

## 噬菌体展示全人源抗 GPC3 的单链抗体的筛选及鉴定

蒋家豪, 孙福谋, 韩月, 王阳, 蔡佳玲, 王旻\*, 张娟\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 使用全人源噬菌体单链抗体文库进行筛选, 获得特异性靶向磷脂酰肌醇聚糖-3 (GPC3) 的单链抗体, 并对单链抗体的生物学活性和抗原表位进行鉴定。经过 4 轮“结合-淘洗-洗脱-扩增”后, 利用噬菌体 ELISA 和 IMGT 数据库分析抗体序列的靶向性和完整性。单链抗体的基因序列与表达载体 pET-22b 进行双酶切并连接, 重组载体转化大肠杆菌 *E. coli* Rosetta (DE3), 抗体表达后经  $\text{Ni}^{2+}$  柱亲和和层析纯化, 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 对单链抗体分子量进行鉴定。抗体对抗原的亲力和常数通过 ELISA 和 SPR 实验获得, 流式细胞术分析其与细胞膜受体的结合能力。经筛选获得 4 个单链抗体 (1F7、1D7、1D4 和 1B10) 具有良好的靶向性和亲和力, 其中 1F7 单链抗体的亲和力和结合能力最高。本课题抗 GPC3 单链抗体为双特性抗体和免疫毒素等新一类免疫治疗药物的开发奠定基础。

**关键词:** 噬菌体展示; 单链抗体; 磷脂酰肌醇聚糖-3; 肿瘤靶向

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 12-1877-07

## Screening and characterization of human anti-GPC3 single chain Fv antibody fragment selected by phage display

JIANG Jia-hao, SUN Fu-mou, HAN Yue, WANG Yang, CAI Jia-ling, WANG Min\*, ZHANG Juan\*

(College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** The aim of the experiments is to screen human single-chain variable fragment (scFv) targeting glypican 3 from phage display library, and analyze its biological activity. After several rounds of panning, the binders with high affinity were obtained through phage ELISA and IMGT analysis. The desired scFv gene was then ligated with pET-22b vector yielding recombinant plasmids, which was then introduced into *E. coli* Rosetta (DE3). Soluble scFv protein was expressed and further purified using  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatography. The purified proteins were identified by SDS-PAGE and Western blot. Subsequently, the affinity and cell based binding activity were measured using Surface Plasmon Resonance (SPR) and flow cytometry assay, separately. Four enriched sequences with relatively high binding affinity were found (1F7, 1D7, 1D4 and 1B10). We also found that 1F7 scFv showed better targeting ability and higher affinity. The scFv could pave the way for new immunotherapies, such as bispecific antibody, antibody-drug conjugate and chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy cell, etc.

**Key words:** phage display; single-chain variable fragment; glypican-3; tumor targeting

收稿日期: 2017-07-13; 修回日期: 2017-08-12.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助 (81473125); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20161459); 西比曼生物科技 (上海) 有限公司项目资助.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271395, E-mail: minwang@cpu.edu.cn;

Tel / Fax: 86-25-83271483, E-mail: juancpu@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0687

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的肝癌亚型, 发病率占全球第五位, 严重威胁着人类健康<sup>[1]</sup>。肝细胞肝癌早期易转移, 术后易复发, 当前的治疗方法并不理想<sup>[2]</sup>。广谱多激酶抑制剂索拉非尼是 FDA 唯一批准的、用于治疗肝细胞肝癌的小分子化学药物, 然而该药物的药效并不令人满意,

平均只能延长患者 3 个月的存活期<sup>[3]</sup>。因此,寻找理想的治疗肝细胞肝癌的新靶点,并研发新的免疫疗法迫在眉睫,近期有研究发现,磷脂酰肌醇聚糖-3 (glypican-3, GPC3) 是诊断和治疗肝细胞肝癌的理想靶点<sup>[4]</sup>。

GPC3 是肝素硫酸多糖家族的一个膜蛋白,其基因位于人类 X 染色体上 (Xp26), 结构全长约 900 kb, cDNA 序列全长为 2263 bp, 编码 580 个氨基酸, 核心分子质量为 70 kDa 的膜蛋白<sup>[4,5]</sup>。GPC3 在 HCC、结肠癌和恶性黑色素瘤等多种恶性肿瘤中高表达<sup>[6]</sup>, 其中, HCC 肿瘤细胞表面的 GPC3 表达率高达 70%, 正常组织中均未检测到表达<sup>[7,8]</sup>。

GPC3 可能与 HCC 细胞的发生、发展有着密切的联系<sup>[9-12]</sup>。研究表明, GPC3 的两个硫酸乙酰肝素 (HS) 侧链通过 Wnt 信号通路促进 HCC 细胞的增殖<sup>[13,14]</sup>, 同时, GPC3 游离的 HS 侧链可以通过 ERK 和/或 AKT 信号蛋白激活相关的信号通路, 从而刺激周围的细胞生长<sup>[15]</sup>。此外, GPC3 在 HCC 细胞中特异性高表达<sup>[16]</sup>, 已成为 HCC 治疗和诊断的标记物, 研究者针对靶向 GPC3 的抗体进行了前期探索。其中以 GC33 为代表的药物进入了临床研究, GC33 是一种特异性靶向 GPC3 的抗体, 该抗体表现出良好的安全性和耐受性, 同时由于 GPC3 在 HCC 细胞中的高表达, 该抗体也在恶性 HCC 患者上取得显著抗肿瘤疗效<sup>[17,18]</sup>。

目前, 已报道靶向 GPC3 的抗体有全长抗体 GC33、hGC33、YP7 及单域抗体 NH3, 以单链抗体作为“生物导弹”的相关研究目前还未开展<sup>[19]</sup>。本研究旨在利用噬菌体筛选技术获得靶向 GPC3 的高亲和力全人源单链抗体, 该抗体可有效避免人抗鼠抗体反应 (human anti-mouse antibody response, HAMA), 同时由于分子质量小, 使其具有良好的渗透性和内化能力<sup>[20]</sup>。其自身独特的性质可使其成为 HCC 新治疗性抗体和诊断试剂的优先选择。

## 材料与方 法

**质粒、菌株、细胞及试剂** pET-22b-His 载体由本实验室保存, *E. coli* Rosetta 购自上海翊圣生物科技有限公司, HepG2、Huh-7 和 Bel-7402 细胞由本实验室保存。质粒提取试剂盒、限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I 均购自美国 NEB 公司; 羟氨苄青霉素 (ampicillin, Amp)、盐酸四环素 (tetracycline hydrochloride, Tet)、异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside,

IPTG)、TMD 显色液、BCA 试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA marker、质粒提取试剂盒均购自上海生物工程股份有限公司; anti-His mouse monoclonal antibody、FITC goat anti mouse antibody、HRP goat anti mouse antibody、human glypican 3/GPC3/OCI-5 protein (His Tag) 均购自北京义翘神州生物技术公司; HEPES 购自美国 GE 公司; 全人源噬菌体单链抗体 (single-chain variable fragment, scFv) 抗体库为本课题组构建。

**仪器** CM5 芯片、Ni<sup>2+</sup>亲和柱、Biacore X100 均购自美国 GE 公司; CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱、-70 °C 冰箱、细胞培养瓶、培养板、培养皿均购自 Thermo 公司; 冷冻离心机购自 Beckman Coulter 公司。

**Anti-GPC3 scFv 的筛选** 本实验所用的人源抗体库的库容量约为  $1.2 \times 10^{13}$  pfu·mL<sup>-1</sup>, 其包被所用的蛋白是市售全长 GPC3 蛋白。本实验用 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 全长 GPC3 蛋白在 4 °C 包被过夜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 将噬菌体抗体库 200  $\mu$ L 加入预先所包被的 GPC3 蛋白孔中, 37 °C 孵育 2 h, 0.1% PBST 震荡去除非特异性结合的噬菌体抗体, 加入 Gly-HCl (pH 2.2) 溶液 100  $\mu$ L 进行洗脱, 震荡洗脱 10 min, 立即用 pH 8.5 Tris-HCl 中和。感染 10 mL 大肠杆菌 (OD<sub>600</sub>=0.5), 取感染后的菌液涂 Tet+Amp 平板, 计算菌落形成单位。剩余的菌液离心弃上清, 沉淀涂大型平板, 即为第 1 轮的 sub-library。同上方法进行 3 轮的吸附-淘洗-洗脱-扩增, 每轮加入相同体积的噬菌体, 观察其是否富集。从第 3 轮和第 4 轮筛选的平板上挑选 192 个单克隆进行培养, 收集含有噬菌体上清进行 ELISA 初步筛选出能够与 GPC3 蛋白结合的阳性克隆。

**Anti-GPC3 scFv 阳性噬菌体克隆的鉴定** 包被 1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 市售全长 GPC3 蛋白, 用 BSA 溶液 37 °C 共孵育 2 h, 用 0.05% PBST 震荡去除非特异性结合的噬菌体抗体, 将收集的噬菌体上清 37 °C 共孵育 2 h, 将抗 M13 鼠源单克隆抗体作为一抗, 带有 HRP 的羊抗鼠抗体作为二抗, TMB 显色后双波长法于酶标仪上测定 OD<sub>450 nm</sub> 和 OD<sub>630 nm</sub> 值, 并计算获取 “OD<sub>450 nm</sub> - OD<sub>630 nm</sub>” 值。

**Anti-GPC3 scFv 的构建和表达** 用质粒提取试剂盒提取 pET-22b-His 质粒和 pCantab-5E 噬菌体质粒, 用 *Nco* I 和 *Not* I 进行双酶切, 纯化回收, 16 °C 过夜连接, 并转化到 *E. coli* Rosetta (DE3) 中, 在含 Amp 平板上 37 °C 培养, 挑选单克隆进行测序, 进行鉴定。

将构建成功的工程菌株接种于平板上 37 °C 过夜

活化,次日挑选单克隆于 LB ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Amp) 液体培养基中。培养至 OD 值为 0.6~1.0,再以 1:100 的比例接种至发酵瓶中,培养至对数生长期时,加入终浓度  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG,于  $25^\circ\text{C}$  诱导表达 20 h。 $4^\circ\text{C}$ 、 $8000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min 收集诱导表达的发酵液菌体,用 1/10 初始发酵液体积的 binding buffer ( $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4,  $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑) 重悬菌体,冰上温和搅拌 10 min。加入终质量浓度  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  溶菌酶,冰上温和搅拌 30 min。再加入相应体积的 5% triton-100 温和搅拌 10 min,  $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min,将 2 次离心的上清混合,  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤。过滤后的样品用镍亲和柱层析纯化,用不同浓度的咪唑溶液 (20、50、100、250 和  $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 进行梯度洗脱,收集洗脱液。用 15% SDS-PAGE 分析各浓度洗脱液,并用 Western blot 验证高纯度的洗脱样品 (以抗 His 鼠源单克隆抗体为一抗,带有 HRP 的羊抗鼠抗体作为二抗)。

**ELISA 法对 anti-GPC3 scFv 的活性初步检测** 设置  $0.25\sim 1024 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 13 个浓度梯度抗体,以抗 His 鼠源单克隆抗体为一抗,带有 HRP 的羊抗鼠抗体作为二抗, TMB 显色后双波长法于酶标仪上测定  $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$  和  $\text{OD}_{630 \text{ nm}}$  值,计算出 “ $\text{OD}_{450 \text{ nm}} - \text{OD}_{630 \text{ nm}}$ ” 值,利用 Graphpad 软件进行  $K_D$  值计算。

**Biacore 法测定 anti-GPC3 scFv 和 GPC3 间的亲和力常数** 先将市售的 GPC3 蛋白固定于 CM5 芯片上,捕获单链抗体,至响应值不低于 2000。用 HBS-EP (pH 7.4) 流动相缓冲液将单链抗体和 GPC3 蛋白稀释成不同的浓度梯度,使单链抗体捕捉 GPC3 蛋白,并测得结合常数  $K_a$  和解离常数  $K_d$ ,最后通过计算得到平衡解离常数  $K_D = K_d/K_a$ 。

**Anti-GPC3 scFv 与肿瘤细胞的结合能力的测定** 流式细胞技术检测 anti-GPC3 scFv 与 GPC3 阳性肝癌细胞 (HepG2 和 Huh-7) 及阴性细胞 (Bel-7402) 的结合率。设置  $0.25\sim 1024 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 13 个 1F7 scFv 浓度梯度,将抗 His 鼠源单克隆抗体作为一抗,带有 FITC 的羊抗鼠抗体作为二抗,从而验证抗体的靶向性。利用 Flow job 软件计算出其平均荧光强度,用 Graphpad 软件进行  $K_D$  值计算。从而验证其 scFv 与天然 GPC3 蛋白的结合能力和特异性。

**Anti-GPC3 scFv 与 GPC3 蛋白结合位点的预测** 利用 Molecular operating environment (MOE.2014) 软件和 SWISS-MODEL 软件分别对 1F7 scFv 和 GPC3 蛋白进行建模并通过 ZDOCK 软件进行对接,利用 MOE 软件进行分析获得 1F7 scFv 结合抗原表位。

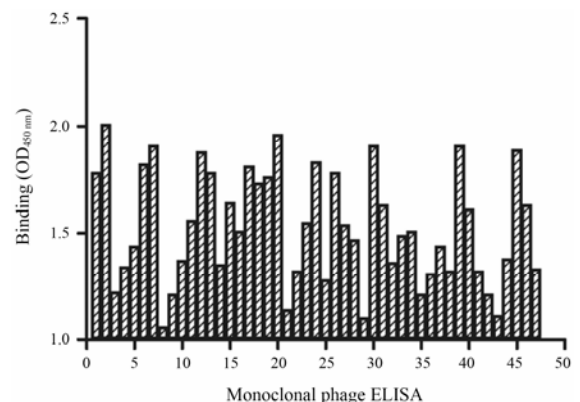
## 结果

### 1 anti-GPC3 scFv 的筛选和鉴定

通过 4 轮“吸附-淘洗-洗脱-扩增”后,筛选的每轮输出率均有增加 (表 1),在第 4 轮的平板中挑取 176 个单克隆于 96 孔板中进行培养并表达含有 anti-GPC3 scFv 基因的噬菌体,利用 ELISA 进行阳性单克隆的初步筛选。如图 1 得到 47 个 OD 值在 1.0 以上的阳性克隆,并进行测序分析,对比发现共筛选出了 4 个富集的序列分别命名为 1F7、1D7、1D4 和 1B10。通过 IMGT 抗体分析软件对 4 种 scFv 序列与全人源化抗体的同源性高达 96.5%~98.2%,并获得了 4 种富集的 scFv 序列。

**Table 1** Four rounds screen for anti-GPC3 scFv. Input and output are tested through dilution titer method. In addition, enrichment is the quotient of  $n$  and  $n-1$  round of recovery rate. Single chain antibodies were effectively enriched

Round	Input /pfu	Output /pfu	Recovery rate/% (output/input)	Enrichment (rate <sub>n</sub> /rate <sub>n-1</sub> )
1	$1.4\times 10^{13}$	$3.1\times 10^4$	$2.2\times 10^{-9}$	-
2	$5.6\times 10^{13}$	$8.5\times 10^5$	$1.5\times 10^{-8}$	6.8
3	$9.6\times 10^{12}$	$6.8\times 10^6$	$7.0\times 10^{-7}$	46.7
4	$8.3\times 10^{12}$	$4.7\times 10^7$	$5.6\times 10^{-6}$	8.0



**Figure 1** The identification of positive clones. The figure is the summary of absorption data on 47 positive phage clones

### 2 Anti-GPC3 scFv 的构建和表达

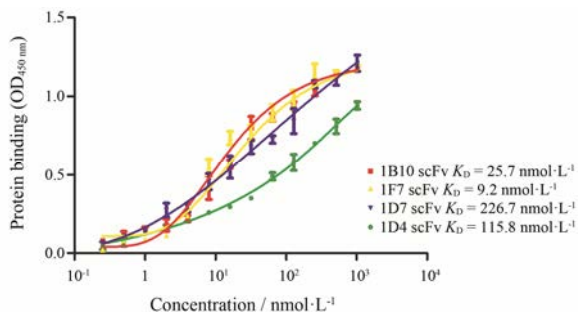
构建 scFv 需用双酶切获取 scFv 的基因,图 2A 中 scFv 的基因片段大小约为 750 bp,与带有 His 标签的载体连接,构建为重组质粒 (图 2B),转化到大肠杆菌 *E. coli* Rosetta 中进行表达,其表达产量可达到  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,SDS-PAGE 显示 4 种构建的 scFv 其纯度较高,无杂蛋白,其分子质量约为 28 kDa,符合预期 (图 2C)。Western blot 显示蛋白的分子质量正确,同时无蛋白降解 (图 2D)。

### 3 Anti-GPC3 scFv 初步筛选

亲和力是治疗性抗体靶向肿瘤细胞最重要的性质之一, 因此先用 ELISA 法对 4 种 anti-GPC3 scFv 进行了初步检测, 利用 Graphpad 5 计算后, 如图 3, 1F7、1D7、1D4 和 1B10 4 种 anti-GPC3 scFv 的  $K_D$  值分别可达到 9.2、226.7、115.8 和 25.7  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 其中 1F7 scFv 的亲和力最高。

### 4 Anti-GPC3 scFv 的亲和力测定

ELISA 法只能对 scFv 的亲和力进行初步测定。为了获取 scFv 准确的亲和力常数, 采用 SPR 技术对 scFv 的亲和力进行了测定, 结果显示 (图 4), 其 1F7



**Figure 3** Preliminary detection of affinity of four anti-GPC3 scFv with ELISA method. This method used commercial human full length GPC3 protein

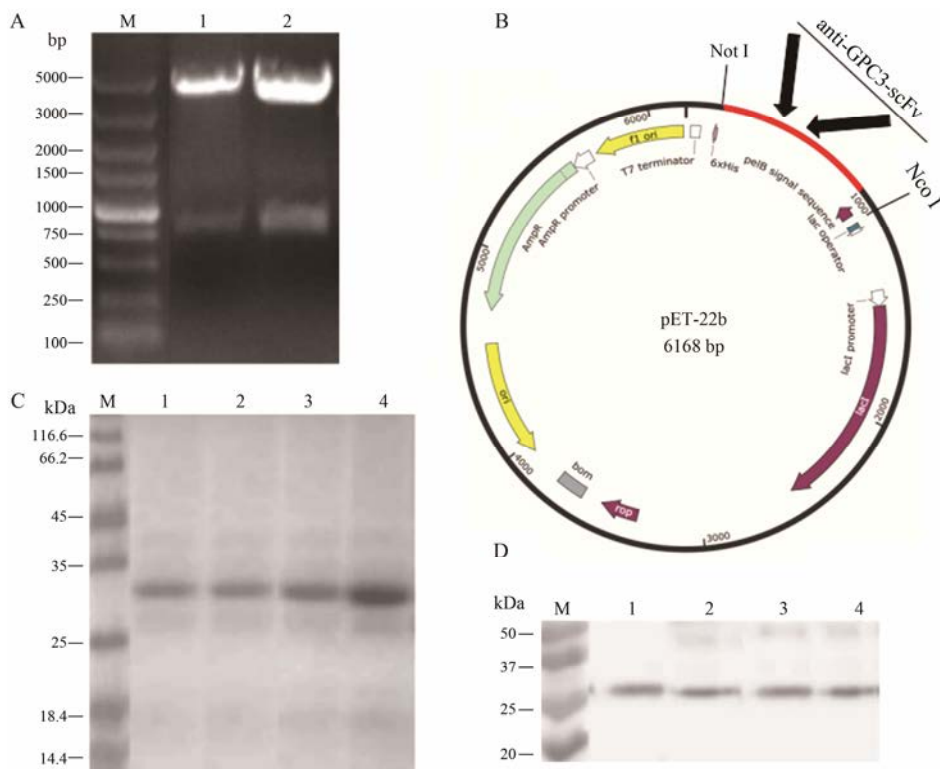
的  $K_D$  值最高, 可达到  $4.037 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而 1D7、1D4 和 1B10 3 种 anti-GPC3 scFv 的  $K_D$  值分别为 208、231 和  $10.97 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 5 Anti-GPC3 scFv 对 HCC 细胞的结合能力

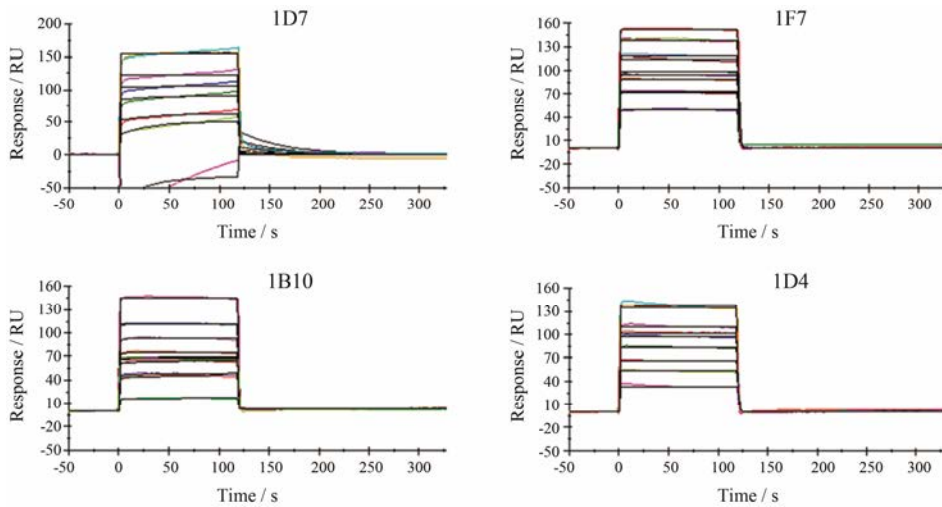
采用 2 株表达 GPC3 的 HCC 细胞和不表达 GPC3 的阴性细胞株 Bel-7402 来测定单链抗体对 HCC 细胞的结合能力。结果如图 5A 显示, 64、128、256 和  $512 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  1F7 scFv 对 Huh-7 的结合率可分别达到 31.9%、42.7%、67.7% 和 78.8%, 对 HepG2 的结合率可分别达到 40.5%、54.6%、77.9% 和 87.4%, 但  $512 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  1F7 scFv 对 BEL-7402 的结合率仅为 6.14%, 1F7 scFv 表现出良好的靶向性。此外, 利用 Graphpad 计算后, 1F7 scFv 对 GPC3 阳性细胞 Huh-7 和 HepG2 表面的天然 GPC3 蛋白  $K_D$  分别为 39.8 和  $10.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 5B)。综上所述, 1F7 scFv 是一种能够特异性、高亲和力靶向 GPC3 蛋白的单链抗体。

### 6 Anti-GPC3 scFv 与 GPC3 蛋白结合位点的预测

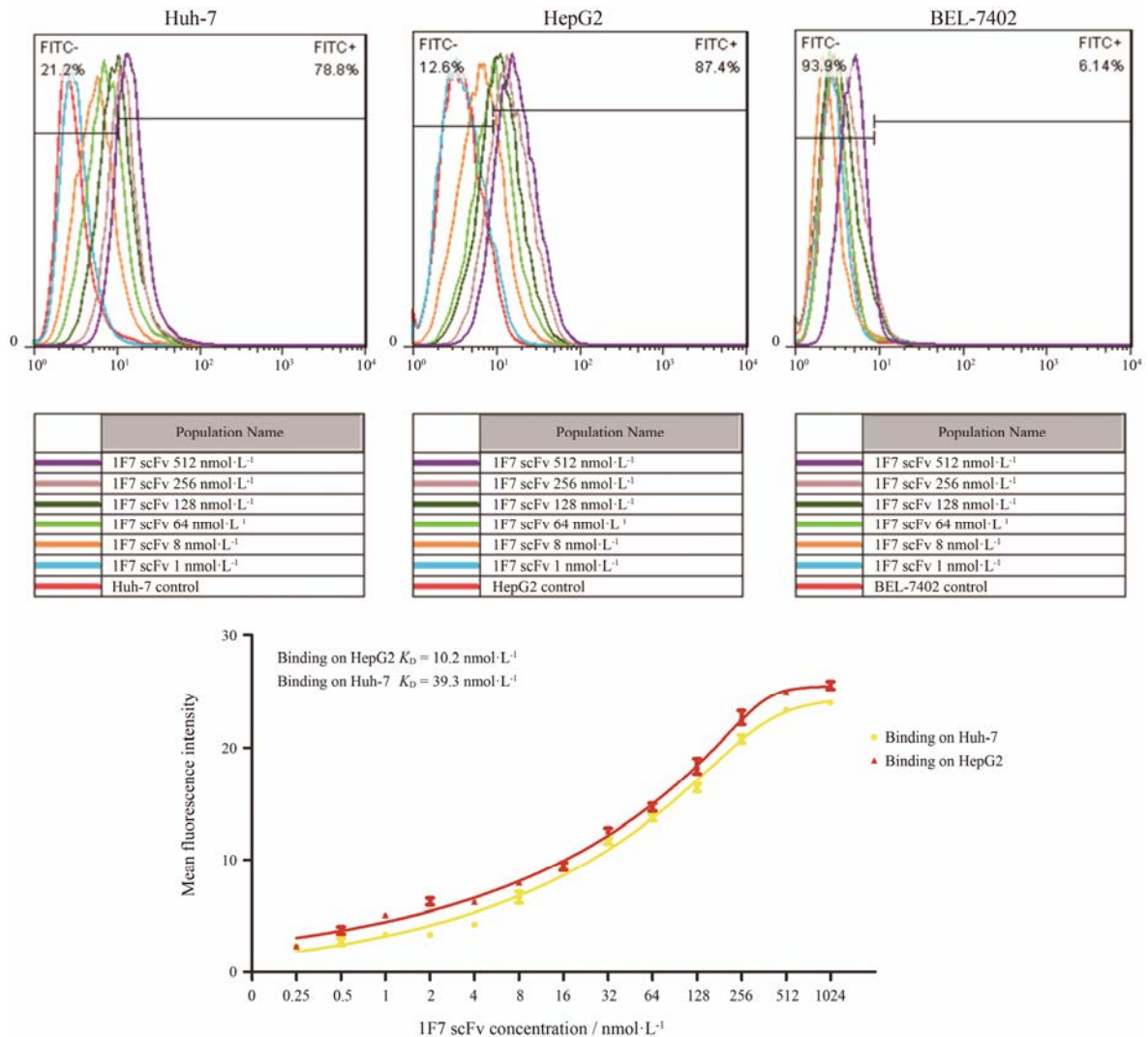
通过生物信息学技术对 GPC3 与 1F7 scFv 进行同源建模、分子对接, 成功模拟 GPC3 与 1F7 scFv 对接的三维模型 (图 6), 从理论上预测抗原抗体的结合位点 (表 2), 为后续的活性实验奠定理论基础。



**Figure 2** The construction and expression of anti-GPC3 scFv. (A) Electrophoresis map of anti-GPC3 scFv phage plasmid. (B) The schematic map of anti-GPC3 scFv with His tag recombinant plasmid. (C) and (D) SDS-PAGE and Western blot analysis of four different anti-GPC3 scFv expressed by *E. coli* Rosetta. Lane 1: 1D7 scFv; Lane 2: 1D4 scFv; Lane 3: 1F7 scFv; Lane 4: 1B10 scFv. GPC3: Glypican-3; scFv: Single-chain variable fragment



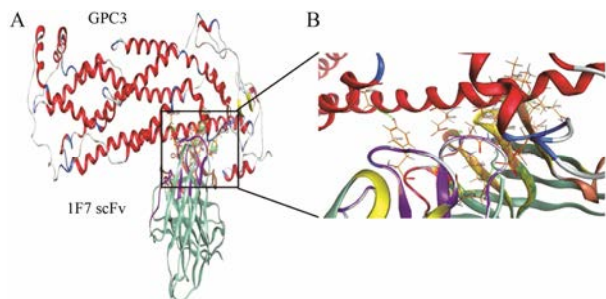
**Figure 4** Affinity and binding capacity analysis. Affinity of anti-GPC3 scFv for binding to commercial human full length GPC3 protein was measured by SPR. Experimental results for the real-time binding of GPC3 to immobilized anti-GPC3 scFv showed that the association rate increased with increasing concentrations of the GPC3 protein



**Figure 5** Affinity and binding capacity analysis. (A) FACS analysis of cell based on different concentration of 1F7 scFv binding on HepG2 (GPC3<sup>+</sup>), Huh-7 (GPC3<sup>+</sup>) and Bel-7402 (GPC3<sup>-</sup>) cells. (B) Detection of affinity of 1F7 scFv for nature GPC3 protein with flow cytometry

**Table 2** Prediction on interactions between GPC3 and 1F7 scFv by ZDOCK

Number	Type	Antigen	Pos	Residue	scFv	Pos	Residue
1	HB	GPC3	386	GLU417.OE2	VL (CDR1)	25	SER25.OG
2	HB	GPC3	366	SER397.OG	VL (CDR1)	31	TYR34.OH
3	HB	GPC3	60	GLN91.O	VH (CDR3)	98	LYS98.NZ
4	HB	GPC3	64	SER95.OG	VL (CDR3)	93	LYS93.NZ
5	HB	GPC3	63	GLN94.OE1	VH (CDR2)	60	TYR60.N
6	HB	GPC3	61	LEU92.CB	VL (CDR3)	92	PHE92.CZ
7	HB	GPC3	378	ILE409.CB	VL (CDR3)	92	PHE92.CZ
8	HB	GPC3	62	LEU92.CB	VH (CDR3)	102	PHE102.CZ
9	HB	GPC3	65	GLU96.OE1	VH (CDR3)	99	ARG99.NH1

**Figure 6** The prediction of interaction site between GPC3 and 1F7 scFv. (A) Complex of GPC3 and 1F7 scFv binding predicted by ZDOCK server. (B) Residues interaction in GPC3 and 1F7 scFv binding sites

## 讨论

目前已报道靶向 GPC3 的抗体有 GC33、hGC33、YP7 和 NH3。GC33 和 hGC33 已进入临床 II 期，用于治疗恶性肝细胞肝癌，YP7 和 NH3 则处于临床前研究<sup>[11, 19, 20]</sup>。GC33 通过诱导抗体依赖性细胞毒性作用 (ADCC)，可抑制 HCC 肿瘤细胞在裸鼠皮下的生长<sup>[21]</sup>。hGC33 是人源化的 GC33，其已应用于肝癌治疗，但 hGC33 在 II 期临床试验中并没有表现出显著的临床疗效<sup>[22]</sup>。YP7 和 NH3 则是由美国 NIH 研发的 2 种不同类型的靶向 GPC3 单克隆抗体。YP7 的识别位点与 hGC33 重叠，都能识别 GPC3 的 C-末端抗原<sup>[23]</sup>。NH3 则为全人源的重链可变区抗体 (heavy chain available antibody, V<sub>H</sub>H)，可有效地抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[24, 25]</sup>。相较于 GC33、hGC33 和 YP7，单链抗体 (scFv) 分子质量小，免疫原性低，拥有良好的组织渗透能力，更易进入实体瘤周围的微环境甚至实体瘤内部，其血液循环和全身的廓清速度较快，半衰期短，肾脏蓄积少。此外，其可与高效“弹头”药物构成免疫偶联物，其良好的内化能力能更好地使药物进入细胞内发挥疗效。目前针对 GPC3 scFv 的 ADC 或免疫毒素药物研究目前还未开展，新型免疫治疗药物将有助于解决 HCC 的治疗难题。

单链抗体作为“生物导弹”，携带相关的毒素蛋白或相关的免疫细胞的激活受体等已逐步应用于临床研究，高亲和力和良好的靶细胞表面蛋白结合能力是单链抗体发挥靶向功能的基础。ELISA 及 SPR 技术均是对抗体亲和力测定的通用技术，其结果均显示 1F7 scFv 的亲和力可达到纳摩尔级，较 1B10、1D4 和 1D7 scFv 的亲和力要高出 10~100 倍。在细胞结合实验中，1F7 scFv 表现出对 GPC3 阳性肿瘤细胞表面的天然 GPC3 蛋白具有良好的结合能力，但对 GPC3 阴性肿瘤细胞株无结合能力，各项数据表明，1F7 scFv 对市售重组 GPC3 蛋白和天然 GPC3 蛋白均表现出良好的特异性和结合能力，具备作为“生物导弹”的潜质。

本研究通过噬菌体库筛选得到 4 个富集 scFv 的序列，结果表明 1F7 scFv 为理想的 anti-GPC3 scFv，该 anti-GPC3 scFv 可作为良好的载体，为下一步的免疫治疗和肿瘤的影像诊断奠定基础。1F7 scFv 能否有效抑制 HCC 的增殖，及抑制肿瘤增殖的相关机制还需要进一步探索。

## References

- [1] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132: 2557–2576.
- [2] Ng IO, Lai EC, Fan ST, et al. Prognostic significance of pathologic features of hepatocellular carcinoma. A multivariate analysis of 278 patients [J]. *Cancer*, 1995, 76: 2443–2448.
- [3] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 378–390.
- [4] Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34: 649–656.

- [5] Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47: 333–338.
- [6] Li W, Guo L, Rathi P, et al. Redirecting T cells to glypican-3 with 4-1BB zeta chimeric antigen receptors results in Th1 polarization and potent antitumor activity [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28: 437–448.
- [7] Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, et al. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2005, 18: 1591–1598.
- [8] Hsu HC, Cheng W, Lai PL. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 5179–5184.
- [9] Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100: 1403–1407.
- [10] Wei G, Ho M. The role of glypican-3 in regulating Wnt in hepatocellular carcinomas [J]. *Cancer Rep*, 2011, 1: 14–19.
- [11] Allegretta M, Filmus J. Therapeutic potential of targeting glypican-3 in hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11: 543–548.
- [12] Chen M, Li G, Yan J, et al. Reevaluation of glypican-3 as a serological marker for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 423: 105–111.
- [13] Zittermann SI, Capurro MI, Shi W, et al. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126: 1291–1301.
- [14] Gao W, Kim H, Ho M. Human monoclonal antibody targeting the heparan sulfate chains of glypican-3 inhibits HGF-mediated migration and motility of hepatocellular carcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0137664.
- [15] Wu Y, Liu H, Weng H, et al. Glypican-3 promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells through ERK signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46: 1275–1285.
- [16] Suzuki S, Yoshikawa T, Hirose T, et al. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102: 1622–1629.
- [17] Zhu AX, Gold PJ, El-Khoueiry AB, et al. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 920–928.
- [18] Ikeda M, Ohkawa S, Okusaka T, et al. Japanese phase I study of GC33, a humanized antibody against glypican-3 for advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105: 455–462.
- [19] Ishiguro T, Sugimoto M, Kinoshita Y, et al. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 9832–9838.
- [20] Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, et al. Making antibodies by phage display technology [J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 433–4556.
- [21] Takai H, Kato A, Ishiguro T, et al. Optimization of tissue processing for immunohistochemistry for the detection of human glypican-3 [J]. *Acta Histochem*, 2010, 112: 240–250.
- [22] Aboualfa GK, Yen CJ, Carrasquillo JA, et al. Phase Ib study of RO5137382/GC33 in combination with sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) (NCT00976170) [J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32: 4100.
- [23] Gao W, Kim H, Feng M, et al. Inactivation of Wnt signaling by a human antibody that recognizes the heparan sulfate chains of glypican-3 for liver cancer therapy [J]. *Hepatology*, 2014, 60: 576–587.
- [24] Feng M, Gao W, Wang R, et al. Therapeutically targeting glypican-3 *via* a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: E1083–E1091.
- [25] Gao W, Tang Z, Zhang YF, et al. Immunotoxin targeting glypican-3 regresses liver cancer *via* dual inhibition of Wnt signaling and protein synthesis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6536.