一种抗 GPC3 抗体或抗原结合片段及其用途

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段及其用途。

背景技术

GPC3 是一种硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,表达于多种恶性细胞的表面,例如肝细胞癌 (HCC) 细胞。 Glypican-3 通过糖基-磷脂酰肌醇锚 (GPI) 与细胞表面相连。GPC3 已被证明在超过 70% 的肝细胞癌活检组织中高度表达，但在邻近的非肿瘤组织中却没有。 GPC3 阳性 HCC 患者的无病生存率明显低于 GPC3 阴性 HCC 患者。

人们已发现某种类型的结合于 GPC3 的抗体通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性以及补体-依赖的细胞毒性(CDC)活性具有细胞生长-抑制活性(国际专利申请 WO 2003/000883)。此外，已表明 GPC3 在体内裂解并以 GPC3 的分泌形式分泌到血液中，且利用能够检测分泌形式 GPC3 的抗体可以进行肿瘤诊断(国际专利申请 WO2004/022739，WO 03/100429 和 WO 2004/018667)。

抗体偶联药物(antibody-drug conjugate，ADC)是一种新型的靶向性药物治疗方法，是将抗体与具有强细胞毒性的小分子化药偶联而成，兼具小分子药物强大的杀伤力和单抗高度的靶向性，因而成为肿瘤靶向治疗的研究和发展热点。ADC 一般包括采用一定方式连接的三个部分：抗体或抗体类配体、连接子(Linker)和小分子化药。ADC 的靶向性来自其中抗体部分，毒性主要来自小分子化药，抗体部分也可以带有毒性。抗体部分与肿瘤细胞表面抗原结合后，被内吞进入细胞，之后 ADC 药物会在溶酶体中分解，释放出有活性的化药毒物，破坏 DNA 或阻止肿瘤细胞分裂，最终杀死肿瘤细胞。ADC 相对其他治疗方式具有以下特点：治疗效力强；肿瘤细胞特异度高，误杀率低，治疗安全窗口更大；免疫原性弱，不容易产生抗药性；血清中循环时间长(短于裸抗)；对非靶点细胞毒性弱。

目前已报道的抗 GPC3 抗体有：

专利 CN1842540B 公开了一种抗 GPC3 抗体，例如 GC33，与传统抗体相比具有较高 ADCC 活性和 CDC 活性，其抗体表位位于 GPC3 C-末端的第 544 到第 553(PKDNEISTFH)的序列内，但是对 GPC3 表位的结合能力仍然较弱；

专利 CN10452033B 公开了一种磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 的高亲和力单克隆抗体及其用途，例如 YP7，其是由 50 个残基组成的肽免疫制备获得的抗体(DGMIKVKNQLRFLAELAYDLDVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHS)，对 GPC3 具有较高的亲和力，但是其与 GPC3 的亲和力仍有待于进一步提高；

专利 CN115850492A 也公开了一种抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 的单克隆抗体、多核苷酸及其制备方法和应用，并声称其解决了现有技术中 GPC3 单克隆抗体和目标抗原之间的亲和力较低的技术问题，然而其与 GPC3 的亲和力仍有待于进一步提高。

由此可见，现有技术报道的抗 GPC3 抗体仍然存在亲和力不够（尤其是细胞水平亲和力）或者杀伤力较差等问题，因此，目前，亟需开发一种对 GPC3 具有很强的结合能力，且具有较好的细胞杀伤效果的抗 GPC3 抗体或抗原结合片段。

发明内容

本发明的目的在于提供一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段及其用途，以解决现有技术中存在的亲和力低，细胞杀伤效果差等问题。

一个方面，本发明提供一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)；

所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，且所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区分别包含与 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；或分别包含与 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相比发生至多 10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个突变的序列；所述突变可选自插入、缺失和/或替换，所述替换优选为保守氨基酸的替换；所述氨基酸序列 SEQ ID Nos：1-2、6-9 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区根据 IMGT、Kabat、Chothia、AbM 或 Contact 的方式定义；

所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区分别包含与氨基酸序列 SEQ ID No：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；或分别包含与氨基酸序列 SEQ ID NO：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相比发生至多 10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个突变的序列；所述突变可选自插入、缺失和/或替换，所述替换优选为保守氨基酸的替换；所述氨基酸序列 SEQ ID No：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区根据 IMGT、Kabat、Chothia、AbM 或 Contact 的方式定义。

在一些实施方案中，所述突变的位置选自 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示氨基酸序列的第 56 位(D56)、第 100 位(Q100)或第 102 位(S102)中的一个或多个。在一些实施方案中，所述突变的位置包括 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示氨基酸序列的第 56 位(D56)和第 102 位(S102)。在一些优选实施方案中，所述突变选自 D56A、D56K、

Q100R 或 S102R 中的一个或多个。在一些优选实施方案中，所述突变选自 Q100R、S102R、D56A、D56K+Q100R、D56A+S102R 或 D56K+S102R。

在一些实施方案中，所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区分别具有与 SEQ ID Nos：1-2、6-9、23-28 任一所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相同的序列；以及所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区分别包含与氨基酸序列 SEQ ID No：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相同的序列。

在一些实施方案中，所述 VH 包含与 SEQ ID Nos：1-2、6-9、23-28 任一至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。在一些实施方案中，所述 VL 包含与 SEQ ID No：3 至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。

在一些实施方式中，所述 VH 包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：1-2、6-9、23-28 任一相同的序列；和/或所述 VL 包含与氨基酸序列 SEQ ID NO：3 相同的序列。

在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)；所述重链恒定区(CH)可以为人 IgG1 的重链恒定区；所述轻链恒定区(CL)可以为人 κ 轻链恒定区；具体地，所述重链恒定区(CH)包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：4、19 或 20 至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；所述轻链恒定区(CL)包含与氨基酸序列 SEQ ID No：5 至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。

在一些实施方式中，所述重链恒定区(CH)包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：4、19 或 20 相同的序列；所述轻链恒定区(CL)包含与氨基酸序列 SEQ ID No：5 相同的序列。

在一些实施方式中，所述重链(H)包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：11-18、29-34 任一至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；和/或所述轻链(L)包含与氨基酸序列 SEQ ID No：10 至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。

作为本发明的优选技术方案，所述重链(H)包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：11-18、29-34 任一相同的序列；所述轻链(L)包含与氨基酸序列 SEQ ID No：10 相同的序列。

在一些实施方案中，本发明所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段是人源化单克隆抗体。

在一些具体的实施方式中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段为：(1)嵌合抗体或其片段；(2)人源化抗体或其片段；或(3)全人抗体或其片段。

在一些实施方案中，本发明所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段具有以下一种或多种生物学功能：

(1) 与 SEQ ID Nos：37 或 38 所示的抗原特异性结合，并且不结合 SEQ ID No：36 所示的抗原；

(2) 与人、猴 GPC3 蛋白特异性结合，并且不结合鼠 GPC3 蛋白。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段与所述抗原的特异性结合通过平衡解离常数 KD 为例如 10^{-4}M 或更小(例如 10^{-5}M、10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M 或 10^{-12}M)来表现。

在一方面，本发明提供一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段特异性结合 SEQ ID Nos：37 或 38 所示的抗原，并且不结合 SEQ ID No：36 所示的抗原。在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：SEQ ID No：39 所示的 VL 和 SEQ ID No：40 所示的 VH；SEQ ID No：41 所示的 VL 和 SEQ ID No：42 所示的 VH；SEQ ID No：43 所示的 VL 和 SEQ ID No：44 所示的 VH；SEQ ID No：45 所示的 VL 和 SEQ ID No：46 所示的 VH；SEQ ID No：47 所示的 VL 和 SEQ ID No：48 所示的 VH；SEQ ID No：49 所示的 VL 和 SEQ ID No：50 所示的 VH；SEQ ID No：51 所示的 VL 和 SEQ ID No：52 所示的 VH；SEQ ID No：53 所示的 VL 和 SEQ ID No：54 所示的 VH；SEQ ID No：55 所示的 VL 和 SEQ ID No：56 所示的 VH；或者，SEQ ID No：57 所示的 VL 和 SEQ ID No：58 所示的 VH。

在一方面，本发明提供一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段与参考抗体竞争结合 GPC3 蛋白的相同表位，所述参考抗体包含 SEQ ID NO：11 所示的重链以及 SEQ ID NO：10 所示的轻链。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段能够阻断参考抗体与 GPC3 蛋白的结合的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%。所述竞争结合可以通过竞争性结合试验测定。本领域技术人员熟知的竞争性结合试验，其通过未知物抑制标记的已知抗原和其特异性抗体结合的能力来检测和定量未知物的免疫学试验，也称为竞争性抑制试验。例如，将抗原预包被在微孔板上，然后把系列稀释的未标记的待测抗体以及特定浓度的经标记的已知抗体共同加入上述预包被后的微孔板中进行孵育，然后在洗涤后测定在不同稀释度的待测抗体下，已知抗体结合到板上的数量。待测抗体竞争已知抗体结合抗原的能力越强，已知抗体结合抗原的能力就越弱，结合到板上的已知抗体就越少。可以利用放射性免疫试验、酶免疫试验如 ELISA、或荧光免疫试验测定待测抗体阻断经标记的参考抗体的能力。

本发明的另一目的在于提供一种新颖的 GPC3 抗原表位肽，以解决现有技术中存在的抗 GPC3 抗体、疫苗以及相关诊断试剂的开发需求未被满足的缺陷，为开发对 GPC3 具有强结合能力或具有较好的细胞杀伤效果的抗 GPC3 抗体提供有效的工具。

一个方面，本发明提供一种 GPC3 抗原表位肽，所述 GPC3 抗原表位肽具有免疫原性，能够诱导机体的免疫反应，产生针对 GPC3 的抗体。

一个方面，本发明提供一种 GPC3 抗原表位肽，所述 GPC3 抗原表位肽由人 GPC3 蛋白残基 485-496 内的至少 7 个连续氨基酸残基组成，所述人 GPC3 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID No：35 所示，并且所述 GPC3 抗原表位

肽具有如下一种或多种生物学功能：

(1) 与抗 GPC3 抗体特异性结合；

(2) 在受试者体内诱导针对 GPC3 的免疫应答(例如体液免疫应答)；

(3) 在受试者体内诱发抗 GPC3 抗体的产生；

(4) 预防和/或治疗受试者与 GPC3 相关的疾病。

在一些实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽与抗 GPC3 抗体的特异性结合通过 ELISA 方法测定。在一些实施方案中，ELISA 方法参照实施例 12 所记载，包括将所述 GPC3 抗原表位肽包被于酶标板，系列梯度稀释抗 GPC3 抗体，加入酶标板中孵育，孵育完成后清洗、显色，终止后测定 450nm 的 OD 值。在一些实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽与抗 GPC3 抗体的特异性结合通过 ELISA 所测定的抗原抗体复合物的 OD_{450} 值反映。在一些实施方案中，当所述 GPC3 抗原表位肽浓度为 6 μ g/mL，抗 GPC3 抗体饱和时的 OD_{450} 值不低于 1.5±0.1，或者不低于 2±0.1，或者不低于 2.5±0.1，或者不低于 3±0.1。在一些实施方案中，所述 OD_{450} 值不低于 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8 或 3.9。在一些实施方案中，与所述 GPC3 抗原表位肽特异性结合的抗 GPC3 抗体包含重链和轻链，所述重链包含 SEQ ID No：11 所示的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID No：10 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽的长度为 7 个、8 个、9 个、10 个、11 个或 12 个氨基酸。在一些实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽至少包含第 487 位的天冬酰胺和第 493 位的苯丙氨酸中的一个以上。

在一些实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽由人 GPC3 蛋白残基 487-493 位的连续氨基酸残基组成。在一些优选实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽由 SEQ ID No：38 所示的氨基酸序列组成。

在一方面，本发明提供一种重组抗原，其包含本发明的 GPC3 抗原表位肽和载体蛋白。所述重组抗原能够增强所述表位肽的免疫原性，使其被机体免疫系统识别并诱导免疫应答。

在一些实施方案中，所述重组抗原具有如下一种或多种生物学功能：

(1) 与抗 GPC3 抗体特异性结合；

(2) 在受试者体内诱导针对 GPC3 的免疫应答(例如体液免疫应答)；

(3) 在受试者体内诱发抗 GPC3 抗体的产生；

(4) 预防和/或治疗受试者与 GPC3 相关的疾病。

在一些实施方案中，与所述重组抗原特异性结合的抗 GPC3 抗体包含重链和轻链，所述重链包含 SEQ ID No：11 所示的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID No：10 所示的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明的 GPC3 抗原表位肽直接连接或通过接头连接载体蛋白。在一些实施方案中，所述接头可以是刚性或柔性接头，例如肽接头，所述肽接头包含一个或多个丝氨酸和/或甘氨酸。

在一些实施方案中，本发明的 GPC3 抗原表位肽连接至所述载体蛋白的 N 末端，和/或 C 末端，和/或插入载体蛋白的内部。在一些优选实施方案中，本发明的 GPC3 抗原表位肽连接至所述载体蛋白的 C 末端。在一些优选实施方案中，本发明的 GPC3 抗原表位连接至所述载体蛋白的 N 末端。

在一些实施方案中，所述载体蛋白包括但不限于匙孔血蓝蛋白（KLH）、牛血清白蛋（BSA）、甲状腺球蛋白、纤维蛋白原、明胶、多聚抗原肽、括白喉毒素 DT、白喉毒素的跨膜结构域 DTT、轮状病毒 VP7、利什曼原虫的热休克蛋白、空肠弯曲菌鞭毛蛋白、沙眼衣原体主要外膜蛋白、鸡卵白蛋白(OVA) 或免疫球蛋白 Fc 结构域，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 结构域。在一些优选实施方案中，载体蛋白选自 KLH 和 BSA。

在一方面，本发明提供一种嵌合抗原受体，其包含本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

在另一方面，本发明提供了一种嵌合抗原受体(CAR)，其包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域，所述细胞外抗原结合结构域包含本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

在一个方面，本发明还提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，或抗体缀合物（例如抗体-药物偶联物），或溶瘤病毒，或嵌合抗原受体，或双特异性或多特异性抗体分子，或 GPC3 抗原表位肽，或重组抗原，以及一种以上药学上可接受的载体。当组合物包含一种以上抗体（或其抗原结合片段、或抗体缀合物、或溶瘤病毒）时，可以分批施用抗体（或其抗原结合片段、或抗体缀合物、或溶瘤病毒）。该组合物可以任选地包含一种或多种另外的药物活性成分，例如另一抗体或药物，例如抗肿瘤药物。

本发明的药物组合物可以是疫苗，所述疫苗包括但不限于蛋白疫苗或核酸疫苗。

药物组合物可以包含任何数量的赋形剂。可以使用的赋形剂包括载体、表面活性剂、增稠剂或乳化剂、固体粘合剂、分散或悬浮助剂、增溶剂、着色剂、调味剂、包衣剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、防腐剂、等渗剂或其组合。在如下中教导了选择和使用合适的赋形剂，Gennaro 编著，Remington: The Science and Practice of Pharmacy，第 20 版（Lippincott Williams & Wilkins 2003），以引用的方式将其公开内容并入本文。

在另一个方面，本发明提供一种试剂盒，其包含本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段、 GPC3 抗原表位肽、重组抗原、抗体-药物偶联物或双特异性或多特异性抗体分子。

在一些实施方案中，所述试剂盒包含本发明的 GPC3 抗原表位肽，以及用于检测抗体的工具。

在一些实施方案中，所述试剂盒用于检测抗 GPC3 抗体。在一些实施方案中，所述试剂盒用于检测样品中是否存在抗 GPC3 抗体。在一些实施方案中，所述试剂盒用于检测样品中抗 GPC3 抗体的水平。在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体包含重链和轻链，所述重链包含 SEQ ID NO：11 所示的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID NO：10 所示的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供一种多核苷酸，其编码本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段、抗原表位肽或重组抗原。本发明的多核苷酸可以是，例如 DNA 或 RNA，并可包含或可不包含内含子序列。在优选实施方案中，所述多核苷酸为 cDNA 分子。本发明的多核苷酸可基于本发明的氨基酸序列的信息通过已知的方式制备或获得，例如通过自动 DNA 合成和/或重组 DNA 技术。

如本领域中所熟知，多个密码子可编码相同氨基酸。因此，编码蛋白质序列的核酸包括具有密码子简并性的核酸。本发明所述的氨基酸序列可由多种核酸编码。遗传密码为通用且熟知。编码本发明所述的任何氨基酸序列的核酸可基于本领域的公知常识容易地构思出，且可经优化以进行生产。尽管编码给定氨基酸的核酸序列的可能数目很大，给定遗传密码的标准表下，且在计算器的辅助下，本领域技术人员可容易地产生编码给定氨基酸的核酸序列的每种可能的组合。

在另一方面，本发明提供一种表达载体，其包含本发明的多核苷酸。所述的表达载体包括：细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

在另一方面，本发明提供一种宿主细胞，其包含本发明的多核苷酸或前述的表达载体；所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞，优选为 CHO 细胞。

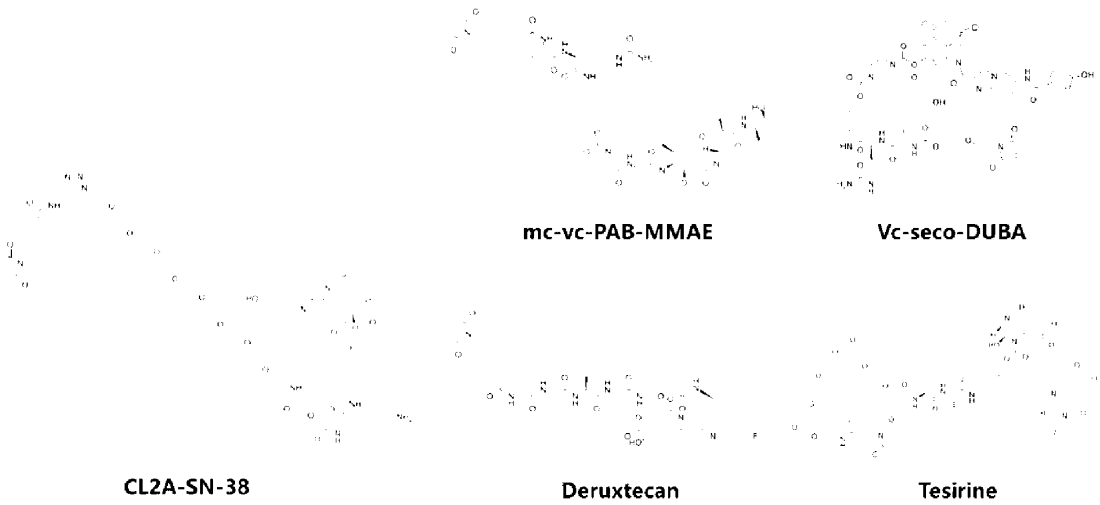
在另一方面，本发明提供一种双特异性或多特异性抗体分子，其包含本发明所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

在另一方面，本发明提供一种抗体-药物偶联物，其包含本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段以及药物或毒素；所述药物或毒素选自：SN-38、MMAE、PBD dimer、DX-8951 (DXd)或 DUBA 中的一种或多种。

所述抗体和所述药物可以通过接头偶联从而形成抗体-药物偶联物（ADC）。典型地，ADC 包含一种本发明所述的抗 GPC3 抗体或抗原结合片段，通过接头连接至一种药物或毒素。所述接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解，从而使治疗剂从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括，酶降解的接头例如，可以被细胞内溶酶体蛋白酶降解的含有肽基的接头，或者糖接头例如，可以被葡糖苷酸酶降解的含葡糖苷酸的接头。肽基接头可以包括二肽例如，缬氨酸-瓜氨酸，苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括，pH 敏感接头（例如 pH 小于 5.5 时水解的腙接头），在还原条件下会降解的接头（例如二硫键接头）。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

连接到抗体之前，接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团，连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的，例如马来酰亚胺类化合物，卤代酰胺，卤代酯，卤代甲基酮，苄基卤代物，乙烯基砜，吡啶基二硫化物，汞衍生物，和聚亚甲基二甲基硫醚硫代磺酸盐。接头可以包括，例如，通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

作为优选，所述接头连接的药物或毒素选自：CL2A-SN-38（CAS No. :1279680-68-0）、mc-vc-PAB-MMAE（CAS No. : 646502-53-6）、Tesirine（SG3249, CAS No. : 1595275-62-9）、Deruxtecan（CAS No. : 1599440-13-7）、Vc-seco-DUBA（SYD985, CAS No. : 1345681-58-4）。分子结构如下图所示：



在本发明中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段通过 CL2A 接头偶联 SN-38。

在本发明中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段通过 mc-VC-PAB 接头偶联 MMAE。

在本发明中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段通过 maleimide-dPEG8-VA-PABA 接头偶联 PBD dimer。

作为优选，所述的药物可以是任何细胞毒性，抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中，接头连接抗体和药物，而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如，药物可以具有可以和连接物成键的氨基，羧基，巯基，羟基或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下，药物在连接到抗体之前，具有反应的活性基团。

作为优选，所述的细胞毒性药物选自下组：抗微管蛋白药物、DNA 小沟结合试剂、DNA 复制抑制剂、DNA

烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱，或其组合。

作为优选，特别有用的细胞毒性药物的例子包括，例如，DNA 小沟结合试剂、DNA 烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂，典型的细胞毒性药物包括，例如奥瑞他汀（auristatins）、喜树碱（camptothecins）、多卡霉素/倍癌霉素（duocarmycins）、依托泊甙（etoposides）、美登木素（maytansines）和美登素类化合物（maytansinoids）(例如 DM1 和 DM4)、紫杉烷（taxanes）、苯二氮卓类（benzodiazepines）或者含有苯二氮卓的药物（benzodiazepine containing drugs）（例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类（PBDs），吲哚啉苯并二氮卓类（indolinobenzodiazepines）和噁唑烷并苯并二氮卓类（oxazolidinobenzodiazepines））和长春花生物碱（vinca alkaloids），或其组合。

作为优选，所述的毒素选自下组：耳他汀类（例如，耳他汀 E、耳他汀 F、MMAE 和 MMAF）、金霉素、类美坦西醇、篦麻毒素、篦麻毒素 A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙（tenoposide）、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、α-八叠球菌、白树毒素、迈托毒素（mitogellin）、局限曲菌素（retstrictocin）、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白（curicin）、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草（Sapaonaria officinalis）抑制剂、糖皮质激素，或其组合。

作为优选，所述的药物或毒素选自：SN-38（NK012, CAS No.: 86639-52-3）、MMAE（Monomethyl auristatin E, CAS No.: 474645-27-7）、PBD dimer（SG3199, CAS No.: 1595275-71-0）、DX-8951（Exatecan, CAS No.: 171335-80-1）或 DUBA（duocarmycin-hydroxybenzamide-azaindole）中的一种或多种。

在本发明中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段通过 maleimide-GGFG 接头偶联 DX-8951(DXd)。

在本发明中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段通过 Vc-seco 接头偶联 DUBA。

在另一方面，本发明还提供一种本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段或本发明的药物组合物或本发明的抗体-药物偶联物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途，所述癌症优选为肝癌。

在另一方面，提供本发明的 GPC3 抗原表位肽、重组抗原、核酸分子、载体或宿主细胞在如下任一中的应用：

(1) 制备抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段；

(2) 制备用于治疗和/或预防和/或诊断受试者与 GPC3 相关的疾病的产品；优选的，所述疾病为 GPC3 阳性癌症；

(3) 制备检测抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的产品；优选的，所述抗 GPC3 抗体包含 SEQ ID NO：11 所示的重链和 SEQ ID NO：10 所示的轻链；

(4) 检测抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段；优选的，所述抗 GPC3 抗体包含 SEQ ID NO：11 所示的重链和 SEQ ID NO：10 所示的轻链；

(5) 筛选抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述疾病为 GPC3 阳性癌症，例如肝癌、结直肠癌、卵巢癌等。

在一方面，本发明提供一种制备抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的方法，包括本发明的 GPC3 抗原表位肽、重组抗原、核酸分子、载体或宿主细胞刺激动物免疫系统，使所述动物产生抗体的步骤。

在一些实施方案中，所述动物选自人，鼠，兔，猴，牛，羊或羊驼等哺乳动物。

在一方面，本发明提供一种筛选抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的方法，使本发明的 GPC3 抗原表位肽与要分析的抗体或其抗原结合片段接触，检测所述 GPC3 抗原表位肽对所述抗体或其抗原结合片段的结合，其中，如果所述 GPC3 抗原表位肽和所述抗体或其抗原结合片段展现出结合，那么所述抗体或其抗原结合片段是候选的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段与所述 GPC3 抗原表位肽结合，所述结合通过 ELISA 方法测定。在一些实施方案中，ELISA 方法参照实施例 12 所记载，包括将所述 GPC3 抗原表位肽包被于酶标板，系列梯度稀释抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，加入酶标板中孵育，孵育完成后清洗、显色，终止后测定 450nm 的 OD 值。在一些实施方案中，所述 GPC3 抗原表位肽与抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的特异性结合通过 ELISA 所测定的抗原抗体复合物的 OD_{450} 值反应。在一些实施方案中，当所述 GPC3 抗原表位肽浓度为 6 μg/mL，抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段饱和时的 OD_{450} 值不低于 1.5±0.1，或者不低于 2±0.1，或者不低于 2.5±0.1，或者不低于 3±0.1。在一些实施方案中，所述 OD_{450} 值不低于 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8 或 3.9。进一步地，本发明还提供一种本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的制备方法：

本发明所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的 DNA 分子的序列可以采用常规技术获得，例如利用杂交瘤 PCR 扩增或噬菌体展示文库筛选等。此外，还可将轻链和重链的编码序列融合在一起，形成单链抗体（例如 scFV）。

一旦获得了有关的序列，就可以将其克隆入载体，再转入宿主细菌，然后通过常规方法从宿主细菌中提取得到有关载体。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体（或其片段，或其衍生物）的 DNA 序列。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可

利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。通常，在适合本发明抗体表达的条件下，培养转化所得的宿主细胞，然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤，如蛋白 A-Sepharose 亲和层析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析等常规分离纯化手段及这些方法的结合，纯化得到本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

作为本发明所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的制备方法的优选实施方式，所述分离、纯化抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的方法为蛋白 A 亲和层析法、阳离子交换法或阴离子交换法。

所得单克隆抗体或双特异性抗体可用常规手段来鉴定。例如，抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验，如酶联免疫吸附分析（ELISA）或放射性免疫分析（RIA）来测定。抗体的结合亲和力例如可用 Munson 等人，Anal.Biochem.，107:220(1980)的 Scatchard 分析来测定。

在本发明中，所述抗体-药物偶联物是按照包括如下步骤的方法制备获得的：

本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的链间二硫键被还原，产生 2n 个（如 2，4，6，8 个）巯基基团；

药物-接头化合物与还原后的抗体巯基交联，生成相应的抗体-药物偶联物；

经超滤脱盐进一步纯化得到产物。

为清楚起见，本文定义了在化合物的描述中所使用的通用术语。

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照普通的含义去理解。当本文中出现商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。这里所采用的术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“GPC3”(也称为磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3)是硫酸肝素蛋白聚糖的一员，通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidylinositol，GPI)锚定于细胞膜表面。人 GPC3 基因位于 X 染色体(Xp26)上并编码 70kDa 蛋白质，该蛋白质含有 580 个氨基酸，在 Arg358 和 Ser359 之间被弗林蛋白酶样转化酶内切切割，产生 40kDa 的 N 末端亚基和 30kDa 的 C 末端亚基，C 末端亚基上还有两条硫酸乙酰肝素(heparan sulfate，HS)链。

本文所指的术语“抗体”包括完整抗体及其任意抗原结合片段（即，“抗原结合部分”）或其单链。完整抗体是包含通过二硫键链间连接的两条重（H）链和两条轻（L）链的糖蛋白。每条重链由重链可变区（在本文中缩写为 VH）和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区（在本文中缩写为 VL）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 区和 VL 区可以进一步细分为高变区（称为互补决定区（CDR）），其间间隔着更为保守的区域，称为框架区（FR）。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成，从氨基端到羧基端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q）。

术语“抗原结合片段”（或简称为“抗体部分”）是指与抗原（例如，GPC3 蛋白）特异性结合的抗体的一个或多个片段。已经显示出了抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段得以实现。术语抗体的“抗原结合片段”所涵盖的结合片段的实例包括：（i）Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；（ii）F(ab')2 片段，包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；（iii）由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；（iv）由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；（v）由 VH 结构域组成的 dAb 片段（Ward 等，（1989）Nature 341：544-546）；（vi）分离的互补决定区（CDR）；以及（vii）纳米抗体，包含单个可变域和两个恒定结构域的重链可变区。此外，尽管 FV 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分隔开的基因编码，但是它们可以使用重组方法通过接头连接起来，从而使它们成为单一蛋白链，其中，VL 区和 VH 区配对以形成单价分子（称为单链 Fv（scFv）；参见例如 Bird 等，（1988）Science 242：423-426；以及 Huston 等，（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：5879-5883）。此类单链抗体也包含在术语抗体的“抗原结合片段”范围内。这些抗体片段可通过本领域技术人员已知的常规技术获得，为使用而进行的片段筛选与完整抗体的方法相同。

如本文所使用的，“分离的抗体”指实质上不含有其它具有不同抗原特异性抗体的抗体，例如，特异性结合 GPC3 蛋白的分离抗体实质上不含与 GPC3 之外的其他抗原特异性结合的抗体。但是，例如，在一些实施例中，特异性地结合人 GPC3 蛋白的分离的抗体可以与其它抗原（例如来自其它物种的 GPC3 蛋白）具有交叉反应性。此外，分离的抗体可以实质上不含其它细胞物质和/或化学物质。

如本文所使用的，术语“单克隆抗体”是指具有单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组成表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

术语“嵌合抗体”是指通过将来自非人来源的遗传物质和来自人类的遗传物质的结合而制成的抗体。或者更通常地，嵌合抗体是具有来自某物种的遗传物质和来自另一物种的遗传物质的抗体。

术语“双特异性”或“多特异性”指抗体和/或抗原结合分子能够特异性结合两种或多种不同的抗原性决定簇，通常，双特异性或多特异性抗体或抗原结合分子包含两种抗原结合位点，其中每种特异于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中，所述双特异性或多特异性抗体或抗原结合分子能够同时结合两种或多种抗原决定簇，特别是在两种或多种不同的细胞上表达的两种或多种抗原性决定簇。

如本文所使用的，术语“人源化抗体”是指来自非人类物种的抗体，其蛋白质序列已被修饰以增加其与人类天然产生的抗体变体的相似性。

术语“抗体-药物偶联物”是指利用抗体特异性识别肿瘤细胞表面特定抗原的特点，从而实现精准地将抗肿瘤治疗剂（如细胞毒素或细胞抑制剂、放射性同位素、小分子化疗物等）递送到肿瘤靶细胞，发生胞内积蓄并释放，达到精准杀伤肿瘤的目的。ADC 也因为其分子量大小合适，稳定性高，靶向性强，毒副作用小被认为是最具潜力的抗肿瘤药物。除单克隆抗体外，双特异性抗体也可以偶联治疗剂。在一些实施方案中，与本发明的抗体或双特异性抗体偶联以形成抗体偶联物的部分是细胞毒素，所述细胞毒素是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质，并包括小分子细胞毒素。在一些实施方案中，所述细胞毒素选自 SN-38、MMAE、PBD dimer、DX-8951 (DXd)或 DUBA。

如本文所用，术语“包括”、“包含”和“具有”之间可互换使用，旨在表示方案的包含性，意味着所述方案可存在除所列出的元素之外的其他元素。同时应当理解，在本文中使用“包括”、“包含”和“具有”描述，也提供“由……组成”方案。

本文术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单价抗体、多价抗体、完整抗体、抗原结合片段、裸抗体、缀合抗体、人源化抗体或全人抗体。

如本文中所使用的，术语“表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成，并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少 3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14 或 15 个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，EpitopeMapping Protocols in Methods in Molecular Biology，第 66 卷，G.E.Morris，Ed.(1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本文中所使用的，术语“表位肽”是指，抗原上能够用作表位的肽段。在一些情况下，单独的表位肽即能够被针对所述表位的抗体特异性识别/结合。在另一些情况下，可能需要将表位肽与载体蛋白融合，以便表位肽能够被特异性抗体识别。

如本文中所使用的，术语“载体蛋白”是指这样的蛋白，其可以充当表位肽的载体，即，其可以在特定位置处(例如蛋白内部，N 端或 C 端)插入表位肽，以便该表位肽能够呈现出来，从而该表位肽能够被抗体或免疫系统识别。

本文术语“保守氨基酸”通常是指属于同一类或具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性、亲水性、主链构象和刚性)的氨基酸。示例性地，下述每组内的氨基酸属于彼此的保守氨基酸残基，组内氨基酸残基的替换属于保守氨基酸的替换：

1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；

2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；

4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)；

5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；和

6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

本文术语“同一性”和“序列……一致性”可以互换，通过以下方式计算获得：为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的“同一性”百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

如本文所用，符号“+”表示突变的组合。在本文中，使用以下术语指定突变：S102R 表示亲本序列第 102 位的氨基酸残基丝氨酸(S)被精氨酸(R)取代。

术语“受试者”包括任何人类或非人类的动物。术语“非人类的动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，比如，非人类的灵长类动物、啮齿类动物、家兔、猪、狗、猫、鸡、两栖动物和爬行动物，尽管哺乳动物比如非人类的灵长类动物、啮齿类动物是优选的。

术语“治疗有效量”是指足以预防或改善与疾病或病症（例如癌症）有关的症状和/或减轻疾病或病症严重程度的本发明的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的量。治疗有效量应在所治疗的病症的背景下理解，其中本领域技术人员可以容易地识别出实际的有效量。本发明的抗体是如下文和以下实施例所述的在结构上和化学上进行表征的单克隆抗体。抗体的重链/轻链可变区及恒定区的氨基酸序列 ID 号（SEQ ID No：）汇总在表 1、表 5 中。

表 1、表 5 中的重链可变区 CDR 和轻链可变区 CDR 由 Kabat、Chothia、IMGT、AbM 或 Contact 编号系统/方法定义。本发明示例性的抗 GPC3 抗体的 CDR 区序列详见表 3。

表 1 抗 GPC3 抗体重链/轻链可变区及恒定区的氨基酸序列

抗体	SEQ ID No：	氨基酸序列
GC90-VH	1	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSS

GC90LH5-VH	2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90-VL	3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIK
GC90-CH	4	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90-CL	5	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GC90LH1-VH	6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSS
GC90LH2-VH	7	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSS
GC90LH3-VH	8	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH4-VH	9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSS
GC90-L	10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
GC90-H	11	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90-4mu-H	12	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90-6mu-H	13	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH1-H	14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90LH2-	15	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD

H		RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90LH3-H	16	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90LH4-H	17	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90LH5-H	18	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90-4mu-CH	19	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
GC90-6mu-CH	20	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
hYP7HM-L	21	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS SRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYNYPLTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
hYP7HM-H	22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKNAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRNKT NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVAGNSFAYWGQGT LVTVSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH6-VH	23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPRWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH7-VH	24	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH8-	25	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGA

VH		RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH9-VH	26	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGK RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPRWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH10-VH	27	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGA RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH11-VH	28	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGK RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEVWG QGTMVTVSS
GC90LH6-H	29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPRWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH7-H	30	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGD RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH8-H	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGA RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH9-H	32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGK RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPRWSSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH10-H	33	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGA RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
GC90LH11-H	34	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSGK RVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEVWG QGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

表 2 GPC3 抗原的氨基酸序列

描述	SEQ ID	氨基酸序列

	No：	
人 GPC3 蛋白	35	MAGTVRTACLVVAMLLSLDFPGQAQPPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPGLKWVPET PVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSASMELKFLIIQNAAV FQEAFEIVVRHAKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDINVDD MVNELFDSLFPVIYTQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFPKLIMTQVS KSLQVTRIFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMMVKPC GGYCNVVMQGCMAGVVEIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTI HDSIQYVQKNAGKLTTTIGKLCAHSQQRQYRSAYYPEDLFIDKKVLKVAHVEHEE TLSSRRRELIQKLKSFISFYSALPGYICSHSPVAENDTLCWNGQELVERYSQKAAR NGMKNQFNLHELKMKGPEPVVSQIIDKLKHINQLLRTMSMPKGRVLDKNLDEEG FESGDCGDDEDECIGGSGDGMIKVKNQLRFLAELAYDLDVDDAPGNSQQATPKD NEISTFHNLGNVHSPLKLLTSMAISVVCFFFLVH
GPC3-A 肽	36	GDGMIKVKNQLRFLAELAYDLDVDDAPGNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHS
GPC3-B 肽	37	MPKGRVLDKNLDEEGFESGDCGDDEDECIGGSGDGMIKVKNQLRFLAELAYDLD
GPC3-B3	38	DKNLDEEGFESG

表 3 抗 GPC3 抗体重链可变区和轻链可变区 CDR 的编号系统/方法定义

抗体 ID	CDR 区	序列	残基位置
SEQ ID Nos：1-2、6-9	CDR1(根据 IMGT)	GFTFNSYA	氨基酸 26-33
	CDR2(根据 IMGT)	IKSSGDRV	氨基酸 51-58
	CDR3(根据 IMGT)	AKPQWSSPQRTFEV	氨基酸 97-110
	CDR1(根据 Kabat)	SYAMS	氨基酸 31-35
	CDR2(根据 Kabat)	SIKSSGDRVQYADSVKG	氨基酸 50-66
	CDR3(根据 Kabat)	PQWSSPQRTFEV	氨基酸 99-110
	CDR1(根据 Chothia)	GFTFNSY	氨基酸 26-32
	CDR2(根据 Chothia)	KSSGDR	氨基酸 52-57
	CDR3(根据 Chothia)	PQWSSPQRTFEV	氨基酸 99-110
	CDR1(根据 AbM)	GFTFNSYAMS	氨基酸 26-35
	CDR2(根据 AbM)	SIKSSGDRVQ	氨基酸 50-59
	CDR3(根据 AbM)	PQWSSPQRTFEV	氨基酸 99-110
	CDR1(根据 Contact)	NSYAMS	氨基酸 30-35
	CDR2(根据 Contact)	WVASIKSSGDRVQ	氨基酸 47-59
	CDR3(根据 Contact)	AKPQWSSPQRTFE	氨基酸 97-109
SEQ ID No：3	CDR1(根据 IMGT)	QSISSY	氨基酸 27-32
	CDR2(根据 IMGT)	AA	氨基酸 50-51
	CDR3(根据 IMGT)	QQSYSTPWT	氨基酸 89-97
	CDR1(根据 Kabat)	RASQSISSYLN	氨基酸 24-34
	CDR2(根据 Kabat)	AASSLQS	氨基酸 50-56
	CDR3(根据 Kabat)	QQSYSTPWT	氨基酸 89-97
	CDR1(根据 Chothia)	RASQSISSYLN	氨基酸 24-34
	CDR2(根据 Chothia)	AASSLQS	氨基酸 50-56
	CDR3(根据 Chothia)	QQSYSTPWT	氨基酸 89-97
	CDR1(根据 AbM)	RASQSISSYLN	氨基酸 24-34
	CDR2(根据 AbM)	AASSLQS	氨基酸 50-56
	CDR3(根据 AbM)	QQSYSTPWT	氨基酸 89-97
	CDR1(根据 Contact)	SSYLNWY	氨基酸 30-36
	CDR2(根据 Contact)	LLIYAASSLQ	氨基酸 46-55
	CDR3(根据 Contact)	QQSYSTPW	氨基酸 89-96

通过下面的详尽描述和实施例，本发明所公开的其它特征和优点将变得显而易见，其不应被解释为限制性的。在本申请全文中引用的所有参考文献、Genbank 条目、专利和公开的专利申请的内容以引用的方式明确地并入本文。

附图说明

图 1A 至图 1B 显示了实施例 1 筛选的阳性单克隆抗体在噬菌体水平与 GPC3-B 肽的 ELISA 检测结果。

图 2、图 3 显示了 GC90 及其突变体单抗对 GPC3 蛋白的亲和力。

图 4 显示了人源化单抗 GC90 和 hYP7HM 在不同浓度下与人肝癌细胞 HepG2、Hep3B 和 Huh-7 的结合情况。

图 5A 至 5D 显示了 GC90 及其突变体单抗与人肝癌细胞的结合情况。

图 6 显示了人源化单抗 GC90 和 hYP7HM 在 1nM 浓度下在人肝癌细胞 HepG2 或 Hep3B 中的内吞情况。

图 7 显示了 GC90 及其突变体单抗的药物偶联物对人肝癌细胞的杀伤情况。

图 8A、8B 显示了本发明的抗体-药物偶联物对体内肿瘤的抑制情况。

图 9 显示了 GC90 与各重叠肽之间经 ELISA 检测所反应的结合强度结果，其中下划线部分的氨基酸序列对应各重叠肽的具体序列。

图 10 显示了人 GPC3 蛋白和鼠 GPC3 蛋白之间的氨基酸序列比对分析。

图 11 显示了 GC90 与其他已报道的抗 GPC3 抗体在 GPC3 蛋白上的抗原识别区域分布情况。**具体实施例**

实施例 1

靶向 GPC3 新表位的全人源抗体阳性克隆分子获得

使用天然全人噬菌体展示文库与 GPC3-B 肽（GPC3 蛋白细胞外结构域第 478 位氨基酸残基 Met 到 531 位氨基酸残基 Asp，作为抗原对人源化重组抗体库进行筛选）进行三轮淘选，获得噬菌体文库洗脱液。将中和后的噬菌体淘选洗脱液加入准备好的 TG1 菌液中，混匀后 37℃静置侵染 TG1 宿主菌 45 分钟。充分侵染后将菌液梯度稀释涂布在带有相关抗性的琼脂平板上，倒置于 37℃过夜培养。次日，准备分装有 0.5mL 2YT 培养基（含有 0.2%w/v 的葡萄糖，及 0.1mg/mL 氨苄抗生素）的 96 孔无菌深孔板，用无菌枪头挑取平板中培养的单克隆菌落于对应孔板中，37℃ 220rpm 振荡过夜培养（16-18 小时）。次日取 0.05-0.1mL 过夜培养的单克隆菌液转接于新准备的无菌深孔板中（分装有 0.5mL 含有终浓度 0.1mg/mL 氨苄抗生素的 2YT 培养基），培养至 OD_{600} 值约为 0.6-0.8，加入一定比例的辅助噬菌体振荡混匀后于 37℃静置侵染 45 分钟后，补加 0.25mL 2YT 培养基（含有 0.1mg/mL 氨苄抗生素，及加入后终浓度为 0.05mg/mL 的卡那霉素）并于 30℃ 220rpm 振荡过夜培养（16-18 小时）。将过夜表达的菌液 4000rpm 离心 10 分钟，获得噬菌体展示表达上清用于针对 GPC3-B 肽的 ELISA 结合检测及针对相应细胞的 FACS 结合检测，以获得阳性全人源抗体克隆。

间接 ELISA 用于评估上清液中噬菌体展示抗体对于 GPC3-B 肽的结合能力。将 ELISA 酶标板用 100μl/孔的 CBS 包被试剂中 4μg/mL 的 GPC3-B 肽在 4℃ 下包被过夜。用 PBST（含 0.05%吐温）洗涤板，并将其用 300μl/孔的含 3%脱脂牛奶的 PBS 在 37℃ 封闭 1 小时。随后弃去封闭液，向每个板加入 50μl 梯度稀释的各噬菌体表达上清液及 50μl 0.05% PBST，以及阴性对照（negative control，lPl；伊匹单抗），然后在室温下孵育 2 小时。将板用 0.05% PBST 洗涤三次，并用 100μl/孔的缀合辣根过氧化物酶的山羊抗 M13 噬菌体抗体（义翘）室温孵育 45 分钟。将板用 0.05% PBST 洗涤六次，然后加入 TMB 显色液（金斯瑞）于室温避光孵育 10 分钟。通过加入 50μl 的 1M HCl 终止液（西格玛）终止反应。使用酶标仪在 450nm 下读板。结合能力检测结果如图 1A-1B 所示，显示了多个阳性单克隆抗体在噬菌体水平与 GPC3-B 肽具有良好的结合能力。

进一步采用 ELISA 鉴定了筛选获得的阳性单克隆抗体是否识别 GPC3-A 肽，具体操作如下：将 GPC3-A 肽和 GPC3-B 肽（6μg/mL）按 100μL/孔包被于 96 孔板中，4℃孵育过夜。之后用含 1% BSA 的 PBST（含 0.05%的 Tween-20）于 37℃封闭 2 小时（200μL/孔），PBST 洗涤三次，将各阳性单克隆抗体 GC008、GC010、GC011、GC025、GC035、GC037、GC053、GC067、GC139、GC147、GC90，以及对照抗体 hYP7HM，先用含 1% BSA 的 PBST 进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔板中（100μL/孔），其工作浓度为：30nM、15nM、15nM 往下以 4 为倍数依次稀释 8 个点。37℃孵育 1 小时，PBST 洗涤三次。然后按 100μL/孔加入 Anti-Human IgG-FC-HRP（Sigma，1/30000 稀释），37℃孵育 1h，PBST 洗涤三次，再加入 50μL TMB（SURMOPICS）反应，用 1M H_2SO_4 终止反应，酶标仪 450nm 测定 OD 值。结果如表 4 所示，本实施例筛选出的阳性单克隆抗体仅特异性地结合 GPC3-B 肽，而对照抗体 hYP7HM 仅识别 GPC3-A 肽（与专利文献记载一致），表明本实施例筛选出的阳性单克隆抗体与对照抗 GPC3 抗体 hYP7HM 相比具有不同的抗原识别位点。

表 4 抗 GPC3 抗体与 GPC3-A 肽、GPC3-B 肽的结合情况

抗体 / 抗原	GC008	GC010	GC011	GC025	GC035	GC037	GC053
GPC3-A 肽	-	-	-	-	-	-	-
GPC3-B 肽	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
抗体 / 抗原	GC067	GC139	GC147	GC90	hYP7HM		
GPC3-A 肽	-	-	-	-	++++		
GPC3-B 肽	++++	++++	++++	++++	-		

注：“-”指示无结合；“++++”指示 ELISA 检测 OD_{450} 值大于 1.5。

本实施例筛选的阳性克隆进行测序，抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列见表 5。

表 5 抗 GPC3 抗体的轻链和重链可变区序列

抗体	VH/VL	SEQ ID No：	氨基酸序列
GC008	VL	39	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIDNSVTWYQQRPGKAPSLLISDASILESGV

			PSRFSGRGSGTHFTLSITSLQPEDIATYYCQQYENLPITFGQGTRLEIK
	VH	40	EVQLLESGGGLVQPGGSMRLSCAASEIDFSVYALGWSRQAPGKQRELVATITTSSTT TYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCHTLRRTGSGIVPGRIWGQ GTPVTVSS
GC010	VL	41	DIQMIQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYSTPFTLGPGTKVDIK
	VH	42	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDESRRKFDYWGQ GTTVTVSS
GC011	VL	43	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSITRYLNWYQQKPGKGPKLLIYAASRLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHSIPRTFGQGTKLEIK
	VH	44	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNPSLDYWGQGTT VTVSS
GC025	VL	45	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLSWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYSCQQSYSTQFTFGPGTKVDIK
	VH	46	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRQRAAIDYWGQG TTVTVSS
GC035	VL	47	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGQTINNYLHWYQQKPGKAPKLLIFAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTRVEIK
	VH	48	EVQLLESGGGVVRPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRKSGSSFDYWGQ GTPVTVSS
GC037	VL	49	AIRLTQFPSSLSASVGDRVTITCRARQSIDNYLNWYQEKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFAAYYCQQSYDSPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:)
	VH	50	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYVSAISSNGG STYYANSVKGRFTISRHPSKNILFLEMNSLRPDDTAVYYCVRGWIRPPPGSFDLWGQ GTPVTVSS
GC053	VL	51	NIQMTQSPSSLSAFVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQHKPGQAPKLLMYAASTLQD EVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLEPEDFATYYCQQSYSTPPTFGGGTKVEIK
	VH	52	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYVSAISSNGG STYYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMGSLRPDDTAVYYCVRGWIRPPPGSFDLWG QGTTVTVSS
GC067	VL	53	NIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
	VH	54	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRLRGSGMDVWG QGTPVTVSS
GC139	VL	55	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGPGTKVDIK
	VH	56	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYVSAISSNGG STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRPDDTAVYYCVRGWIRPPPGSFDLWG QGTTVTVSS
GC147	VL	57	AIRLTQSPSSLSASVGDRVSITCRASQSISTFLNWYQQKPGKAPNLLIYSASTLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPPTFGQGTKLEIK
	VH	58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEYVSAISSNGG STYYANSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCVRGWIRPPPGSFDLW GQGTPVTVSS
GC90	VL	3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIK
	VH	1	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSS

实施例 2

人源化单抗的制备

2.1 载体构建

首先将编码人 IgG1 重链恒定区（IgG1-CH）的核苷酸序列，前端接上分泌信号肽（SP）编码序列，后端接上终止密码子 TAG，进行基因合成并克隆到 pcDNA3.1 载体（生工生物工程(上海)股份有限公司），通过 In-fusion cloning 方法插入到 pCHOGUN 载体 CMV 启动子下游。具体地，通过设计特定插入位点引物、及高保真 PCR 酶

（HiFi PCR Premix，TAKARA）分别扩增合成的基因片段、及 pCHOGUN 载体质粒片段，胶回收后 IgG1 重链基因片段和线性化载体片段进行连接（In-fusion Snap Assembly Master Mix，TAKARA），得到重链恒定区载体 pCHOGUN-IgG1。按上述实施方法，将人免疫球蛋白 κ 轻链恒定区（IgG-CK）编码序列，前端加信号肽（SP）编码序列后端加终止密码子 TAG，基因合成后插入到 pCHOGUN 载体 CMV 启动子下游，得到轻链恒定区载体 pCHOGUN-CK。

对于各人源单抗表达载体的构建，分别将 GC90 单抗及其优化突变体各自的重链可变区（VH）、轻链可变区（VL）的编码序列进行基因合成，按上述 In-fusion cloning 方法插入到 pCHOGUN-IgG1 或 pCHOGUN-CK 载体的 SP 和恒定区之间，得到单抗的重链表达载体和轻链表达载体。具体各抗体序列，见表 6。

表 6 人源化单抗的轻链和重链序列

GC90	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：11	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
GC90-4mu	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：12	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGP**C**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
GC90-6mu	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：13	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSL SPGK
GC90LH1	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

		LSPGK
GC90LH2	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：15	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
GC90LH3	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：16	QVQLLESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLEMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
GC90LH4	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：17	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
GC90LH5	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：18	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
GC90LH6	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPRWSSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

		NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGK
GC90LH7	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：30	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG DRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGK
GC90LH8	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG ARVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWSSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGK
GC90LH9	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：32	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG KRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPRWSSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGK
GC90LH10	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID No：33	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG ARVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEV WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGK
GC90LH11	L 链 SEQ ID No：10	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	H 链 SEQ ID	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIKSSG KRVQYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAIYYCAKPQWRSPQRTFEV

	No：34	WGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSHYTQKSL SLSPGK

2.2 细胞转染表达

按 TransIT-PRO® Transfection Reagent（Mirus）说明书进行转染。如下所述，ExpiCHO-S 细胞（Thermo）培养于完全培养基（CHOgro® High Yield Expression System，含 30mL/L 的 Poloxamer 188 solution 10%和 20mL/L 的 L-谷氨酰胺 200mM，Mirus），在转染前 24 小时进行传代培养，将细胞稀释至 $2x10^6$ 个细胞/mL，以确保第二天细胞密度为 $4x10^6$ 个细胞/mL。将轻重链质粒按 1：1 比例各 25μg，加入至 12.5mL 完全培养基中混匀，再加入 50μL 转染试剂 TransIT-PRO® Transfection Reagent（Mirus），轻柔颠倒混匀后静置 4 分钟，然后边摇晃边逐滴加入到稀释好的 50mL 细胞中，并逐滴加入 1mL 的 CHOgro-titer Enhancer（Mirus）。转染完成后立刻放入 32℃、5% CO_2 的培养箱，每隔一天添加 5%的 Efficient Feed C+ AGT Supplement（Thermo），共培养 7 天。

2.3 抗体纯化

在摇瓶中培养 7 天后，收集细胞上清液，4000rpm 离心 20 分钟后取上清，用 0.22um 滤膜（Milipore）过滤，通过蛋白 A 亲和层析纯化抗体。简言之，使用 20mM PB+0.15M NaCl 缓冲液以 5 至 10 倍柱体积平衡 HiTrap Mabselect suRe 预装柱（Cytiva），使用 AKTA Avant 150 层析系统（Cytiva），将过滤后的上清液上样，之后依次用 3 倍柱体积的 20mM PB+0.15M NaCl 缓冲液、1 倍柱体积的 20mM PB+1M NaCl 缓冲液淋洗该纯化柱，再用 20mM PB 洗涤至基线平稳。最后用 20mM 柠檬酸（20mM 柠檬酸钠调 pH 至 3.0）洗脱抗体，收集峰形 200mAu-200mAu，洗脱的抗体立即用中和缓冲液（1M Tris-HCl，pH 9.0）中和，并置于 1.5mL 管中，-80 冻存备用。

实施例 3

人源化单抗的 ELISA 亲和力检测

应用 ELISA 方法测定各抗体对人 GPC3 蛋白的相对结合活性。具体操作为：重组人 GPC3 蛋白（1μg/mL）按 100μL/孔包被于 96 孔板中，4℃孵育过夜。之后用含 1% BSA 的 PBST（含 0.05%的 Tween-20）于 37℃封闭 2 小时（200μL/孔），PBST 洗涤三次，将各人源化单抗，先用含 1% BSA 的 PBST 进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔板中（100μL/孔），人源化单抗 GC90、GC90-4mu、GC90LH1、GC90LH2、GC90LH3、GC90LH4 和 GC90LH5 工作浓度为：15nM、3.75nM 以及 3.75nM 往下以 4 为倍数依次稀释 8 个点。37℃孵育 1 小时，PBST 洗涤三次。然后按 100μL/孔加入 Anti-Human IgG-FC-HRP（Sigma，1/30000 稀释），37℃孵育 1h，PBST 洗涤三次，再加入 50μL TMB（SURMOPICS）反应，用 1M H_2SO_4 终止反应，酶标仪 450nm-570nm 测定 OD 值。根据图 2 的结果可以看出，本发明的 GC90 单抗及其突变体与 GPC3 蛋白均具有非常好的结合力。

实施例 4

亲和成熟单抗分子 ELISA 检测

应用 ELISA 方法测定各抗体对人 GPC3 蛋白的相对结合活性。具体操作为：重组人 GPC3 蛋白（1μg/mL）按 100μL/孔包被于 96 孔板中，4℃孵育过夜。之后用含 1% BSA 的 PBST（含 0.05%的 Tween-20）于 37℃封闭 2 小时（200μL/孔），PBST 洗涤三次，将各人源化单抗，先用含 1% BSA 的 PBST 进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔板中（100μL/孔），人源化单抗 GC90-4mu、GC90LH6、GC90LH7、GC90LH8 工作浓度为：10000ng/ul、3333.33ng/ul 以及 1111.11ng/ul 往下依次 3 倍稀释共 10 个点，以及 GC90LH8 和 GC90LH10 工作浓度为：10000ng/ul、2500ng/ul 以及 625ng/ul 往下依次 4 倍稀释共 8 个点。37℃孵育 1 小时，PBST 洗涤三次。然后按 100μL/孔加入 Anti-Human IgG-FC-HRP（Sigma，1/30000 稀释），37℃孵育 1h，PBST 洗涤三次，再加入 50μL TMB（SURMOPICS）反应，用 1M H_2SO_4 终止反应，酶标仪 450nm-570nm 测定 OD 值。根据图 3 的结果可以看出，本发明的 GC90 单抗及其突变体与 GPC3 蛋白均具有非常好的结合力。

实施例 5

流式细胞术检测人源化单抗与肿瘤细胞的结合

应用流式细胞术测定各抗 GPC3 抗体与 HepG2、Hep3B、Huh7 细胞的亲和力。具体操作为：各人源化单抗，用 FACS Buffer（PBS+5%FBS）进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔 U 形板中，具体操作如下：各人源化单抗的工作浓度为：100nM、25nM 以及 6.25nM 往下以 4 为倍数依次稀释 6 个点。用胰酶消化 HepG2、Hep3B、Huh7 细胞，1000rpm 离心 5min，弃上清，用含 FACS Buffer 重悬细胞，浓度为 2×10^6 个/mL，96 孔 U 底板中每孔加入 50μL，再将上述稀释好的抗体每孔加入 50μL，轻轻混匀，置于冰上孵育 90min。4℃ 3500rpm 离心 3min 后弃去上清，随后加入 250μL 预冷 FACS Buffer 重悬细胞，重复离心洗涤 2 次。每孔加入 100μL 稀释好的 PE anti-human IgG FC 荧光二抗（BioLegend，0.5μL/1×10^5 个细胞配制），冰上避光孵育 30min。弃去上清洗涤两次，最后用 200μL FACS Buffer 重悬细胞。使用 Attune NxT 流式细胞仪（Thermo）上机检测 MFI 值，利用 GraphPad Prism 软件对数据进行处理，图 4 结果表明本发明的单抗对 HepG2 细胞、Hep3B 细胞和 Huh-7 细胞均具有很好的亲和力。

实施例 6

流式细胞术检测人源化单抗与肿瘤细胞的结合

应用流式细胞术测定各抗 GPC3 抗体与 HepG2 或 Hep3B 细胞的亲和力。具体操作为：各人源化单抗，用 FACS Buffer（PBS+5%FBS）进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔 U 形板中，具体操作如下：GC90-4mu、GC90、GC90LH1、GC90LH2、GC90LH3、GC90LH4 和 GC90LH5，工作浓度为：100nM、25nM、6.25nM 往下以 4 为倍数依次稀释共 8 个点。用胰酶消化 HepG2、Hep3B 细胞，1000rpm 离心 5min，弃上清，用含 FACS Buffer 重悬细胞，浓度为 2×10^6 个/mL，96 孔 U 底板中每孔加入 50μL，再将上述稀释好的抗体每孔加入 50μL，轻轻混匀，置于冰上孵育 90min。4℃ 3500rpm 离心 3min 后弃去上清，随后加入 250μL 预冷 FACS Buffer 重悬细胞，重复离心洗涤 2 次。每孔加入 100μL 稀释好的 PE anti-human IgG FC 荧光二抗（BioLegend，0.5μL/1×105 个细胞配制），冰上避光孵育 30min。弃去上清洗涤两次，最后用 200μL FACS Buffer 重悬细胞。使用 Attune NxT 流式细胞仪（Thermo）上机检测 MFI 值，利用 GraphPad Prism 软件对数据进行处理，结果见图 5A-5B，可以看出本发明的单抗对 HepG2 细胞或 Hep3B 细胞均具有很好的亲和力。

实施例 7

流式细胞术检测亲和成熟单抗与肿瘤细胞的结合

应用流式细胞术测定各抗 GPC3 抗体与 HepG2 细胞的亲和力。具体操作为：各人源化单抗，用 FACS Buffer（PBS+5%FBS）进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔 U 形板中，具体操作如下：IgG1、GC90-4mu、GC90LH6、GC90LH7、GC90LH8、GC90LH9、GC90LH10 和 GC90LH11，工作浓度为：100nM、25nM、6.25nM 往下以 4 为倍数依次稀释共 8-9 个点。用胰酶消化 HepG2 细胞，1000rpm 离心 5min，弃上清，用含 FACS Buffer 重悬细胞，浓度为 2×10^6 个/mL，96 孔 U 底板中每孔加入 50μL，再将上述稀释好的抗体每孔加入 50μL，轻轻混匀，置于冰上孵育 90min。4℃ 3500rpm 离心 3min 后弃去上清，随后加入 250μL 预冷 FACS Buffer 重悬细胞，重复离心洗涤 2 次。每孔加入 100μL 稀释好的 PE anti-human IgG FC 荧光二抗（BioLegend，0.5μL/1×10^5 个细胞配制），冰上避光孵育 30min。弃去上清洗涤两次，最后用 200μL FACS Buffer 重悬细胞。使用 Attune NxT 流式细胞仪（Thermo）上机检测 MFI 值，利用 GraphPad Prism 软件对数据进行处理，结果见图 5C-5D，可以看出本发明的单抗对 HepG2 细胞均具有很好的亲和力。

实施例 8

流式细胞术检测人源化单抗的内化效率

在 HepG2、Hep3B 细胞中，应用流式细胞术测定各抗 GPC3 抗体的内化效率。具体操作为：用 FACS Buffer 将 GC90 和 hYP7HM 单抗浓度稀释至 1nM 实验浓度，50μL/孔加入 96 孔 U 形板中。按照实施例 5 的方式进行抗体和细胞的结合，洗去未结合的抗体后，将细胞转移至 37℃分别孵育 0、1、2、4h，孵育完成后立即加入 100μL 预冷 FACS buffer 终止内化，随后 3500rpm 离心 3min 后弃去上清。按照实施例 5 中方式配置二抗，每孔使用 100μL 二抗重悬细胞，并置于冰上孵育 30min。离心洗涤两次，最后用 200μL FACS Buffer 重悬细胞，上机检测 MFI 值，利用 GraphPad Prism 软件对数据进行处理，人源化单抗的细胞内化效率计算公式为：（1-抗体 37℃ MFI 值/抗体 4℃ MFI 值）×100%，结果见图 6，根据图 6 的结果可以看出，本发明的人源化单抗具有很好的内化效率。

实施例 9

抗体-药物偶联物的制备

9.1 定点偶联

将抗体重链 239 位残基突变为半胱氨酸（S239C，EU 编号，对应于 GC90-4mu 重链的第 243 位），从而通过该半胱氨酸经由接头与药物进行定点偶联。具体而言，将单抗原液置换为 20mM PBS 缓冲液（pH=7.2）并调浓度至约 5mg/mL，按 50：1 体积比（抗体：EDTA）加入 250mM 的 EDTA 溶液，充分混匀。之后根据不同单抗和不同 linker-payload（LP）组合情况，加入 1-12 倍过量摩尔比（相对于抗体）的三（2-羧乙基）膦盐酸盐（TCEP），充分混匀后置于室温（25℃）进行还原反应 3 小时。向上述反应液中加入适量的 DMSO，再加入 6-12 倍过量摩尔比（相对于抗体）的 LP 药物（5mM/10mM 预先溶在 DMSO 中），保证反应体系中 DMSO 的体积占比不超过 15%，充分混匀后室温下反应 1.5 小时。然后加入 N-乙酰-L-半胱氨酸（NAC）溶液，室温下静置 10min 终止反应。

采用超滤脱盐，将反应液转移至 10 KD 超滤管（Millipore）中，补加 PBS 缓冲液（pH 6.0），3500 g 离心浓缩至所需体积，补加 PBS 重复离心浓缩 5 次。将产物经 0.22 μ m 滤膜（Millipore）过滤后，-80℃保存。

经偶联反应后，获得 IgG1-PBD，GC90-4mu-PBD、GC90LH8-PBD、GC90LH9-PBD、GC90LH10-PBD、GC90LH11-PBD 以及 IgG1-DUBA，GC90-4mu-DUBA、hYP7HM-DUBA 定点偶联产物，利用体积排阻色谱法（SEC）分析 ADC 产物纯度，利用疏水相互作用色谱（HIC）分析药物抗体偶联比(DAR)及裸抗比例。

表 7 ADC 产物检测分析

序号	ADC	DAR (HIC)
1	GC90-4mu-PBD	1.8

2	IgG1-PBD	1.89
3	GC90LH8-PBD	1.9
4	GC90LH9-PBD	1.85
5	GC90LH10-PBD	1.92
6	GC90LH11-PBD	1.83
7	IgG1-DUBA	1.77
8	GC90-4mu-DUBA	1.72
9	hYP7HM-DUBA	1.53

9.2 随机偶联

将单抗原液置换为 20mM NaAc-HAc 缓冲液(pH5.5)并调节浓度至 5±1mg/mL，按照三(2-羧乙基)膦(TCEP)与抗体的摩尔比 20:1，将所需量的 TCEP 加入反应体系中混匀后于 37℃还原反应 3 小时。还原反应结束后使用 10kD 超滤离心管离心换液成 20 mM NaAc/Tris，1mM EDTA，pH7.0 缓冲液（3500×g，4 次），调节浓度至 5±1mg/mL。向上述反应液中加入适量的 DMSO（~10%），按照 LP 药物与抗体摩尔比 10:1，将所需量的 LP 溶液（5~10mM，预先溶解在 DMSO 中）加入反应体系中混匀后于 21~25℃偶联反应 1 小时。然后按照 N-乙酰半胱氨酸（NAC）与抗体摩尔比 40:1 加入 NAC 溶液混匀后于 21~25℃终止反应 1 小时。终止反应结束后使用 10kD 超滤离心管换液成 20 mM His/His-HCl，pH6.0 缓冲液（3500×g，4 次），并调节至目标浓度，经 0.22μm 除菌滤器过滤后，≤-20℃保存。

经偶联反应后，获得 IgG1-Dxd，GC90-4mu-Dxd 随机偶联产物，利用体积排阻色谱法（SEC）分析 ADC 产物纯度，利用疏水相互作用色谱（HIC）分析药物抗体偶联比(DAR)及裸抗比例。

实施例 10

抗体-药物偶联物对肿瘤细胞的杀伤检测

使用 Cell Counting Kit-8（Dojindo）测定各抗体-药物偶联物对 HepG2、Hep3B、Huh7 肝癌细胞的杀伤作用。具体操作为：HepG2、Hep3B、Huh7 细胞使用 10% FBS（Gibco）+DMEM 培养基（Corning）培养，当细胞汇合度达 75%以上，使用胰酶（0.25% Trypsin-EDTA）消化后计数，分别以 1.5×10^4 个细胞/mL、160μL/孔（2400 cells/孔）铺板至 96 孔板，37℃、5% CO_2 培养过夜。再使用 10% FBS+DMEM 培养基，将各抗体-药物偶联物稀释至 333.5nM，按 40μL/孔加入到含 160ul/孔的 96 孔板中 5 倍稀释，初始浓度为 66.7nM，连续倍比稀释 8 个浓度点，并做重复孔；之后置于 37℃、5%CO_2 恒温培养箱培养。在第 4 天使用 Cell Counting Kit-8 检测肿瘤细胞的活率。具体杀伤结果如图 7 所示，随着给药浓度升高，本发明的抗体-药物偶联物对各类肝癌细胞显示出良好的细胞杀伤效果。

实施例 11

11.1 受试物的抗肿瘤试验 1

建立人源肝癌 Hep3B 细胞株皮下异种移植荷瘤裸鼠模型。

收集指数生长期的 Hep3B 细胞，细胞重悬在 1:1 的 PBS 与基质胶中调整细胞密度为 5×10^7，实验小鼠于右前侧背部皮下接种 5×10^6 Hep3B 细胞（0.1 mL/只），定期观察肿瘤生长情况定期观察肿瘤生长情况；待肿瘤生长至平均体积大于 100 mm^3 时根据肿瘤大小随机分组给药，每组 6 只，分组当天定义为第 0 天；分组当天分别单次尾静脉注射给予 1.5 mg/kg 的 IgG1-PBD、GC90-4mu-PBD。每周进行两次肿瘤体积测量。体积计算公式如下：

肿瘤体积（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示长径，b 表示短径）

结果：数据表明 GC90-4mu-PBD（1.5 mg/kg）具有显著的抗肿瘤作用（图 8A）。

11.2 受试物的抗肿瘤试验 2

建立人源肝癌 Hep3B 细胞株皮下异种移植荷瘤裸鼠模型。

收集指数生长期的 Hep3B 细胞，细胞重悬在 1:1 的 PBS 与基质胶中调整细胞密度为 5×10^7，实验小鼠于右前侧背部皮下接种 5×10^6 Hep3B 细胞（0.1 mL/只），定期观察肿瘤生长情况定期观察肿瘤生长情况；待肿瘤生长至平均体积大于 100 mm^3 时根据肿瘤大小随机分组给药，每组 6 只，分组当天定义为第 0 天；分组当天分别单次尾静脉注射给予 5 或 10mg/kg 的 IgG1-DUBA、hYP7HM-DUBA、GC90-4mu-DUBA。每周进行两次肿瘤体积测量。体积计算公式如下：

肿瘤体积（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示长径，b 表示短径）

结果：数据表明 GC90-4mu-DUBA（5 mg/kg）和 hYP7HM-DUBA（10mg/kg）均具有显著的抗肿瘤作用（图 8B）。

11.3 受试物的抗肿瘤试验 3

建立人源肝癌 Hep3B 细胞株皮下异种移植荷瘤裸鼠模型

收集指数生长期的 Hep3B 细胞，细胞重悬在 1:1 的 PBS 与基质胶中调整细胞密度为 5×10^7，实验小鼠于右前侧背部皮下接种 5×10^6 Hep3B 细胞（0.1 mL/只），定期观察肿瘤生长情况定期观察肿瘤生长情况；待肿瘤生长至平均体积 80~150mm^3（主实验组）或 300~500 mm^3（卫星组）根据肿瘤大小和小鼠体重随机分组给药，每组 6 只（卫星组 IgG-PBD 组 1 只），分组第二天定义为第 0 天（Day 0）：卫星组 Day 0 单次尾静脉注射给予 1.5 mg/kg GC90-4mu-PBD、IgG1-PBD，卫星组 IgG-PBD 组于给药后 24h 最大量采血收集血清并取瘤，GC90-4mu-PBD 组交替采血并取瘤（15min 采血清，7h、D1、D2、D3、D5、D7 采血清并取瘤）；主实验组 Day 0 单次尾静脉注射给予 IgG1-PBD（0.6 mg/kg）、GC90-4mu-PBD（0.1、0.3、0.6 mg/kg）、GC90-4mu-Dxd（3、10 mg/kg），每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。体积计算公式如下：

肿瘤体积（mm^3）= 1/2 ×（a × b^2）（其中 a 表示长径，b 表示短径）

实施例 12

GC90 抗体的功能表征

12.1 种属交叉反应

应用 ELISA 方法测定 GC90 对不同种属的 GPC3 蛋白的结合情况。具体操作为：分别将各 GPC3 蛋白（6μg/mL）按 100μL/孔包被于 96 孔板中，4℃孵育过夜。之后用含 1% BSA 的 PBST（含 0.05%的 Tween-20）于 37℃封闭 2 小时（200μL/孔），PBST 洗涤三次，将 GC90 先用含 1% BSA 的 PBST 进行系列梯度稀释，依次加入 96 孔板中（100μL/孔），其工作浓度为：30nM、15nM、15nM 往下以 4 为倍数依次稀释 8 个点。37℃孵育 1 小时，PBST 洗涤三次。然后按 100μL/孔加入 Anti-Human IgG-FC-HRP（Sigma，1/30000 稀释），37℃孵育 1h，PBST 洗涤三次，再加入 50μL TMB（SURMOPICS）反应，用 1M H_2SO_4 终止反应，酶标仪 450nm 测定 OD 值，结果如表 8 所示。

表 8 GC90 与不同种属的 GPC3 蛋白的结合情况

抗原	结合情况
Mouse GPC3 (ACRO Biosystems，GP3-M52H3)	×
Cyno GPC3 (ACRO Biosystems，GP3-C5225)	√
Human GPC3 (ACRO Biosystems，GP3-HP2E3)	√

注：√代表亲和识别，×代表不识别。

12.2 识别表位的精细定位

将 GPC3-B 肽的氨基酸序列分成多个重叠肽，所述重叠肽的氨基酸序列如表 9 所示，合成重叠肽并使用 ELISA 测量每种肽与 GC90 之间的结合特性，以进一步精确鉴定 GC90 识别的抗原表位。具体操作为：分别将各重叠肽（6μg/mL）按 100μL/孔包被于 96 孔板中，4℃孵育过夜。之后用含 1% BSA 的 PBST（含 0.05%的 Tween-20）于 37℃封闭 2 小时（200μL/孔），PBST 洗涤三次，将 GC90 用含 1% BSA 的 PBST 进行系列梯度稀释（阴性对照为 1% BSA），依次加入 96 孔板中（100μL/孔），其工作浓度为：30nM、15nM、15nM 往下以 4 为倍数依次稀释 8 个点。37℃孵育 1 小时，PBST 洗涤三次。然后按 100μL/孔加入 Anti-Human IgG-FC-HRP（Sigma，1/30000 稀释），37℃孵育 1h，PBST 洗涤三次，再加入 50μL TMB（SURMOPICS）反应，用 1M H_2SO_4 终止反应，酶标仪 450nm 测定 OD 值。结果如图 9 所示，以测量的抗原抗体复合物的 OD_{450} 值，展示 GC90 与每种肽之间的结合强度，可见该抗体仅与 GPC3-B3 或包含 GPC3-B3 的长片段之间存在强结合活性，可以确定 GPC3 抗原表位区域位于 GPC3-B3，即人 GPC3 蛋白残基 485-496 位（DKNLDEEGFESG）。

表 9 重叠肽的氨基酸序列

编号	氨基酸序列
GPC3-B1	SMPKGRVLDKNL
GPC3-B2	GRVLDKNLDEEG
GPC3-B3	DKNLDEEGFESG
GPC3-B4	DEEGFESGDCGD
GPC3-B5	FESGDCGDDEDE
GPC3-B6	DCGDDEDECIGG
GPC3-B7	DEDECIGGSGDGM
GPC3-B8	SMPKGRVLDKNLDEEGFESGDCGDDEDECIGGSGDGM

进一步地，基于氨基酸序列分析人 GPC3 蛋白和鼠 Gpc3 蛋白之间的同源性（图 10），发现在 GPC3-B3 区域内二者存在 2 个氨基酸残基的差异（猴 GPC3 蛋白参考 Genbank ID：XP_005594665.1，亦包括 GPC3-B3），即人 GPC3 蛋白的第 487 位氨基酸残基（N）和第 493 位氨基酸残基（F），结合种属交叉检测结果可知，由于鼠 Gpc3 蛋白在对应于人 GPC3 蛋白的第 487 位天冬酰胺和第 493 位苯丙氨酸处发生了变异，从而导致 GC90 无法与鼠 Gpc3 蛋白结合，表明人 GPC3 蛋白的第 487 位和/或第 493 位是抗原表位区域的核心结合位点之一。

图 11 汇总了各抗 GPC3 抗体在 GPC3 蛋白上的抗原识别区域，可见本发明的抗体所结合的抗原表位远离其他已报道的抗 GPC3 抗体的抗原结合区域，其识别一种全新的 GPC3 抗原表位。本发明鉴定了新颖的 GPC3 抗原表位，与所述表位结合的抗体具备高亲和力和内化效率，采用该 GPC3 抗原表位制备免疫原，为抗 GPC3 抗体领域开辟了一个新的研发方向，能够降低抗体制备和筛选的不确定性，以及有利于开发功能改善的新抗体。

尽管本发明已通过一个或多个实施方式来描述，但是应当理解的是，本发明不限于这些实施方式，并且本发明说明书旨在涵盖落在所附权利要求的精神和宽范围内的所有替代、修改和变动。本发明所引用的所有参考文献均通过引用整体的方式并入本发明中。

权利要求书

1. 一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)；

所述重链可变区(VH)包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区，且所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区分别包含与 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；

或分别包含与 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示的氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相比发生至多 3 个、2 个或 1 个突变的序列；

所述轻链可变区(VL) 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区，且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区分别包含与氨基酸序列 SEQ ID No：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；

或分别包含与氨基酸序列 SEQ ID NO：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相比发生至多 3 个、2 个或 1 个突变的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段具有以下生物学功能：与 SEQ ID Nos：37 或 38 所示的抗原特异性结合，并且不结合 SEQ ID No：36 所示的抗原。

3. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，所述突变的位置选自 SEQ ID Nos：1-2、6-9 任一所示氨基酸序列的第 56 位(D56)、第 100 位(Q100)或第 102 位(S102)中的一个或多个；

优选地，所述突变选自 Q100R、S102R、D56A、D56K+Q100R、D56A+S102R 或 D56K+S102R。

4. 根据权利要求 3 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 区分别具有与 SEQ ID Nos：1-2、6-9、23-28 任一所示氨基酸序列的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相同的序列；以及所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 区分别包含与氨基酸序列 SEQ ID No：3 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区相同的序列。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述 CDR1、CDR2 和 CDR3 区根据 IMGT、Kabat、Chothia、AbM 或 Contact 的方式定义。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述 VH 包含与 SEQ ID Nos：1-2、6-9、23-28 任一所示氨基酸序列至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；和/或

所述 VL 包含与 SEQ ID No：3 至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。

7. 根据权利要求 6 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述 VH 包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：1-2、6-9、23-28 任一相同的序列；所述 VL 包含与氨基酸序列 SEQ ID NO：3 相同的序列。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，其还包含重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)；优选地，所述 CH 包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：4、19 或 20 相同的序列；所述 CL 包含与氨基酸序列 SEQ ID No：5 相同的序列。

9. 根据权利要求 8 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述重链(H)包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：11-18、29-34 任一至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列；和/或所述轻链(L)包含与氨基酸序列 SEQ ID No：10 至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的序列。

10. 根据权利要求 9 所述的抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述重链(H)包含与氨基酸序列 SEQ ID Nos：11-18、29-34 任一相同的序列；所述轻链(L)包含与氨基酸序列 SEQ ID No：10 相同的序列。

11. 一种抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段结合 SEQ ID Nos：37 或 38 所示的抗原，并且不结合 SEQ ID No：36 所示的抗原；

或者，所述抗体或其抗原结合片段与参考抗体竞争结合 GPC3 蛋白的相同表位，所述参考抗体包含 SEQ ID NO：11 所示的重链以及 SEQ ID NO：10 所示的轻链；

优选地，所述抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段能够阻断参考抗体与 GPC3 蛋白的结合的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%。

12. 一种 GPC3 抗原表位肽，其特征在于，所述 GPC3 抗原表位肽由人 GPC3 蛋白残基 485-496 内的至少 7 个连续氨基酸残基组成，所述人 GPC3 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO：35 所示；并且至少包含第 487 位的天冬酰胺和第 493 位的苯丙氨酸中的一个以上，以及所述 GPC3 抗原表位肽具有如下一种或多种生物学功能：

(1) 与抗 GPC3 抗体特异性结合；

(2) 在受试者体内诱导针对 GPC3 的免疫应答(例如体液免疫应答)；

(3) 在受试者体内诱发抗 GPC3 抗体的产生；

(4) 预防和/或治疗受试者与 GPC3 相关的疾病。

13. 根据权利要求 12 所述的 GPC3 抗原表位肽，其特征在于，所述 GPC3 抗原表位肽由 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列组成。

14. 一种重组抗原，其特征在于，所述重组抗原包含权利要求 12 或 13 所述的 GPC3 抗原表位肽和载体蛋白。

15. 一种嵌合抗原受体，其包含权利要求 1-11 任一项的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

16. 一种多核苷酸，其编码权利要求 1-11 任一项所述抗的 GPC3 抗体或其抗原结合片段，权利要求 12-13 任一项所述的 GPC3 抗原表位肽，或权利要求 14 所述的重组抗原。

17. 一种表达载体，其包含权利要求 16 所述的多核苷酸。

18.一种宿主细胞，其包含权利要求 16 的多核苷酸或权利要求 17 的表达载体。

19. 一种抗体-药物偶联物，其特征在于，其包含权利要求 1-11 任一项所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段以及药物或毒素。

20. 根据权利要求 19 所述的抗体-药物偶联物，其特征在于，所述药物或毒素选自：SN-38、MMAE、PBD dimer、DX-8951 (DXd)或 DUBA 中的一种或多种。

21. 一种双特异性或多特异性抗体分子，其特征在于，包含权利要求 1-11 任一项所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。

22. 一种药物组合物，其特征在于，其包含权利要求 1-11 任一项所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，或权利要求 12-13 任一项所述的 GPC3 抗原表位肽，或权利要求 14 所述的重组抗原，或权利要求 15 所述的嵌合抗原受体，或权利要求 16 所述的核酸分子，或权利要求 17 所述的载体，或权利要求 18 所述的宿主细胞，或权利要求 19-20 任一项所述的抗体-药物偶联物，或权利要求 21 所述的双特异性或多特异性抗体分子；以及一种以上药学上可接受的载体。

23. 一种试剂盒，其包含权利要求 1-11 任一项所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，或权利要求 12-13 任一项所述的 GPC3 抗原表位肽，或权利要求 14 所述的重组抗原，或权利要求 19-20 任一项所述的抗体-药物偶联物，或权利要求 21 所述的双特异性或多特异性抗体分子。

24. 权利要求 1-11 任一项所述的抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段，权利要求 12-13 任一项所述的 GPC3 抗原表位肽，权利要求 14 所述的重组抗原，权利要求 15 所述的嵌合抗原受体，权利要求 16 所述的核酸分子，权利要求 17 所述的载体，权利要求 18 所述的宿主细胞，权利要求 19-20 任一项所述的抗体-药物偶联物，权利要求 21 所述的双特异性或多特异性抗体分子，或权利要求 23 所述的试剂盒在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途，所述癌症优选为肝癌。

25. 权利要求 12-13 任一项所述的 GPC3 抗原表位肽，或权利要求 14 所述的重组抗原在如下任一中的应用：

(1) 制备抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段；

(2) 制备用于治疗和/或预防和/或诊断受试者与 GPC3 相关的疾病的产品；

(3) 制备检测抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段的产品；

(4) 检测抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段；

(5) 筛选抗 GPC3 抗体或其抗原结合片段。