克隆 GEP 抗体 A23 特异性识别来自 HepG2 (G2) 和 Hep3B (3B) 的细胞裂解物的、约 88kDa 的 GEP-糖基化形式以及重组 GEP-全长(FL)。相比于其邻接的非肿瘤肝组织(N), GEP 在肿瘤(T)中被显著上调(患者 289 和 291)。(B) 来自肝细胞癌细胞裂解物 Hep3B (3B)、HepG2 (G2) 和 Huh7 (H7) 的免疫沉淀。泳道 1、3 和 5 使用单克隆 GEP 抗体 A23 免疫沉淀。泳道 2、4 和 6 是使用小鼠 IgG 的模拟免疫沉淀。兔多克隆 GEP 抗体用于检测。泳道 7、8 和 9 是来自相同肝细胞癌细胞系的细胞裂解物。A23 免疫沉淀复合物的约 88 kDa 的 GEP 证实了单克隆和多克隆抗体的特异性。(C) 在泳道 1、2 和 3 中分别为培养的肝细胞癌细胞 Hep3B (3B)、HepG2 (G2) 和 Huh7 (H7) 的上清液中的分泌性 GEP 的检测情况。泳道 4、5 和 6 为来自相同肝细胞癌细胞的细胞裂解物。

图 2 显示了 GEP 在人肝组织中的定位。(A) 在瘤性肝细胞中检测到 GEP 表达(以褐色染色显现), 但在肿瘤组分中的其它细胞类型中没有检测到(400×放大倍数)。(B) 邻接肿瘤的非肿瘤肝组织(400×放大倍数)揭示在非瘤性肝细胞中没有 GEP 信号。

图 3 显示了在 72 名健康供体、38 名慢性乙型肝炎患者和 107 名 HCC 患者中的血清 GEP 浓度。

图 4 显示关于血清 GEP 的接受者操作特征曲线分析(粗实线)。将

“灵敏度” (真阳性系数)对“1-特异性” (假阳性系数)作图。

图5显示,采用A23的体外治疗以剂量依赖性方式抑制细胞生长。经MTT测定检测细胞增殖。A) HepG2细胞和B) Hep3B细胞与PBS(对照)(■)、A23-50 $\mu\text{g/ml}$ (▲)或A23-100 $\mu\text{g/ml}$ (●)在1% FBS存在下温育5天。相比于PBS对照,差异于 $*P < 0.05$ 水平时是显著的。C)通过直接ELISA检测到的A23 (+)或PBS对照(-)处理后的HepG2和Hep3B培养上清液中的GEP浓度。D) Hep3B和HepG2的A23处理导致MAPK磷酸化降低。使HCC细胞系血清饥饿24小时,然后用A23-100 $\mu\text{g/ml}$ (泳道1-HepG2和泳道3-Hep3B)或PBS(对照)(泳道2-HepG2和泳道4-Hep3B)处理72小时。用兔多克隆GEP、抗磷酸化MAPK和抗MAPK抗体免疫印迹细胞裂解物(10 μg),抗- β 肌动蛋白用作蛋白加样和转移的对照。

图6显示了Hep3B肿瘤异种移植物在裸小鼠中的生长抑制。以每周2次的方案用A23治疗所建立的Hep3B肿瘤治疗的剂量依赖性作用。以A23-50 μg (▲)或A23-100 μg (●)腹膜内注射A23抗体,PBS用作对照(■)。与PBS对照相比,差异于 $*P < 0.05$ 和 $**P < 0.005$ 的水平时是显著的。

图7显示了于A23治疗后31天的小鼠血清谱。A) A23浓度。B) GEP浓度。

图8显示了A)于A23治疗后31天的200 \times 放大倍数的Hep3B异种移植物的组织学检查结果。B)于A23治疗后31天的200 \times 放大倍数的非肿瘤肝脏的组织学检查结果。

图9为A23在Hep3B肿瘤中的增殖和凋亡作用的分析。A)通过Ki-67染色评价异种移植肿瘤细胞的增殖。B)通过TUNEL测定评价肿瘤细胞的凋亡。

图10显示了A23对Hep3B异种移植物的作用。用所示的针对磷酸化-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr04)和磷酸化-AKT (Ser473)抗体的磷酸化特异性抗体免疫印迹总的异种移植细胞裂解物(20 μg)。总MAPK

和 AKT 用作加样对照。还显示了抗-GEP 印迹, 并显示了作为加样对照的代表性的 β -肌动蛋白再探测印迹。异种移植物得自 PBS 对照处理小鼠(泳道 1)、50 μ g A23 治疗小鼠(泳道 2)和 100 μ g A23 治疗小鼠(泳道 3)。

优选实施方案的详述

下面详细描述本发明的当前优选的实施方案, 其与后面的实施例和附图一起用于解释本发明的原理。

本发明人由早前的 cDNA 微阵列分析(11)鉴定出 GEP 为潜在的 HCC 肿瘤标记。本发明人已进一步验证了在不同的患者样品组中的观测结果, 并证实 GEP 蛋白在 HCC 组织中被上调(12)。另外, 本发明人还证实, GEP 水平正调节癌细胞增殖和肿瘤侵袭(12)。由于 GEP 为分泌性自分泌生长因子, 所以本发明人认为, HCC 肿瘤组织中的 GEP 上调还会导致患者的血清 GEP 蛋白水平升高, 其因此可用作肝细胞癌的有用的诊断标记。

在本研究中, 本发明人报告了 GEP 特异性单克隆和多克隆抗体的制备。使用新近分离的单克隆抗体表明 GEP 蛋白水平在 HCC 肿瘤组织中被上调, 这与先前的观测结果一致(11, 12)。由免疫组织化学研究可知, GEP 蛋白在瘤性肝细胞中表达, 但在其它肿瘤组分中不表达。本发明人随后由 HCC 细胞系条件培养基进行免疫印迹, 评价 HCC 细胞是否会分泌 GEP 蛋白。本发明人已证实, 由培养物上清液可检测到 GEP, 提示 GEP 可能为 HCC 患者血清中可检测到的分泌性蛋白。

为检测 GEP 血清蛋白, 使用新近分离的抗体已建立了特异性 GEP ELISA。针对 GEP 的 C-末端的单克隆抗体用作捕获抗体, 针对 GEP 的中心部分的多克隆抗体用作检测抗体。利用这两种抗体组合针对 GEP 全长蛋白的两种不同表位增强了测定的特异性, 这由免疫沉淀实验得到证实(图 1B)。

尽管如此, 由于 HCC 的异质性(20), 在所有的 HCC 组织中是否

会表达一种肿瘤标记值得怀疑。然而，组合使用两种或三种标记将增强检测的灵敏度。在本研究中，本发明人证实，血清 GEP 水平与 HCC 患者的血清 AFP 水平没有关联。任何一种标记的 HCC 诊断灵敏度仅为 58.0% (仅 AFP) 至 60.7% (仅 GEP)，但通过组合使用这两种标记，灵敏度增加至 87.9%。

HCC 伴有的高死亡率部分原因在于其早期没有症状。治疗性切除仅为 20% 的 HCC 患者的治疗选择。因此，HCC 的早期检测是改善存活的重要因素。在本研究中，血清 GEP 在早期 HCC 患者中也是可检测到的(56.6%)，提示该标记对改善患者存活很重要的早期诊断应当是有用的。因此，血清 GEP 测定将提高 HCC 的早期检测，使得可以得到更好的治疗选择和存活结果。

本发明人先前已表明，使用反义方法下调 GEP 可显著降低 HCC 在无胸腺裸小鼠模型中的致癌性(12)。此观测结果提示，GEP 是引人注目的癌症治疗靶。然而，基因传递模式和感染/转染效力仍是成功的癌症基因疗法的主要障碍。相比于基因疗法，使用 GEP 抗体是对靶向癌症疗法更实用的且可行的方案。由于 GEP 是分泌性自分泌生长因子，因此本发明人认为，通过 GEP 特异性抗体 A23 中和胞外 GEP 可以阻碍 GEP 的增殖功能。与反义方法的靶向不同的是，诸如赫赛汀和抗 VEGF 的抗体靶向疗法具有较高效力和较低毒性，使靶向疗法在癌症患者中的变得切实可行。

为了研究抗 GEP 抗体如 A23 的抑制作用，在 1% FBS 存在下，将它们添加到 HepG2 和 Hep3B 细胞的培养上清液。与未处理对照相比，癌细胞的增殖被 mAb A23 以剂量依赖性方式显著抑制(图 5A 和 5B)。培养上清液中的 GEP 浓度通过夹心 ELISA 检测。Hep3B 的培养上清液中的 GEP 浓度高于 HepG2 (图 5C)。在 A23 处理 72 小时后，培养上清液中的 GEP 浓度在两种细胞系中均降低(图 5C)。该结果表明，加入 A23 能有效中和分泌到培养上清液中的 GEP。还已表明，GEP 在胞外调节的激酶信号转导途径中刺激 p44/42 有丝分裂原活化

蛋白激酶(MAPK)的磷酸化。为研究抗-GEP 处理的增殖抑制是否与 p44/42 MAPK 的磷酸化相关,在用 A23 处理后对培养的细胞裂解物进行蛋白质印迹分析。如图 5D 所示,在培养上清液中加入抗-GEP A23 达 72 小时,在 HepG2 和 Hep3B 这两种细胞系中均显著降低 MAPK 的磷酸化,提示细胞增殖的下降依赖于 p44/42 MAPK 的磷酸化下降。

在动物研究中,用植入裸小鼠的 Hep3B 肿瘤证实抗-GEP mAb A23 的抗肿瘤作用。一旦肿瘤的大小达到约 0.3 cm^3 ,就开始 $50 \mu\text{g}$ 和 $100 \mu\text{g}$ /注射的抗体治疗。每周 2 次给予 9 剂治疗,并监测肿瘤的大小。在治疗 5 周后,对于 $50 \mu\text{g}$ 和 $100 \mu\text{g}$ 治疗,用抗-GEP A23 治疗的小鼠的中值肿瘤体积分别为 1.57 cm^3 (范围 $1.44\text{-}2.53 \text{ cm}^3$)和 1.21 cm^3 (范围 $0.79\text{-}1.97 \text{ cm}^3$),而对照小鼠的中值肿瘤体积为 2.20 cm^3 (范围 $1.65\text{-}3.04 \text{ cm}^3$)。通过 t-检验进行方差分析证实,治疗动物和未治疗动物之间的差异具有统计学显著性($P < 0.05$)(图 6)。该实验表明,在用 A23 治疗的个体中产生剂量依赖性的 Hep3B 肿瘤生长抑制。而且,该模型模拟了临床上大部分 HCC 患者在晚期才被诊断并且已经不能手术的情形。由于抗体治疗的肿瘤体积显著下降表明,使用抗-GEP 抗体中和 GEP 即便在所建立的肿瘤中也可显著延迟肿瘤增殖。本研究证实,抗-GEP 疗法对稳定所述疾病和/或延迟肿瘤发展是切实可行的。

当腹膜内注射抗-GEP mAb A23 时,检测抗体效价,以便评价在小鼠血液循环中存在的实际抗体量。通过直接 ELISA 检测小鼠血清中的抗-GEP mAb A23 的抗体效价。正如所料,对照组中的 A23 水平是检测不到的,但在治疗组中仍较高。对于 $100 \mu\text{g}$ 治疗组,A23 的中值水平为 $74.61 \mu\text{g/ml}$ (范围为 $4.50 \mu\text{g/ml}$ 至 $145.48 \mu\text{g/ml}$)。对于 $50 \mu\text{g}$ 治疗组,A23 的中值水平为 $8.87 \mu\text{g/ml}$ (范围为 $1.35\text{-}16.24 \mu\text{g/ml}$)(图 7A)。为了研究 A23 在血清 GEP 清除中的有效性,通过夹心 ELISA 检测小鼠血清中的 GEP 浓度。对于 PBS 对照组,血清 GEP 水平是最高的,GEP 的中值水平为 21.46 ng/ml (范围为 $8.33\text{-}137.50 \text{ ng/ml}$)。然而,在 A23 治疗后,血清 GEP 水平被显著降低($P < 0.05$)。在 $100 \mu\text{g}$ 治疗后,

几乎检测不到血清 GEP 水平(中值 = 0 ng/ml, 范围为 0-2.5 ng/ml)。在 50 μ g 治疗后, GEP 的中值水平降低至 7.08 ng/ml (范围为 0-10.83 ng/ml)(图 7B)。

在治疗结束时的异种移植物的组织学检查表明, 接受 A23 的动物的肿瘤与接受对照疗法的动物的肿瘤相比具有显著差异。在 100 μ g A23 治疗组中, 发现大块坏死区域, 相比于对照组, 细胞稀少区域明显更多(图 8A)。治疗组和对照组的非肿瘤肝脏没有明显组织学差异(图 8B)。

使用 Ki-67 抗体进行异种移植物的免疫组织学检查, 在 100 μ g A23 治疗小鼠中的 Ki-67 阳性细胞相比于对照组显著下降(图 9A)。然而, 在治疗组和对照组中由 TUNEL 测定得到的阳性细胞数没有差异(图 9B)。这些结果表明, A23 治疗的肿瘤体积下降主要由增殖下降引起的, 而不是由凋亡增加引起的。

为研究抗-GEP 抗体对小鼠异种移植瘤中的肿瘤细胞增殖的作用机制, 检测了关键增殖基因 MAPK 和 AKT 的磷酸化水平。MAPK 和 AKT 这两者在 Ser473 处的磷酸化在抗-GEP 治疗后被显著降低, 提示抗-GEP 抗体治疗经 MAPK 和 AKT 途径延迟肿瘤细胞增殖(图 10)。这些观测结果表明, 抗-GEP 在体外和体内均延迟肿瘤细胞增殖。其以剂量依赖性方式抑制 p44/42 MAPK 磷酸化和 AKT 磷酸化。

总之, 本发明人已证明, GEP 是 HBV 相关性 HCC 的新血清标记。AFP 和 GEP 组合提高处于早期和晚期肿瘤的 HCC 诊断灵敏度。这种简单且可靠的免疫测定对检测血清 GEP 浓度的可用性可以提供一种有价值的工具, 以进一步评价血清 GEP 对 HCC 管理的临床可用性。而且, 本发明人已表明, 抗-GEP 抗体能够抑制所建立的 HCC 肿瘤的生长。这些结果表明 GEP 是 HCC 治疗靶标, 并表明了抗-GEP 抗体治疗 HCC 的潜在用途。

实施例 1

患者样本

研究方案由香港大学伦理审查委员会 (the Institutional Review Board of The University of Hong Kong) 批准, 并获得患者和对照个体签署的同意书。在 1999 年 3 月至 2004 年 10 月之间, 由 107 名被诊断为原发性 HCC 的患者、38 名慢性乙型肝炎患者(只有那些在 2 年以上的随访期内没有恶性疾病征兆的患者才被纳入本研究)和 72 名乙型肝炎表面抗原(HBsAg)阴性的健康供体获得血样。血清 HBsAg 在 96 名(89.7%) HCC 患者中为阳性, 因此对照组包括慢性乙型肝炎患者和健康志愿者。将血清样品冷冻于 -70°C 直至使用。由 HCC 患者收集肿瘤和邻接的非肿瘤肝组织, 在液氮中急冻, 并储存于 -70°C 直至使用。对平行切片进行福尔马林固定, 并石蜡包埋, 用于组织学检查和免疫组织化学研究。前瞻性收集包括所有患者和对照受试者的血清 AFP 水平在内的临床和病理学数据。

实施例 2

细胞系

将人 HCC 细胞系 Hep3B、HepG2 和 Huh7 (美国组织培养物保藏中心 ((American Tissue Culture Collection), Manassas, VA)和日本健康科学研究资源库 ((Japan Health Science Research Resources Bank), Osaka, Japan)) 保持在补加 10%胎牛血清(Gibco BRL, Carlsbad, CA)的 Dulbecco 氏改良的 Eagle 培养基(DMEM)中。

实施例 3

建立抗体

通过用 33 μg 缀合匙孔蕨血蓝蛋白(KLH)的定制 GEP 特异性肽 SEQ ID No:3 连同弗氏完全佐剂(Sigma-Aldrich, Dorset, UK)皮下免疫接种 BALB/c 小鼠以产生 GEP-特异性抗体。对于随后的加强免疫, 每

周2次腹腔内注射在弗氏不完全佐剂中的相同量的抗原。在每次加强免疫后，使用针对肽抗原的 ELISA 监测针对免疫抗原的血清抗体活性。对于显示出针对所述抗原的高血清抗体效价的小鼠，给予最后1次静脉内注射抗原的加强免疫，3天后采集脾脏。

抗-GEP 单克隆抗体 A23 的产生

由其血清中显示出高抗体效价的小鼠采集脾脏。按照最初来源于 Kohler 和 Milstein (21)的标准方案进行脾细胞与非生产性骨髓瘤细胞系 NS0 的融合。NS0 保持在补加 10%胎牛血清(Gibco BRL, Carlsbad, CA)的 DMEM 中。简而言之，由小鼠脾脏收集淋巴细胞，并使用聚乙二醇 1500 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)与 NS0 融合。通过铺板入含 HAT 和 20% FBS 的 DMEM 培养基中选择杂交瘤。通过 ELISA 选择分泌抗体的杂交瘤，随后通过有限稀释亚克隆，使用小鼠 MonoAB ID 试剂盒(HRP)(Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA)测定单克隆抗体的同种型。

开发针对 GEP 的多克隆抗体

用 100 µg 缀合匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)的 GEP 特异性肽 SEQ ID No:4 (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA)使用标准方案(22)免疫接种新西兰白兔。使用固定化抗原柱亲和纯化兔抗血清，对 1×PBS 透析，并浓缩至 1 mg/ml。

单克隆抗体的产生和检验

为产生 GEP 单克隆抗体，使用在 GEP 羧基末端的 16 个氨基酸的合成肽 SEQ ID NO:3 作为免疫原，以产生抗体。然后针对全长重组 GEP 和 Hep3B 细胞裂解物对克隆进行另一轮 ELISA 筛选。然后对这些克隆的上清液进行蛋白质印迹分析，并通过有限稀释亚克隆。克隆 A23 被鉴定为识别得自 GEP 重组蛋白(FL)、HCC 培养细胞裂解物(Hep3B 和 HepG2)和患者组织裂解物的 88-Kda 的 GEP 糖基化形式的

唯一抗体(图 1A)。为增加夹心 ELISA 对全长 GEP 的特异性, 本发明人定制了另一种特异性识别 GEP 的中心部分 SEQ ID NO:4 的 GEP 特异性多克隆抗体。

为测定多克隆 GEP 抗体和单克隆 GEP 抗体的特异性, 进行免疫沉淀。单克隆 GEP 抗体和多克隆 GEP 抗体识别得自培养裂解物的 88-kDa 的糖基化 GEP (图 1B)。

为确定 GEP 是否为分泌性蛋白, 使用 GEP 单克隆抗体检验 HCC 细胞系的条件培养基中的 GEP。如图 1C 所示, 在 HCC 细胞的上清液中可检测到 88-kDa 的糖基化 GEP。

通过对肿瘤组织石蜡切片进行免疫组织化学揭示 GEP 定位。发现蛋白信号一律与瘤性肝细胞相关, 但与肿瘤组织中的内皮细胞或成纤维细胞不相关, 而在非肿瘤组织中的肝细胞没有显示出信号(图 2)。

实施例 4

蛋白质提取、蛋白质印迹和免疫沉淀

对 HCC 细胞系、HCC 和邻近的非肿瘤肝组织进行蛋白印迹分析。通过在含有 1 mM PMSF 的缓冲液 A (8 M 尿素, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) 中匀浆急冻的患者样品提取总蛋白。通过 10% SDS-PAGE 凝胶继之以蛋白质印迹分离总共 10 μ g 蛋白提取物。用 5% 脱脂乳的 PBS/0.1% Tween 20 溶液封闭印迹, 并用适宜的单克隆抗体探测。多克隆山羊抗 β -肌动蛋白抗体以 1:1000 稀释度使用(DAKO, Glostrup, Denmark)。缀合辣根过氧化物酶(HRP)的抗小鼠和抗山羊二抗分别以 1:3000 稀释度使用(AP biotech, Chalfont St. Giles, UK)。按照生产商的说明(AP biotech, Chalfont St. Giles, UK)进行 ECL。用 500 μ g 细胞裂解物进行免疫沉淀, 并与 1 μ g 纯化的单克隆抗体温育。在 SDS-PAGE 上分离免疫复合物, 并用多克隆抗-GEP 抗体免疫印迹。

实施例 5

免疫组织化学

对石蜡包埋的 HCC 和邻接的非肿瘤肝脏组织进行免疫组织化学研究。方案先前已描述，并有修改(12)。通过微波进行抗原修复，切片浸没在柠檬酸盐缓冲液中，接着浸没在内源过氧化物酶封闭试剂和生物素封闭试剂(DAKO, Glostrup, Denmark)中。适宜的单克隆抗体以 2 µg/ml 使用。通过缀合 HRP 的抗小鼠二抗检测信号，并用二氨基联苯胺(DAB)作为色原显色。用苏木精反染色组织切片。

实施例 6

测定受试者血清中的 GEP 水平

以每孔 0.5 µg 抗-GEP mAb A23 的 50 µl PBS 溶液包被 96 孔 ELISA 板(Nalge Nunc International, Rochester, NY)。用 300 µl 封闭缓冲液(1×PBS, 1% BSA, 5%蔗糖, 0.05% NaN₃)封闭板 1 小时，然后加入 50 µl 1:5 稀释的血清样品，并于室温温育 2 小时。在用 0.05% Tween 20 的 1×PBS 溶液洗涤未结合的物质后，使用亲和纯化的抗-GEP 兔多克隆抗体(1:2000, 1 mg/ml)，接着使用 TMB (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL)作为底物与缀合辣根过氧化物酶的山羊抗兔 IgG (Zymed Laboratories, Inc, San Francisco, CA.)温育，从而检测结合的 GEP。为定量存在于血清中的 GEP，平行进行以含 10%胎牛血清的 PBS 稀释的纯化 GEP 的校准曲线。每个样品都以一式四份检测 3 次。GEP 夹心 ELISA 的动态范围为 469 pg/ml 至 30 ng/ml。将合并的患者血清样品纳入每个测定，用于调整板与板之间的偏差。测定之内和之间的偏差分别为 2.9% (范围 1.1-5.5%)和 5.0% (范围 1.3-10.8%)。

通过特异性 ELISA 检测 107 名 HCC 患者、72 名健康个体和 38 名慢性乙型肝炎患者的血清 GEP 蛋白水平(图 3)。健康受试者的中值和平均血清 GEP 水平分别为 4.59 ng/ml 和 5.63 ng/ml (范围 0-20.46 ng/ml)。慢性乙型肝炎患者的血清 GEP 的中值和平均浓度分别为 6.03 ng/ml 和 6.85 ng/ml (范围 0.17-28.36 ng/ml)。HCC 患者的中值水平和

平均血清 GEP 水平分别为 10.53 ng/ml 和 16.09 ng/ml (范围 0-113.59 ng/ml)。在 HCC 患者中检测的血清 GEP 水平显著高于健康对照($P < 0.001$)和慢性乙型肝炎患者($P < 0.001$)的该水平。还建立了 GEP 的 ROC 曲线(图 4), 表明 AUC 为 0.74 (95% CI 0.67-0.81, $P < 0.001$)。为辨别 HCC 与包括慢性乙型肝炎携带者和健康个体在内的对照, 使用 Youden 指数确定类别预测的最佳截取值。最佳截取值为 9.07 ng/ml, 其分别达到了 60.7%的灵敏度和 82.5%的特异性。

实施例 7

用血清 AFP 和 GEP 的组合筛选诊断 HCC

还检测了同一组样品的血清 AFP 水平, 并与血清 GEP 数据相比较。在使用血清 AFP 水平进行 HCC 诊断时, 使用 100 ng/ml 的截取值, 其被视为相对高的和特异性的(表 1 和 2)。还检验了 20 ng/ml 的较低血清 AFP 截取值, 与血清 GEP 比较的数据在补充表 1 和 2 中提供。通过血清 AFP (58.0%, 62/107, 截取值为 100 ng/ml)和血清 GEP (60.7%, 65/107, 截取值 9.07 ng/ml)进行 HCC 诊断的灵敏度相当(表 1)。在 HCC 患者中, GEP 和 AFP 血清水平之间没有关联($r = -0.113$; $P = 0.243$)。大部分 HCC 患者(87.9%, 94/107)表现出血清 GEP (> 9.07 ng/ml)或 AFP (> 100 ng/ml)升高。重要之处在于, 同时使用这两个标记将 HCC 诊断的灵敏度由 58.0% (仅 AFP 升高)增加至 87.9% (AFP 或 GEP 或这二者的升高)。

实施例 8

用血清 AFP 和 GEP 的组合筛选早期诊断 HCC

早期诊断是能使 HCC 患者接受有效治疗和改善存活的关键。按照肿瘤阶段检验血清标记的性能。在早期 HCC 患者中, 通过血清 GEP (56.6%, 43/76)和血清 AFP (55.3%, 42/76)进行检测的灵敏度是相似的(表 2)。在晚期患者中, 通过血清 GEP 进行 HCC 检测的灵敏度(71.0%,

22/31)稍好于血清 AFP (64.5%, 20/31)。在 84.2% (64/76)的早期患者和 96.8% (30/31)的晚期 HCC 患者中观察到血清 GEP 或 AFP 升高。因此,在早期和晚期 HCC 患者中使用两个标记均应增加诊断灵敏度。

实施例 9

细胞增殖测定

经由 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四氮唑(MTT)测定检测细胞增殖。简而言之,如所示将 5×10^3 个细胞接种至含有 1% FBS、有或没有 mAb A23 的 100 μ l DMEM 培养基的 96 孔板。每 24 小时用含有 0.5 mg/ml MTT 的 100 μ l DMEM 更换培养基,并于 37°C 温育 3 小时。以 100 μ l MTT 溶剂(0.1 N HCl 的异丙醇溶液)溶解晶体,吸光度以 540 nm 的检测值减去 650 nm 的背景吸光度作图。每个数据点代表 3 个独立实验的结果,每个实验以一式三份进行。

在 1% FBS 存在下,将抗-GEP mAb A23 加至 HepG2 和 Hep3B 细胞的培养上清液中,与未处理的对照相比,癌细胞增殖受到所述 mAb 的显著抑制(图 5A 和 B)。这种抑制为剂量依赖性方式(图 5B)。培养上清液的 GEP 浓度通过夹心 ELISA 检测。Hep3B 在培养上清液中的 GEP 浓度高于 HepG2 (图 5C)。在 A23 处理 72 小时后,培养上清液中的 GEP 浓度在两个细胞系中均降低(图 5C)。该结果表明,加入 A23 可有效中和分泌到培养上清液中的 GEP。

实施例 10

抗-GEP 抗体处理对 MAPK 磷酸化的作用

在含有 1 mM PMSF 的细胞裂解缓冲液(Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA)中匀浆小鼠异种移植物和 Hep3B 细胞以提取总蛋白。通过 10% SDS-PAGE 凝胶继之以蛋白质印迹分离总共 10 μ g 蛋白提取物。用 5%脱脂乳的 PBS/0.1% Tween 20 溶液封闭印迹,并用适宜的抗体探测。多克隆山羊抗 β -肌动蛋白抗体以 1:1000 稀释度使用

(DAKO, Glostrup, Denmark)。多克隆兔抗-GEP 抗体以 1:500 稀释度使用(12)。针对 p44/p42 MAPK 和磷酸化-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) 的抗体按照生产商的说明(Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA) 使用。缀合 HRP 的抗小鼠、抗兔和抗山羊二抗分别以 1:3000 稀释度使用(AP biotech, Chalfont St. Giles, UK)。按照生产商说明(AP biotech, Chalfont St. Giles, UK)进行 ECL。

业已表明, GEP 在胞外调节的激酶信号转导途径中刺激 p44/42 有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)的磷酸化(23)。为研究抗-GEP 处理的增殖抑制是否与 p44/42 MAPK 的磷酸化相关, 在用 A23 处理后对培养细胞的裂解物进行蛋白质印迹分析。如图 5D 所示, 在培养上清液中加入抗-GEP A23 达 72 小时, 在 HepG2 和 Hep3B 这两个细胞系中均显著降低 MAPK 的磷酸化, 提示细胞增殖的降低依赖于 p44/42 MAPK 的磷酸化降低。

实施例 11

裸小鼠的 HCC 异种移植物和皮下异种移植物的治疗

本研究方案由香港大学关于教学和研究中活体动物的使用的委员会批准。将小鼠(n = 15) 关在 12 小时昼夜循环的栅栏实验室中, 并接受食物和水。所有的操作都在小鼠处于异氟烷气体麻醉之下时进行。没有小鼠显示出消瘦迹象或其它毒性迹象。将 Hep3B 细胞(2×10^6 个细胞/小鼠)皮下注射至 5 至 6 周龄的雄性无胸腺裸小鼠。用游标卡尺测量测定肿瘤的大小, 按照式 $(a \times b^2)/2$ 计算肿瘤体积, 其中 a 和 b 分别为最大和最小直径(24)。在肿瘤体积达到约 0.3 cm^3 的平均肿瘤体积时开始治疗, 将小鼠随机分为 3 组(n = 5)。在研究过程中每周 2 次腹膜内注射抗体。据我们初步研究, 在腹膜内注射后血清 A23 抗体在小鼠中的半衰期时间($T_{1/2}$)长于 72 小时(数据未显示), 因此, 选择每周 2 次腹膜内注射 100 μg 和 50 μg 的治疗方案。第 1 组小鼠用 100 μg 纯化的小鼠 IgG (Zigma-Aldrich, Saint Louis, MO)或 PBS 治疗。在初步研

究中, 本发明人发现, 小鼠 IgG 或 PBS 对肿瘤生长没有差异。第 2 组和第 3 组小鼠分别用 50 μg 和 100 μg A23 mAb 治疗。

检验抗-GEP mAb A23 对植入裸小鼠的 Hep3B 肿瘤的抗肿瘤作用。一旦肿瘤的大小达到约 300 mm^3 , 就开始 50 μg 和 100 μg /注射的抗体治疗。每周 2 次给予 9 剂治疗, 并监测肿瘤的大小。在 5 周治疗后, 对于 50 μg 和 100 μg 治疗, 用抗-GEP A23 治疗的小鼠的中值肿瘤体积分别为 1.57 cm^3 (范围为 1.44-2.53 cm^3) 和 1.21 cm^3 (范围为 0.79-1.97 cm^3), 而对照小鼠的中值肿瘤体积为 2.20 cm^3 (范围 1.65-3.04 cm^3)。通过 t-检验方差分析证实, 治疗动物和未治疗动物之间的差异为统计学显著性差异($P < 0.05$)(图 6)。用 A23 治疗产生剂量依赖性的 Hep3B 肿瘤生长抑制。

实施例 12

定量 A23 治疗后小鼠血清中的 GEP

收集小鼠血清, 使用 ELISA 检测抗体浓度和血清 GEP 浓度。

当腹膜内注射抗-GEP mAb A23 时, 检测抗体效价, 以便评价小鼠血液循环中存在的实际抗体量。小鼠血清中的抗-GEP mAb A23 的抗体效价通过直接 ELISA 检测。正如所料, 对照组的 A23 水平检测不到, 但治疗组中仍然较高。对于 100 μg 治疗组, A23 的中值水平为 74.61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (范围为 4.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至 145.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。对于 50 μg 治疗组, A23 的中值水平为 8.87 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (范围为 1.35-16.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(图 7A)。

为了检验 A23 在血清 GEP 清除中的有效性, 通过夹心 ELISA 检测小鼠血清的 GEP 浓度。对于 PBS 对照组, 血清 GEP 水平是最高的, GEP 的中值水平为 21.46 ng/ml (范围为 8.33-137.50 ng/ml)。然而, 在 A23 治疗后, 血清 GEP 水平被显著降低($P < 0.05$)。在 100 μg 治疗后, 几乎检测不到血清 GEP 水平(中值 = 0 ng/ml , 范围为 0-2.5 ng/ml)。在 50 μg 治疗后, GEP 的中值水平降低至 7.08 ng/ml (范围为 0-10.83 ng/ml)(图 7B)。

实施例 13

安乐死和组织处理

至第 5 周末使小鼠安乐死。收集异种移植物和肝组织，在液氮中急冻，并储存于 -70°C 直至使用。对平行切片进行福尔马林固定，并石蜡包埋，用于组织学检查和免疫组织化学研究。

A23 治疗后的异种移植物的组织学检查

治疗结束时的异种移植物的组织学检查表明，给予 A23 的动物的肿瘤相比于接受对照治疗的动物的肿瘤有显著差异。在 $100\ \mu\text{g}$ A23 治疗组中，发现大块坏死区域，相比于对照组有显著更多的细胞稀少区域(图 8A)。治疗组和对照组的非肿瘤肝脏没有明显组织学差异(图 8B)。

使用 Ki-67 抗体进行异种移植物的免疫组织学检查，在 $100\ \mu\text{g}$ A23 治疗小鼠中的 Ki-67 阳性细胞相比于对照组显著下降(图 9A)。然而，在治疗组和对照组中由 TUNEL 测定得到的阳性细胞数没有差异(图 9B)。这些结果表明，A23 治疗的肿瘤体积下降主要是由增殖下降引起的，而不是由凋亡增加引起的。

实施例 14

体内抗-GEP 抗体治疗的作用

为研究 A23 作用于细胞增殖的机制，使用得自治疗后的小鼠肿瘤异种移植物的总蛋白裂解物检查关键增殖蛋白 MAPK 和 AKT 的磷酸化水平。按照生产商的说明(Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA)使用针对 p44/p42 MAPK、磷酸化-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)、AKT 和磷酸化-AKT(ser473)的抗体。MAPK 和 AKT 在 Ser473 处的磷酸化在抗-GEP 治疗下被降低(图 10)，提示抗-GEP 抗体治疗在小鼠肿瘤异种移植物中经由 MAPK 和 AKT 途径延迟肿瘤细胞增殖。

实施例 15

抗-GEP 抗体的开发

用位于 SEQ ID No. 5、6、7、8、9、10、11、12 或 13 及其周围的 GEP 特异性肽序列免疫接种 BALB/c 小鼠或新西兰白兔产生 GEP 特异性抗体(图 11)。使用抗-GEP 单克隆抗体或抗-GEP 多克隆抗体检测血清 GEP 水平或抑制肿瘤生长。

参考文献

1. El-Serag HB: Hepatocellular carcinoma: An epidemiologic view. (肝细胞癌: 流行病学观察) J Clin Gastroenterol 2002; 35:S72-8.
2. Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L 等: Epidemiology, risk factors, and natural history of Hepatocellular carcinoma. (肝细胞癌的流行病学、风险因子和自然史) Ann N Y Acad Sci 2002; 963: 13-20.
3. Befeler AS, Di Bisceglie AM: Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. (肝细胞癌: 诊断和治疗) Gastroenterology 2002; 122: 1609-19.
4. Yu AS, Keeffe EB: Management of Hepatocellular carcinoma. (肝细胞癌的管理) Rev Gastroenterol Disord 2003; 3:8-24.
5. Fan ST, Lo CM, Liu CL 等: Hepatectomy for Hepatocellular carcinoma: Toward zero hospital deaths. (肝细胞癌的肝切除术: 医院零死亡目标) Ann Surg 1999; 229:322-30.
6. Ng KK, Lam CM, Poon RT 等: Thermal ablative therapy for malignant liver tumors: a critical appraisal. (恶性肝肿瘤的热消融疗法: 关键评价) J Gastroenterol Hepatol 2003; 18:616-29.
7. MacDonald DJ, Kelly AM: The rapid quantitation of serum alpha-fetoprotein by two-site micro enzyme immunoassay. (双位微酶免疫测定快速定量血清甲胎蛋白) Clin Chim Acta 1978; 87: 367-72.
8. Taketa K: Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology. (甲胎蛋白: 在肝脏病学中的重新评价) Hepatology 1990; 12: 1420-32.

9. Johnson PJ: The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of Hepatocellular carcinoma. (评估血清甲胎蛋白在肝细胞癌的诊断和管理的作用) Clin Liver Dis 2001; 5: 145-59.
10. Gebo KA, Chander G, Jenckes MW 等: Screening tests for Hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: a systematic review. (用于慢性丙型肝炎患者的肝细胞癌的筛选测试: 系统性综述) Hepatology 2002; 36:S84-92.
11. Chen X, Cheung ST, So S 等: Gene expression patterns in human liver cancers. (人肝癌的基因表达模式) Mol Biol Cell 2002; 13: 1929-39.
12. Cheung ST, Wong SY, Leung KL 等: Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of Hepatocellular carcinoma. (颗粒体蛋白-上皮素前体过表达促进肝细胞癌的生长和侵袭) Clin Cancer Res 2004; 10:7629-36.
13. Guillemard V, Saragovi HU. Novel approaches for targeted cancer therapy. (靶向癌症疗法的新途径) Curr Cancer Drug Targets 2004; 4:313-326.
14. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. (癌症的单克隆抗体疗法) Nat Biotechnol 2005; 23:1147-1157.
15. von Schilling C. Immunotherapy with anti-CD20 compounds. (采用抗 CD20 化合物的免疫疗法) Semin Cancer Biol. 2003; 13:211-22.
16. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. (曲妥珠单抗(赫赛汀)抗 HER2 单克隆抗体临床计划在 HER2 过表达转移性乳癌中的综述) Herceptin Multinational Investigator Study Group (赫赛汀多国调查研究小组). Semin Oncol. 1999:71-7
17. Willems A, Gauger K, Henrichs C, Harbeck N. Antibody therapy for breast cancer. (乳癌的抗体疗法) Anticancer Res. 2005; 25: 1483-9.
18. Vanhoefer U, Tewes M, Rojo F, Dirsch O, Schleucher N, Rosen O, Tillner J, Kovar A, Braun AH, Trarbach T, Seeber S, Harstrick

A, Baselga J. Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. (人源化抗表皮生长因子受体单克隆抗体 EMD72000 在表达表皮生长因子受体的晚期实体瘤患者中的 I 期研究) *J Clin Oncol*. 2004, 22: 175-84.

19. Fernando NH, Hurwitz HI. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. (结肠直肠癌的靶向治疗: 采用贝伐单抗的临床实验) *Oncologist*. 2004;9:11-8.

20. Thorgeirsson SS, Grisham JW: Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. (人肝细胞癌分子致病机理) *Nat Genet* 2002; 31 :339-46.

21. Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. (分泌预定特异性的抗体的融合细胞的连续培养) *Nature* 1975; 256:495-7.

22. Campbell AM: Production and purification of antibodies. (抗体的生产和纯化) 载于: Diamandis EP, Christopoulos TK 编辑, *Immunoassay*. 95-15 页. San Diego, CA: Academic Press, 1996.

23. Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH, Baserga R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. (颗粒体蛋白/上皮素前体的生物活性和信号转导途径) *Cancer Res*. 1999; 59:5331-40.

24. Shimada N, Ishii T, Imada T, Takaba K, Sasaki Y, Maruyama-Takahashi K, Maekawa-Tokuda Y, Kusaka H, Akinaga S, Tanaka A, Shitara K. A neutralizing anti-fibroblast growth factor 8 monoclonal antibody shows potent antitumor activity against androgen-dependent mouse mammary tumors in vivo. (中和抗成纤维细胞生长因子 8 单克隆抗体显示出在体内抗雄激素依赖性小鼠乳房肿瘤的有效抗肿瘤活性) *Clin Cancer Res* 2005; 11:3897-904.

表 1. 颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)和甲胎蛋白(AFP)在肝细胞癌患者
(n = 107)中的诊断灵敏度

GEP	AFP		总计
	< 100 ng/ml	> 100 ng/ml	
< 9.07 ng/ml	13 (12.1%)	29 (27.1%)	42 (39.3%)
> 9.07 ng/ml	32 (29.9%)	33 (30.8%)	65 (60.7%)
总计	45 (42.1%)	62 (58.0%)	107 (100%)

表 2. 颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)和甲胎蛋白(AFP)在不同肿瘤阶段的肝细胞癌患者中的诊断灵敏度

早期

GEP	AFP		总计
	< 100 ng/ml	> 100 ng/ml	
< 9.07 ng/ml	12 (15.8%)	21 (27.6%)	33 (43.4%)
> 9.07 ng/ml	22 (28.9%)	21 (27.6%)	43 (56.6%)
总计	34 (44.7%)	42 (55.3%)	76 (100%)

晚期

GEP	AFP		总计
	< 100 ng/ml	> 100 ng/ml	
< 9.07 ng/ml	1 (3.2%)	8 (25.8%)	9 (29.0%)
> 9.07 ng/ml	10 (32.3%)	12 (38.7%)	22 (71.0%)
总计	11 (35.5%)	20 (64.5%)	31 (100%)

补充表 1. 颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)和甲胎蛋白(AFP)在肝细胞癌患者(n = 107)中的诊断灵敏度

GEP	AFP		总计
	< 20 ng/ml	> 20 ng/ml	
< 9.07 ng/ml	9 (8.4%)	33 (30.8%)	42(39.3%)
> 9.07 ng/ml	24 (22.4%)	41 (38.3%)	65 (60.7%)
总计	33 (30.8%)	74 (69.2%)	107 (100%)

补充表 2. 颗粒体蛋白-上皮素前体(GEP)和甲胎蛋白(AFP)在不同肿瘤阶段的肝细胞癌患者中的诊断灵敏度

早期

GEP	AFP		总计
	< 20 ng/ml	> 20 ng/ml	
< 9.07 ng/ml	9 (11.8%)	24 (31.6%)	33 (43.4%)
> 9.07 ng/ml	16 (21.1%)	27 (35.5%)	43 (56.6%)
总计	25 (32.9%)	51 (67.1%)	76 (100%)

晚期

GEP	AFP		总计
	< 20 ng/ml	> 20 ng/ml	
< 9.07 ng/ml	0 (0%)	9 (29.0%)	9 (29.0%)
> 9.07 ng/ml	8 (25.8%)	14(45.2%)	22 (71.0%)
总计	8 (25.8%)	23 (74.2%)	31 (100%)

SEQ ID No. 1: GEP 的核苷酸序列

1 ggcgagagga agcagggagg agagtgattt gagtagaaaa gaaacacagc attccaggct
61 ggccccacct ctatattgat aagtagccaa tgggagcggg tagccctgat ccttgccaa
121 tggaaactga ggtaggcggg tcatcgcgct ggggtctgta gctgagcgc taccgggtg
181 ctgctgcca aggaccgcg agtcggacgc aggcagacca tgtggaccct ggtgagctgg
241 gtggccttaa cagcagggct ggtggctgga acgcggtgcc cagatgttca gttctgccct
301 gtggcctgct gcctggaccc cggaggagcc agctacagct gctgccctcc cttctggac
361 aaatggccca caacactgag caggcatctg ggtggcccct gccagggtga tgcccactgc
421 tctgccggcc actcctgcat cttaccgtc tcagggactt ccagttgctg ccccttcca
481 gaggccgtg catgcgggga tggccatcac tgctgccac ggggcttcca ctgcagtga
541 gacgggcat cctgctcca aagatcaggt aacaactccg tgggtgccat ccagtgcct
601 gatagtcagt tcgaatgcc ggacttctcc acgtgctgtg ttatggtcga tggctcctg
661 ggggtgctgc ccatgcccc ggcctcctgc tgtgaagaca gggtgactg ctgtccgac
721 ggtgccttct gcgacctgt tcacaccgc tcatcacac ccacgggac ccaccccctg
781 gcaaagaagc tccctgcccc gaggactaac agggcagtg cctgtccag ctgggtcatg
841 tgtccggacg cacgggtccc gtgccctgat ggttctacct gctgtgagct gccagtggtg
901 aaglatggct gctgccaat gccaacgcc acctgctgct ccgatcacct gcactgctg
961 cccaagaca ctgtgtgta cctgatccag agtaagtgcc tctccaagga gaacgtacc
1021 acggacctcc tactlaagct gcctgcgac acagtggggg atgtgaaatg tgacatggag
1081 gtgagctgcc cagatggcta tacctgctgc cgtctacagt cgggggctg gggctgctg
1141 ccttttacc aggctgtgt ctgtgaggac cacatacact gctgtcccgc ggggtttacg
1201 tgtgacacgc agaaggttac ctgtgaacag gggccccacc aggtgccctg gatggagaag
1261 gccccagctc acctcagcct gccagacca caagccttga agagagatgt cccctgtgat
1321 aatgtcagca gctgtccctc ctccgatacc tgctgccaac tcacgtctgg ggagtggggc
1381 tgctgtcaa tcccagaggc tgtctgctgc tcggaccacc agcactgctg ccccagggc
1441 tacacgtgtg tagctgagg gcagtgtcag cgaggaagcg agatcgtggc tggactggag
1501 aagatgctg cccgccggc ttcctatcc cccccagag acatcggctg tgaccagcac
1561 accagctgcc cggtggggca gacctgctg ccgagcctgg gtgggagctg gcctgctg
1621 cagttgccc atgctgtgt ctgcgaggat cggcagcact gctgccggc tggctacacc
1681 tgcaacgtga aggctcgtc ctgcgagaag gaagtgttct ctgccagcc tgccacctc
1741 ctggcccgtg gccctcacgt ggtgtgaag gacgtggagt gtggggaagg acacttctg
1801 catgataacc agacctgct cggagacaac cgacagggct gggcctgctg tccctaccgc
1861 cagggcgtct gttgtgctga tcggcggcac tgctgtcctg ctggcttccg ctgcgcagcc
1921 aggggtacca agtgtttgcg caggaggcc ccgcgctggg acgcccctt gagggacca

1981 gccttgagac agctgctgtg agggacagta ctgaagactc tgcagccctc gggacccac
2041 tcggaggggtg ccctctgctc aggcctccct agcacctccc cctaacaaa ttctccctgg
2101 accccattct gagctcccca tcaccatggg aggtggggcc tcaatctaag gcctccctg
2161 tcagaagggg gttgtggcaa aagccacatt acaagctgcc atcccctccc cgtttcagt
2221 gaccctgtgg ccaggtgctt ttcctatcc acaggggtgt ttgtgtgtg ggcggtgtg
2281 gttcaataa agttgtaca cttcaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa

SEQ ID No. 2: GEP 的氨基酸序列

1MWTLSVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKW
PTTLRHLGGP
61CQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADG
RSCFQRSGNNS
121VGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPH
GAFCDLVHTRCIT
181PTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKY
GCCPMPNATCC
241SDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVS
CPDGYTCCRLQ
301SGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEK
APAHLSLPDPQAL
361KRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQG
YTCVAEGQCQRGS
421EIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQ
LPHAVCCEDRQH
481CCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFLARSPHVGVDVECGEGHFCH
DNQTCCRDNRQG
541WACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDP
ALRQLL

SEQ ID No. 3: 部分 GEP 的氨基酸序列

GEP 氨基酸 578-593

“PRWDAPLRDPALRQLL”

SEQ ID No. 3a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 3 GEP 氨基酸 578-593

CCGCGCTGGGACGCCCTTTGAGGGACCCAGCCTTGAGACAGCTGCTG

SEQ ID No. 4: 部分 GEP 的氨基酸序列

GEP 氨基酸 351-365

“HLSLPDPQALKRDVP”

SEQ ID No. 4a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 4 GEP 氨基酸 351-365

CACCTCAGCCTGCCAGACCCACAAGCCTTGAAGAGAGATGTCCCC

SEQ ID No. 5: 部分 GEP 的氨基酸序列, 含有 SEQ ID No. 3

GEP 氨基酸 574-593

“RREAPRW DAPLRDPALRQLL”

SEQ ID No. 5a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 5 GEP 氨基酸 574-593

CGCAGGGAGGCCCGCGCTGGGACGCCCTTTGAGGGACCCAGCCTTG
AGACAGCTGCTG

SEQ ID No. 6: 部分 GEP 的氨基酸序列, 含有 SEQ ID No. 4

GEP 氨基酸 337-363

“QGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRD”

SEQ ID No. 6a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 6 GEP 氨基酸 337-363

CAGGGGCCCCACCAGGTGCCCTGGATGGAGAAGGCCCCAGCTCACCTC
AGCCTGCCAGACCCACAAGCCTTGAAGAGAGAT

SEQ ID No. 7: 部分 GEP 信号肽的氨基酸序列

GEP 氨基酸 1-17

“MWTLVSWWALTAGLVAG”

SEQ ID No. 7a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 7 GEP 氨基酸 1-17

ATGTGGACCCTGGTGAGCTGGGTGGCCTTAACAGCAGGGCTGGTGGCTG
GA

SEQ ID No. 8: 部分 GEP 接头的氨基酸序列

GEP 氨基酸 18- 57

“TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWP”

SEQ ID No. 8a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 8 GEP 氨基酸 18-57

ACGCGGTGCCAGATGGTCAGTTCTGCCCTGTGGCCTGCTGCCTGGACC
CCGGAGGAGCCAGCTACAGCTGCTGCCGTCCCCTTCTGGACAAATGGCC
CACAACACTGAGCAGGCATCTG

SEQ ID No. 9: 部分 GEP 接头的氨基酸序列

GEP 氨基酸 114-122

“QRSGNNSVG”

SEQ ID No. 9a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 9 GEP 氨基酸 114-122

CAAAGATCAGGTAACAACACTCCGTGGGT

SEQ ID No. 10: 部分 GEP 接头的氨基酸序列

GEP 氨基酸 180-205

“TPTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSS”

SEQ ID No. 10a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 10 GEP 氨基酸 180-205

ACACCCACGGGCACCCACCCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCAGAGGA
CTAACAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCG

SEQ ID No. 11: 部分 GEP 接头的氨基酸序列

GEP 氨基酸 262-280

“KENATDLLTKLPAHTVG”

SEQ ID No. 11a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 11 GEP 氨基酸 262-280

TCCAAGGAGAACGCTACCACGGACCTCCTCACTAAGCTGCCTGCGCACA
CAGTGGGG

SEQ ID No. 12: 部分 GEP 接头的氨基酸序列

GEP 氨基酸 418-441

“RGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRD”

SEQ ID No. 12a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 12 GEP 氨基酸 418-441

CGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACTGGAGAAGATGCCTGCCCCGCCGG
GCTTCCTTATCCCACCCAGAGAC

SEQ ID No. 13: 部分 GEP 接头的氨基酸序列

GEP 氨基酸 497-517

“KEVWSAQPATFLARSPHVGVK”

SEQ ID No. 13a: 部分 GEP 的核苷酸序列

含有 SEQ ID No. 13 GEP 氨基酸 497-517

AAGGAAGTGGTCTCTGCCAGCCTGCCACCTTCCTGGCCCGTAGCCCTC
ACGTGGGTGTGAAG

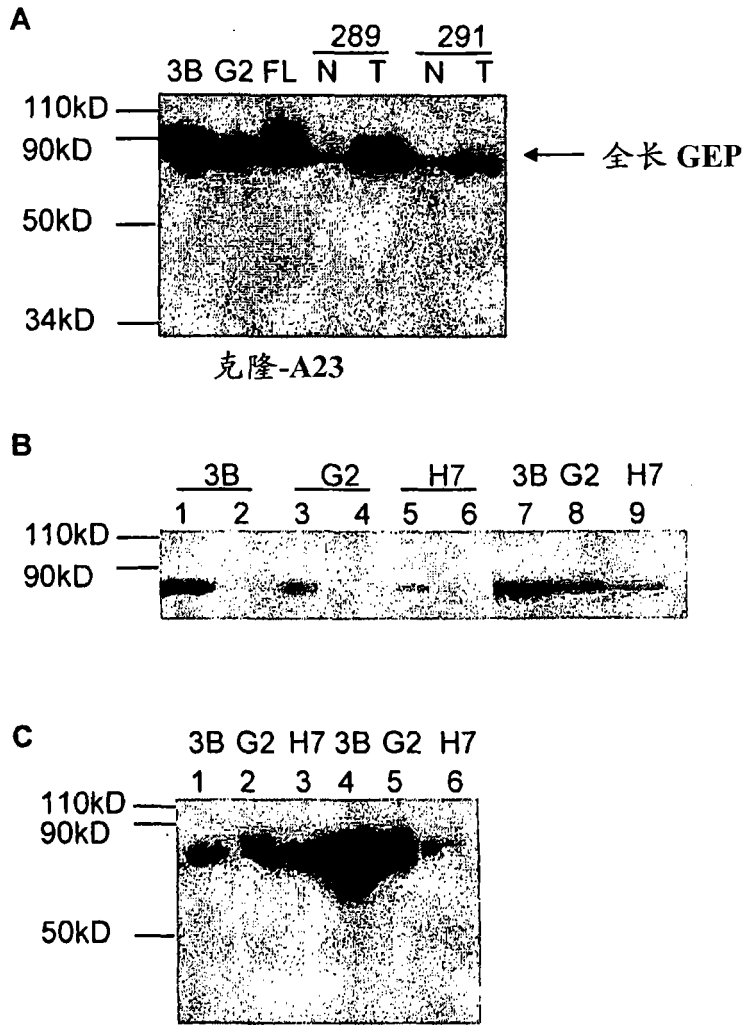


图 1

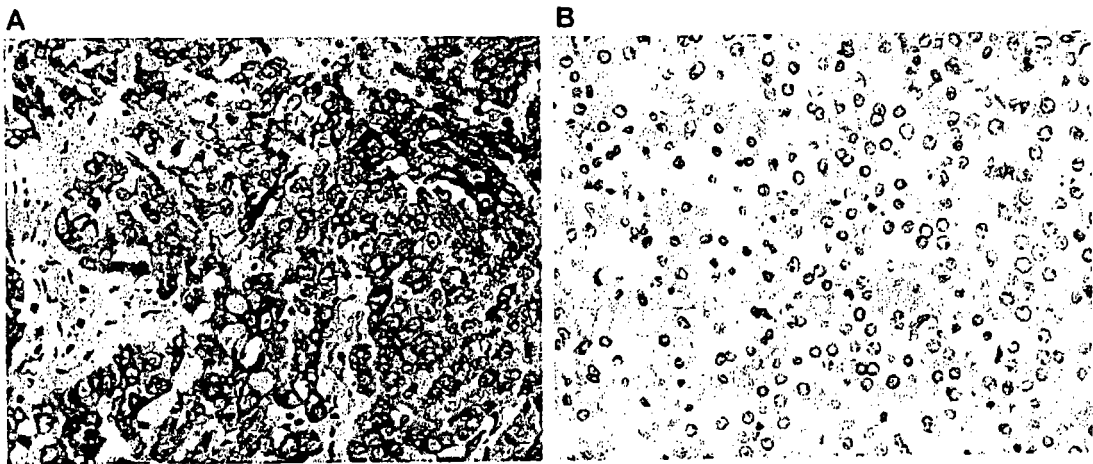


图 2

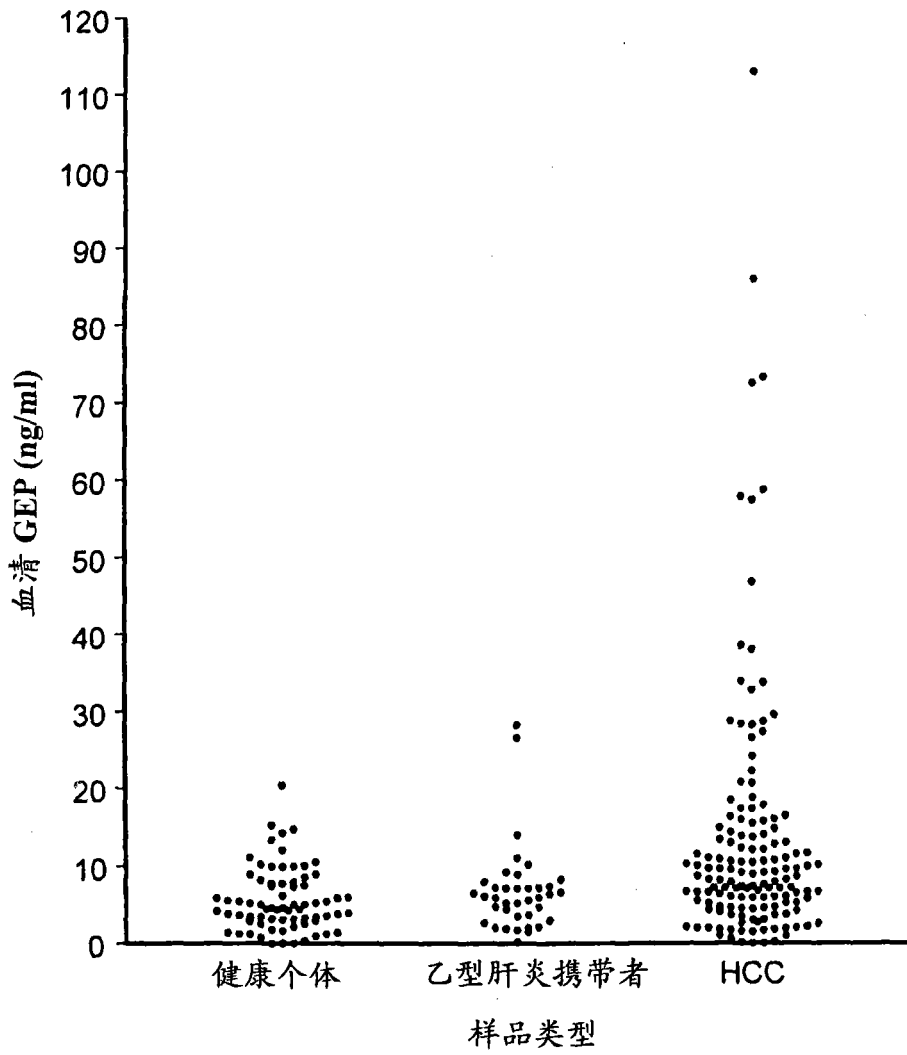


图 3

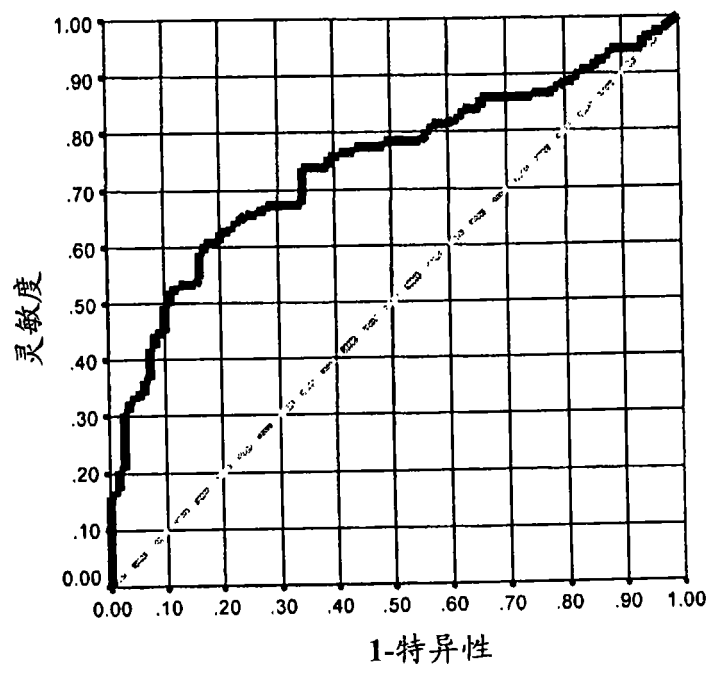


图 4

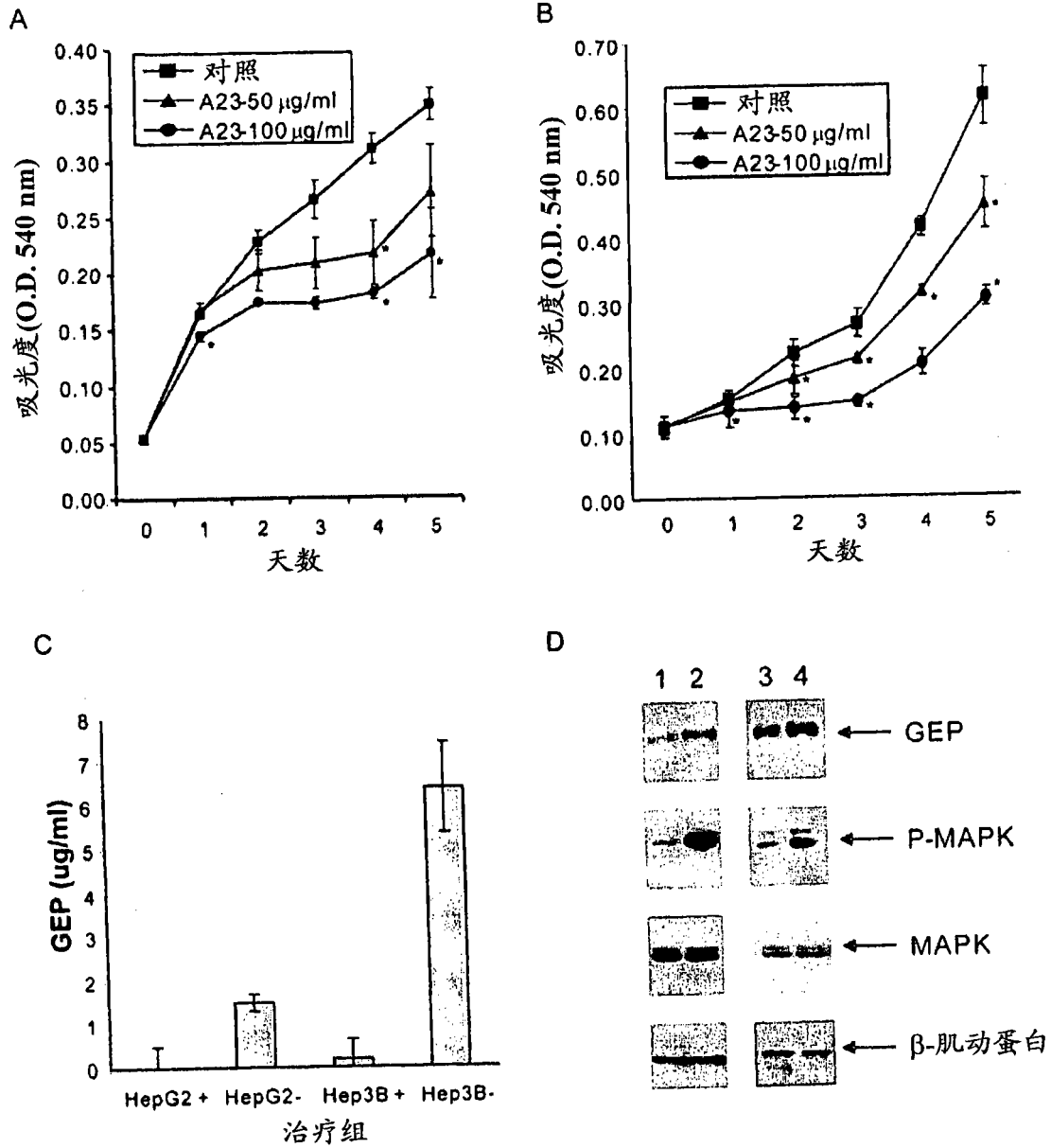


图 5

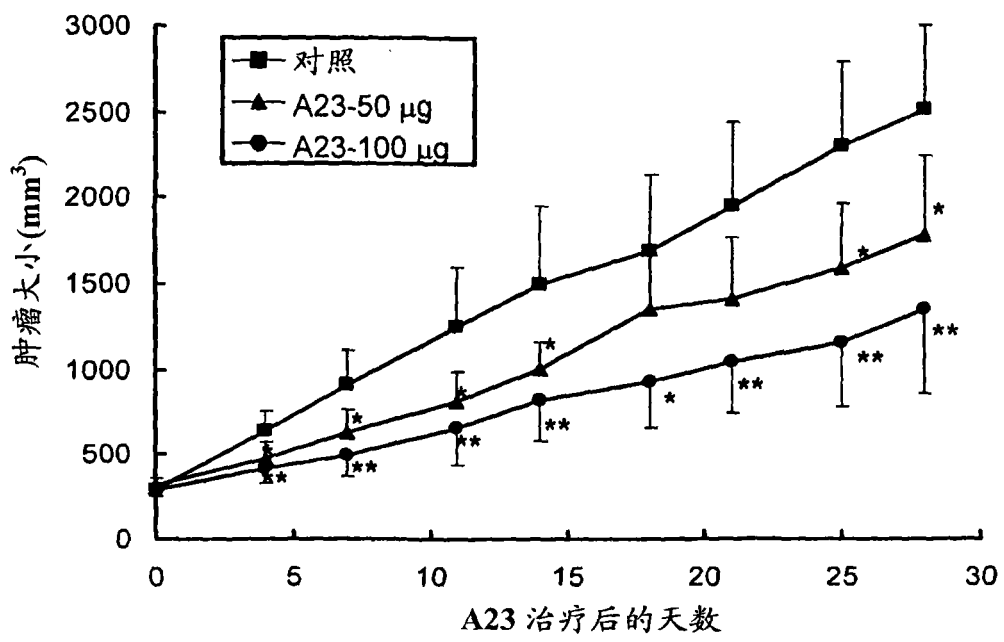


图 6

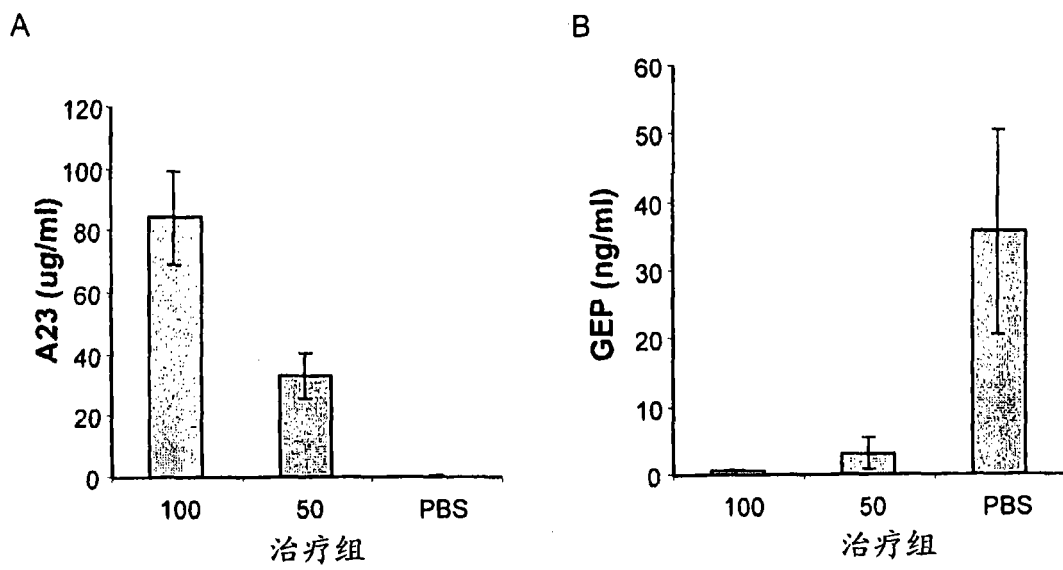


图 7

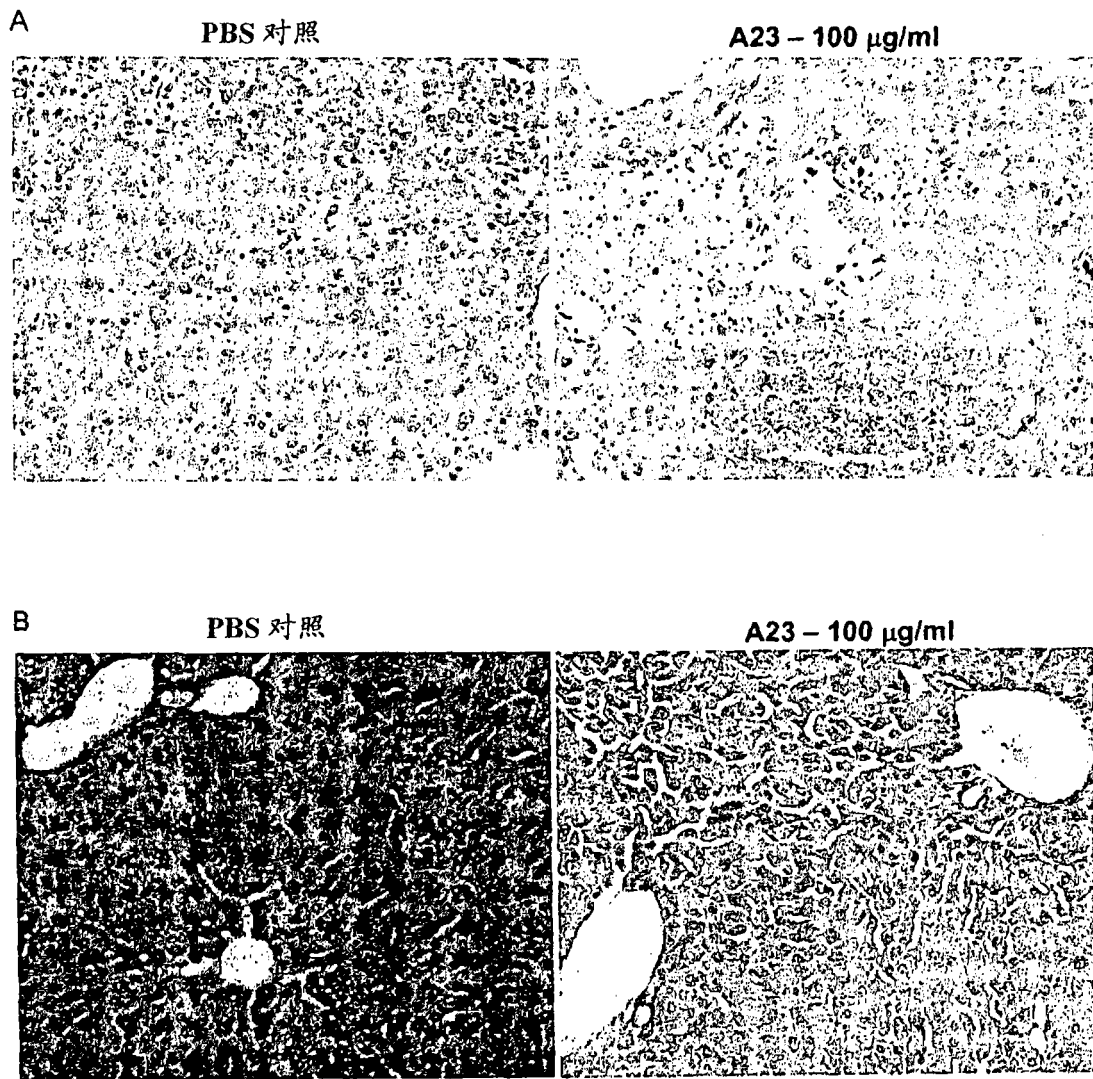


图 8

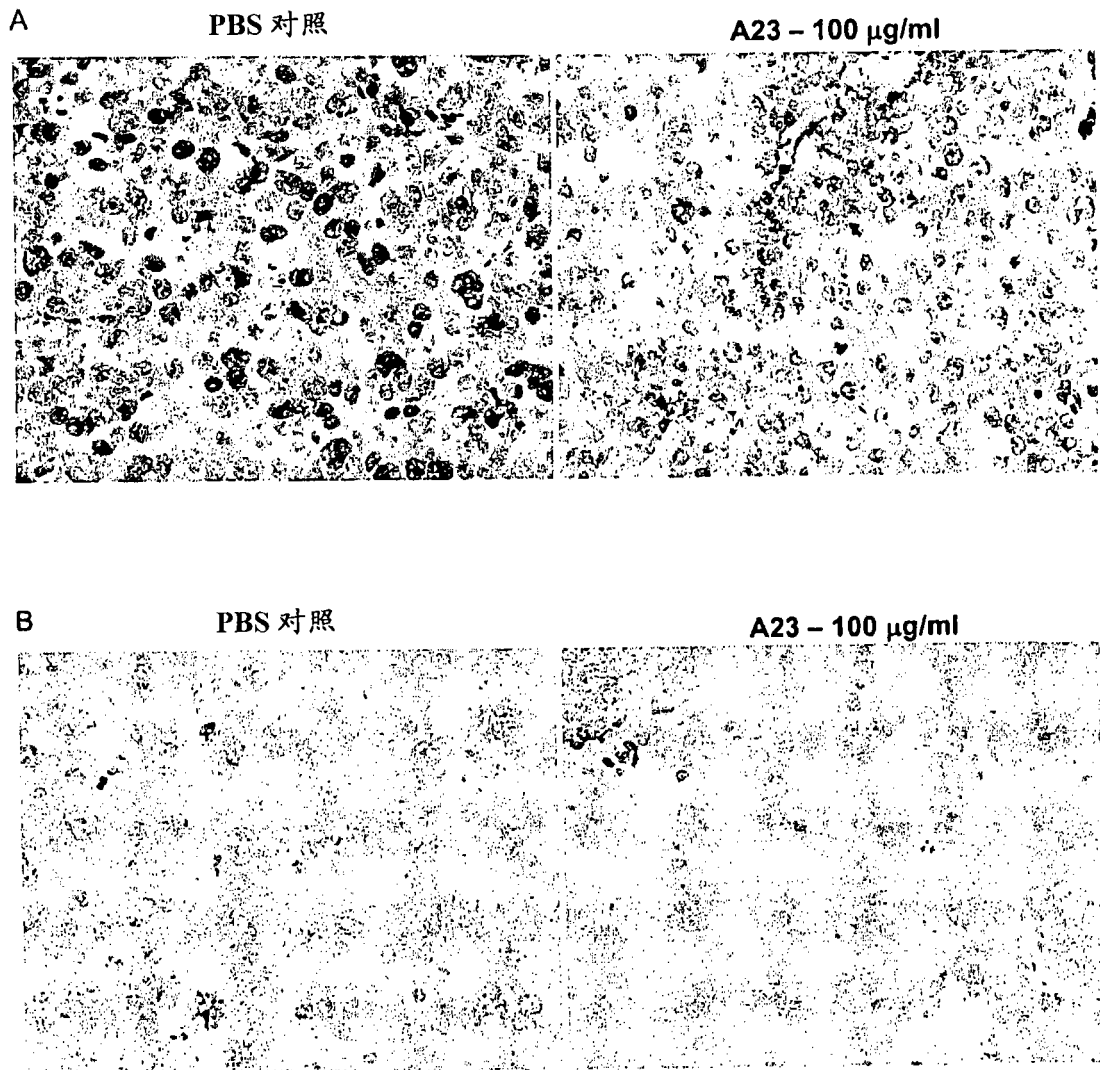


图 9

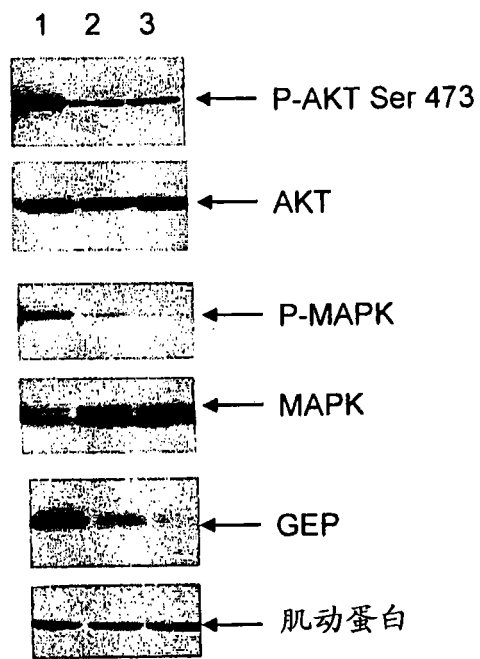


图 10

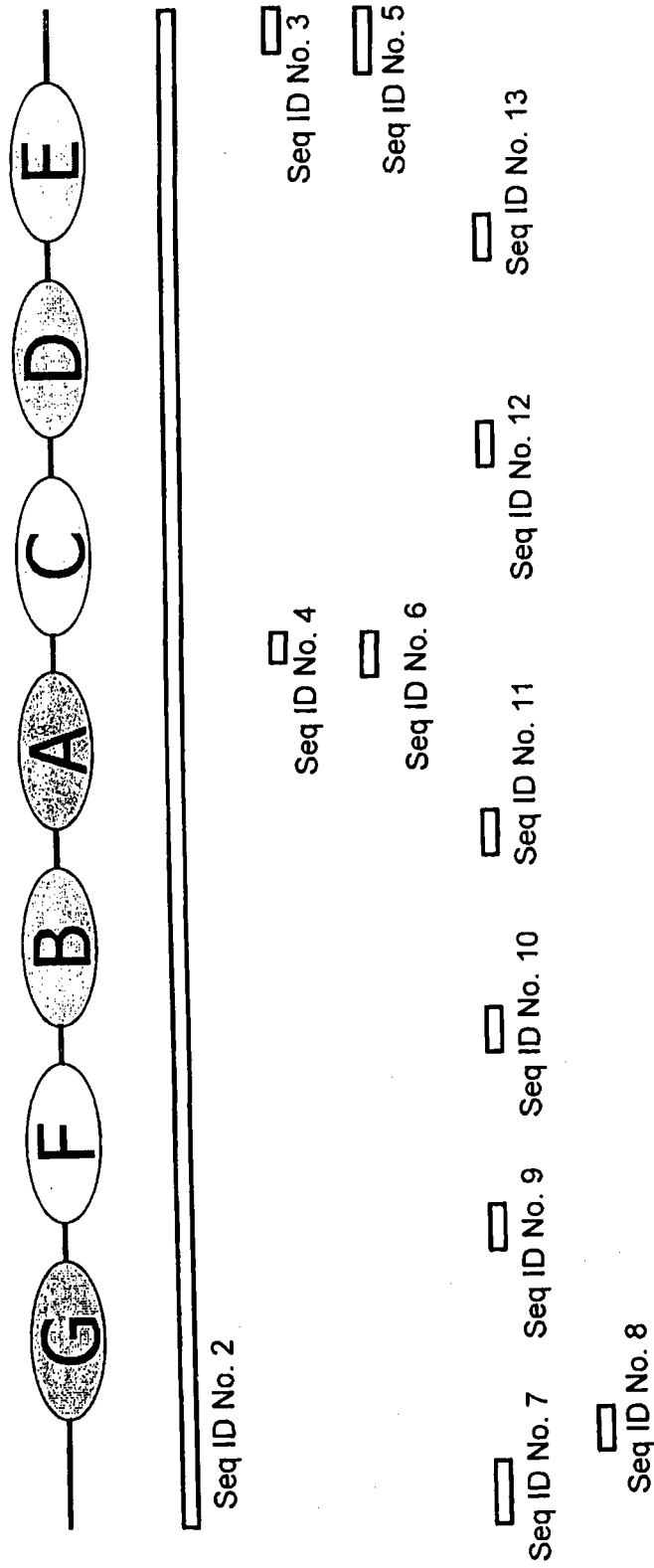


图 11

专利名称(译)	颗粒体蛋白 - 上皮素前体(GEP)抗体用于检测和抑制肝细胞癌(HCC)的用途		
公开(公告)号	CN101553728A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200780040670.4	申请日	2007-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	香港大学		
申请(专利权)人(译)	香港大学		
当前申请(专利权)人(译)	香港大学		
[标]发明人	张兆恬 何颂怡 范上达		
发明人	张兆恬 何颂怡 范上达		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/577 C07K14/00 A61K39/395 A61P35/00		
CPC分类号	C07K16/22 C07K14/475 A61K2039/505 G01N33/57438 C07K2317/73		
代理人(译)	梁谋 付磊		
优先权	60/861318 2006-11-28 US		
其他公开文献	CN101553728B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供检测血清GEP水平的方法。本发明进一步提供通过检测血清GEP水平确定患者是否患有肝细胞癌(HCC)的方法。在另一个实施方案中，本发明提供用抗 - GEP单克隆抗体A23治疗患者从而在体外和体内均抑制HCC生长和发展的方法。

