

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 12 月 20 日 (20.12.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/227643 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/576 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/088945

(22) 国际申请日: 2017 年 6 月 19 日 (19.06.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710443740.6 2017年6月13日 (13.06.2017) CN

(71) 申请人: 首都医科大学附属北京地坛医院 (BEIJING DITAN HOSPITAL CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区京顺东街8号李艳召, Beijing 100015 (CN)。北京热景生物技术股份有限公司 (BEIJING HOTGEN BIOTECH CO., LTD) [CN/CN]; 中国北

京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢, Beijing 102600 (CN)。

(72) 发明人: 魏红山(WEI, Hongshan); 中国北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢, Beijing 102600 (CN)。李伯安(LI, Boan); 中国北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢, Beijing 102600 (CN)。林长青(LIN, Changqing); 中国北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢, Beijing 102600 (CN)。乔雍(QIAO, Yong); 中国北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢, Beijing 102600 (CN)。

(74) 代理人: 北京科石知识产权代理有限公司 (BEIJING TECHSTONE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD); 中国北京市海

(54) Title: TARGET MARKER GP73 FOR DETECTING STEATOHEPATITIS AND DETECTION APPLICATION METHOD

(54) 发明名称: 一种用于脂肪性肝炎检测的靶标志物GP73及检测应用方法

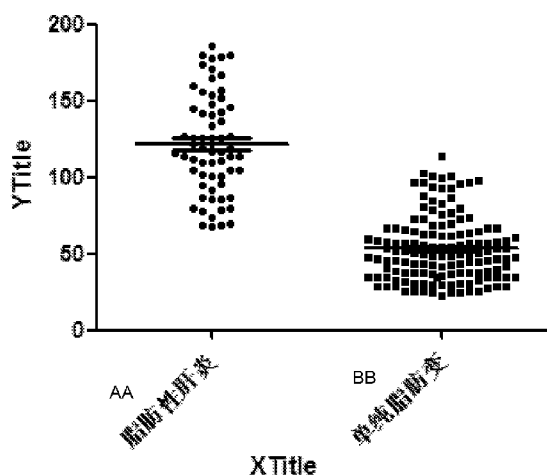


图 11

AA Steatohepatitis
BB Simple fatty change

(57) Abstract: A novel serological target marker GP73 used for diagnosing and identifying a simple fatty change and steatohepatitis in crowds with fatty liver and a detection application method thereof. The serological target marker GP73 and the application thereof can replace golden standard liver puncture to identify and diagnose the simple fatty change and steatohepatitis in crowds with fatty liver, reduce the detection pain of a patient, and have an extremely high clinical application value in clinically identifying and diagnosing the simple fatty change and steatohepatitis in the crowds with fatty liver and assisting the treatment of the simple fatty change and steatohepatitis.

淀区学院南路38号智慧大厦203B高元吉, Beijing 100082 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 用于在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的新血清学靶标志物GP73及其检测应用方法。血清学靶标志物GP73及其应用可代替金标准肝穿刺鉴别诊断脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂肪性肝炎, 降低患者检测痛苦, 对于临床鉴别诊断脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂肪性肝炎, 辅助单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的治疗具有极高的临床应用价值。

一种用于脂肪性肝炎检测的靶标志物 GP73 及检测应用方法

技术领域

[01] 本发明涉及一种体外检测脂肪性肝炎的新标志物及检测方法，属于生物技术和体外诊断的细分领域。

背景技术

[02] 脂肪肝是指由于各种原因引起的肝细胞内脂肪异常堆积过多的病变。正常人肝组织中含有少量的脂肪，其重量约为肝重量的4%~5%，若脂肪量超过5%为轻度脂肪肝，超过10%为中度脂肪肝，超过25%为重度脂肪肝。脂肪肝是目前最常见的慢性肝脏疾病之一，在发达国家和部分发展中国家发病率达到30%以上，已成为一个重要的公共健康问题，严重威胁人民健康。脂肪肝包括单纯性脂肪变、脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化等主要病理阶段；脂肪肝中的单纯性脂肪变是良性的，通过饮食、运动调控等可以逆转，不需要经过特异性治疗；而脂肪性肝炎如不及时治疗，将随着疾病的进展将进一步向肝纤、肝硬化、肝癌发展，报道显示脂肪性肝炎转化为肝纤肝硬化，直至肝癌的发病率与病毒性肝炎的发病率相当。脂肪性肝炎严重威胁人民的健康，目前，脂肪肝主要通过B超、CT、MRI等影像学手段检测，但是影像学检测无法区分单纯性脂肪变和脂肪性肝炎，脂肪性肝炎的确诊仍依赖于肝穿刺检测，肝穿刺检测会给患者带来较大的身体和心理负担，不利于脂肪性肝炎的诊断确诊和日常检测。

[03] 高尔基体蛋白73（如无特殊说明，以下均简称GP73）是高尔基体糖蛋白，2000年首先由Kladney等在研究成人巨细胞肝炎病原学时发现的一种新的跨膜糖蛋白，又称II型高尔基体膜蛋白(Golph 2)和高尔基体膜蛋白I(Golm 1)，相对分子量为73000 kDa。GP73在正常的肝细胞内不表达或少量表达，

近几年的研究发现, GP73在肝纤、肝硬化及肝癌等多种肝脏疾病中呈高表达状态, 并可分泌进入血清, 肝癌患者中的GP73升高最为明显, 是肝癌早期诊断的优选标志物之一, 其敏感性和特异性均优于AFP。

[04] 中国专利公布CN 101735319 A(北京热景生物技术股份有限公司, 专利名称“一种抗GP73 蛋白的单克隆抗体、其制备方法和应用”), 公开了一种抗高尔基蛋白GP73 的单克隆抗体, 一种应用GP73的酶联免疫定量检测试剂盒和一种快速诊断试剂盒, 并公开了正常人与肝病患者的GP73 含量的临界值为40ng/ml, 良性肝病患者与恶性肝病患者的GP73 含量的临界值为100ng/ml。

[05] 中国专利公布CN 101407544 A(专利名称: “抗高尔基体蛋白单克隆抗体及应用”)公开了一种抗GP73 单克隆抗体及应用该单克隆体的肝癌检测的酶免试剂和免疫沉淀、免疫印迹、免疫组化等方面的应用。

[06] 中国专利公布CN 104215761 A(专利名称: “检测血清中抗GP73 抗体的试剂盒”)公开了一种检测血清中抗GP73 抗体检测的酶联免疫试剂盒, 主要用于肝癌检测。

[07] 近年来, GP73及其相关应用研究主要集中在肝癌早期诊断领域, GP73相关专利申请也主要集中在应用GP73及其抗体进行肝癌检测的体外诊断试剂盒领域, 未见GP73用于脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的研究及应用的报道及相关专利申请。我们经过大量临床样本研究分析, 充分证明GP73是在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的优秀血清学标志物, 对于脂肪性肝炎人群的诊断和鉴别都有着重要的临床应用价值。

发明内容

[08] 目前临床上应用肝穿刺来诊断鉴别脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂

肪性肝炎，给患者带来巨大痛苦，为了解决现有影像学检测技术和血清学检测技术无法在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的不足，本发明提供了一种在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的新血清学靶标志物GP73，并进一步提供了在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的检测GP73的检测试剂盒，检测方法及其判定标准。

[09] 本发明提供了一种用于在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的新血清学靶标志物GP73及其体外诊断的检测样本中GP73含量的方法。

[10] 本发明更进一步提供了在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的血清学体外诊断检测试剂盒，及其应用体外诊断检测试剂盒检测GP73的方法及其判定标准。

[11] 在本发明的实施方案中，GP73检测方法原理为基于抗原抗体结合反应的免疫学检测方法原理，优选化学发光法、酶联免疫法、免疫层析法的任意一种。

[12] 在本发明的某些实施方案中，所述化学发光法为化学发光法、磁微粒化学发光法、电化学发光法、酶促化学发光法、时间分辨化学发光法的至少一种。

[13] 在本发明的某些实施方案中，所述酶联免疫法为酶联免疫法、免疫渗滤法、蛋白芯片法的至少一种。

[14] 在本发明的某些实施方案中，所述免疫层析法为上转发光免疫层析法、乳胶免疫层析法、胶体金免疫层析法、发光免疫层析法、量子点免疫层析法的至少一种。

[15] 在本发明的某些实施方案中，GP73的检测样本为脂肪肝人群的血液样本，所述血液样本检测结果用于在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎。

[16] 在本发明的某些实施方案中，GP73血清学体外诊断检测试剂盒在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的判定cutoff值为82.25ng/ml。

[17] 与现有技术相比，本发明在于提供一种在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的新血清学靶标志物GP73，并进一步提供了在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的检测GP73的方法及其判定标准，解决了现有的影像学检测技术和血清学检测技术无法在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的问题，为脂肪性肝炎的诊断和治疗提供依据，检测样本为血液样本，大幅度降低了肝穿刺检测脂肪性肝炎为患者带来的痛苦，对脂肪肝人群中鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎具有重要的临床诊断价值和临床意义。

附图说明

图1，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果绝对偏倚图。

图2，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果绝对偏倚图。

图3，200例GP73酶联免疫法检测试剂检测、GP73免疫层析法检测试剂检测结果绝对偏倚图。

图4，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果相对偏倚图。

图5，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果相对偏倚图。

图6，200例GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果相对偏倚图。

图7，所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检

测试剂检测结果线性相关性。

图8，所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果线性相关性。

图9，所述200例GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果线性相关性。

图10，ROC曲线分析图。

图11，GP73检测结果数据分布图。

图12，临床一致性分析图。

具体实施方式

[18] 以下结合附图和实施案例，对本发明进行进一步详细说明，应当理解，此处所述的优选实施案例仅用于解释本发明，并不限定发明范围。

[19] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式，并非用于限制本发明。对于本发明中的数值范围，应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[20] 除非另有说明，否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的不同含义。虽然本发明仅描述了优选的实验方法、测定或测试方法，但是在本发明的实验、测定或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法。本说明书中提到的所有文献通过引用并入，用以公开和描述与所述文献相关的方法或实验。在与任何并入的文献冲突时，以本说明书的内容为准。

[21] 本发明中，名词术语既包括单数形式，也包括复数形式，除非上下文另行明确指出。本发明中所述的“至少之一”或“至少一种”不仅仅指包含“一

个”或“一种”的情况，更重要的还包含“多个”或“多种”的情况。

[22] GP73靶标志物及其GP73检测方法、判定标准通过应用抗GP73蛋白抗体，制备成基于抗原抗体结合反应的免疫学检测方法原理的检测试剂，包括化学发光法、酶联免疫法、免疫层析法及其基于所述方法的改进方法的任意一种方法的定量检测试剂，应用所述定量试剂检测的样本为脂肪肝人群的血液样本，可以为血清、血浆、全血的任意一种，所述血液样本检测结果用于在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎。

[23] 本发明中测量GP73的方法包括使用试剂，所述试剂包括但不限于抗体。所述抗体具体涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)及抗体片段，例如抗体中呈现期望生物学活性的可变结构域及其它部分。术语“单克隆抗体(mAb)”是指具有高度特异性且针对单一抗原决定簇(表位)的抗体。因此，术语“单克隆”指针对相同表位的抗体，且不应理解为需要借助任何特定方法来产生该抗体。应理解，单克隆抗体可借助业内已知的任何技术或方法来制备；包括(例如)融合瘤方法(Kohler等人，1975,Nature256:495)，或业内已知的重组DNA方法(例如，参见美国专利第4,816,567号)，或使用噬菌体抗体文库并使用以下文献中所述技术分离以重组方式产生的单克隆抗体的方法：Clackson等人，1991, Nature 352:624-628；及Marks等人，1991,J.Mol.Biol. 222:581-597。

[24] 本发明中，“抗体片段”指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；双抗体；线性抗体；单链抗体分子(例如scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[25] 本发明所述的试剂还包括其它试剂。所述其它试剂的实例包括ABC稀释液、TMB显色液、TMB终止液、洗涤液等。在某些实施方案中，任何上述物质之一可以与其他物质分离的状态单独存在分别存放于不同的容器(例

如，小瓶)中，只要在使用时它们能够相互接触即可。另外，优选地，任何两种以上的上述物质可混合作为混合物存在。

[26] 在某些实施方案中，所述其它试剂可分别以干燥粉末的形式提供，或以溶液形式提供，例如水溶液的状态存在。在以水溶液状态存在的情况下，这些物质的浓度或含量是本领域技术人员能够根据不同需求而方便地确定的。例如，用于储存的目的时，所述物质的浓度可以较高的形式存在，当处于工作状态或使用，可通过例如稀释上述较高浓度的溶液来将浓度降低至工作浓度。

[27] 本发明中，测量GP73的试剂可被进一步制备为用于在患有脂肪肝的受试者中鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的诊断剂。所述诊断剂的形式或为诊断组合物、诊断试剂盒，或者多种单独存在的试剂组合使用的其他任何形式。

[28] 实施案例1:

[29] 抗GP73蛋白抗体制备：参考已有专利技术进行制备、或筛选自商品化的抗GP73蛋白抗体、或通过已有公知技术制备的抗GP73蛋白抗体，制备或筛选的单克隆抗体可用于脂肪肝人群血液样本中的GP73的精确定量检测及结果判定。

[30] 为更优的解释本发明，本发明某些实施方案中所述的抗GP73蛋白抗体优选使用北京热景生物技术股份有限公司的专利技术“一种抗GP73蛋白的单克隆抗体、其制备方法和应用，CN 101735319 B”中的抗GP73蛋白抗体制备方法制备的抗GP73蛋白抗体，所述制备抗GP73蛋白抗体的杂交瘤细胞株(3E12株)于2008年11月11日以保藏号CGMCC No.2742保藏于中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)。

[31] 制备单克隆抗体：成年BALB/c小鼠腹腔接种降植烷或液体石蜡，每只小鼠0.3-0.5ml，7-10天后，腹腔接种用PBS或无血清培养基稀释的3E12株杂交瘤细胞株，每只小鼠 5×10^5 /0.2ml，每天观察小鼠腹水产生情况，如腹部

明显膨大，以手触摸时，皮肤有紧张感，采集腹水，每只小鼠约采3ml腹水，将腹水2000r/min离心5分钟，除去细胞成分和其他的沉淀物，收集上清，经重组proteinG 预装层析柱纯化后即获得抗GP73 单克隆抗体。

[32] 实施案例2:

[33] 化学发光法检测试剂制备：所述化学发光法为化学发光法、磁微粒化学发光法、电化学发光法、酶促化学发光法、时间分辨化学发光法及其改进方法的至少一种，不同化学发光法之间仅标记颗粒和分离方法之间存在差异，反应原理相同，经抗GP73蛋白抗体浓度优化处理后，均能达到精确定量检测鉴别脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂肪性肝炎，达到辅助诊断和治疗脂肪性肝炎的目的。GP73化学发光法的制备均来自成熟的化学发光法制备技术，并对该技术进行相关优化，使之达到优异的检测结果。

[34] 为更优的解释本发明，本发明某些实施方案中所述的化学发光法优选磁微粒化学发光法制备化学发光法检测试剂，磁微粒化学发光法检测试剂制备参照北京热景生物技术股份有限公司相关专利技术公开方法进行，所述抗体为实施案例1中所述的抗GP73蛋白抗体。

[35] 1、GP73磁微粒化学发光法检测试剂的GP73分离试剂制备：

[36] 所述GP73分离试剂制备概括为将磁性粒子与抗GP73蛋白抗体反应形成连接物，按一定浓度加入缓冲液中配制而成。主要步骤如下：

[37] 将磁珠混匀后加磁场去掉上清，用包被缓冲液清洗磁珠一次，然后加入活化剂（碳二亚胺），常温震荡反应30min，然后去上清，加入包被缓冲液及适量抗GP73蛋白抗体，常温震荡3h，反应结束后加入封闭液并震荡，最后加清洗液，清洗完成后加入保存液过夜保存即可。

[38] 所述包被缓冲液为0.1mol/L的pH5.0的MES缓冲液。

[39] 所述活化剂碳二亚胺的终浓度为0.01-0.1g/ml。

[40] 所述抗GP73蛋白抗体的适宜浓度为10-100ug/mg磁珠。

[41] 包被结束后，加磁场弃上清，加入约10倍体积的封闭液，常温振荡至少1小时。

[42] 所述封闭液主要组成成分为：50mM的Tris缓冲液，1-5%BSA溶液，0.1%防腐剂，pH7.4。

[43] 封闭结束后，加磁场弃上清，加入约10倍体积的清洗液清洗。

[44] 所述清洗液的主要组成成分为0.02M PBS、100nM氯化钠溶液，0.5-1%的吐温-20溶液。

[45] 清洗结束后，加磁场弃上清，准确加入10倍体积的磁性颗粒保存液保存抗DCP单克隆抗体的磁性颗粒，即为GP73分离试剂。

[46] 所述保存液的主要组成成分为0.02-0.1M PBS溶液，1%-5%的BSA溶液，0.1%的防腐剂，0.5-3%的甘氨酸溶液，pH7.4。

[47] 2、GP73磁微粒化学发光法检测试剂的检测试剂制备

[48] 所述检测试剂制备：概括为碱性磷酸酶标记的抗GP73蛋白抗体按照一定浓度加入到缓冲液中配制而成。

[49] 为更优的解释本发明，并于包被抗体对应，碱性磷酸酶标记抗体优选抗GP73蛋白抗体；该制备方法仅为更好的解释本发明，不作为标记抗体的制备及使用的限制条件。

[50] 取与抗GP73蛋白抗体质量比为1/4~1/1的碱性磷酸酶，加入与碱性磷酸酶溶液等体积的NaIO₄（12.8mg/ml，4℃现配），4℃避光反应30分钟，然后加入与碱性磷酸酶溶液等体积的乙二醇溶液 4℃避光反应45分钟；加入抗GP73蛋白抗体，再加入混合液1/40~1/10体积的CBS标记缓冲液（0.05mol/L，pH9.6）置4℃避光透析过夜，最后加入硫酸铵溶液，反应2小时，离心，弃去上清，沉淀用0.01mol/L的PBS溶解后置4℃避光透析过夜，透析完后加等体积甘油混匀，-20℃保存。

[51] 按比例（推荐浓度≥1:1000）将碱性磷酸酶标记的抗GP73蛋白抗体加入

保存液中，混匀即得GP73标记抗体，即为检测试剂制备。

[52] 3、GP73磁微粒化学发光法检测试剂的清洗液制备：

[53] 所述清洗液主要组成为：0.1M Tris缓冲液，0.1-1%吐温溶液、0.1%防腐剂。

[54] 4、GP73磁微粒化学发光法检测试剂的定标液制备：

[55] 所述GP73定标液制备概括为将检验合格的GP73抗原加入定标生产稀释液中配制冻干而成。

[56] 所述定标生产稀释液包括1-5%BSA溶液、1-5%的海藻糖溶液、10-50%新生牛血清溶液。将高值GP73抗原冻干液进行梯度稀释稀，释至适宜浓度，检测完后放入冻干机冻干，预冻时间为2h，抽真空时间为16-24h。

[57] 5、GP73磁微粒化学发光法检测试剂制备：

[58] 将GP73分离试剂、GP73检测试剂、GP73清洗液、GP73底物液按照工艺规程或说明书要求分装至相应大小的试剂瓶内，或条装试剂的试剂条的相应孔位，然后密封。分装后的试剂与定标液、耗材反应槽、一次性取样头等组成GP73磁微粒化学发光法检测试剂，所述试剂适配北京热景生物技术股份有限公司MQ60系列自动免疫分析仪使用。

[59] 实施案例3：

[60] GP73酶联免疫法检测试剂(96人份)制备：所述酶联免疫法为酶联免疫法为酶联免疫吸附法、斑点免疫渗滤法、磁颗粒酶联免疫法分析、酶联免疫荧光测量法和蛋白芯片法的至少一种或酶联免疫相应改进方法的至少一种，不同酶联免疫法之间仅承载载体之间存在差异，反应原理相同，经抗GP73蛋白抗体浓度优化处理后，均能达到精确定量检测鉴别脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂肪性肝炎，达到辅助诊断和治疗脂肪性肝炎的目的。GP73酶联免疫法的制备均来自成熟的酶联免疫法制备技术，并对该技术进行相关优化，使之达到优异的检测结果。

[61] 为更优的解释本发明, 本发明某些实施方案中所述的酶联免疫法优选酶联免疫吸附法制备的检测试剂, 酶联免疫法制备的检测试剂的制备参照北京热景生物技术股份有限公司相关专利技术公开方法进行, 所述抗体为实施案例1中所述的抗GP73蛋白抗体。

[62] GP73酶联免疫法检测试剂(96人份)组成包括: GP73 标准品5 瓶; 抗GP73蛋白抗体包被板(96 孔)1 块; 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的抗GP73蛋白抗体1 瓶, 10ml/ 瓶; 显色液A、显色液B 各1 瓶, 各5ml/ 瓶; 终止液1 瓶, 5ml/ 瓶; 洗液(20×浓缩)1 瓶, 50ml/ 瓶。

[63] 1. GP73酶联免疫法检测试剂的标准品制备:

[64] 将高值GP73抗原按0, 20ng/ml, 40ng/ml, 100ng/ml, 250ng/ml 的不同浓度稀释于2%的BSA溶液中, 加入防腐剂procline 300至最终浓度0.1%, 过滤除菌, 并在无菌的条件下分装入1.5ml 小管中, 每管0.5ml。贮存于4℃。

[65] 2. 抗GP73蛋白抗体包被板(96 孔)制备:

[66] 酶标板采用12×8或8×12可拆条酶标板, 将抗GP73蛋白抗体用0.05mol/L, pH9.5 的碳酸盐缓冲液稀释为10-50 μg/ml 后加入酶标板各孔, 每孔100 μl, 吸附过夜, 用清洗缓冲液(PBST 溶液, 包含20mmol/LPBS, 0.5% Tween-20, pH7.4) 洗板, 再用每孔120 μl封闭液缓冲液(2% BSA, 稀释于PBST 溶液中)封闭过夜, 弃去封闭液, 晾干, 即获得抗GP73蛋白抗体包被板(96 孔), 铝箔袋真空封闭包装备用。

[67] 3. 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的抗GP73蛋白抗体制备(全过程避光处理)。

[68] 称取HRP 5mg, 加ddH₂O 250 μl 溶解; 称取NaIO₄ 5mg, 加ddH₂O 250 μl 溶解, 配制成20mg/mL 的浓度; 往HRP 溶液中逐滴加入NaIO₄ 溶液, 边加边搅拌, 将混合好的溶液置于4℃, 静置30 分钟。取5ml 乙二醇溶于25 μl ddH₂O 中, 逐滴加入上述混合溶液中, 边加边搅拌, HRP 终浓度为

10mg/ml, 室温静置30 分钟。

[69] 调整抗GP73蛋白抗体浓度为5mg/ml 左右, 将抗GP73蛋白抗体与HRP按1:4 混合, 于50mmol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液中透析6 小时以上, 头两个小时换液一次。

[70] 用新鲜配置的1mg NaBH₄ 溶液终止反应, 摇匀, 4℃静置2 小时, 每半小时摇一次。

[71] 用pH7.2 的10mM PBS(预配置0.01mol/L 的Na₂HPO₄ 和NaH₂PO₄ 储备液, 根据需要的pH 值混匀二者成PBS 缓冲液) 透析过夜, 换液一次。

[72] 完成HRP标记的抗GP73蛋白抗体溶液用饱和硫酸铵溶液透析过夜, 然后用超滤管12000rpm离心, 得到浓缩纯化的HRP标记的抗GP73蛋白抗体。

[73] HRP标记的抗GP73蛋白抗体用含10%胎牛血清的缓冲液(20mmol/L PBS) 稀释至合适的工作浓度, 推荐稀释浓度 $\geq 1:500$, 按10ml/ 瓶分装, 贮存于4℃。

[74] 4.显色液A配制: 用磷酸-柠檬酸缓冲液(50mmol/L, PH5.0) 配制3%过氧化氢溶液, 按5ml/ 瓶分装。

[75] 5. 显色液B配制: TMB(0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按5ml/ 瓶分装。

[76] 6. 终止液配制: 2mol/L H₂SO₄, 按5ml/ 瓶分装。

[77] 7.洗液(20 倍浓缩液) : PBS(pH7.4) 配制的1%吐温20 溶液, 按50ml/ 瓶分装。

[78] 将GP73 标准品, 抗GP73蛋白抗体包被板, HRP 标记的抗GP73蛋白抗体, 显色液A, 显色液B , 终止液1 瓶, 洗液(20×浓缩)按照要求组装成GP73酶联免疫法检测试剂(96人份)。

[79] 实施案例4:

[80] GP73酶联免疫法检测试剂(96人份)的使用方法, 所述使用方法主要步骤如下:

[81] 1、清洗缓冲液配制: 将浓缩缓冲液加纯化水20 倍稀释备用。

[82] 2、准备标准品：标准品包括5 个不同浓度，分别为0、20ng/ml、40ng/ml、100ng/ml、250ng/ml。

[83] 3、抗原-抗体反应：在抗体包被板的微孔中分别加入100 μ l 样本稀释液，然后加入不同浓度的标准品或待测血清样品各10 μ l，37℃孵育30 分钟，然后用清洗缓冲液洗板4 次。

[84] 4、酶联反应：每孔加入100 μ l HRP标记的抗GP73蛋白抗体溶液，37℃孵育30 分钟，然后用清洗缓冲液洗板4 次。

[85] 5、显色反应：每孔依次加入显色液A、显色液B各50 μ l，37℃孵育10 分钟，每孔再加入50 μ l终止液结束反应。

[86] 6、比色：以空白对照孔的吸光值调零，用酶标仪在450nm 测定OD 平均值；记录各孔吸光值；计算双孔标准品OD 值的平均值。

[87] 7、结果计算：

[88] 1) 标准曲线的绘制：以标准品浓度为横坐标、标准品测定的平均OD 值为纵坐标，绘制本次测定的标准曲线；计算标准曲线回归系数R²，当R² $\geq$ 0.98 时，本次实验有效。

[89] 2) 计算待测样品浓度：根据待测样本的OD值，从标准曲线计算出GP73 浓度。

[90] 实施案例5：

[91] 免疫层析法为上转发光免疫层析法、乳胶免疫层析法、胶体金免疫层析法、发光免疫层析法、量子点免疫层析法的至少一种。

[92] GP73免疫层析法检测试剂制备：所述免疫层析法为上转发光免疫层析法、乳胶免疫层析法、胶体金免疫层析法、发光免疫层析法、量子点免疫层析法或免疫层析法相应改进方法的至少一种，不同免疫层析法之间仅标记颗粒之间存在差异，反应原理相同，经抗GP73蛋白抗体浓度优化处理后，均能达到精确定量检测鉴别脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂肪性肝炎，达到辅

助诊断和治疗脂肪性肝炎的目的。GP73免疫层析法的制备均来自成熟的免疫层析法制备技术，并对该技术进行相关优化，使之达到优异的检测结果。

[93] 为更优的解释本发明，本发明某些实施方案中所述的免疫层析法优选上转发光免疫层析法制备的检测试剂，上转发光免疫层析法制备的检测试剂的制备参照北京热景生物技术股份有限公司相关专利技术公开方法进行，所述抗体为实施案例1中所述的抗GP73蛋白抗体。

[94] GP73免疫层析法检测试剂制备：

[95] 1、包被：

[96] 将抗GP73蛋白抗体稀释到2mg/ml，作为T线包被液，将羊抗鼠IgG稀释到2mg/ml，作为C 线包被液，通过喷膜机，将T 线包被液和C 线包被液包被到硝酸纤维素膜上，晾干，即获得单克隆抗体包被膜条。

[97] 2、上转化发光颗粒（UCP）标记抗体：

[98] 称取10mg UCP 颗粒置于锥形瓶中，加入10ml pH=7.2 的0.20M PB溶液，制备成UCP 颗粒悬浊液，然后加入0.5-2mg抗GP73蛋白抗体，再加入无水戊二醛至终浓度1%，37℃搅拌过夜；12000rpm，4℃，离心15min，弃上清；UCP 沉淀物中加入10ml pH=7.2 的0.20M PB溶液，吹打混匀；12000rpm，4℃，离心15min，弃上清，收集UCP 沉淀物待用。

[99] 3、GP73免疫层析法检测试剂的冻干结合垫制备：

[100] 用50ml pH=7.2 的0.20M PB溶液将UCP 沉淀物重悬，制备成UCP 标记物悬浊液，12000rpm，4℃，离心30min，弃上清；加入45ml 的冻干液(pH = 7.2.0.20M PB, 含2% BSA, 3%蔗糖)；将UCP 标记物悬浊液按2-5cm²/ml加于玻璃纤维上，真空冻干11h；将冻干的结合垫裁剪成1cm 宽的长条，即为GP73免疫层析法检测试剂的冻干结合垫。

[101] 4、组装试纸条：

[102] 依次将硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、样品垫贴到底板上，切成

4.0mm 宽的纸条，然后装到塑料卡底壳中，盖上塑料卡上壳，压紧，加入干燥剂，密封包装。

[103] 5、样本稀释液配制：

[104] 样本稀释液成分为pH=7.2 的0.20M PB溶液，加入1% Tween20。

[105] 6、组装的GP73免疫层析法检测试剂条和样本稀释液共同组成GP73免疫层析法检测试剂，适配北京热景生物技术股份有限公司的UPT-3A系列上转发光免疫分析仪使用。

[106] 实施案例6：

[107] GP73定量检测样本的准备，所述检测样本均来自临床样本，具有明确临床诊断背景，临床诊断均为脂肪肝背景。

[108] 所述临床确诊为脂肪肝背景的样本总计200例，包括确诊为脂肪性肝炎背景的肝病进程样本（包括脂肪性肝炎引起的肝纤维化样本和肝硬化样本，不包含肝癌患者样本，以下简称脂肪型肝炎样本）的血清/血浆样本63例，单纯脂肪变的脂肪肝样本137例。

[109] 全血样本不易长期保存，不适宜建立长期队列样本进行检测分析，在本发明所述实施案例中未做分析，但依据本发明改进的适宜于全血检测GP73用于在脂肪肝人群中诊断鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的检测GP73的方法及其判定标准的标准仍视为在本发明的保护范围内。

[110] 实施案例7：

[111] 分别用GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂等三种方法的定量检测试剂检测200例临床确诊为脂肪肝背景的样本，分别对检测结果分别进行汇总分析。

[112] 1、不同方法学检测结果分析：

[113] 统计分析GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂三种试剂检测结果的绝对偏倚、相对偏倚和线

性相关性，判断不同方法学之间的偏差情况。

[114] a、绝对偏倚分析，根据“方法对比及偏差评估方法NCCLS EP9-A”相关规定的的方法和标准，计算所有样本绝对偏差：

[115] 所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果最大绝对偏差为20.08,小于200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果的平均绝对偏差的4倍，即20.22。详见图1，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果绝对偏倚图。

[116] 所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果最大偏差为20.92,小于200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果的平均绝对偏差的4倍，即20.10。详见图2，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果绝对偏倚图。

[117] 所述200例GP73酶联免疫法检测试剂检测、GP73免疫层析法检测试剂检测结果最大绝对偏差为17.43,小于GP73酶联免疫法检测试剂检测、GP73免疫层析法检测试剂检测结果的平均绝对偏差的4倍，即19.03。详见图3，200例GP73酶联免疫法检测试剂检测、GP73免疫层析法检测试剂检测结果绝对偏倚图。

[118] 依据上述分析结果，GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂三种试剂的检测结果的绝对偏差均在NCCLS EP9-A规定范围内，三种方法学之间无明显偏差。

[119] b、相对偏倚分析，根据“方法对比及偏差评估方法NCCLS EP9-A”相关规定的的方法和标准，计算所有样本相对偏差：

[120] 所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果最大相对偏差为30.89%,小于200例GP73磁微粒化学发光法检测

试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果的平均相对偏差的4倍，即32.36%。详见图4，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果相对偏倚图。

[121] 所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果最大相对偏差为33.91%，小于200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果的平均相对偏差的4倍，即33.98%。详见图5，200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果相对偏倚图。

[122] 所述200例GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果最大相对偏差为30.48%，均小于GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果的平均相对偏差的4倍，即30.55%。详见图6，200例GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果相对偏倚图。

[123] 依据上述分析结果，GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂三种试剂的检测结果的相对偏差均在NCCLS EP9-A规定范围内，三种方法学之间无明显偏差。

[124] c、线性相关性分析：

[125] 将所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果采用Graphpad Prism 4.0软件进行相关系数的计算： $R^2=0.9927$ 。详见图7，所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂检测结果线性相关性。

[126] 将所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果采用Graphpad Prism 4.0软件进行相关系数的计算： $R^2=0.9916$ 。详见图8，所述200例GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果线性相关性。

[127] 将所述200例GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂

剂检测结果采用Graphpad Prism 4.0软件进行相关系数的计算： $R^2=0.9904$ 。详见图9，所述200例GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂检测结果线性相关性。

[128] 根据绝对偏倚分析、相对偏倚分析和线性相关性分析结果，GP73用于脂肪肝样本检测分析时，GP73磁微粒化学发光法检测试剂、GP73酶联免疫法检测试剂、GP73免疫层析法检测试剂三种方法学对于脂肪肝样本的检测结果具有良好的一致性。

[129] 4、检测结果cut-off值设定及临床一致性分析：

[130] a、cut-off值设定：

[131] 以GP73磁微粒化学发光法检测试剂检测结果分析，根据200例临床背景为依据,根据ROC曲线分析，GP73在用于脂肪肝人群中鉴别诊断单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的cut-off值为82.25ng/ml.详见图10，ROC曲线分析图；图11，GP73检测结果数据分布图。

[132] b、临床一致性分析：

[133] 与已知临床背景结果（单纯性脂肪变137例，脂肪性肝炎63例）对比分析，以GP73含量为82.25ng/ml作为在脂肪肝人群中鉴别诊断单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的cut-off值，检测结果单纯性脂肪变符合率均为86.86%,脂肪性肝炎符合率均为85.71%，总符合率为86.50%，详见图12，临床一致性分析图。临床背景与检测结果不符合的偏差样本主要集中在靶值82.25ng/ml的 $\pm 20\%$ 之间。

[134] 根据本发明实施案例分析，血清学靶标志物GP73及其应用可以作为在脂肪肝人群中鉴别诊断单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的优秀血清学靶标志物，以GP73含量为82.25ng/ml作为在脂肪肝人群中鉴别诊断单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的cut-off值，特异性为86.86%，敏感性为85.71%，不同检测方法之间的检测结果一致性好。

[135] 血清学靶标志物GP73及其应用对于临床鉴别诊断脂肪肝人群中的单纯性脂肪变和脂肪性肝炎，辅助单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的治疗具有极高的临床应用价值。

[136] 上述实施案例描述了本发明的优选实施案例，如前所述，应当理解为本发明的解释，而非局限于本发明实施案例披露的形式，不应看做是对其他实施例的排除，而可以用于各种其他形式的组合、修改，并能够在本发明的构思范围内改动。本领域人员所进行的改动和变化在本发明构思及范围内的，都应在本发明所附权利要求保护范围内。

1. 一种在患有脂肪肝的受试者中鉴别单纯性脂肪变和脂肪性肝炎的方法，其包括测量来自所述受试者的待测样品中的靶标志物GP73的步骤。

2. 根据权利要求1所述的方法，其进一步包括将所述待测样品中的靶标志物GP73的含量与其标准含量比较的步骤。

5 3. 根据权利要求2所述的方法，其中当所述待测样品中的靶标志物GP73的含量小于所述标准含量时，将所述受试者鉴别为患有单纯性脂肪变；或当所述待测样品中的靶标志物GP73的含量大于所述标准含量时，将所述受试者鉴别为患有脂肪性肝炎。

10 4. 根据权利要求1-3任一项所述的方法，其中所述测量通过免疫学方法进行，且选自化学发光法、酶联免疫法和免疫层析法组成的组中的任意一种。

5. 根据权利要求4所述的方法，其中所述化学发光法为磁微粒化学发光法、电化学发光法、时间分辨化学发光法、标记增强化学发光法和酶促化学发光法中的至少一种。

15 6. 根据权利要求4所述的方法，其中所述酶联免疫法为酶联免疫吸附法、斑点免疫渗滤法、磁颗粒酶联免疫法分析、酶联免疫荧光测量法和蛋白芯片法中的至少一种。

7. 根据权利要求4所述的方法，其中所述免疫层析法为上转发光免疫层析法、乳胶免疫层析法、胶体金免疫层析法、发光免疫层析法、量子点免疫层析法中的至少一种。

20 8. 根据权利要求1-3任一项所述的方法，其中所述待测样品为脂肪肝背景人群的血液样本，优选血清或血浆样本中的一种。

9. 根据权利要求2或3所述的方法，其中所述标准含量为cutoff值82.25ng/ml。

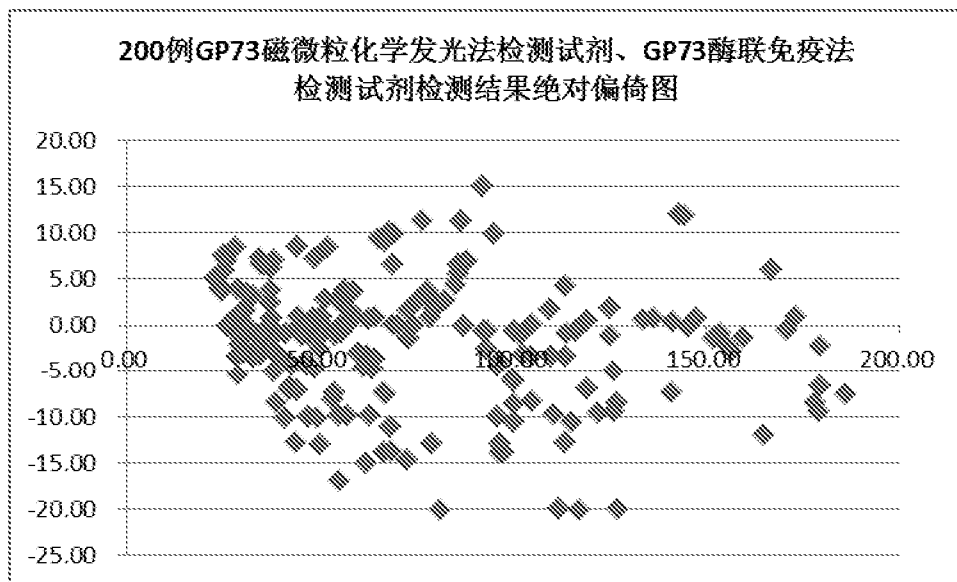


图 1

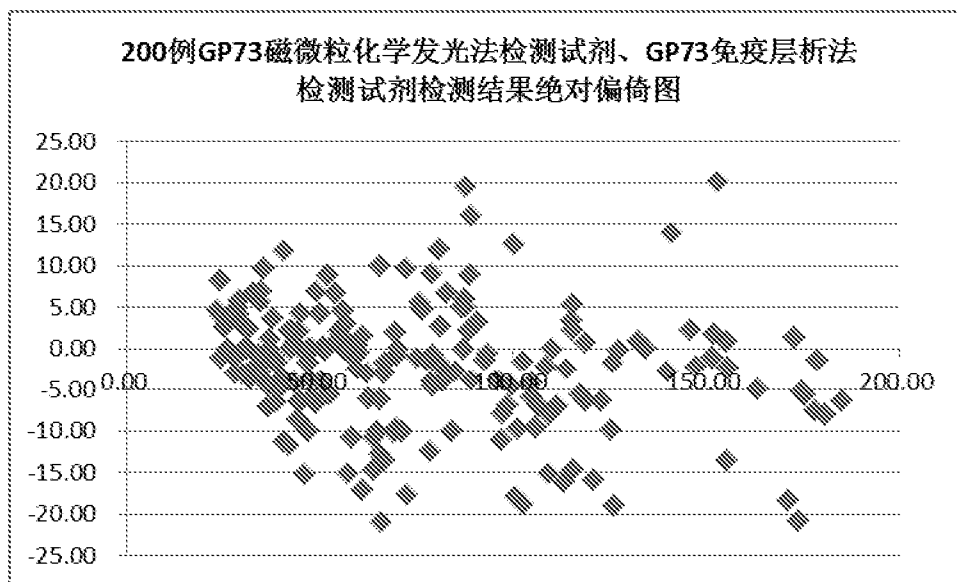


图 2

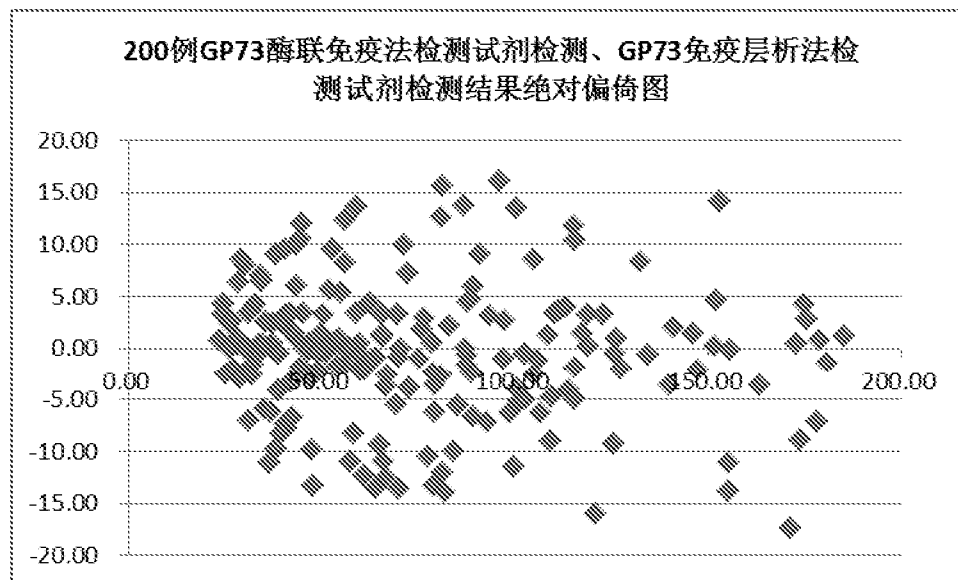


图 3

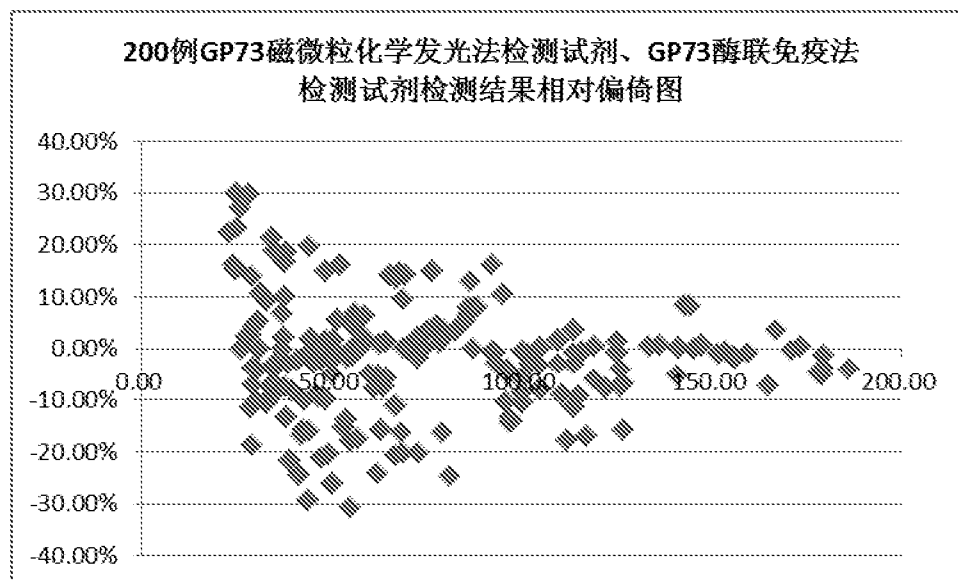


图 4

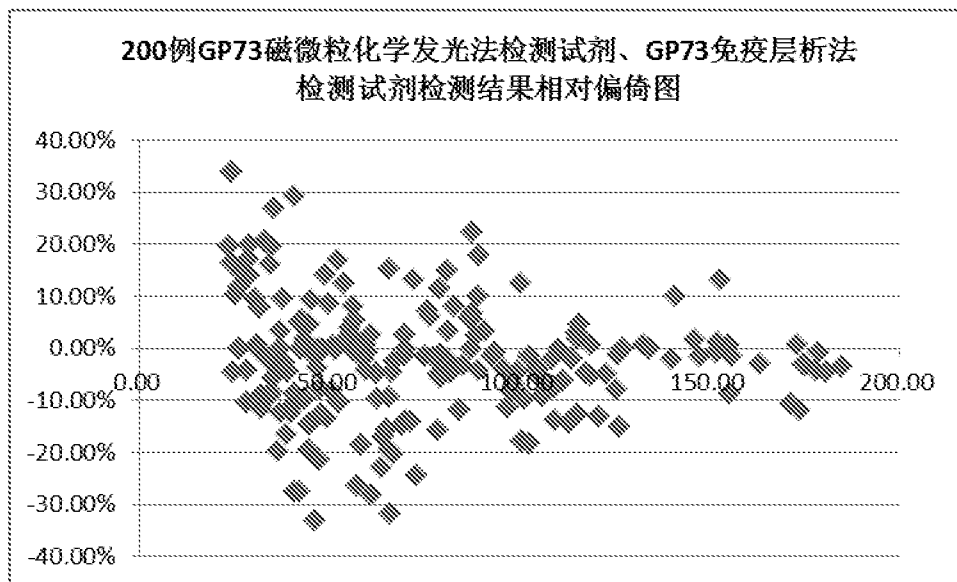


图 5

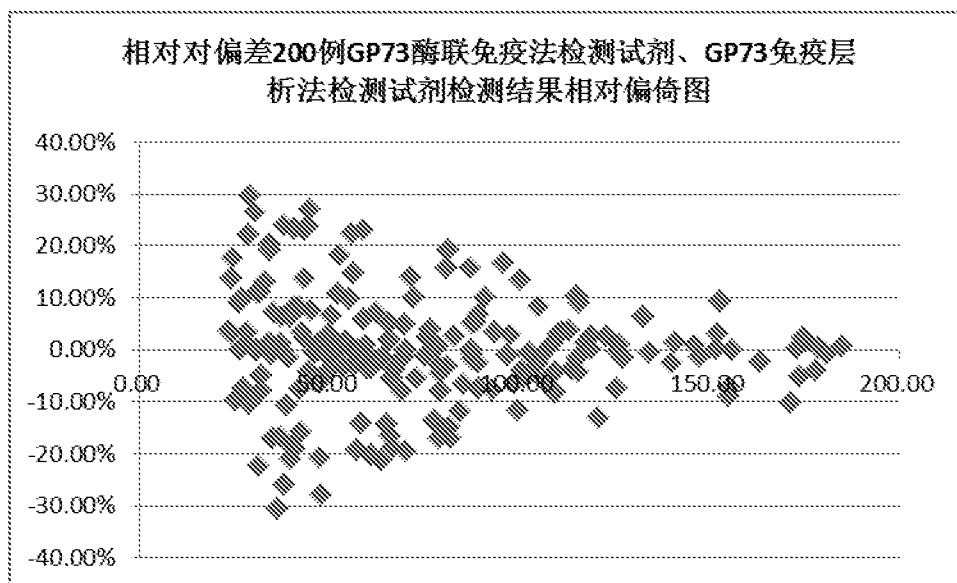


图 6

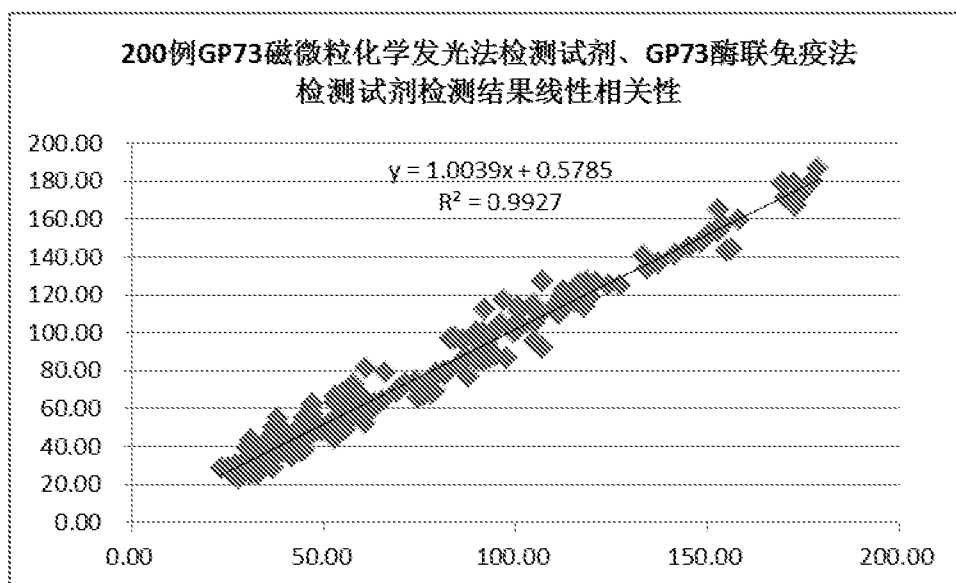


图 7

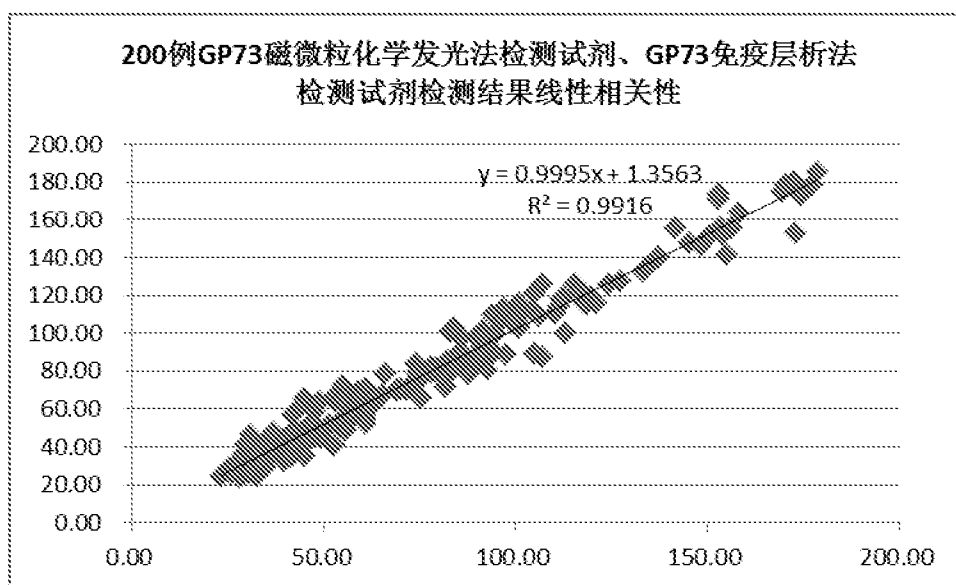


图 8

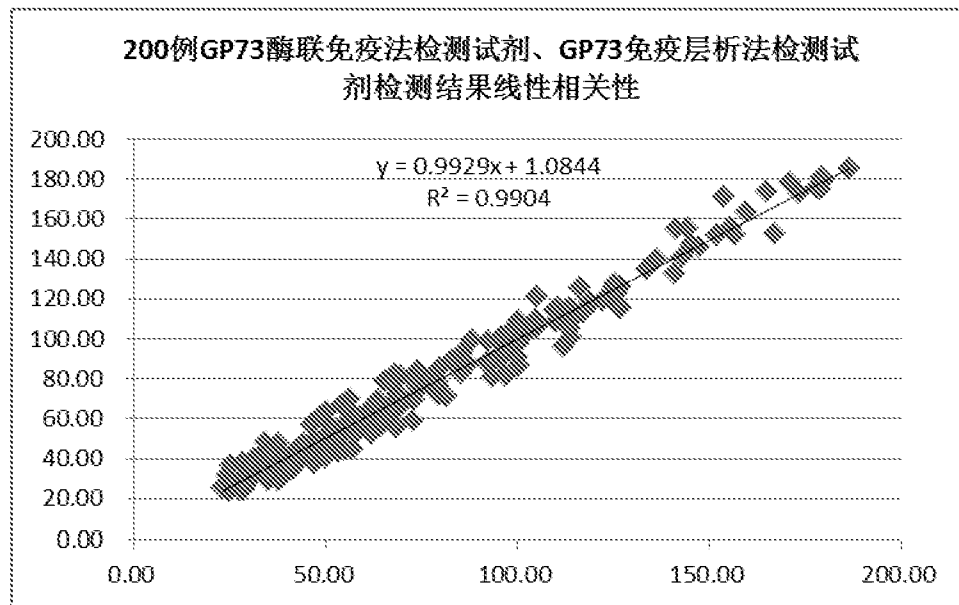


图 9

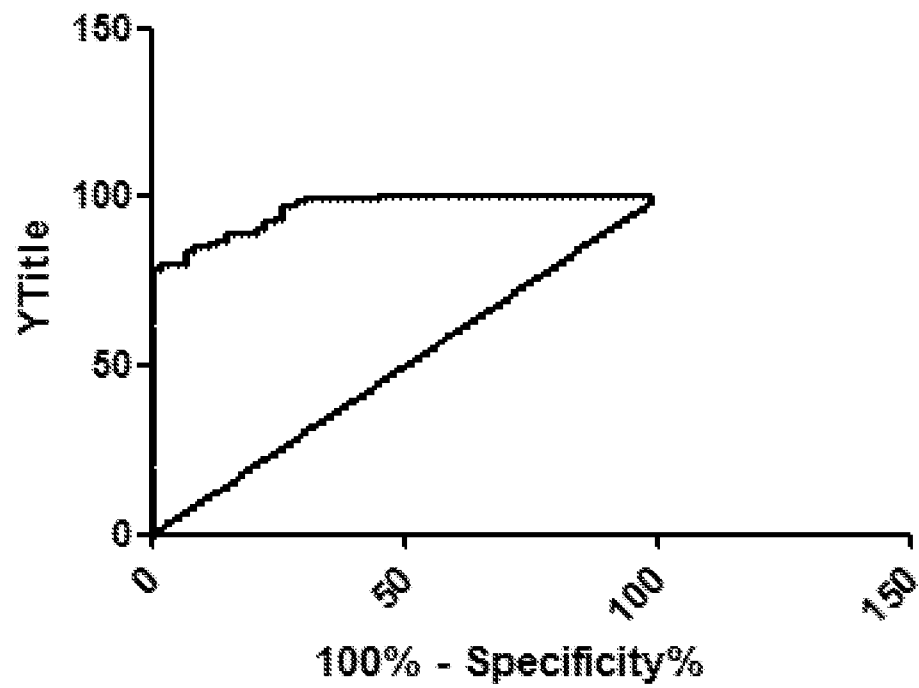


图 10

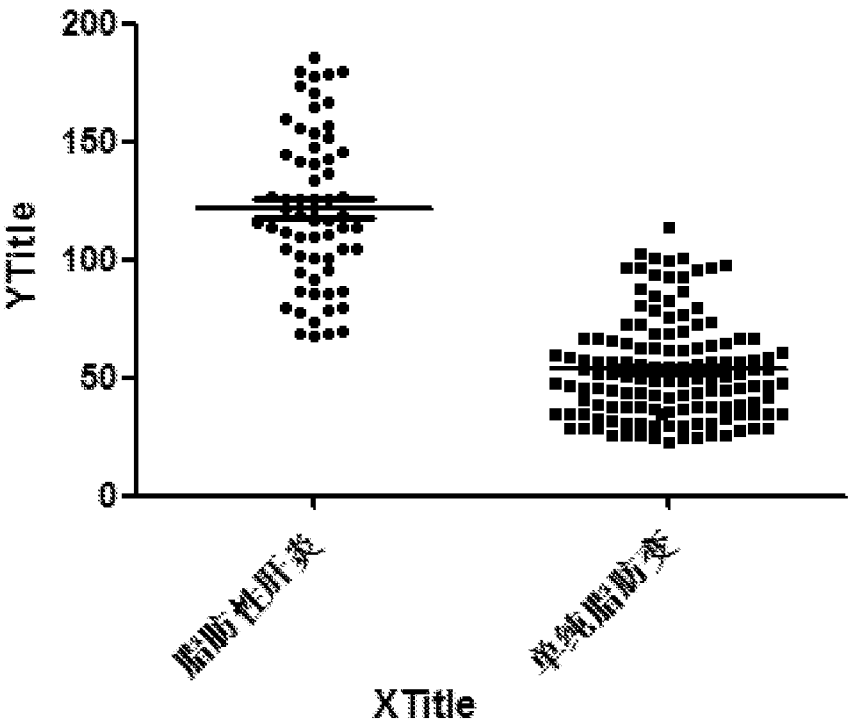


图 11

		临床背景		
		单纯性脂肪变	脂肪性肝炎	总计
热景GP73 检测结果，cut- off=82.2 5ng/ml	单纯性脂肪变	119	9	128
	脂肪性肝炎	18	54	72
	总计	137	63	200
	符合率	86.86%	85.71%	86.50%

图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/088945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/576(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNKI, 万方, Wanfang, GOOGLE, Pubmed, DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, NCBI, EBI: simple steatosis, steatohepatitis, fatty liver, GP73, Golgi apparatus 73, golph2, golgi protein 73, Golm1, BDSFIL-12, Golgi phosphoprotein 2, 高尔基体蛋白73, 高尔基体膜蛋白1, 高尔基体磷蛋白2, 高尔基体磷酸蛋白2, hepatic inflammation, 申请人/发明人		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	魏红山 等 (WEI, Hongshan et al.). "肝细胞脂肪变对血清糖蛋白GP73水平的影响 (Non-official translation: Effect of Hepatocyte Steatosis on Serum Glycoprotein GP73 Level)" <i>中华实验和临床病毒学杂志 (Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology)</i> , Vol. 27, No. (4), 31 August 2013 (2013-08-31), pages 244-246	1-9
Y	冯志刚 等 (FENG, Zhigang et al.). "GP73在酒精性肝病中的临床意义 (Diagnostic Value of GP73 in Alcoholic Liver Disease)" <i>国际检验医学杂志 (International Journal of Laboratory Medicine)</i> , Vol. 36, No. (15), 31 August 2015 (2015-08-31), pages 2214-2215 and 2217	1-9
Y	许文芳 等 (XU, Wenfang et al.). "血清GP73在肝病患者中的表达水平 (Non-official translation: Expression Level of Serum GP73 in Patients with Liver Diseases)" <i>放射免疫学杂志 (Journal of Radioimmunity)</i> , Vol. 25, No. (2), 31 December 2012 (2012-12-31), pages 190-193	1-9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
04 February 2018		13 February 2018
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/088945**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 3056905 A1 (PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION CORP.) 17 August 2016 (2016-08-17) entire document	1-9
A	CN 106290872 A (TIANJIN JINHONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 04 January 2017 (2017-01-04) entire document	1-9
A	CN 105189549 A (ABBOTT LABORATORIES) 23 December 2015 (2015-12-23) entire document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/088945

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
EP	3056905	A1	17 August 2016	AU	2012247075	B2	24 September 2015
				AU	2015275300	B2	22 June 2017
				US	7776550	B2	17 August 2010
				JP	6184935B2	B2	23 August 2017
				US	2010317127	A1	16 December 2010
				WO	2006121892	A3	22 December 2007
				HK	1228005	A0	27 October 2017
				CA	2607285	A1	16 November 2006
				US	2007037221	A1	15 February 2007
				AU	2012247075	A1	29 November 2012
				JP	2013156266	A	15 August 2013
				JP	2015092167	A	14 May 2015
				EP	1877796	A2	16 January 2008
				US	2009208926	A1	20 August 2009
				AU	2006244398	C1	12 January 2016
				JP	5964769	B2	03 August 2016
				WO	2006121892	A2	16 November 2006
				JP	2016040548	A	24 March 2016
				US	2012196277	A1	02 August 2012
				US	2016313352	A1	27 October 2016
				US	8183000	B2	22 May 2012
				AU	2006244398	B2	09 August 2012
				AU	2015275300	A1	21 January 2016
				AU	2006244398	A1	13 December 2007
				JP	2008541060	A	20 November 2008
CN	106290872	A	04 January 2017	None			
CN	105189549	A	23 December 2015	US	2014271651	A1	18 September 2014
				US	2017096477	A1	06 April 2017
				US	9469686	B2	18 October 2016
				WO	2014144355	A2	18 September 2014
				WO	2014144355	A3	29 January 2015
				EP	2970450	A2	20 January 2016
				EP	3124499	A1	01 February 2017
				JP	2016516045	A	02 June 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/088945

A. 主题的分类 G01N 33/576(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																				
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNKI, 万方, GOOGLE, Pubmed, DWPI, VEN, CNABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, NCBI, EBI:simple steatosis, steatohepatitis, fatty liver, GP73, Golgi apparatus 73, golph2, golgi protein 73, Golm1, BDSFIL-12, Golgi phosphoprotein 2, 高尔基体蛋白73, 高尔基体膜蛋白1, 高尔基体磷蛋白2, 高尔基体磷酸蛋白2, hepatic inflammation, 申请人/发明人																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>魏红山 等. "肝细胞脂肪变对血清糖蛋白GP73水平的影响" 中华实验和临床病毒学杂志, 第27卷, 第4期, 2013年 8月 31日 (2013 - 08 - 31), 第244-246页</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>冯志刚 等. "GP73在酒精性肝病中的临床意义" 国际检验医学杂志, 第36卷, 第15期, 2015年 8月 31日 (2015 - 08 - 31), 第2214-2215、2217页</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>许文芳 等. "血清GP73在肝病患者中的表达水平" 放射免疫学杂志, 第25卷, 第2期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第190-193页</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 3056905 A1 (PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION CORP.) 2016年 8月 17日 (2016 - 08 - 17) 全文</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106290872 A (天津金虹生物科技有限公司) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 全文</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	魏红山 等. "肝细胞脂肪变对血清糖蛋白GP73水平的影响" 中华实验和临床病毒学杂志, 第27卷, 第4期, 2013年 8月 31日 (2013 - 08 - 31), 第244-246页	1-9	Y	冯志刚 等. "GP73在酒精性肝病中的临床意义" 国际检验医学杂志, 第36卷, 第15期, 2015年 8月 31日 (2015 - 08 - 31), 第2214-2215、2217页	1-9	Y	许文芳 等. "血清GP73在肝病患者中的表达水平" 放射免疫学杂志, 第25卷, 第2期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第190-193页	1-9	A	EP 3056905 A1 (PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION CORP.) 2016年 8月 17日 (2016 - 08 - 17) 全文	1-9	A	CN 106290872 A (天津金虹生物科技有限公司) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 全文	1-9
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
Y	魏红山 等. "肝细胞脂肪变对血清糖蛋白GP73水平的影响" 中华实验和临床病毒学杂志, 第27卷, 第4期, 2013年 8月 31日 (2013 - 08 - 31), 第244-246页	1-9																		
Y	冯志刚 等. "GP73在酒精性肝病中的临床意义" 国际检验医学杂志, 第36卷, 第15期, 2015年 8月 31日 (2015 - 08 - 31), 第2214-2215、2217页	1-9																		
Y	许文芳 等. "血清GP73在肝病患者中的表达水平" 放射免疫学杂志, 第25卷, 第2期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第190-193页	1-9																		
A	EP 3056905 A1 (PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION CORP.) 2016年 8月 17日 (2016 - 08 - 17) 全文	1-9																		
A	CN 106290872 A (天津金虹生物科技有限公司) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 全文	1-9																		
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																				
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																		
2018年 2月 4日		2018年 2月 13日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员																		
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		张颖 电话号码 (86-10)53961952																		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/088945

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105189549 A (雅培制药有限公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 全文	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/088945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
EP	3056905	A1	2016年 8月 17日	AU	2012247075	B2	2015年 9月 24日
				AU	2015275300	B2	2017年 6月 22日
				US	7776550	B2	2010年 8月 17日
				JP	6184935B2	B2	2017年 8月 23日
				US	2010317127	A1	2010年 12月 16日
				WO	2006121892	A3	2007年 12月 22日
				HK	1228005	A0	2017年 10月 27日
				CA	2607285	A1	2006年 11月 16日
				US	2007037221	A1	2007年 2月 15日
				AU	2012247075	A1	2012年 11月 29日
				JP	2013156266	A	2013年 8月 15日
				JP	2015092167	A	2015年 5月 14日
				EP	1877796	A2	2008年 1月 16日
				US	2009208926	A1	2009年 8月 20日
				AU	2006244398	C1	2016年 1月 12日
				JP	5964769	B2	2016年 8月 3日
				WO	2006121892	A2	2006年 11月 16日
				JP	2016040548	A	2016年 3月 24日
				US	2012196277	A1	2012年 8月 2日
				US	2016313352	A1	2016年 10月 27日
				US	8183000	B2	2012年 5月 22日
				AU	2006244398	B2	2012年 8月 9日
				AU	2015275300	A1	2016年 1月 21日
				AU	2006244398	A1	2007年 12月 13日
				JP	2008541060	A	2008年 11月 20日
CN	106290872	A	2017年 1月 4日	无			
CN	105189549	A	2015年 12月 23日	US	2014271651	A1	2014年 9月 18日
				US	2017096477	A1	2017年 4月 6日
				US	9469686	B2	2016年 10月 18日
				WO	2014144355	A2	2014年 9月 18日
				WO	2014144355	A3	2015年 1月 29日
				EP	2970450	A2	2016年 1月 20日
				EP	3124499	A1	2017年 2月 1日
				JP	2016516045	A	2016年 6月 2日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)