



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202307004 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 02 月 16 日

(21) 申請案號：111118554 (22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 18 日

(51) Int. Cl. : C07K16/30 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
 C12N15/13 (2006.01) C12N15/63 (2006.01)
 C12N15/64 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2021/05/21 世界智慧財產權組織 PCT/CN2021/095113
 2022/04/21 世界智慧財產權組織 PCT/CN2022/088175

(71) 申請人：英屬開曼群島商百濟神州有限公司 (開曼群島) BEIGENE, LTD. (KY)
 開曼群島

(72) 發明人：曲亮 QU, LIANG (CN)；李卓 LI, ZHUO (CN)；薛柳 XUE, LIU (CN)；劉琦 LIU, QI (CN)；朱琳 ZHU, LIN (CN)；王鵬皓 WANG, PENGHAO (CN)；孫漢資 SUN, HANZI (CN)；唐曉燕 TANG, XIAOYAN (CN)

(74) 代理人：葉璟宗；卓俊傑

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：12 共 113 頁

(54) 名稱

抗 C E A 抗體及使用方法

(57) 摘要

本揭露提供了結合人 CEA 的抗體及其抗原結合片段、包含所述抗體的藥物組成物，以及抗 CEA 抗體或該組成物用於治療疾病諸如癌症之用途。

The present disclosure provides for antibodies and antigen-binding fragments thereof that bind to human CEA, a pharmaceutical composition comprising said antibody, and use of the anti-CEA antibody or the composition for treating a disease, such as cancer.

【發明摘要】

【中文發明名稱】抗CEA抗體及使用方法

【英文發明名稱】 ANTI-CEA ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【中文】本揭露提供了結合人CEA的抗體及其抗原結合片段、包含所述抗體的藥物組成物，以及抗CEA抗體或該組成物用於治療疾病諸如癌症之用途。

【英文】 The present disclosure provides for antibodies and antigen-binding fragments thereof that bind to human CEA, a pharmaceutical composition comprising said antibody, and use of the anti-CEA antibody or the composition for treating a disease, such as cancer.

【指定代表圖】 無。

【代表圖之符號簡單說明】
無。

【特徵化學式】
無。

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗CEA抗體及使用方法

【英文發明名稱】 ANTI-CEA ANTIBODIES AND METHODS OF USE

【技術領域】

【0001】 本文揭露了結合人 CEA 的抗體或其抗原結合片段以及用於治療癌症之方法。

【先前技術】

【0002】 癌胚抗原（CEA，也稱為 CEACAM5 或 CD66e）係一種糖蛋白，其分子量為約 70-100 kDa，具體取決於所存在的糖基化的量。Gold 等人, J. Exp. Med. [實驗醫學雜誌], 121, 439 (1965) 首先報導了與人腺癌中的癌症特異性抗原相關的 CEA 之存在。CEA 通常在多種腺上皮組織（諸如胃腸道、呼吸道和泌尿生殖道）中表現，在該等腺上皮組織中它似乎位於細胞的頂端表面（Hammarstrom, S. Semin. Cancer Biol. [癌症生物學研討會] 9, 67-81 (1999)）。例如，發現它存在於結腸的柱狀上皮細胞和杯狀細胞中（Fraengsmyr 等人, Tumor Biol. [腫瘤生物學] 20:277-292(1999)）。在由該等組織類型產生的腫瘤中，CEA 表現從頂端膜到細胞表面增加，並且一旦從細胞表面除去，就會進入血流（Hammarstrom, S. Semin. Cancer Biol. [癌症生物學研討會] 9, 67-81；(1999)，還參見 Fraengsmyr 等人, Tumor Biol. [腫瘤生物學] 20:277-292(1999)）。在許多類型的癌症中觀察到 CEA 過表現，該等癌症包括結腸直腸癌、

胰臟癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、乳癌和甲狀腺癌。因此，在癌症的預後和治療中，CEA 已經用作診斷性腫瘤標誌物以確定癌症患者血液中的 CEA 水平升高 (Chevinsky, A. H. (1991) *Semin. Surg. Oncol.* [外科腫瘤學研討會] 7, 162-166 ; Shively, J. E.等人, (1985) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* [腫瘤學/血液學評論] 2, 355-399)。

【0003】 CEA 已被認為是用於靶向治療的有用的腫瘤相關抗原 (Kuroki M 等人, (2002) *Anticancer Res* [抗癌研究] 22:4255-64)。一種方法係產生展示抗 CEA scFv 的反轉錄病毒構建體，並將一氧化氮合酶 (iNOS) 基因遞送至表現 CEA 的癌細胞。(Kuroki M. 等人, (2000) *Anticancer Res.* [抗癌研究] 20(6A): 4067-71)。另一種方法係將放射性同位素與抗 CEA 抗體連接，並證明放射特異性針對表現 CEA 的腫瘤 (Wilkinson 等人, *PNAS USA* [美國國家科學院院刊] 98, 10256-60 (2001); Goldenberg 等人, *Am. J. Gastroenterol.* [美國胃腸病學雜誌], 86: 1392-1403 (1991); Olafsen T.等人, *Protein Engineering, Design & Selection* [蛋白質工程設計與選擇], 17, 21-27, (2004); Meyer 等人, *Clin. Cancer Res.* [臨床癌症研究] 15:4484-4492 (2009); Sharkey 等人, *J. Nucl. Med.* [核醫學雜誌] 46:620-633 (2005))。放射性同位素方法已擴展到抗 CEA 抗體藥物軛合物 (ADC)。例如，Shinmi 等人報導了一種與單甲基澳瑞他汀 E (MMAE) 軛合的抗 CEA 抗體 (Shinmi 等人, *Cancer Med.* [癌症醫學] 6(4): 798-808 (2017))。

【0004】 然而，抗 CEA 抗體的問題之一係交叉反應性。CEA 與其他 CEACAM 家族成員高度同源，例如，人 CEA 與 CEACAM6 顯示出 84% 同源性，與 CECAM8 顯示出 77% 同源性，與 CEACAM1

顯示出 73% 同一性。本揭露提供了對 CEA 特異的抗 CEA 抗體。

【發明內容】

【0005】 本揭露關於抗 CEA 抗體及其抗原結合片段。本揭露涵蓋以下實施方式。

【0006】 一種抗 CEA 抗體或其抗原結合片段，其包含在 SEQ ID NO: 52 的胺基酸 596 至 674 處特異性結合人 CEA 的抗體或其結合片段。

【0007】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段不結合其他 CEACAM 家族成員。

【0008】 如請求項 1 所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其包含：

(i) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 7 的 HCDR1 (重鏈互補決定區 1)、(b) SEQ ID NO: 8 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 9 的 HCDR3，以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 10 的 LCDR1 (輕鏈互補決定區 1)、(e) SEQ ID NO: 11 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 6 的 LCDR3；

(ii) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 24 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 25 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 26 的 HCDR3；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 27 的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 28 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 23 的 LCDR3；或

(iii) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 41 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 42 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 43 的 HCDR3；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 44

的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 45 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 40 的 LCDR3。

【0009】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其包含：

(i) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 14 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列，以及輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 15 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列；

(ii) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 31 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列，以及輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 32 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列；或

(iii) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 48 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列，以及輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 49 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列。

【0010】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中 SEQ ID NO: 14、15、31、32、48 或 49 中已插入、缺失或取代一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個胺基酸。

【0011】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其包含：

(i) 包含 SEQ ID NO: 14 的重鏈可變區 (VH) 和包含 SEQ ID NO: 15 的輕鏈可變區 (VL)；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 31 的重鏈可變區 (VH) 和包含 SEQ ID NO: 32 的輕鏈可變區 (VL); 或

(iii) 包含 SEQ ID NO: 48 的重鏈可變區 (VH) 和包含 SEQ ID NO: 49 的輕鏈可變區 (VL)。

【0012】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其為單株抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人工程化抗體、單鏈抗體 (scFv)、Fab 片段、Fab'片段或 F(ab')₂ 片段。

【0013】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 或補體依賴性細胞毒性 (CDC)。

【0014】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有降低的糖基化或無糖基化或係低岩藻糖基化的。

【0015】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含增加的二等分 GlcNac 結構。

【0016】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該 Fc 結構域係 IgG1。

【0017】 該抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體軛合到毒素。

【0018】 一種包含該抗 CEA 抗體或抗原結合片段的藥物組成物，其進一步包含藥學上可接受的載劑。

【0019】 一種治療癌症之方法，其包括向有需要的患者投與有效量的該抗體或抗原結合片段。

【0020】 該方法，其中該癌症係胃癌、結腸癌、胰臟癌、乳癌、頭頸癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、皮膚癌、間皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和肉瘤。

【0021】 該方法，其中該抗體或抗原結合片段與另一種治療劑組合投與。

【0022】 該方法，其中該治療劑係紫杉醇或紫杉醇藥劑、多西他賽、卡鉑、托泊替康、順鉑、伊立替康、多柔比星、來那度胺或 5-氮雜胞苷。

【0023】 該方法，其中該治療劑係抗 PD1 或抗 PDL1 抗體。

【0024】 一種分離的核酸，其編碼該抗 CEA 抗體或抗原結合片段。

【0025】 一種載體，其包含該核酸。

【0026】 一種宿主細胞，其包含該核酸或載體。

【0027】 一種用於生產抗 CEA 抗體或其抗原結合片段之方法，其包括培養宿主細胞以及從培養物中回收該抗體或抗原結合片段。

【0028】 在一個實施方式中，該抗 CEA 抗體或其抗原結合片段包含一或多個互補決定區（CDR），該一或多個互補決定區包含選自由以下組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45 或 SEQ ID NO:40。

【0029】 在另一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：(a) 包含一或多個互補決定區（HCDR）的重鏈可變區，該一或多個互補決定區包含選自由以下組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42 或 SEQ ID NO:43；和/或 (b) 包含一或多個互補決定區（LCDR）的輕鏈可

變區，該一或多個互補決定區具有選自由以下組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 40。

【0030】 在另一個實施方式中，該抗體或其抗原結合片段包含：(a) 包含三個互補決定區（HCDR）的重鏈可變區，這三個互補決定區係包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 24 或 SEQ ID NO: 41 的胺基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 25 或 SEQ ID NO: 42 的胺基酸序列的 HCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 43 的胺基酸序列的 HCDR3，和/或 (b) 包含三個互補決定區（LCDR）的輕鏈可變區，這三個互補決定區係包含 SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 44 的胺基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 28 或 SEQ ID NO: 45 的胺基酸序列的 LCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 40 的胺基酸序列的 LCDR3。

【0031】 在另一個實施方式中，該抗 CEA 抗體或其抗原結合片段包含：(a) 包含三個互補決定區（HCDR）的重鏈可變區，這三個互補決定區係包含 SEQ ID NO: 7 的胺基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 8 的胺基酸序列的 HCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 9 的胺基酸序列的 HCDR3；或包含 SEQ ID NO: 24 的胺基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 25 的胺基酸序列的 HCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 26 的胺基酸序列的 HCDR3；或包含 SEQ ID NO: 41 的胺基酸序列的 HCDR1，包含 SEQ ID NO: 42 的胺基酸序列的 HCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 43 的胺基酸序列的 HCDR3；和/或

(b) 包含三個互補決定區 (LCDR) 的輕鏈可變區，這三個互補決定區係包含 SEQ ID NO: 10 的胺基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 11 的胺基酸序列的 LCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 6 的胺基酸序列的 LCDR3；或包含 SEQ ID NO: 27 的胺基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 28 的胺基酸序列的 LCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 23 的胺基酸序列的 LCDR3；或包含 SEQ ID NO: 44 的胺基酸序列的 LCDR1，包含 SEQ ID NO: 45 的胺基酸序列的 LCDR2，以及包含 SEQ ID NO: 40 的胺基酸序列的 LCDR3。

【0032】 在另一個實施方式中，該抗 CEA 抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 7 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 8 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 9 的 HCDR3，以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 10 的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 11 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 6 的 LCDR3。

【0033】 在另一個實施方式中，抗 CEA 抗體或其抗原結合片段包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 24 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 25 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 26 的 HCDR3；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 27 的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 28 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 23 的 LCDR3。

【0034】 在又一個實施方式中，該抗 CEA 抗體或抗原結合片段包含：重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 41 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 42 的 HCDR2 和 (c) SEQ ID NO: 43 的 HCDR3；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 44 的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 45 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 40 的

LCDR3。

【0035】 在一個實施方式中，本揭露的抗體或其抗原結合片段包含：(a) 重鏈可變區，該重鏈可變區具有 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 48 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 48 中的任一個至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列；和/或 (b) 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 49 的胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 49 中的任一個至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列。

【0036】 在另一個實施方式中，本揭露的抗 CEA 抗體或其抗原結合片段包含：(a) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 48 的胺基酸序列或在 SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 48 的胺基酸序列中包含一個、兩個或三個胺基酸取代的胺基酸序列，和/或 (b) 輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 49 的胺基酸序列或在 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 49 的胺基酸序列中包含一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代的胺基酸序列。在另一個實施方式中，該等胺基酸取代係保守胺基酸取代。

【0037】 在一個實施方式中，本揭露的抗體係 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同種型。在更特定的實施方式中，本揭露的抗體包含野生型人 IgG1（也稱為人 IgG1wt 或 huIgG1）或 IgG2 的 Fc 結構域。在另一個實施方式中，本揭露的抗體包含具有 S228P 和/或 R409K 取代（根據 EU 編號系統）的人 IgG4 的 Fc 結構域。

【0038】 在一個實施方式中，本揭露的抗 CEA 抗體以 1×10^{-6} M 至 1×10^{-10} M 的結合親和力 (K_D) 結合 CEA。在另一個實施方式中，本揭露的抗體以約 1×10^{-6} M、約 1×10^{-7} M、約 1×10^{-8} M、約 1×10^{-9} M 或約 1×10^{-10} M 的結合親和力 (K_D) 結合 CEA。

【0039】 在另一個實施方式中，本揭露的抗人 CEA 抗體顯示對石蟹獼猴 CEA 的跨物種結合活性。

【0040】 在一個實施方式中，本揭露的抗體具有強的 Fc 介導的效應子功能。抗體介導對表現 CEA 的靶細胞的抗體依賴性細胞毒性 (ADCC)。

【0041】 本揭露關於分離的核酸，該等分離的核酸包含編碼抗 CEA 抗體或抗原結合片段的胺基酸序列的核苷酸序列。在一個實施方式中，分離的核酸包含 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 50 的 VH 核苷酸序列或與 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 50 具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列，並且編碼本揭露的抗體或抗原結合片段的 VH 區。替代性地或另外地，分離的核酸包含 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 34、或 SEQ ID NO: 51 的 VL 核苷酸序列或與 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 34、或 SEQ ID NO: 51 具有至少 95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的核苷酸序列，並且編碼本揭露的抗體或抗原結合片段的 VL 區。

【0042】 在另一方面，本揭露關於包含抗 CEA 抗體或其抗原結合片段和視需要藥學上可接受的賦形劑的藥物組成物。

【0043】 在又一方面，本揭露關於治療受試者的疾病之方法，該方法包括向有需要的受試者投與治療有效量的抗 CEA 抗體或其抗原

結合片段或抗 CEA 抗體藥物組成物。在另一個實施方式中，待由該抗體或抗原結合片段治療的疾病係癌症。

【0044】 本揭露關於抗 CEA 抗體或其抗原結合片段或抗 CEA 抗體藥物組成物用於治療疾病諸如癌症之用途。

【圖式簡單說明】

【0045】 [圖 1]示出了脫落 CEA (sCEA)、嵌合 CEA (CHIM)、CEACAM6 和 CEA 變體 (CEA-v) 之示意圖。在 CEA 中，標記了 N 結構域、A1、B1、A2、B2、A3、B3 和 GPI 連接子 (GPI)；在 CEACAM6 中，標記了結構域 N'、A'和 B'。

【0046】 [圖 2A-圖 2B]描繪了抗 CEA 結構域 B3 抗體 VH (圖 2A) 和 VL (圖 2B) 區之系統發生樹。使用 DNASTAR 的 Megalign™ 軟體對候選抗 CEA 抗體的 VH 和 VL 序列進行比對。序列同源性在系統發生樹中顯示。

【0047】 [圖 3A]示出了藉由表面電漿共振 (SPR) 對嵌合構建體 (CHIM) 上的純化的鼠抗 CEA 抗體 BGA13 之親和力測定。圖 3B 描繪了藉由抗原 ELISA 分析的 BGA13 之結合概況。

【0048】 [圖 4A-圖 4B]示出了可溶性 CEA (sCEA) 對 CEA 抗體與 MKN45 細胞的結合之影響。圖 4A 示出了在可溶性 CEA (sCEA) 存在或不存在下結構域 B3 抗體之結合概況；圖 4B 係圖 4A 的抗體結合概況，示出為直方圖。

【0049】 [圖 5A-圖 5B]示出了產生用於人源化 BGA13 抗體輕鏈 CDR (LCDR) 區 (圖 5A) 和重鏈 CDR (HCDR) 區 (圖 5B) 的親和力成熟的抗體文庫之隨機化位點。

【0050】 [圖 6]示出了四輪選擇後 BGA13 輕鏈 CDR 區的胺基酸改變。

【0051】 [圖 7]示出了藉由流式細胞術測定的親和力成熟的人源化 BGA13 變體與 LOVO 細胞的結合。

【0052】 [圖 8]係藉由流式細胞術測定的優化的人源化 BGA113 變體與 MKN45 細胞的結合。

【0053】 [圖 9A 和圖 9B]表明藉由流式細胞術 (圖 9A) 和抗原 ELISA (圖 9B) 所發現，抗體 BGA113K 與各種 CEACAM 家族成員沒有脫靶結合。

【0054】 [圖 10]示出了在各種濃度的可溶性 CEA 存在下，可溶性 CEA 對 BGA113K 與 CEA 表現細胞 MKN45 細胞結合之影響。

【0055】 [圖 11]表明抗體 BGA113 在體外藉由 ADCC 殺傷細胞。

【0056】 [圖 12]描繪了當用 BGA113 抗體治療時鼠癌症模型的腫瘤體積減小。

【實施方式】

定義

【0057】 除非在本文件的其他地方具體定義，否則本文所用的所有其他技術和科學術語具有本領域的普通技術者通常理解的含義。

【0058】 如本文所用，包括所附申請專利範圍，除非上下文另外明確說明，否則如「一個」、「一種」和「該」的單數形式包括它們相應的複數指代。

【0059】 除非上下文另外明確說明，否則術語「或」意指術語「和

/或」並且可與術語「和/或」互換使用。

【0060】 如本文所用的術語「抗癌劑」係指可用於治療細胞增殖性障礙（如癌症）的任何藥劑，包括但不限於細胞毒性劑、化療劑、放射療法 and 放射治療劑、靶向性抗癌劑、和免疫治療劑。

【0061】 術語「癌胚抗原」或「CEA」係指大約 70-100 kDa 的糖蛋白。CEA 也稱為 CEACAM5 或 CD66e。人 CEA 的胺基酸序列（SEQ ID NO: 52）也可在登錄號 P06731 或 NM_004363.2 中找到。

【0062】 如本文所用的術語「投與（administration/administering）」和「治療（treating/treatment）」，當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，意指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組成物與該動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體接觸。細胞的處理涵蓋試劑與細胞的接觸以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。術語「投與」和「治療」還意指藉由試劑、診斷劑、結合化合物或另一種細胞進行的例如細胞的體外和離體處理。本文中的術語「受試者」包括任何生物，較佳的是動物，更較佳的是哺乳動物（例如，大鼠、小鼠、狗、貓、兔），最較佳的是人。在一方面，治療任何疾病或障礙係指改善該疾病或障礙（即，減緩或阻止或減少疾病或其至少一種臨床症狀的發展）。在另一方面，「治療（treat/treating/treatment）」係指緩解或改善至少一個身體參數，包括患者可能無法辨別的那些。在又另一方面，「治療（treat/treating/treatment）」係指在身體上（例如，可辨別症狀的穩定化）、在生理上（例如，身體參數的穩定化）或兩者上調節疾病或障礙。在又另一方面，「治療（treat/treating/treatment）」係指預防或延遲疾病或障礙的發作或發展或進展。

【0063】 在本揭露的上下文中，術語「受試者」係哺乳動物，例如，靈長類動物，較佳的是高等靈長類動物，例如人（例如，患有本文所述之障礙或處於患上本文所述之障礙的風險中的患者）。

【0064】 如本文所用的術語「親和力」係指抗體與抗原之間相互作用的強度。在抗原內，抗體的可變區通過非共價力與抗原在許多位點相互作用。通常，相互作用越多，親和力越強。

【0065】 如本文所用的術語「抗體」係指免疫球蛋白家族的多肽，其可以非共價地、可逆地和以特異性方式結合相應的抗原。例如，天然存在的 IgG 抗體係包含藉由二硫鍵相互連接的至少兩條重（H）鏈和兩條輕（L）鏈的四聚體。每條重鏈由重鏈可變區（本文縮寫為 VH）和重鏈恒定區構成。重鏈恒定區由三個結構域 CH1、CH2 和 CH3 構成。每條輕鏈由輕鏈可變區（本文縮寫為 VL 或 Vκ）和輕鏈恒定區構成。輕鏈恒定區由一個結構域 CL 構成。VH 和 VL 區可以進一步細分為高變區，稱為互補決定區（CDR），其間插有更保守的區域，稱為框架區（FR）。每個 VH 和 VL 由從胺基末端到羧基末端按以下順序排列的三個 CDR 和四個框架區（FR）構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重鏈和輕鏈的可變區含有與抗原相互作用的結合結構域。抗體的恒定區可以介導免疫球蛋白與宿主組織或因子（包括免疫系統的各种細胞（例如，效應細胞）以及經典補體系統的第一組分（C1q））的結合。

【0066】 術語「抗體」包括但不限於單株抗體、人抗體、人源化抗體、嵌合抗體和抗獨特型（抗 Id）抗體。抗體可為任何同種型/類別（例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY）或亞類（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）。

【0067】 在一些實施方式中，抗 CEA 抗體包含至少一個抗原結合位點，至少一個可變區。在一些實施方式中，抗 CEA 抗體包含來自本文所述 CEA 抗體的抗原結合片段。在一些實施方式中，抗 CEA 抗體係分離的或重組的。

【0068】 本文中的術語「單株抗體」或「mAb」或「Mab」係指基本上同質的抗體的群體，即，除了可能少量存在的可能天然發生的突變外，該群體中包含的抗體分子在胺基酸序列上係相同的。相比之下，常規（多株）抗體製劑典型地包括在其可變結構域中具有不同胺基酸序列的多種不同抗體，特別地其互補決定區（CDR），它們通常對不同的表位具有特異性。修飾語「單株」指示獲得自基本上均質的抗體群體的抗體的特徵並且不應理解為要求藉由任何特定方法產生抗體。可以藉由熟悉該項技術者已知的方法獲得單株抗體（mAb）。參見，例如 Kohler 等人，Nature [自然] 1975 256:495-497；美國專利案號 4,376,110；Ausubel 等人，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY [分子生物學現代方法] 1992；Harlow 等人，ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL [抗體：實驗室手冊]，Cold spring Harbor Laboratory [冷泉港實驗室] 1988；以及 Colligan 等人，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY [當代免疫學方案] 1993。本文揭露的抗體可為任何免疫球蛋白類別（包括 IgG、IgM、IgD、IgE、IgA），及其任何亞類（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）。產生單株抗體的融合瘤可以在體外或在體內培養。高效價的單株抗體可以在體內產生中獲得，其中將來自單個融合瘤的細胞腹膜內注射到小鼠中，例如原始引發的 Balb/c 小鼠，以產生含有高濃度所需抗體的腹水。可以使

用熟悉該項技術者熟知的柱層析方法從這樣的腹水，或從培養上清液中純化同種型 IgM 或 IgG 的單株抗體。

【0069】 通常，基本抗體結構單元包含四聚體。每個四聚體包括兩對相同的多肽鏈，每對具有一條「輕鏈」(約 25 kDa) 和一條「重鏈」(約 50-70 kDa)。每條鏈的胺基末端部分包括主要負責抗原識別的約 100 至 110 或更多個胺基酸的可變區。重鏈的羧基末端部分可以定義為主要負責效應子功能的恒定區。典型地，人輕鏈被分類為 κ 和 λ 輕鏈。此外，人重鏈典型地分類為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ ，並且分別將抗體的同種型定義為 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。在輕鏈和重鏈內，可變區和恒定區藉由約 12 個或更多個胺基酸的「J」區連接，重鏈還包括約 10 個以上胺基酸的「D」區。

【0070】 每個輕鏈/重鏈 (VL/VH) 對的可變區形成抗體結合位點。因此，一般而言，完整抗體具有兩個結合位點。除了在雙功能或雙特異性抗體中，兩個結合位點通常在一級序列中係相同的。

【0071】 典型地，重鏈和輕鏈的可變結構域包含三個高變區，也稱為「互補決定區 (CDR)」，其位於相對保守的框架區 (FR) 之間。CDR 通常由框架區對齊，使得能夠結合特異性表位。一般而言，從 N-末端到 C-末端，輕鏈和重鏈可變結構域兩者都包含 FR-1 (或 FR1)、CDR-1 (或 CDR1)、FR-2 (FR2)、CDR-2 (CDR2)、FR-3 (或 FR3)、CDR-3 (CDR3) 和 FR-4 (或 FR4)。CDR 和框架區的位置可以使用本領域熟知的多種定義確定，例如 Kabat、Chothia、AbM 和 IMGT (參見，例如 Johnson 等人, *Nucleic Acids Res.* [核酸研究], 29:205-206 (2001); Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌], 196:901-917 (1987); Chothia 等人, *Nature* [自然], 342:877-

883 (1989) ; Chothia 等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌], 227:799-817 (1992) ; Al-Lazikani 等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌], 273:927-748 (1997))、ImMunoGenTics (IMGT) 編號 (Lefranc, M.-P., *The Immunologist* [免疫學者], 7, 132-136 (1999) ; Lefranc, M.-P. 等人, *Dev. Comp.Immunol.* [發育與比較免疫學], 27, 55-77 (2003) (「IMGT」編號方案))。抗原結合位點的定義還在以下文獻中描述 : Ruiz 等人, *Nucleic Acids Res.* [核酸研究], 28:219-221 (2000) ; 和 Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.* [核酸研究], 29:207-209 (2001) ; MacCallum 等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌], 262:732-745 (1996) ; 和 Martin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美國國家科學院院刊], 86:9268-9272 (1989) ; Martin 等人, *Methods Enzymol.* [酶學方法], 203:121-153 (1991) ; 和 Rees 等人, 在 Sternberg M. J. E. (編) , *Protein Structure Prediction* [蛋白質結構預測], Oxford University Press [牛津大學出版社], 牛津, 141-172 (1996)中。例如, 根據 Kabat, 重鏈可變結構域 (VH) 中的 CDR 胺基酸殘基編號為 31-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) ; 並且輕鏈可變結構域 (VL) 中的 CDR 胺基酸殘基編號為 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3)。根據 Chothia, VH 中的 CDR 胺基酸編號為 26-32 (HCDR1)、52-56 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) ; VL 中的胺基酸殘基編號為 26-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和 91-96 (LCDR3)。藉由結合 Kabat 和 Chothia 的 CDR 定義, CDR 由人 VH 中的胺基酸殘基 26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) 以及人 VL 中的胺基酸殘基 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) 組成。根據 IMGT,

VH 中的 CDR 胺基酸殘基編號為約 26-35 (HCDR1)、51-57 (HCDR2) 和 93-102 (HCDR3)，VL 中的 CDR 胺基酸殘基編號為約 27-32 (LCDR1)、50-52 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) (編號根據 Kabat)。根據 IMGT，可以使用程式 IMGT/DomainGap Align 確定抗體的 CDR 區。

【0072】 術語「高變區」係指抗體中負責抗原結合的胺基酸殘基。高變區包含來自「CDR」(例如輕鏈可變結構域中的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 以及重鏈可變結構域中的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3) 的胺基酸殘基。參見 Kabat 等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* [免疫學上感興趣的蛋白質序列], 第 5 版 Public Health Service [公共衛生署], National Institutes of Health [國立衛生研究院], 貝塞斯達, 馬里蘭州 (藉由序列定義抗體的 CDR 區); 還參見 Chothia 和 Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌] 196: 901-917 (藉由結構定義抗體的 CDR 區)。術語「框架」或「FR」殘基意指除了本文定義為 CDR 殘基的高變區殘基之外的那些可變結構域殘基。

【0073】 除非另外說明, 否則「抗原結合片段」係指抗體的抗原結合片段, 即保留與全長抗體結合的抗原特異性結合的能力的抗體片段, 例如保留一或多個 CDR 區的片段。抗原結合片段之實例包括但不限於 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段; 雙抗體; 線性抗體; 單鏈抗體分子 (例如, 單鏈 Fv (ScFv)); 奈米抗體以及從抗體片段形成的抗體。

【0074】 如本文所用, 抗體「特異性結合」靶蛋白, 係指與其他蛋白相比, 抗體表現出優先結合靶蛋白, 但這種特異性不需要絕對的

結合特異性。在描述抗原（例如蛋白質）與抗體或抗原結合抗體片段之間的相互作用的上下文中使用的抗體「特異性結合」或「選擇性結合」係指決定抗原在蛋白質和其他生物製劑的異質群體中（例如在生物樣本、血液、血清、血漿或組織樣本中）的存在的結合反應。因此，在某些指定的免疫測定條件下，抗體或其抗原結合片段與特定抗原特異性結合係背景水平的至少兩倍，並且不以顯著量與樣本中存在的其他抗原特異性結合。在一方面，在指定的免疫測定條件下，抗體或其抗原結合片段與特定抗原的特異性結合係背景結合水平的至少十（10）倍，並且不以顯著量與樣本中存在的其他抗原特異性結合。

【0075】 本文中的術語「人抗體」意指僅包含人免疫球蛋白蛋白質序列的抗體。如果在小鼠、小鼠細胞或源自小鼠細胞的融合瘤中產生，人抗體可以含有鼠碳水化合物鏈。類似地，「小鼠抗體」或「大鼠抗體」意指分別僅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白蛋白質序列的抗體。

【0076】 術語「人源化」或「人源化抗體」意指含有來自非人（例如鼠）抗體以及人抗體的序列的抗體形式。此類抗體含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。通常，人源化抗體將包含基本上至少一個、並且典型地兩個可變結構域的全部，其高變環的全部或基本上全部對應於非人免疫球蛋白的那些，並且 FR 的全部或基本上全部係人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗體還將視需要包含免疫球蛋白恒定區（Fc）的至少一部分，典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。當有必要區分人源化抗體與親本齧齒動物抗體時，將前綴「hum」、「hu」、「Hu」或「h」添加到抗體殖株名稱中。人源化形式

的齧齒動物抗體會通常包含親本齧齒動物抗體的共同 CDR 序列，但是可包括某些胺基酸取代以增加親和力，增加人源化抗體的穩定性，除去翻譯後修飾或出於其他原因。

【0077】 術語「相應的人種系序列」係指編碼人可變區胺基酸序列或亞序列的核酸序列，與由人種系免疫球蛋白可變區序列編碼的所有其他已知可變區胺基酸序列相比，其與參考可變區胺基酸序列或亞序列具有最高確定的胺基酸序列同一性。相應的人種系序列也可以指與所有其他評估的可變區胺基酸序列相比，與參考可變區胺基酸序列或亞序列具有最高胺基酸序列同一性的人可變區胺基酸序列或亞序列。相應的人種系序列可以僅是框架區，僅互補決定區，框架和互補決定區，可變區段（如上定義），或包含可變區的序列或亞序列的其他組合。可以使用本文所述之方法確定序列同一性，例如使用 **BLAST**、**ALIGN** 或本領域已知的另一種比對演算法比對兩個序列。相應的人種系核酸或胺基酸序列可以與參考可變區核酸或胺基酸序列具有至少約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性。此外，如果抗體含有恒定區，則恒定區也衍生自此類人序列，例如人種系序列，或突變形式的人種系序列或含有衍生自人框架序列分析的共有框架序列的抗體，例如 Knappik 等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌] 296:57-86, 2000 中所述。

【0078】 術語「平衡解離常數 (K_D , M)」係指解離速率常數 (k_d , 時間⁻¹) 除以締合速率常數 (k_a , 時間⁻¹, M⁻¹)。平衡解離常數可以使用本領域任何已知的方法測量。本揭露的抗體通常將具有小於約 10^{-7} 或 10^{-8} M，例如小於約 10^{-9} M 或 10^{-10} M，在一些方面，小

於約 10^{-11} M、 10^{-12} M 或 10^{-13} M 的平衡解離常數。

【0079】 本文中的術語「癌症」或「腫瘤」具有如本領域理解的最廣泛的含義，並且係指哺乳動物中典型地以不受調控的細胞生長為特徵的生理病症。在本揭露的上下文中，癌症不限於某個類型或位置。

【0080】 在本揭露的上下文中，當提及胺基酸序列時，術語「保守取代」意指用新胺基酸取代原始胺基酸，該新胺基酸基本上不改變抗體或片段的化學、物理和/或功能性質，例如其與 CEA 的結合親和力。具體地，胺基酸的常見保守取代係本領域熟知的。

【0081】 如本文所用的術語「杵臼 (knob-into-hole)」技術係指胺基酸在體外或體內藉由在它們相互作用的介面上將空間突起 (杵) 引入一個多肽並將穴袋或空腔 (臼) 引入另一個多肽從而引導將兩條多肽配對在一起。例如，杵臼已經被引入了抗體的 Fc: Fc 結合介面、C_L: C_HI 介面、或 V_H/V_L 介面 (參見例如 US 2011/0287009、US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431 和 Zhu 等人, 1997, Protein Science [蛋白質科學] 6:781-788)。在一些實施方式中，杵臼確保了抗體製備期間兩個不同重鏈正確配對在一起。例如，在其 Fc 區中具有杵臼胺基酸的抗體還可包含與每個 Fc 區連接的單個可變結構域，或者進一步包含與相似或不同輕鏈可變結構域配對的不同重鏈可變結構域。杵臼技術還可在 V_H 或 V_L 區中使用，以確保正確配對。

【0082】 如本文在「杵臼」技術的上下文中所用的術語「杵」係指向多肽在該多肽與另一多肽相互作用的介面處引入突起 (杵) 的胺基酸改變。在一些實施方式中，另一多肽具有臼突變。

【0083】 如本文在「杵臼」的上下文中所用的術語「臼」係指向多肽在該多肽與另一多肽相互作用的介面處引入穴袋或空腔(臼)的胺基酸改變。在一些實施方式中，另一多肽具有杵突變。

【0084】 適用於確定百分比序列同一性和序列相似性的演算法之實例係 BLAST 演算法，其分別描述於 Altschul 等人, *Nuc.Acids Res.* [核酸研究] 25:3389-3402, 1977 和 Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* [分子生物學雜誌] 215:403-410, 1990 中。用於進行 BLAST 分析的軟體可通過國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information) 揭露獲得。此演算法包括首先藉由鑒定查詢序列中短字長 W 鑒定高得分序列對 (HSP)，當與數據庫序列中相同字長比對時，其匹配或滿足一些正值閾值得分 T 。 T 被稱為鄰域字得分閾值。該等初始鄰域字命中作為開始搜索以找到包含它們的較長 HSP 的值。字命中沿著每個序列在兩個方向上延伸，直到累積比對得分可以增加為止。對於核苷酸序列，使用參數 M (一對匹配殘基的獎勵得分；始終 > 0) 和 N (錯配殘基的罰分；始終 < 0) 來計算累積得分。對於胺基酸序列，使用得分矩陣來計算累積得分。在以下情況下，將停止字命中在每個方向上的延伸：累積比對得分從其最大實現值下降了數量 X ；由於一或多個負得分殘基比對的累積，累積得分趨於零或更低；或者到達任一序列的末端。BLAST 演算法參數 W 、 T 和 X 決定了比對的靈敏度和速度。BLASTN 程式 (對於核苷酸序列) 默認使用字長 (W) 11，期望值 (E) 10， $M = 5$ ， $N = -4$ 並比較兩條股。對於胺基酸序列，BLAST 程式預設使用字長 3，期望值 (E) 10 和 BLOSUM62 得分矩陣 (參見 Henikoff 和 Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

[美國國家科學院院刊] 89: 10915) 比對 (B) 50, 期望值 (E) 10, $M = 5$, $N = -4$ 並比較兩條股。

【0085】 BLAST 演算法還對兩個序列之間的相似性進行統計分析 (參見例如 Karlin 和 Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院院刊] 90:5873-5787, 1993)。BLAST 演算法提供的一種相似性度量係最小總和概率 (P(N)), 其提供了兩個核苷酸或胺基酸序列之間偶然發生匹配的概率的指示。例如, 如果測試核酸與參考核酸的比較中最小總和概率小於約 0.2, 更較佳的是小於約 0.01, 最較佳的是小於約 0.001, 則認為該核酸與參考序列相似。

【0086】 兩個胺基酸序列之間의 同一性百分比還可使用以下的演算法來確定: E. Meyers 和 W. Miller, Comput. Appl. Biosci. [生物科學中的電腦應用] 4: 11-17, (1988), 其已併入 ALIGN 程式 (2.0 版本), 使用 PAM120 權重殘基表, 空位長度罰分為 12, 空位罰分為 4。此外, 可以使用以下確定兩個胺基酸序列之間의 同一性百分比: Needleman 和 Wunsch, J.Mol.Biol. [分子生物學雜誌] 48:444-453 (1970) 的演算法, 其已併入 GCG 套裝軟體中的 GAP 程式中, 使用 BLOSUM62 矩陣或 PAM250 矩陣, 空位權重為 16、14、12、10、8、6 或 4, 並且長度權重為 1、2、3、4、5 或 6。

【0087】 術語「核酸」在本文中可與術語「多核苷酸」互換使用, 並且係指單股或雙股形式的去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。該術語涵蓋含有已知的核苷酸類似物或經修飾的主鏈殘基或連接的核酸, 它們係合成的, 天然存在的和非天然存在的, 具有與參考核酸相似的結合特性, 並且以與參考核苷酸相似的方式代謝。此類類似物之實例包括但不限於硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、甲

基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

【0088】 在核酸的上下文中，術語「可操作地連接」係指兩個或更多個多核苷酸（例如 DNA）區段之間的功能關係。典型地，它係指轉錄調節序列與轉錄序列的功能關係。例如，啟動子或強化子序列如果在合適的宿主細胞或其他表現系統中刺激或調節編碼序列的轉錄，則可操作地連接至編碼序列。通常，可操作地連接至轉錄序列的啟動子轉錄調節序列與轉錄序列在物理上鄰接，即它們係順式作用的。然而，一些轉錄調節序列（如強化子）不需要在物理上鄰接或緊鄰它們增強其轉錄的編碼序列。

【0089】 在一些方面，本揭露提供了組成物，例如藥學上可接受的組成物，其包含與至少一種藥學上可接受的賦形劑一起配製的如本文所述之抗 CEA 抗體。如本文所用，術語「藥學上可接受的賦形劑」包括生理學上相容的任何和所有溶劑、分散介質、等滲劑和吸收延遲劑等。賦形劑可適於靜脈內、肌內、皮下、腸胃外、直腸、脊柱或表皮投與（例如藉由注射或輸注）。

【0090】 本文揭露的組成物可為多種形式。該等包括例如液體、半固體和固體劑型，如液體溶液（例如可注射和輸注溶液）、分散液或懸浮液、脂質體和栓劑。合適的形式取決於預期的投與方式和治療應用。典型的合適組成物係可注射或輸注溶液的形式。一種合適的投與方式係腸胃外（例如靜脈內、皮下、腹膜內、肌內）。在一些實施方式中，該抗體藉由靜脈內輸注或注射來投與。在某些實施方式中，該抗體藉由肌內或皮下注射來投與。

【0091】 如本文所用的術語「治療有效量」係指當投與於受試者以治療疾病、或疾病或障礙的至少一種臨床症狀時，足以影響該疾

病、障礙或症狀的治療的抗體之量。「治療有效量」可以隨抗體，疾病，障礙，和/或疾病或障礙的症狀，疾病、障礙、和/或疾病或障礙的症狀的嚴重程度，待治療的受試者的年齡，和/或待治療的受試者的體重而變化。在任何給定情況下的合適量對於熟悉該項技術者而言係顯而易見的，或者可以藉由常規實驗確定。在組合療法的情況下，「治療有效量」係指用於有效治療疾病、障礙或病症的組成對象的總量。

【0092】 術語「組合療法」係指投與兩種或更多種治療劑以治療本揭露中所述之治療病症或障礙。這種投與涵蓋以基本上同時的方式共同投與該等治療劑。這種投與也涵蓋在多個容器中或在每種活性成分的獨立容器（例如，膠囊、粉末和液體）中共同投與。可以將粉末和/或液體在投與之前重構或稀釋到所需劑量。此外，這種投與也涵蓋在大致相同的時間或在不同的時間以順序方式使用每種類型的治療劑。在任何一種情況下，治療方案將在治療本文所述之病症或障礙方面提供藥物組合的有益作用。

【0093】 如本文所用，短語「與...組合」意指將抗 CEA 抗體在投與另外的治療劑的同時、就在該投與前或就在該投與後投與於受試者。在某些實施方式中，將抗 CEA 抗體作為與另外的治療劑的共同配製物來投與。

【0094】 術語「毒素」或「有效負荷」或「細胞毒性劑」在本文中用作抑制或減少細胞中的分子表現、細胞功能、誘導細胞凋亡和/或引起細胞破壞的分子。該術語包括放射性同位素、化療劑和毒素諸如細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或變體。細胞毒性劑之實例包括但不限於奧瑞他汀類

(auristatins)(例如,奧瑞他汀 E、奧瑞他汀 F、MMAE 和 MMAF)、金黴素類 (auromycins)、美登素類 (maytansinoids)、吡咯并苯并二氮呋(PBD)、蓖麻毒素、蓖麻毒素 A 鏈、康普瑞汀(combrestatin)、倍癌黴素類(duocarmycins)、朵拉司他汀類(dolastatins)、阿黴素、道諾黴素、紫杉醇、順鉑、絲裂黴素、依託泊苷、替諾泊苷、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、二羥基蔥二酮、放線菌素、白喉毒素、假單胞菌外毒素(PE) A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素 A 鏈、莫迪素(modeccin) A 鏈、 α -八疊球菌素(alpha-sarcin)、白樹毒素(gelonin)、絲林黴素(mitogellin)、局限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、依諾黴素(enomycin)、麻瘋樹逆境蛋白(curicin)、巴豆毒素(crotonin)、卡利奇黴素(calicheamicin)以及放射性同位素諸如 At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212 或 213、P32 和 Lu177。

【0095】 本揭露提供了抗 CEA 抗體及其抗原結合片段。此外,本揭露提供了具有所需的藥物動力學特徵和其他期望的屬性的抗體,並且因此可用於降低癌症的可能性或治療癌症。本揭露進一步提供了包含抗體的藥物組成物以及製備和使用此類藥物組成物用於預防和治療癌症和相關障礙之方法。

抗 CEA 抗體

【0096】 本揭露提供了特異性結合 CEA 的抗體或其抗原結合片段。本揭露的抗體或抗原結合片段包括但不限於如下所述產生的抗體或其抗原結合片段。

【0097】 本揭露提供了特異性結合 CEA 的抗體或抗原結合片段,其中所述抗體或抗體片段(例如,抗原結合片段)包含具有 SEQ

ID NO: 14、31 或 48 的胺基酸序列（表 1）的 VH 結構域。本揭露還提供了特異性結合 CEA 的抗體或抗原結合片段，其中所述抗體或抗原結合片段包含具有表 1 中列出的 HCDR 中的任一個的胺基酸序列的 HCDR。在一方面，本揭露提供了特異性結合 CEA 的抗體或抗原結合片段，其中所述抗體包含（或替代性地，由其組成）具有表 1 中列出的 HCDR 中的任一個的胺基酸序列的一個、兩個、三個或更多個 HCDR。

【0098】 本揭露提供了特異性結合 CEA 的抗體或抗原結合片段，其中所述抗體或抗原結合片段包含具有 SEQ ID NO: 15、32 或 49 的胺基酸序列（表 1）的 VL 結構域。本揭露還提供了特異性結合 CEA 的抗體或抗原結合片段，其中所述抗體或抗原結合片段包含具有表 1 中列出的 LCDR 中的任一個的胺基酸序列的 LCDR。具體地，本揭露提供了特異性結合 CEA 的抗體或抗原結合片段，所述抗體或抗原結合片段包含（或替代性地，由其組成）具有表 1 中列出的 LCDR 中的任一個的胺基酸序列的一個、兩個、三個或更多個 LCDR。

【0099】 本揭露的其他抗體或其抗原結合片段包括已被改變，但在 CDR 區中與表 1 中揭露的 CDR 區具有至少 60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 百分比同一性的胺基酸。在一些方面，其包括胺基酸改變，其中當與表 1 中描述的序列中描繪的 CDR 區相比時，在 CDR 區中改變不超過 1、2、3、4 或 5 個胺基酸。

【0100】 本揭露的其他抗體包括其中胺基酸或編碼胺基酸的核酸已被改變，但與表 1 中描述的序列具有至少 60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 百分比同一性的那些。在一些方面，其包括胺基

酸序列的改變，其中當與表 1 中描述的序列中描繪的可變區相比時，在可變區中改變不超過 1、2、3、4 或 5 個胺基酸，同時保持基本上相同的治療活性。

【0101】 本揭露還提供了編碼特異性結合 CEA 的抗體的 VH、VL、全長重鏈和全長輕鏈的核酸序列。可以優化此類核酸序列以在哺乳動物細胞中表現。

[表 1].

抗體	SEQ ID NO		序列
BGA113K (IMGT)	SEQ ID NO: 1	HCDR1 (IMGT)	GYIFTSYY
	SEQ ID NO: 2	HCDR2 (IMGT)	INPQTGKT
	SEQ ID NO: 3	HCDR3 (IMGT)	AREYGNVNYPLDY
	SEQ ID NO: 4	LCDR1 (IMGT)	ENQYGY
	SEQ ID NO: 5	LCDR2 (IMGT)	NY
	SEQ ID NO: 6	LCDR3 (IMGT)	QHHLGTPYT
BGA113K (Kabat)	SEQ ID NO: 7	HCDR1 (Kabat)	SYYLH
	SEQ ID NO: 8	HCDR2 (Kabat)	YINPQTGKTSYAQKFQG
	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Kabat)	EYGNVNYPLDY
	SEQ ID NO: 10	LCDR1 (Kabat)	RASENQYGYLA
	SEQ ID NO: 11	LCDR2 (Kabat)	NYKNLVE
	SEQ ID NO: 6	LCDR3 (Kabat)	QHHLGTPYT
BGA113K (Chothia)	SEQ ID NO: 12	HCDR1 (Chothia)	GYIFTSY
	SEQ ID NO: 13	HCDR2 (Chothia)	NPQTGK

	SEQ ID NO: 9	HCDR3 (Chothia)	EYGNVNYPLDY
	SEQ ID NO: 10	LCDR1 (Chothia)	RASENQYGYLA
	SEQ ID NO: 11	LCDR2 (Chothia)	NYKNLVE
	SEQ ID NO: 6	LCDR3 (Chothia)	QHHLGTPYT
BGA113K	SEQ ID NO: 14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSY YLHWVVRQAPGQGLEWIGYINPQTGKTSYAQK FQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYY CAREYGNVNYPLDYWGQGTLVTVSS
	SEQ ID NO: 15	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASENQYGYL AWYQQKPGKVPKLLIYNYKNLVEGVPSRFSGS GSGTDFLTISLQPEDVATYYCQHHLGTPYTF GQGTKVEIK
	SEQ ID NO: 16	VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAA GTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTG AGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTACCA GCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCC GGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATATTA CCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCAG AAATTTAGGGCCGCGTGACCATGACCCGC GATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGGAAC TGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGT GTATTATTGCGCGCGGAATATGGCAACTATAAC TATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCAC CCTGGTGACCGTGAGCAGC
	SEQ ID NO: 17	VL DNA	GATATTCAGATGACCCAGAGCCGAGCAGCC TGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGTGACCAT TACCTGCCGCGGAGCGAAAACCAGTATGGC TATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCA AAGTGCCGAAACTGCTGATTTATAACTATAAAA ACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCT GACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTG GCGACCTATTATTGCCAGCATCATCTGGGCAC CCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTG GAAATTTAAA
BGA190 (IMGT)	SEQ ID NO: 18	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFG
	SEQ ID NO: 19	HCDR2 (IMGT)	ISIGSDII

	SEQ ID NO: 20	HCDR3 (IMGT)	TRRSYRSYWYFDV
	SEQ ID NO: 21	LCDR1 (IMGT)	ENIYSY
	SEQ ID NO: 22	LCDR2 (IMGT)	NA
	SEQ ID NO: 23	LCDR3 (IMGT)	QHHFLSPWM
BGA190 (Kabat)	SEQ ID NO: 24	HCDR1 (Kabat)	SFGMH
	SEQ ID NO: 25	HCDR2 (Kabat)	YISIGSDIYYADTVKG
	SEQ ID NO: 26	HCDR3 (Kabat)	RSYRSYWYFDV
	SEQ ID NO: 27	LCDR1 (Kabat)	RTSENIYSYLA
	SEQ ID NO: 28	LCDR2 (Kabat)	NAKTLAE
	SEQ ID NO: 23	LCDR3 (Kabat)	QHHFLSPWM
BGA190 (Chothia)	SEQ ID NO: 29	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSF
	SEQ ID NO: 30	HCDR2 (Chothia)	SIGSDI
	SEQ ID NO: 26	HCDR3 (Chothia)	RSYRSYWYFDV
	SEQ ID NO: 27	LCDR1 (Chothia)	RTSENIYSYLA
	SEQ ID NO: 28	LCDR2 (Chothia)	NAKTLAE
	SEQ ID NO: 23	LCDR3 (Chothia)	QHHFLSPWM
BGA190	SEQ ID NO: 31	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRLESCAASGFTFSSFG MHWVRQAPERGLEWVAYISIGSDIYYADTVK GRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDVAVYYCTRR SYRSYWYFDVWGAGTTVTVSS
	SEQ ID NO: 32	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLA WYQQKQKSPHLLVYNAKTLAEGVPSRFSGS GSGTQFSLKIISLQPEDFGTYQCQHHFLSPWMF GGGTKLEIK
	SEQ ID NO: 33	VH DNA	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT AGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGGAACCTCTC CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTT

			TGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCAGA GAGGGGGCTGGAGTGGGTTCGCATACATTAGTA TTGGCAGTGATATCATCTACTATGCAGACACAG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAT CCCAAGAACACCCTGTTCTGCAAATGA CCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTACAAGAAGGTCTTATAGGTCTACTG GTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
[0001]	SEQ ID NO: 34	VL DNA	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCC TATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATC ACATGTCGAACAAGTGAGAATATTTACAGTT ATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAA TCTCCTCATCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACC TTAGCAGAGGGTGTGCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTG AAGATCATCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG GGACTTATTACTGTCAGCATCATTTTCTTAGT CCGTGGATGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGG AAATCAAA
BGA288 (IMGT)	SEQ ID NO: 35	HCDR1 (IMGT)	GYTFTDYN
	SEQ ID NO: 36	HCDR2 (IMGT)	IGPNYGGT
	SEQ ID NO: 37	HCDR3 (IMGT)	ARRGSIPRAVDY
	SEQ ID NO: 38	LCDR1 (IMGT)	QDIHNY
	SEQ ID NO: 39	LCDR2 (IMGT)	RA
	SEQ ID NO: 40	LCDR3 (IMGT)	LQYDEFPTY
BGA288 (Kabat)	SEQ ID NO: 41	HCDR1 (Kabat)	DYNID
	SEQ ID NO: 42	HCDR2 (Kabat)	DIGPNYGGTIYNQKFKG
	SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Kabat)	RGSIPRAVDY
[0001]	SEQ ID NO: 44	LCDR1 (Kabat)	KASQDIHNYLS
[0001]	SEQ ID NO: 45	LCDR2 (Kabat)	RANRLVD
[0001]	SEQ ID NO: 40	LCDR3	LQYDEFPTY

		(Kabat)	
BGA288 (Chothia)	SEQ ID NO: 46	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDY
[0001]	SEQ ID NO: 47	HCDR2 (Chothia)	GPNYGG
[0001]	SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Chothia)	RGSIPRAVDY
[0001]	SEQ ID NO: 44	LCDR1 (Chothia)	KASQDIHNYLS
[0001]	SEQ ID NO: 45	LCDR2 (Chothia)	RANRLVD
[0001]	SEQ ID NO: 40	LCDR3 (Chothia)	LQYDEFPTYT
BGA288	SEQ ID NO: 48	VH	EVLLQQSGPELVKPGASVKIFCKASGYTFTDY NIDWVQQSHGKSLEWIGDIGPNYGGTIYNQKF K GKATLTVAKSSSTAYMELRSLTSED TAVYYCAR RGSIPRAVDYWGQGTSVTVSS
[0001]	SEQ ID NO: 49	VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYL SWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGS GSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYT GGGTKLEIK
[0001]	SEQ ID NO: 50	VH DNA	GAGGTCCTGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGC TGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATTTT CTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTGACTA CAACATAGACTGGGTGCAGCAGAGCCATGGA AAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTGGTCC TAATTATGGTGGTACTATCTACAACCAGAAGTT CAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGCCAAGT CCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCC GCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTCTA TTACTGTGCAAGACGCGGTAGCATCCCGAGGG CTGTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC ACCGTCTCCTCA
[0001]	SEQ ID NO: 51	VL DNA	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATG TATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATC ACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTA TTTAAGCTGGTTCCAGCAGAAACCAGGGAAAT CTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAAACAGAT TGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTGAG TGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCAC CATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGATATGGGAA TTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTTCCGTA CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA

			AATAAAA
--	--	--	---------

【0102】 本揭露提供了結合人 CEA 的表位的抗體及其抗原結合片段。在某些方面，抗體和抗原結合片段可以結合 CEA 的相同表位。

【0103】 本揭露還提供了結合與表 1 中描述的抗 CEA 抗體相同的表位的抗體及其抗原結合片段。因此，其他抗體及其抗原結合片段可以基於它們在結合測定中與其他抗體交叉競爭（例如，以統計學顯著的方式競爭性抑制其結合）的能力來鑒定。測試抗體抑制本揭露的抗體及其抗原結合片段結合 CEA 的能力證明測試抗體可與該抗體或其抗原結合片段競爭結合 CEA。不受任何一種理論的束縛，這種抗體可以結合 CEA 上的與其競爭的抗體或其抗原結合片段相同或相關（例如，在結構上相似或在空間上鄰近）的表位。在某些方面，結合 CEA 上的與本揭露的抗體或其抗原結合片段相同的表位的抗體係人或人源化單株抗體。這種人或人源化單株抗體可以如本文所述製備和分離。

連接子

【0104】 還應理解，抗體的多肽鏈的結構域和/或區可被各種長度的連接子區分開。在一些實施方式中，抗原結合結構域藉由連接子區與彼此 CL、CH1、鉸鏈、CH2、CH3 或整個 Fc 區分開。例如，VL1-CL-（連接子）VH2-CH1 這種連接子區可以包含隨機分類的胺基酸，或一組受限的胺基酸。此類連接子區可為柔性的或剛性的（參見 US2009/0155275）。

【0105】 在不同的實施方式中，連接子可用於將化合物軛合在毒素與抗體之間，在一些實施方式中，連接子在細胞內條件下可裂解，使得連接子的裂解在細胞內環境中從抗體釋放毒素。在其他實

施方式中，連接子單元係不可裂解的，毒素例如藉由抗體降解而釋放。連接子可為但不限於可裂解的連接子、不可裂解的連接子、親水性連接子、預先帶電荷的連接子和基於二羧酸的連接子。

二聚化特異性胺基酸

【0106】 在一個實施方式中，抗體包含至少一個二聚化特異性胺基酸改變。二聚化特異性胺基酸改變導致「突起到孔中」相互作用，並增加正確抗體的組裝。二聚化特異性胺基酸可以在 CH1 結構域或 CL 結構域或其組合內。用於將 CH1 結構域與其他 CH1 結構域 (CH1-CH1) 和 CL 結構域與其他 CL 結構域 (CL-CL) 配對的二聚化特異性胺基酸至少可以在 WO 2014082179、WO 2015181805 家族和 WO 2017059551 的揭露內容中找到。二聚化特異性胺基酸也可以在 Fc 結構域內，並且可以與 CH1 或 CL 結構域內的二聚化特異性胺基酸組合。在一個實施方式中，本揭露提供了包含至少一個二聚化特異性胺基酸對的抗體。

對 Fc 區框架的進一步改變

【0107】 在其他方面，藉由用不同的胺基酸殘基替代至少一個胺基酸殘基來改變 Fc 區，以改變抗體的效應子功能。例如，可以用不同的胺基酸殘基替代一或多個胺基酸，使得抗體對效應配體具有改變的親和力，但保留親本抗體的抗原結合能力。親和力改變的效應子配體可為例如 Fc 受體或補體的 C1 組分。此方法描述於例如 Winter 等人的美國專利案號 5,624,821 和 5,648,260 中。

【0108】 在另一方面，可以用一或多個不同的胺基酸殘基替代一或多個胺基酸殘基，使得抗體具有改變的 C1q 結合和/或降低的或消除的補體依賴性細胞毒性 (CDC)。此方法描述於例如 Idusogie

等人的美國專利案號 6,194,551 中。

【0109】 另一方面，改變一或多個胺基酸殘基從而改變抗體固定補體的能力。此方法描述於例如 Bodmer 等人的公開 WO 94/29351 中。在特定的方面，本揭露的抗體或其抗原結合片段的一或多個胺基酸被 IgG1 亞類和 κ 同種型的一或多個同種異型胺基酸殘基替代。同種異型胺基酸殘基還包括但不限於 IgG1、IgG2 和 IgG3 亞類的重鏈恒定區以及 κ 同種型的輕鏈恒定區，如 Jefferis 等人, MAbs. [單株抗體] 1:332-338 (2009)所述。

【0110】 在另一方面，藉由修飾一或多個胺基酸來修飾 Fc 區以增加抗體介導抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 的能力和/或增加抗體對 Fc γ 受體的親和力。此方法描述於例如 Presta 的公開 WO 00/42072 中。此外，已經繪製了在人 IgG1 上與 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 FcRn 的結合位點，並且已經描述了具有改善的結合的變體 (參見 Shields 等人, J. Biol. Chem. [生物化學雜誌] 276:6591-6604, 2001)。

【0111】 在另一方面，抗體的糖基化被修飾。例如，可以製備無糖基化抗體 (即，抗體缺乏或具有降低的糖基化)。例如，可以改變糖基化以增加抗體對「抗原」的親和力。這種碳水化合物修飾可以藉由例如改變抗體序列內的一或多個糖基化位點來實現。例如，可以進行一或多個胺基酸取代，其導致消除一或多個可變區框架糖基化位點，從而消除該位點的糖基化。這種無糖基化可以增加抗體對抗原的親和力。此方法描述於例如 Co 等人的美國專利案號 5,714,350 和 6,350,861 中。

【0112】 另外地或替代性地，可以製備具有改變的糖基化類型的抗體，如具有減少量的岩藻糖基殘基的低岩藻糖基化抗體或具有

增加的二等分 GlcNac 結構的抗體。已經證明此類改變的糖基化模式增加抗體的 ADCC 能力。這種碳水化合物修飾可藉由例如在具有改變的糖基化途徑的宿主細胞中表現抗體來實現。具有改變的糖基化途徑的細胞已經在本領域中描述並且可以用作宿主細胞，在其中表現重組抗體從而產生具有改變的糖基化的抗體。例如，Hang 等人的 EP 1,176,195 描述了具有功能性破壞的 FUT8 基因的細胞系，其編碼岩藻糖基轉移酶，使得在這種細胞系中表現的抗體表現出低岩藻糖基化。Presta 的公開 WO 03/035835 描述了變體 CHO 細胞系 Lec13 細胞，其具有降低的將岩藻糖連接至 Asn(297)-連接的碳水化合物的能力，也導致在該宿主細胞中表現的抗體的低岩藻糖基化（也參見 Shields 等人, (2002) *J. Biol. Chem.* [生物化學雜誌] 277:26733-26740）。Umana 等人的 WO 99/54342 描述了被工程化以表現糖蛋白修飾的糖基轉移酶（例如， $\beta(1,4)$ -N 乙醯胺基葡萄糖轉移酶 III（GnTIII））的細胞系，使得在工程化的細胞系中表現的抗體表現出增加的二等分 GlcNac 結構，這導致抗體的 ADCC 活性增加（還參見 Umana 等人, *Nat. Biotech.* [自然生物技術] 17:176-180, 1999）。

【0113】 在另一方面，如果所需的 ADCC 降低，許多先前的報導顯示人抗體亞類 IgG4 僅具有適度的 ADCC 並且幾乎沒有 CDC 效應子功能（Moore G L 等人, 2010 *MAbs* [單株抗體], 2:181-189）。然而，發現天然 IgG4 在應激條件下（如在酸性緩衝劑中或在升高的溫度下）較不穩定（Angal, S. 1993 *Mol Immunol* [分子免疫學], 30:105-108；Dall'Acqua, W. 等人, 1998 *Biochemistry* [生物化學], 37:9266-9273；Aalberse 等人, 2002 *Immunol* [免疫學], 105:9-19）。

降低的 ADCC 可以藉由將抗體可操作地連接至用降低 Fc γ R 結合或 C1q 結合活性的改變的組合工程化的 IgG4 Fc，從而降低或消除 ADCC 和 CDC 效應子功能來實現。考慮到抗體作為生物藥物的物理化學性質，IgG4 的較不期望的固有特性之一係其兩條重鏈在溶液中動態分離以形成半抗體，這導致通過稱為「Fab 臂交換」的過程在體內產生雙特異性抗體（Van der Neut Kolfshoten M 等人，2007 Science [科學], 317:1554-157）。228 位（EU 編號系統）絲胺酸突變為脯胺酸表現出對 IgG4 重鏈分離的抑制作用（Angal, S. 1993 Mol Immunol [分子免疫學], 30:105-108；Aalberse 等人，2002 Immunol [免疫學], 105:9-19）。據報導，鉸鏈區和 γ Fc 區中的一些胺基酸殘基對抗體與 Fc γ 受體的相互作用具有影響（Chappel S M 等人，1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美國國家科學院學報], 88:9036-9040；Mukherjee, J.等人，1995 FASEB J [美國實驗生物學學會聯合會雜誌], 9:115-119；Armour, K. L.等人，1999 Eur J Immunol [歐洲免疫學雜誌], 29:2613-2624；Clynes, R. A.等人，2000 Nature Medicine [自然醫學], 6:443-446；Arnold J. N., 2007 Annu Rev immunol [免疫學年鑒], 25:21-50）。此外，在人群中一些罕見的 IgG4 同種型也可引起不同的物理化學特性（Brusco, A.等人，1998 Eur J Immunogenet [歐洲免疫遺傳學雜誌], 25:349-55；Aalberse 等人，2002 Immunol [免疫學], 105:9-19）。為了產生具有低 ADCC 和 CDC 但具有良好穩定性的抗體，可以修飾人 IgG4 的鉸鏈區和 Fc 區並引入許多改變。該等經修飾的 IgG4 Fc 分子可在 SEQ ID NO: 83-88，Li 等人的美國專利案號 8,735,553 中找到。

抗體產生

【0114】 抗體及其抗原結合片段可藉由本領域已知的任何方法產生，包括但不限於抗體四聚體的重組表現、化學合成和酶消化，而全長單株抗體可藉由例如融合瘤或重組產生獲得。重組表現可以來自本領域已知的任何合適的宿主細胞，例如哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆蟲宿主細胞等。

【0115】 本揭露還提供了編碼本文所述抗體的多核苷酸，例如編碼包含本文所述之互補決定區的重鏈或輕鏈可變區或區段的多核苷酸。在一些方面，編碼重鏈可變區的多核苷酸與選自由 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 50 組成之群組的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 核酸序列同一性。在一些方面，編碼輕鏈可變區的多核苷酸與選自由 SEQ ID NO: 17、34 或 51 組成之群組的多核苷酸具有至少 85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 核酸序列同一性。

【0116】 本揭露的多核苷酸可以編碼抗 CEA 抗體的可變區序列。它們還可以編碼抗體的可變區和恒定區。一些多核苷酸序列編碼包含示例性抗 CEA 抗體的重鏈和輕鏈的可變區的多肽。

【0117】 本揭露還提供了用於產生抗 CEA 抗體的表現載體和宿主細胞。表現載體的選擇取決於表現載體的預期宿主細胞。通常，表現載體含有可操作地連接至編碼抗 CEA 抗體鏈或抗原結合片段的多核苷酸的啟動子和其他調節序列（例如，強化子）。在一些方面，除了在誘導條件的控制下，使用誘導型啟動子來防止插入序列的表現。誘導型啟動子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金屬硫蛋白啟動子或熱激啟動子。可以在非誘導條件下、而不在偏向宿主細胞更好耐

受其表現產物的編碼序列的群體的情況下擴大經轉化的生物體的培養。除啟動子外，其他調節元件也可為有效表現抗 CEA 抗體或抗原結合片段所需要或期望的。該等元件典型地包括 ATG 起始密碼子和相鄰的核糖體結合位點或其他序列。此外，藉由包含適合於使用中的細胞系統的強化子，可以提高表現效率（參見，例如，Scharf 等人, *Results Probl. Cell Differ.* [細胞分化中的結果和問題] 20:125, 1994；以及 Bittner 等人, *Meth. Enzymol.* [酶學方法], 153:516, 1987)。例如，SV40 強化子或 CMV 強化子可以用來增加哺乳動物宿主細胞中的表現。

【0118】 用於攜帶並表現抗 CEA 抗體鏈的宿主細胞可為原核或真核的。大腸桿菌係一種可用於選殖和表現本揭露多核苷酸的原核宿主。其他適用的微生物宿主包括桿菌，如枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)，和其他腸桿菌科 (*enterobacteriaceae*)，如沙門氏菌屬 (*Salmonella*)、沙雷氏菌屬 (*Serratia*) 和各種假單胞菌屬 (*Pseudomonas*) 物種。在該等原核宿主中，還可以製備表現載體，其典型地含有與宿主細胞相容的表現控制序列（例如複製起點）。此外，將存在任何數量的多種熟知的啟動子，如乳糖啟動子系統、色胺酸 (*trp*) 啟動子系統、 β -內醯胺酶啟動子系統或來自噬菌體 λ 的啟動子系統。啟動子典型地視需要用操縱子序列控制表現，並具有核糖體結合位點序列等，用於啟動和完成轉錄和翻譯。其他微生物如酵母也可用於表現抗 CEA 抗體。也可以使用昆蟲細胞與桿狀病毒載體的組合。

【0119】 在其他方面，哺乳動物宿主細胞用於表現和產生本揭露的抗 CEA 抗體。例如，它們可為表現內源性免疫球蛋白基因的融

合瘤細胞系或攜帶外源性表現載體的哺乳動物細胞系。該等包括任何正常死亡或正常或異常永生化動物或人細胞。例如，已經開發了幾種能夠分泌完整免疫球蛋白的合適宿主細胞系，包括 CHO 細胞系、各種 COS 細胞系、HEK 293 細胞、骨髓瘤細胞系、轉化的 B 細胞和融合瘤。使用哺乳動物組織細胞培養物來表現多肽一般在例如 Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, N.Y. [從基因到殖株，紐約 VCH 出版社，紐約市]，1987 中討論。用於哺乳動物宿主細胞的表現載體可以包括表現控制序列，如複製起點、啟動子和強化子（參見例如 Queen 等人, *Immunol. Rev.* [免疫學綜述] 89:49-68, 1986）和必要的加工資訊位點，如核糖體結合位點、RNA 剪接位點、聚腺苷酸化位點和轉錄終止子序列。該等表現載體通常含有衍生自哺乳動物基因或哺乳動物病毒的啟動子。合適的啟動子可為組成型的、細胞類型特異性的、階段特異性的、和/或可調控的或可調節的。有用的啟動子包括但不限於金屬硫蛋白啟動子、組成型腺病毒主要晚期啟動子、地塞米松誘導型 MMTV 啟動子、SV40 啟動子、MRP polIII 啟動子、組成型 MPSV 啟動子、四環素誘導型 CMV 啟動子（如人立即早期 CMV 啟動子）、組成型 CMV 啟動子和本領域已知的啟動子-強化子組合。

檢測和診斷方法

【0120】 本揭露的抗體或抗原結合片段可用於多種應用，包括但不限於檢測 CEA 之方法。在一方面，抗體或抗原結合片段可用於檢測生物樣本中 CEA 的存在。如本文所用的術語「檢測」包括定量或定性檢測。在某些方面，生物樣本包括細胞或組織。在其他方面，此類組織包括相對於其他組織以更高水平表現 CEA 的正常和

/或癌性組織。

【0121】 在一方面，本揭露提供了檢測生物樣本中 CEA 的存在之方法。在某些方面，該方法包括在允許抗體與抗原結合的條件下，將生物樣本與抗 CEA 抗體接觸，並檢測抗體與抗原之間是否形成複合物。生物樣本可以包括但不限於尿液、組織、痰或血液樣本。

【0122】 還包括診斷與 CEA 表現相關的障礙之方法。在某些方面，該方法包括使測試細胞與抗 CEA 抗體接觸；藉由檢測抗 CEA 抗體與 CEA 多肽的結合來測定測試細胞表現的 CEA 的表現水平(定量或定性)；以及將測試細胞的表現水平與對照細胞(例如，與測試細胞相同組織來源的正常細胞或非 CEA 表現細胞)中的 CEA 表現水平進行比較，其中與對照細胞相比，測試細胞中較高水平的 CEA 表現表明存在與 CEA 表現相關的障礙。

治療方法

【0123】 本揭露的抗體或抗原結合片段可用於多種應用，包括但不限於治療 CEA 相關障礙或疾病之方法。在一方面，CEA 相關障礙或疾病係癌症。

【0124】 在一方面，本揭露提供了治療癌症之方法。在某些方面，該方法包括向有需要的患者投與有效量的抗 CEA 抗體或抗原結合片段。癌症可包括但不限於胃癌、結腸癌、胰臟癌、乳癌、頭頸癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、皮膚癌、間皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和肉瘤。

【0125】 本文揭露的抗體或抗原結合片段可以藉由任何合適的方式投與，包括腸胃外、肺內和鼻內，並且如果需要用於局部治療、病灶內投與。腸胃外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮

下投與。給藥可以藉由任何合適的途徑，例如藉由注射，如靜脈內或皮下注射，這部分取決於投與是短暫的還是長期的。本文考慮了多種給藥方案，包括但不限於單次投與或在不同時間點的多次投與、推注投與、和脈衝輸注。

【0126】 本揭露的抗體或抗原結合片段可以以符合良好醫學實踐的方式配製、給藥和投與。關於這點要考慮的因素包括治療的特定障礙、治療的特定哺乳動物、個體患者的臨床病症、障礙的起因、藥劑的遞送位點、投與方法、投與方案、和醫療從業者已知的其他因素。抗體不需要但視需要與目前用於預防或治療所研究的障礙的一或多種藥劑一起配製。此類其他藥劑的有效量取決於配製物中存在的抗體的量、障礙或治療的類型、以及上文討論的其他因素。該等通常以與如本文所述相同的劑量和投與途徑使用，或以本文所述劑量的約 1%-99% 使用，或以經驗/臨床確定為合適的任何劑量和任何途徑使用。

【0127】 為預防或治療疾病，本揭露的抗體或抗原結合片段的合適的劑量將取決於待治療的疾病的類型、抗體的類型、疾病的嚴重程度和病程、投與抗體是用於預防還是治療目的、先前療法、患者的臨床病史和對抗體的響應、以及主治醫生的判斷。抗體適當地以一次或經一系列治療投與於患者。取決於疾病的類型和嚴重性，約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 100 mg/kg 的抗體可為用於向患者投與的初始候選劑量，無論是例如藉由一次或多次分開投與，還是藉由連續輸注。取決於上述因素，一個典型的日劑量可以為約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 100 mg/kg 或更多。對於幾天或更長時間內的重複投與，取決於病症，治療通常會持續直到出現疾病症狀的期望抑制。此類劑量可以間歇地投與，例

如每週或每三週(例如使得患者接受約兩個至約二十個,或例如約六個劑量的抗體)。投與初始較高負載劑量,隨後投與一或多個較低劑量。但是,其他給藥方案可為有用的。藉由常規技術和測定可以容易地監測此療法的進展。

組合療法

【0128】 在一方面,本揭露的抗 CEA 抗體可與其他治療劑組合使用。可以與本揭露的抗 CEA 抗體一起使用的其他治療劑包括:但不限於化療劑(例如,紫杉醇或紫杉醇藥劑;(例如 Abraxane®)、多西他賽;卡鉑;拓撲替康;順鉑;伊立替康、多柔比星、來那度胺、5-氮雜胞苷、異環磷醯胺、奧沙利鉑、培美曲塞二鈉、環磷醯胺、依託泊苷、地西他濱、氟達拉濱、長春新鹼、苯達莫司汀、苯丁酸氮芥、白消安、吉西他濱、黴法蘭、噴司他丁、米托蒽醌、培美曲塞二鈉)、酪胺酸激酶抑制劑(例如 EGFR 抑制劑(例如厄洛替尼)、多激酶抑制劑(例如 MGCD265、RGB-286638)、CD-20 靶向劑(例如利妥昔單抗、奧法木單抗、RO5072759、LFB-R603)、CD52 靶向劑(例如阿倫單抗)、普賴蘇穠、達貝泊汀 α 、來那度胺、Bcl-2 抑制劑(例如奧利默森鈉)、極光激酶抑制劑(例如 MLN8237、TAK-901)、蛋白酶體抑制劑(例如硼替佐米)、CD-19 靶向劑(例如 MEDI-551、MOR208)、MEK 抑制劑(例如 ABT-348)、JAK-2 抑制劑(例如 INCB018424)、mTOR 抑制劑(例如坦羅莫司、依維莫司)、BCR/ABL 抑制劑(例如伊馬替尼)、ET-A 受體拮抗劑(例如 ZD4054)、TRAIL 受體 2(TR-2)促效劑(例如 CS-1008)、EGEN-001、Polo 樣激酶 1 抑制劑(例如 BI 672)。

【0129】 在另一方面,抗 CEA 抗體可與抗 PD1 抗體組合使用。抗

PD1 抗體可包括但不限於替雷利珠單抗、帕博利珠單抗 (Pembrolizumab) 或納武利尤單抗 (Nivolumab)。替雷利珠單抗揭露於 US 8,735,553 中。由默克公司 (Merck) 揭露於 US 8,354,509 和 US 8,900,587 中的帕博利珠單抗 (以前稱為 MK-3475) 係人源化 IgG4-K 免疫球蛋白, 其靶向 PD1 受體並抑制 PD1 受體配體 PD-L1 和 PD-L2 的結合。帕博利珠單抗已被批准用於轉移性黑色素瘤和轉移性非小細胞肺癌 (NSCLC) 的適應症, 並且正在進行用於治療頭頸部鱗狀細胞癌 (HNSCC) 和難治性何杰金氏淋巴瘤 (cHL) 的臨床研究。納武利尤單抗 (如由百時美施貴寶公司 (Bristol-Meyers Squibb) 所揭露的) 係全人 IgG4-K 單株抗體。納武利尤單抗 (殖株 5C4) 揭露於美國專利案號 US 8,008,449 和 WO 2006/121168 中。納武利尤單抗被批准用於治療黑色素瘤、肺癌、腎癌、和何杰金氏淋巴瘤。

藥物組成物和配製物

【0130】 還提供了包含抗 CEA 抗體或其抗原結合片段或包含編碼抗 CEA 抗體或抗原結合片段的序列的多核苷酸的組成物, 包括藥物配製物。在某些實施方式中, 組成物包含一或多種抗 CEA 抗體或抗原結合片段, 或包含編碼一或多種抗 CEA 抗體或抗原結合片段的序列的一或多種多核苷酸。該等組成物還可包含合適的載劑, 如本領域熟知的藥學上可接受的賦形劑, 包括緩衝劑。

【0131】 藉由將具有所需純度的這種抗體或抗原結合片段與一或多種視需要的藥學上可接受的載劑混合來製備本文所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段的藥物配製物 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition [雷明頓藥物科學第 16 版], Osol, A. 編

(1980))，呈凍乾配製物或水溶液的形式。藥學上可接受的載劑在所採用的劑量和濃度下對於接受者通常是無毒性的，並且包括但不限於：緩衝劑，如磷酸鹽、檸檬酸鹽、和其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸和甲硫胺酸；防腐劑（如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲雙銨；苯紮氯銨；氯化本索寧；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥基苯甲酸烷基酯，如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；和間甲酚）；低分子量（少於約 10 個殘基）的多肽；蛋白質，如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，如 EDTA；糖，如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽反離子，如鈉；金屬絡合物（例如 Zn-蛋白絡合物）；和/或非離子型界面活性劑，如聚乙二醇（PEG）。本文的示例性藥學上可接受的載劑進一步包括間質藥物分散劑，例如可溶性中性活性透明質酸酶糖蛋白（sHASEGP），例如人可溶性 PH-20 透明質酸酶糖蛋白，如 rHuPH20 (HYLENEX[®]，百特國際有限公司（Baxter International, Inc.）。在美國專利案號 US 7,871,607 和 2006/0104968 中描述了某些示例性 sHASEGP 和使用方法，包括 rHuPH20。在一方面，將 sHASEGP 與一或多種另外的糖胺聚糖酶如軟骨素酶組合。

【0132】 示例性凍乾抗體配製物描述於美國專利案號 6,267,958 中。水性抗體配製物包括美國專利案號 6,171,586 和 WO 2006/044908 中所述的那些，後者的配製物包含組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

【0133】 可以製備緩釋製劑。緩釋製劑之合適實例包括含有該抗體的固體疏水性聚合物的半透性基質，該基質為成形製品的形式，例如膜或微膠囊。

【0134】 用於體內投與的配製物通常是無菌的。無菌性可以例如通過無菌過濾膜過濾而容易地實現。

實例

實例 1：抗 CEA 單株抗體的產生

用於免疫和結合測定的 CEA 重組蛋白

【0135】 為了發現在含有結構域 B3(SEQ ID NO: 52 的胺基酸 596-674, 參見 Beauchemin 等人, Mol. Cell Bio. [分子細胞生物學], 1987, 7(9):3321-3330)的膜周圍區域與人和獼猴 CEA 發生交叉反應但不與其他人 CEACAM 成員脫靶結合的針對 CEA 的新抗體，設計並表現了幾種重組蛋白用於抗體篩選（參見表 2）。

【0136】 將全長人 CEA (SEQ ID NO: 52)、獼猴 CEA (SEQ ID NO: 53) 和全長人 CEACAM6 (SEQ ID NO: 54) 的 cDNA 編碼區根據 GenBank 序列排序。對於人 CEA (登錄號：NM_004363.2)，該基因可獲自 Sinobio，目錄號 HG11077-UT。對於獼猴 CEA (登錄號：NM_001047125)，該基因可獲自 Genscript，目錄號 OMB23865D。對於人 CEACAM6 (登錄號：NM_002483.4)，該基因可獲自 Sinobio，目錄號 HG10823-UT。CEA 融合蛋白之示意圖如圖 1 所示。據報導，人 CEA 的剪接變體與全長 CEA 在腫瘤上同時表現 (Peng 等人, PloS one [公共科學圖書館：綜合], 7, e36412-e36412 (2012))，並且因此製備了變體 (CEA-v)。為了產生此構建體，將由 huCEA (SEQ ID NO: 55) 的胺基酸 (AA) 1-687 組成的細胞外

結構域 (ECD) 的編碼區、猴 CEA (SEQ ID NO: 56) 的胺基酸 (AA) 1-690 的區域和 CEACAM6 (SEQ ID NO: 57) 的胺基酸 (AA) 1-320 的區域進行 PCR 擴增。將 CEA 胺基酸 (AA) 1-78 (SEQ ID NO: 58) 和 CEA 的胺基酸 398-687 (SEQ ID NO: 59) 的區域進行 PCR 擴增，然後藉由重疊 PCR 軛合以製備 CEA 變體 (CEA-v) (SEQ ID NO: 60)。替代性地，將 CEACAM6 胺基酸 (AA) 1-273 (SEQ ID NO: 61) 的區域和含有 CEA 胺基酸 (AA) 596-687 的結構域 B3 (SEQ ID NO: 62) 的膜周圍區域進行 PCR 擴增，然後藉由重疊 PCR 軛合以製備嵌合構建體 (CHIM) (SEQ ID NO: 63)。然後將所有構建體選殖到基於 pcDNA3.1 的表現載體(美國加利福尼亞州卡爾斯巴德的英傑公司 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)) 中，其 C 末端分別與 6xHis 標籤融合，從而產生五個重組融合蛋白表現質體 CEA、猴 CEA、CEACAM6、CEA-v 和 CHIM。為了產生重組融合蛋白，將 CEA、猴 CEA、CEACAM6、CEA-v 和 CHIM 質體瞬時轉染到基於 HEK293 的哺乳動物細胞表現系統 (內部產生) 中，並在裝備有旋轉振盪器的 CO₂ 培養箱中培養 5-7 天。收集含有重組蛋白的上清液並離心澄清。使用 Ni-NTA 瓊脂糖 (目錄號 R90115, 英傑公司) 純化重組蛋白。將所有重組蛋白用磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS) 透析，並以小等分試樣保存在 -80°C 冰箱中。

在細胞系中穩定表現

【0137】 為了建立表現全長人 CEA 的穩定細胞系 (登錄號: NM_004363.2), 將表現 CEA 的 cDNA 選殖到反轉錄病毒載體 pFB-Neo (目錄號 217561, 美國的安捷倫公司 (Agilent, USA)) 中。根據先前的方案 (Zhang 等人, Blood. [血液] 2005 106(5):1544-51)

產生雙嗜性反轉錄病毒載體。將含有人 CEA 的病毒載體轉導到 L929 (美國維吉尼亞州馬納薩斯的美國典型培養物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA, USA)) 和 CT26 細胞 (美國維吉尼亞州馬納薩斯的美國典型培養物保藏中心) 中, 以產生人 CEA 表現細胞系。藉由在含有 10% FBS 和 G418 的完全 RPMI1640 培養基中培養來選擇高表現細胞系, 然後藉由 FACS 結合測定來驗證。

免疫、融合瘤融合和選殖

【0138】 用 500 μ l 含有或不含水溶性佐劑 (目錄號 KX0210041, 中國北京的康碧泉公司 (KangBiQuan, Beijing, China)) 的 1×10^7 個 L929/huCEA 細胞腹膜內 (i.p.) 免疫八至十二週齡 Balb/c 小鼠 (中國北京的華阜康生物科技有限公司 (HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Beijing, China))。兩週後重複該過程以促進抗體產生。第三次免疫後兩週, 藉由 ELISA 和 FACS 評估小鼠血清的可溶性 CEA (sCEA) 結合。使用標準技術 (Colligan JE 等人, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY [免疫學實驗手冊], 1993) 分離脾細胞並與鼠骨髓瘤細胞系 SP2/0 細胞 (美國維吉尼亞州馬納薩斯的美國典型培養物保藏中心) 融合。

藉由 ELISA 和 FACS 評估抗體的 CEA 結合活性

【0139】 為了篩選結合人 CEA 但不結合 CEACAM6 或 sCEA 的抗體, 篩選並反篩選結合 CHIM 但不結合 sCEA、CEACAM6 和 CEA-v 的抗體, 以及結合 CHIM、sCEA 和 CEA-v 但不結合 CEACAM6 的抗體。融合瘤植株的上清液最初藉由 (Methods in Molecular Biology [分子生物學方法] (2007) 378:33-52) 中所述的 ELISA (略作修改) 進行篩選。簡而言之, 將 sCEA、CHIM、CEACAM6 或

CEA-v 分別以 3 $\mu\text{g/ml}$ 的低濃度包被在 96 孔板中。使用 HRP-連接的抗小鼠 IgG 抗體(目錄號 7076S, 美國的細胞傳導技術公司(Cell Signaling Technology, USA)) 和底物 (目錄號 00-4201-56, 美國的伊生物技術公司 (eBioscience, USA)) 進行顯色, 並使用酶標儀 (SpectraMax Paradigm™, 美國的分 子設備公司(Molecular Devices, USA)) 測量 450 nm 波長處的吸光度信號。使用 L929/huCEA 和/或 MKN45 細胞(ATCC)藉由 FACS 進一步驗證 ELISA 陽性植株。MKN45 細胞來源於人胃癌。將表現 CEA 的細胞 (10^5 個細胞/孔) 與 ELISA 陽性融合瘤上清液一起孵育, 隨後與 Alexa Fluro-647 標記的山羊抗小鼠 IgG 抗體 (目錄號 A0473, 中國的碧雲天生物技術公司 (Beyotime Biotechnology, China)) 結合。使用流式細胞儀 (Guava easyCyte™ 8HT, 美國的默克密理博公司(Merck-Millipore, USA)) 定量細胞螢光。

【0140】 對來自融合瘤的在 FACS 篩選中表現出陽性信號並且與 CHIM 而不是 CEACAM6 和 sCEA 結合的條件培養基進行功能測定, 以評估 sCEA 的存在對 CEA 抗體與 CEA 表現細胞的結合的影響 (參見下面的實例)。對具有所需結合特異性和功能活性的抗體進一步亞選殖和表徵。

融合瘤亞選殖和對無血清或低血清培養基的適應

【0141】 主要藉由 ELISA、FACS 和功能測定進行初步篩選後, 藉由有限稀釋亞克選殖性融合瘤植株。通過功能測定而驗證的靠前抗體亞植株在含 3% FBS 的 CDM4MAb 培養基 (目錄號 SH30801.02, 美國的海植株公司 (Hyclone, USA)) 中適應生長。

單株抗體的表現和純化

【0142】 將融合瘤細胞在 CDM4MAb 培養基(目錄號 SH30801.02, 海殖株公司)中培養,並在 37°C 下、在 CO₂ 培養箱中孵育 5 至 7 天。通過離心收集條件培養基並在純化前通過 0.22 μm 膜過濾。依照製造商的指導中的方案應用含有鼠抗體的上清液並結合到蛋白 A 柱(目錄號 17127901, 通用生命科學公司(GE Life Sciences))。該程序通常產生純度高於 90%的抗體。將蛋白 A 親和純化的抗體用 PBS 透析或使用 HiLoad 16/60 Superdex™ 200 柱(目錄號 17531801, 通用生命科學公司)進一步純化以去除聚集物。藉由測量 280 nm 處的吸光度來確定蛋白質濃度。將最終的抗體製劑以等分試樣儲存在 -80°C 冰箱中。

[表 2]：胺基酸和核酸序列

SEQ ID NO :	構建體	序列
SEQ ID NO: 52	全長人 CEA	MESPSAPPHRWCIWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVA EGKEVLLL VHNLPQH LFGYSWYKGERVDG NRQIIGYVIGTQQAT PGPAYSGREI IYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQ FRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWVWN NQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARR SDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYS WVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSSGSYTCQAHNSDTGLN RTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYL WVNNQSLPVS PRLQLSNDNRTLTL LSVTRNDVGPYECGIQNEL SVDHSDPVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNLSLSCHAASN PPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGH SRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTY LWVNGQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGI QNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSAS NPSPQYSWRINGIPQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLAT GRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
SEQ ID NO: 53	獼猴 CEA	MGSPSAPLHRWCIPWQTL LLLTASLLTFWNPPTTAQLTIESRPFNVA EGKEVLLL AHNVSQNLFGYIWKGERVDASRRIGSCVIRTQQITP GPAHSGRETIDFNASLLIHNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATG

		<p>QFRVYPELPKPYISSNNSNPVEDKDAVALTCEPETQDTTYLWVW NNQSLPVSRLLELSSDNRTLTVFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRR SDPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLTCHAASNPTAQYF WFNNGTFQOSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRRTVT AITVYAEPLKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQDTTYLWVW NNQSLSVSSRLELSSDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRRS DPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAQYS WFNNGTFQOSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATG LNRTTVAITVYVELPKPYISSNNSNPIEDKDAVTLTCEPVAENTT YLWVWNNQSLSVSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTGPYECGI QNSESAKRSDPVTNLNVTYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLSCHS DSNPSPQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNSGAYACFVSNLAT GRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSARATVGHIGMLVGVALM</p>
SEQ ID NO: 54	全長人 CEACAM6	<p>MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNV AEGKEVLLLAHNLPQNRIGYSWKGERVDGNSLIVGYVIGTQQ ATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVNQNDTGFYTLQVIKSDLVNEE ATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLW WVNGQSLPVSRLQLSNGNMTLTLSSVKRNDAGSYECEIQN PASANRSDPVTNLNVLYGPDVPTISPSKANYRPGENLNLSCHAAS NPPAQYSWFINGTFQOSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGL NRRTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI</p>
SEQ ID NO: 55	huCEA 的1-687	<p>MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVA EGKEVLLLVHNLQPQLFGYSWKGERVDGNRQIIGYVIGTQQAT PGPAYSGREIIPNASLLIQNIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQ FRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWVW NNQSLPVSRLQLSNGNRRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARR SDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYS WFNNGTFQOSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLN RTTVTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYL WVVNNQSLPVSRLQLSNDNRTLTLSSVTRNDVGPYECGIQNEL SVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSSLSCHAASN PPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGH SRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTY LWVWNGQSLPVSRLQLSNGNRRTLTLFNVTRNDARAYVCGI QNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSAS NPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLAT GRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGAHHHHHH</p>
SEQ ID NO: 56	猴CEA 的1-690	<p>MGSPSAPLHRWCIPWQTLLLTASLLTFWNPPTAQLTIESRPFNVA EGKEVLLLAHNVSQNLFGYIWKGERVDASRRIGSCVIRTQQITP GPAHSGRETIDFNASLLIHNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATG QFRVYPELPKPYISSNNSNPVEDKDAVALTCEPETQDTTYLWVW NNQSLPVSRLLELSSDNRTLTVFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRR SDPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLTCHAASNPTAQYF</p>

		WVFNQSTQELFIPNITVNNSSGSMCQAHNSATGLNRRTVT AITVYAEKPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQDTTYLWVWN NQSLSVSSRLELSDNRRLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRRS DPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCAASNPAQYS WVFNQSTQELFIPNITVNNSSGSMCQAHNSATG LNRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPIEDKDAVTLTCEPVAENTT YLWVWNNQSLSVSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTGPYECGI QNSESAKRSDPVTLNVTYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLSCS DSNPSPQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNSGAYACFVSNLAT GRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSARAHHHHHH
SEQ ID NO: 57	CEACA M6的1- 320	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNV AEGKEVLLLAHNLQNRIGYSWKGERVDGNSLIVGYVIGTQQ ATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEE ATGQFHVYPELKPSSSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLW WVNGQSLPVPSPRLQLSNGNMTLLSVKRNDAGSYECEIQN PASANRSDPVTLNVLYGPDVPTISPSKANYRPGENLNLSCAAS NPPAQYSWFINGTFQSTQELFIPNITVNNSSGSMCQAHNSATGL NRRTVTMITVSGHHHHHH
SEQ ID NO: 58	huCEA 的1-78	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVA EGKEVLLLHNLQHLFGYSWKGERVDGNRQIIGYVIGTQQAT PGPAYSGREIIPNASLLIQNIQN
SEQ ID NO: 59	huCEA 的398- 687	ELSVDHSDPVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNLSSLSCAAS NPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASG HSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTT YLWVWNGQSLPVPSPRLQLSNGNRRLTLFNVTRNDARAYVCGIQ NSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASN PSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLAT GRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGA
SEQ ID NO: 60	CEA-v	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVA EGKEVLLLHNLQHLFGYSWKGERVDGNRQIIGYVIGTQQAT PGPAYSGREIIPNASLLIQNIQNELSDHSDPVILNVLYGPDPT ISPSYTYRPGVNLSSLSCAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQ ELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSIS SNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWVWNGQSLPVPSPRLQL SNGNRRLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGP DTPIHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPPQYSWRINGIPQQHT QVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGL SAGAHHHHHH
SEQ ID NO: 61	CEACA M6的1- 273	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNV AEGKEVLLLAHNLQNRIGYSWKGERVDGNSLIVGYVIGTQQ ATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEE ATGQFHVYPELKPSSSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLW WVNGQSLPVPSPRLQLSNGNMTLLSVKRNDAGSYECEIQN

		PASANRSDPVTLNVLYGPDVPTIS
SEQ ID NO: 62	huCEA 的596- 687	PIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVL FIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLS GA
SEQ ID NO: 63	CHIM	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNV AEGKEVLLLAHNLPQNRIGYSWKGERVDGNSLIVGYVIGTQQ ATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVNQNDTGFYTLQVIKSDLVNEE ATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLW WVNGQSLPVPRLQLSNGNMTLTLSSVKRNDAGSYECEIQN PASANRSDPVTLNVLYGPDVPTISPIISPPDSSYLSGANLNLSCHS ASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTYACFVSNLA TGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGAHHHHHH
SEQ ID NO: 64	CEACA M1	MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMPFN VAEGKEVLLLHNLPPQLFGYSWKGERVDGNRQIVGYAIG TQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVNQNDTGFYTLQVIKSDL VNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDT TYLWWINNQSLPVPRLQLSNGNRTLTLSSVTRNDTGPYECEIQ NPVSANRSDPVTLNVTYGPDPTPTISPSDTYYRPGANLSLSCYAAS NPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANNSV TGCNRTTVKTIIVTELSPVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCST NDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTTSLINPVKREDAGTY WCEVFNPIKSNQSDPIMLVNRYNALPQENGLSPGAIAGIVIGVVA LVALIAVALACFLHFGKTGSSGPLQ
SEQ ID NO: 65	CEACA M3	MGPPSASPHRECIPWQGLLLTASLLNFWNPPTAKLTIESMPLSV AEGKEVLLLHNLPHLFGYSWKGERVDGNSLIVGYVIGTQ QATPGAAYS GRETIYTNASLLIQNVNQNDIGFYTLQVIKSDLVN EEATGQFHVYQENAPGLPVGAVAGIVTGVLVGVVALVAALVCFL LAKTGRTSIQRDLKEQQPQALAPGRGPHSSAFMSPLSTAQAP LPNPRTAASIYEELLKHDTNIYCRMDHKAEVAS
SEQ ID NO: 66	CEACA M7	MGSPSACPYRVCIPWQGLLLTASLLTFWNLPSAQTNIDVVPFN VAEGKEVLLLVHNESQNLGYNWKGERVHANYRIIGYVKNI SQENAPGPAHNGRETIYPNGTLLIQNVTHNDAGIYTLHVIKENLV NEEVTRQFYVFSEPPKPSITSNNFNPVENKDIVVLTCPETQNTT YLWVWNNQSLVSPRLLLSTDNRTLVLLSATKNDIGPYECEIQNP VGASRSDPVTLNVRYESVQASSPDL SAGTAVSIMIGVLAGM ALI
SEQ ID NO: 67	CEACA M8	MGPISAPSCRWRIPWQGLLLTASLTFWNPPTAQLTIEAVPSNAA EGKEVLLLHNLPPQDPRGYNWKGETVDANRRIIGYVISNQQ ITPGPAYSNRETIYPNASLLMRNVTRNDTGSYTLQVIKLNLMSE EVTGQFSVHPETPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQNTTYL WVNGQSLPVPRLQLSNGNRTLTLSSVTRNDVGPYECEIQNPA SANFSDPVTLNVLYGPDAPTISPSDTYYHAGVNLNLSCHAAS NPPSQYSWSVNGTFQQYTQKLFIPNITTKNSGSYACHTTNSATGR

		NRTTVRMITVSDALVQGSSPGLSARATVVSIMIGVLRVALI
SEQ ID NO: 68	全長人 CEA DNA	<p> ATGGAGTCTCCCTCGGCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCC TGGCAGAGGGCTCCTGCTCACAGCTCCTACTTCTAACCTTCTGG AACCCGGCCACCACCTGCCAAGCTCCTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCGCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCAC AATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGT GAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATATGTAATA GGAACTCAACAAGCTACCCAGGGCCCCGATACAGTGGTCCG AGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATC ATCCAGAATGACACAGGATCTACACCTTACACGTCATAAAG TCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCGGGGT ATACCCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAATC CAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACTGTG AACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACTTGTGGTGGGTAAC AATCAGAGCTTCCGGTCACTCCAGGCTGCAGCTGTCCAAI GGCAACAGGACCTCCTACTTATTCAATGTCACAAGAAATGAC ACAGCAAGCTACAATAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGGAGTGC CAGGGCCAGTGTATCAGTCACTTGAATGTCCTCTATGGCC GGATGCCCCACCATTTCCTCTAAACACATCTTACAGATCA GGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCAACGCAGCCTCTAACCC ACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCA ATCCACCC AAGAGCTCTTTATCCCAACATCAC TGTGATAAT AGTGGATCTATACGTGCCAAGCCATAACTCAGACACTGGC CTCAATAGGACCACAGTCAAGACGATCACAGTCTATGCAGAG CCACCCAAACCTTCATCACCAAGCAACAAC TCCAACCCGT GGAGGATGAGGATGCTGTAGCTTAACCTGTGAACCTGAGAT TCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGTAAATAATCAGAGCCT CCCGGTCACTCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGA CCCTCACTCTACTCAGTGTCAACAAGGAATGATGTAGGACCT </p>

		<p>ATGAGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTGACCACAGC GACCCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCCAGACGACCCC ACCATTTCCTCCCTCATAACCTATTACCGTCCAGGGGTGAACC TCAGCCCTCTCTGCCATGCAGCCTCTAACCACCTGCCACAGT ATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAG AGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCT ATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGG ACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCCGAGCTGCCCAA GCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAACCCCGTGGAGGACA AGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAAC ACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCACAGTC AGTCCCAGGCCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGLACCTCAC TCATTCAATGTCACAAGAAATGACGCCAAGAGCCTATGTATG TGGAAATCCAGAACTCAGTGAGTGC AAACCGCAGTGCACCCAG TCACCCCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTTC CCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCCGGGAGCGGAACCTCAACCT CTCTGCCACTCGGCCTCTAACCCTATCCCGCAGTATCTTTGG CGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTT ATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCGTGT TTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCCAATAATCCATAGTCA AGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCTCTCTGGTCTCT CAGCTGGGGCCACTGTCCGCATCATGATTGGAGTGCTGGTTG GGGTTGCTCTGATATAG</p>
--	--	---

SEQ ID NO: 69	猴CEA DNA	ATGGGGICTCCCTCAGCCCCCTCTTCACAGATGGTGCATCCCC TGGCAGACGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCGCCACCCTGCCCAGCTCACTATTGAATCCAGGCCG TTCAATGTTGCAGAGGGGAAGGAGGTTCTTCTACTTGCCAC AATGTGTCCCAGAATCTTTTTGGCTACATTTGGTACAAGGGA GAAAGAGTGGATGCCAGCCGTCGAATTGGATCATGTGTAATA AGAACTCAACAAATTACCCCAGGGCCCGCACACAGCGGTCCG AGAGACAATAGACTTCAATGCATCCCTGCTGATCCACAATGT CACCCAGAGTGACACAGGATCCTACACCATAACAAGTCATAAA GGAAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCGGGG TATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTACATCTCCAGCAACAAC CCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTAACCTGT GAACCTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAA CAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGGAGCTGTCCA GTGACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAATG ACACAACATCCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGT GTCAGACGCAGCGACCCAGTCACCCCTGAACGTCCTCTATGG CCCGGATGGCCACCATTTCCTCTAAACACACCTTACAG AGCAGGGGAAAATCTGAACCTCACCTGCCACGCAGCCTCTA ACCCAACTGCACAGTACTTTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCC AGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGA ATAATAGCGGATCCTATATGTGCCAAGCCATAACTCAGCCAC TGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTACGC GGAGCTGCCCAAGCCCTACATCACCAGCAACAACCTCCAACC CCATAGAGGACAAGGATGCTGTGACCTTAACCTGTGAACCTG AGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAG
---------------------	-------------	---

		<p>AGCCTCTCGGTCAGTTCAGGCTGGAGCTGTCCAATGACAA CAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAACGACACAAC GTTCTACGAATGTGAGACCCAGAACCCAGTGAGTGTGAGAC GCAGCGACCCAGTCACCCTGAATGTCTCTATGGCCCCGGATG CGCCACCATTTCCCTCTAAACACACCTTACAGAGCAGGGG AAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCAGCTG CACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCCAGCAATCCA CACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATAGCG GATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCCTCA ATAGGACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTAIGTGGAGCTGC CCAAGCCCTACATCTCCAGCAACAACCTCCAACCCCATAGAGG ACAAGGATGCTGTGACCTTAACCTGTGAACCTGTGGCTGAG AACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCTC GGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTCTCCAATGGCAACAGGATCCT CACTCTACTCAGTGTACACGGGAATGACACAGGACCCTATGA ATGTGGAATCCAGAACTCAGAGAGTGCAAAACGCAGTGACC CAGTCACCCTGAATGTACCTATGGCCAGACACCCCCATCA TATCCCCCCCAGACTTGTCTTACCGTTCGGGAGCAAACCTCA ACCTCTCTGCCACTCGGACTCTAACCCATCCCCGCAGTATTC TTGGCTTATCAATGGGACACTGCGGCAACACACACAAGTTCT CTTTATCTCCAAAATCACATCAAACAATAGCGGGGCCTATGCC TGTTTGTCTCIAACTTGGCTACCGGTCGCAATAACTCCATAG TCAAGAACATCTCAGTCTCTCTGGCGATTGAGCACCTGGAA GTTCTGGTCTCTCAGCTAGGGCTACTGTGGGCATCATAATTGG AATGCTGGTTGGGGTTGCTCTGATGTAG</p>
<p>SEQ ID NO: 70</p>	<p>全長人 CEACA M6 DNA</p>	<p>ATGGGACCCCCCTCAGCCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCC TGGAAGGAGGTCTGTCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCACCCACCCTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCCGAGAGGGGAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCAC AACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACAGCTGGTACAAAGGC GAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATATGTAATA GGAACTCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATAAGTGGTCCG AGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGT CACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAA GTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCATGT ATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC CAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTG AACCTGAGGTTCAGAACAACCTACCTGTGGTGGGTAAAT GGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAA TGGCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTCAAAGGAACG ATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTG CCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCTCTATGGCC CAGATGTCCCCACCATTTCCCTCAAAAGGCCAATTACCGTC CAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAAC CCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTATCAATGGGACGTTCCAG CAATCCACACAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAAT AATAGCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTG GCCTCAATAGGACCACAGTCACGATGATCACAGTCTCTGGAA</p>

		GTGCTCCIGTCCICTCAGCTGTGGCCACCGTCGGCATCACGA TTGGAGTGCTGGCCAGGGTGGCTCTGATATAG
--	--	--

SEQ ID NO: 71	huCEA DNA的 1-687	ATGGAGICTCCCTCGGCCCCCCCCACAGATGGTGCATCCCC TGGCAGAGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCGCCACCCTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCGCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCAC AATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGT GAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATATGTAATA GGAECTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCCGCATACAGTGGTCCG AGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATC ATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAG TCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGT ATACCCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC CAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCCTTACCTGTG AACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTAAC AATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAAT GGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGAC ACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGC CAGGCGCAGTGATTCAGTCATCCTGAAIGTCCCTATGGCCC GGATGCCCCACCATTTCCTTCTAAACACATCTTACAGATCA GGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCC ACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCA ATCCACCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAAT AGTGGATCCTATACGTGCCAAGCCCATAACTCAGACACTGGC CTCAATAGGACCACAGTCACGACGATCACAGTCTATGCAGAG CCACCCAACCCTTCATCACCAGCAACAACCTCCAACCCCGT GGAGGATGAGGATGCTGTAGCCTTAACCTGTGAACCTGAGAT TCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAATAATCAGAGCCT CCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGA CCCTCACCTACTCAGTGTACAAGGAATGATGTAGGACCCT ATGAGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTGTGACCACAGC GACCCAGTCACTCTGAATGTCCTCTATGGCCCAGACGACCCC ACCATTTCCTCCCTCATAACCTATTACCGTCCAGGGGTGAACC TCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGT ATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAG AGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCT ATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGG ACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAA GCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCAAACCCCGTGGAGGACA AGGATGCTGTGGCCTTACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAAC ACAACCTACCTGTGGTGGGTAATAATGGTCAGAGCCTCCCAGTC AGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCCTCAC TCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATG TGGAAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCCGAGTGACCCAG TCACCCCTGGATGTCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTTC CCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCCGGGAGCGAACCTCAACCT CTCCTGCCACTCGGCCCTAAACCCATCCCCGAGTATTCTTGG CGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTT ATCGCCAAAATCAGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGT
---------------------	------------------------	--

		TTTGICTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCA AGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACTTCTCCTGGTCTCT CAGCTGGGGCCCATCACCATCACCATCAC
--	--	--

SEQ ID NO: 72	猴CEA DNA的 1-690	ATGGGGTCTCCCTCAGCCCCCTTTCACAGATGGTGCATCCCC TGGCAGACGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCGCCACCCTGCCCAGCTCACTATTGAATCCAGGCCG TTCAATGTTGCAGAGGGGAAGGAGGTTCTTCTACTTGCCCAC AATGTGTCCCAGAATCTTTTTGGCTACATTTGGTACAAGGGA GAAAGAGTGGATGCCAGCCGTCGAATTGGATCATGTGTAATA AGAACTCAACAAATTACCCAGGGCCCCGCACACAGCGGTCC AGAGACAATAGACTTCAATGCATCCCTGCTGATCCACAATGT CACCCAGAGTGACACAGGATCCTACACCATAACAAGTCATAAA GGAAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCGGGG TATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTACATCTCCAGCAACA ACTCCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTAACCTGT GAACCTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGGGTA AAA CAATCAGAGCCTCCCGGTCAAGTCCCAGGCTGGAGCTGTCCA GTGACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAATG ACACAACATCCTACAAATGTGAAACCCAGAACCAGTGAGT GTCAGACGCAGCGACCAGTCACCCGTAACGTCCTCTATGG CCCGGATGCGCCACCATTTCCCCTCTAAACACACCTTACAG AGCAGGGGAAAATCTGAACCTCACCTGCCACGCAGCCTCTA ACCCAACTGCACAGTACTTTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCC AGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGA ATAATAGCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCAC TGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTACGC GGAGCTGCCCAAGCCCTACATCACAGCAACA ACTCCAACC CCATAGAGGACAAGGATGCTGTGACCTTAACCTGTGAACCTG AGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGGGTAACAATCAG AGCCTCTCGGTCAGTTCAGGCTGGAGCTGTCCAATGACAA CAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAACGACACAAC GTTCTACGAATGTGAGACCCAGAACCAGTGAGTGTGACAC GCAGCGACCCAGTCACCCGTAATGTCTCTATGGCCCCGGATG CGCCACCATTTCCCCTCTAAACACACCTTACAGAGCAGGGG AAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCAGCTG CACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCCAGCAATCCA CACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATAGCG GATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCA ATAGGACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTATGTGGAGCTGC CCAAGCCCTACATCTCCAGCAACA ACTCCAACCCCATAGAGG ACAAGGATGCTGTGACCTTAACCTGTGAACCTGTGGCTGAG AACACAACCTACCTGTGGTGGGTAACAATCAGAGCCTCTC GGTCACTCCCAGGCTGCAGCTCTCCAATGGCAACAGGATCCT CACTCTACTCAGTGTACACGGAAATGACACAGGACCCTATGA ATGTGGAATCCAGA ACTCAGAGAGTGCAAAACGCAGTGACC CAGTCACCCGTAATGTCACTATGGCCCAGACACCCCCATCA TATCCCCCCCAGACTTGTCTTACCGTTTCGGGAGCAAACCTCA ACCTCTCCTGCCACTCGGACTCTAACCCATCCCCGCAGTATTC TTGGCTTATCAATGGGACACTGCGGCAACACACACAAGTTCT
---------------------	-----------------------	---

		CTTTATCTCCAAAATCACATCAAACAATAGCGGGGCTATGCC TGTTTIGTCTCTAACTTGGCTACCGGTCGCAATAACTCCATAG TCAAGAACATCTCAGTCTCCTCTGGCGATTGAGCACCTGGAA GTTCTGGTCTCTCAGCTAGGGCTCATCACCATCACCATCAC
SEQ ID NO: 73	CEACA M6 DNA的 1-320	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCC TGGAAGGAGGTCTTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCACCCACCACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCCGAGAGGGGAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCAC AACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACAGCTGGTACAAAGGC GAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATATGTAATA GGAACTCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATAACAGTGGTCCG AGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGT CACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCCTACAAGTCATAAA GTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCATGT ATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC CAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCCTCACCTGTG AACCTGAGGTTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAT GGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAA TGGCAACATGACCCCTCACTCTACTCAGCGTCAAAGGAACG ATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTG CCAACCGCAGTGACCCAGTCACTTGAATGTCTCTATGGCC CAGATGTCCCCACCATTTCCCCCTCAAAGGCCAATTACCGTC CAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAAC CCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTATCAATGGGACGTTCCAG CAATCCACACAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAAT AATAGCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTG GCCTCAATAGGACCACAGTCACGATGATCACAGTCTCTGGAC ATCACCATCACCATCAC
SEQ ID NO: 74	huCEA DNA的 1-78	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCC TGGCAGAGGCTCCTTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCGCCCACCACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCCGAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCAC AATCTGCCCCAGCATCTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGT GAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATATGTAATA GGAACTCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATAACAGTGGTCCG AGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATC ATCCAGAAT

SEQ ID NO: 75	huCEA DNA的 398-687	GAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTC CTCTATGGCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATAACCT ATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAG CCTCTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGA ACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCA CTGAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAACT CAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGACAATCACA GTCTCTGCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAAC TCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTG TGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAA ATGGTCAGAGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCC AATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAAT GACGCAAGAGCCATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGT GCAAACCGCAGTGACCCAGTCACCCCTGGATGTCTCTATGGG CCGGACACCCCATCATTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTT CGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCCTTAACC CATCCCCGCAGTATTCTTGGGGTATCAATGGGATAACCGCAGCA ACACACACAAGTTCCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAAATAA TAACGGGACCATGCTGTGTTTGTCTCTAACCTGGCTACTGGC CGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTG GAACTTCCTCGGTCTCTCAGCTGGGGCC
---------------------	--------------------------	--

SEQ ID NO: 76	CEA-v DNA	<p>ATGGAGTCTCCCTCGGCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCC TGGCAGAGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCGCCACCCTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCCGAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCAC AATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGT GAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATATAGGATATGTAATA GGAACTCAACAAGCTACCCCAAGGGCCCGCATACAGTGGTCG AGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATC ATCCAGAATGAATTAAGTGTGACCACAGCGACCCAGTCATC CTGAATGTCTCTATGGCCCAGACGACCCACCATTCCCCC TCATACACCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCC TGCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTG ATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTTTATC TCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAG GCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAA GACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTC CAGCAACAACCTCCAAACCCGTTGGAGGACAAGGATGCTGTGG CCTTCACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACAACAACCTAUCTGT GGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCAGTCAGTCCCAGGCTG CAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCTCCTCTATTCAATGTC ACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAA CTCAGTGAGTGCAAAACCCAGTGACCCAGTCAACCCTGGATG TCCTCTATGGGCCGGACACCCCATCATTTCCCCCCCAGACT CGTCTTACCTTTCCGGAGCGAACCCTCAACCTCTCCTGCCACT CGGCCTCTAACCCATCCCCGAGTATTCTTGGCGTATCAATGG GATACCGCAGCAACACACACAAGTCTCTTTATCGCCAAAAT CACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCTGTGTTTGTCTCTAAC TTGGCTACTGGCCGCATAAATTCATAGTCAAGAGCATCACAA GTCTCTGCATCTGGAACCTCTCTGGTCTCTCAGCTGGGGCC CATCACCATCACCATCAC</p>
SEQ ID NO: 77	CEACA M6 DNA的 1-273	<p>ATGGGACCCCCCTCAGCCCCCTCCCTGCAGATTGCATGICCCC TGGAAGGAGGTCCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCACCCACCCTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCCGAGAGGGGAAGGAGGTCTTCTACTCGCCAC AACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACAGCTGGTACAAAGGC GAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATATGTAATA GGAACTCAACAAGCTACCCCAAGGGCCCGCATACAGTGGTCG AGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGT CACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCCTACAAGTCATAAA GTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCCGGACAGTTCATGT</p>

		ATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC CAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTG AACCTGAGGTTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAT GGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAA TGGCAACATGACCCTCACCTACTCAGCGTCAAAGGAACG ATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTG CCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCTCTATGGCC CAGATGTCCCCACCATTTCC
SEQ ID NO: 78	huCEA DNA的 596-687	CCCATCATTTCACCCAGACTCGTCTTACCTTTCGGGAGCG AACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCCTTAACCCATCCCCG CAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACA CAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGG ACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATA ATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCT CTCCTGGICTCTCAGCTGGGGCC
SEQ ID NO: 79	CHIM DNA	ATGGGACCCCTCAGCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCC TGGAAGGAGGTCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGG AACCCACCCACCACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCG TTCAATGTCCGAGAGGGGAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCAC AACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACAGCTGGTACAAAGGC GAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATATGTAATA GGAActCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATAcAGTGGTCG AGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGT CACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCTACAAGTCATAAA GTCAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCATGT ATACCCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTC CAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTG AACCTGAGGTTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAT GGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAA TGGCAACATGACCCTCACCTACTCAGCGTCAAAGGAACG ATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTG CCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCTCTATGGCC CAGATGTCCCCACCATTTCCCCCATCATTTCCCCCCCAGACTC GTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTC GGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGG ATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATC ACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGICTCTAACT TGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAG TCTCTGCATCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCC ATCACCATCACCATCAC

實例 2. CEA 抗體的選殖和序列分析

【0143】 根據製造商的方案，使用 Ultrapure RNA 套組 (kit) (目錄號 74104，德國的凱傑公司 (QIAGEN, Germany)) 收穫鼠融合

瘤細胞以製備總 RNA。使用來自英傑公司的 cDNA 合成套組（目錄號 18080-051）合成第一條股 cDNA，並使用 PCR 套組（目錄號 CW0686，中國北京的康為世紀公司（CWBio, Beijing, China））進行鼠單株抗體的 VH 和 VL 基因的 PCR 擴增。基於先前報導的序列（Brocks 等人, Mol Med. [分子醫學] 2001 7(7):461-9）合成用於重鏈可變區（VH）和 κ 輕鏈可變區（VL）的抗體 cDNA 選殖的寡核苷酸引物。然後將 PCR 產物亞選殖到 pEASY-Blunt 選殖載體（目錄號 CB101-02，中國的全式金公司（TransGen, China））中，並定序。從 DNA 定序結果確定 VH 和 VL 區的胺基酸序列。

【0144】單株抗體藉由比較序列同源性來分析，並基於序列相似性分組（圖 2）。根據 IMGT（Lefranc 等人, 1999 Nucleic Acids Research [核酸研究] 27:209-212）系統藉由序列注釋來定義互補決定區（CDR）。代表性殖株 BGA13 的胺基酸序列在表 3 中列出。

[表 3]：胺基酸序列

BGA13 (IMGT)	SEQ ID NO: 80	HCDR1 (IMGT)	GYIFTSYW
	SEQ ID NO: 81	HCDR2 (IMGT)	INPNTGYT
	SEQ ID NO: 3	HCDR3 (IMGT)	AREYGNVNYPLDY
	SEQ ID NO: 82	LCDR1 (IMGT)	ENIYGY
	SEQ ID NO: 83	LCDR2 (IMGT)	NA
	SEQ ID NO: 84	LCDR3 (IMGT)	QHHYGTPYT
BGA13	SEQ ID NO: 85	VH	QVQLQQSGAELAKSGASVKMSCKASGYIFT SYWLHWVKQRPGQGLEWIGYINPNTGYTNY SQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCAREYGNVNYPLDYWGQGTSVTVSS
[0001]	SEQ ID NO: 86	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYGY LAWYQQKQKGKSPQLLVFNAKNLVEGVPSRF

			SGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYG TPYTFGGGKLEIK
--	--	--	--

實例 3. 純化的鼠抗 CEA 抗體之結合概況測定

【0145】 藉由使用 BIAcore™ T-200 (通用生命科學公司) 的 SPR 測定，表徵了具有 CEA 特異性結合 (如藉由 ELISA 和 FACS 顯示的) 以及沒有 sCEA 干擾的 CEA 抗體的結合動力學 (圖 3A)。簡言之，將抗鼠 IgG 抗體固定在活化的 CM5 生物感測器晶片 (目錄號 BR100530, 通用生命科學公司) 上。使純化的鼠抗體流過晶片表面並被抗鼠 IgG 抗體捕獲。然後使純化的 CHIM、CEA-v、CEA 或猴 CEA 重組蛋白的連續稀釋液 (6.0 nM 至 2150 nM) 流過晶片表面，並藉由使用一對一 Langmuir 結合模型 (BIA 評估軟體，通用生命科學公司) 分析表面電漿共振信號的變化以計算締合速率 (k_{on}) 和解離速率 (k_{off})。將平衡解離常數 (K_D) 計算為比率 k_{off}/k_{on} 。BGA13 的結合親和力概況在下表 4 中示出。

【0146】 通過抗原 ELISA 檢查 BGA13 的結合概況，觀察到純化的 BGA13 與 huCEA 和猴 CEA 的結合，這表明 BGA13 對可溶性 huCEA 和猴 CEA 係弱結合劑，或者可溶性 CEA 在固定時具有不同的構象 (圖 3B)。對於該實驗，將 sCEA、CHIM、猴 CEA、CEA-v 和 BSA 以 10 µg/ml 的高濃度在 4°C 下包被在 96 孔板中過夜。BGA13 或對照抗體 ab4451 (目錄號 ab4451, 美國的艾博抗公司 (abcam, USA)) 以 2 µg/ml 的濃度孵育 1 小時。使用 HRP-連接的抗小鼠 IgG 抗體 (目錄號 7076S, 美國的細胞傳導技術公司) 和底物 (目錄號 00-4201-56, 美國的伊生物技術公司) 進行顯色，並使用酶標儀 (SpectraMax Paradigm, 美國的分生設備公司) 測量 450

nm 波長處的吸光度信號。

[表 4]：藉由 SPR 比較 BGA13 結合親和力

抗原	KD (M)
sCEA	ND
sCEA-v	1.50E-07
CHIM	1.20E-07
猴CEA	ND (由於結合較弱，無法檢測到)

實例 4. 重組可溶性 CEA 對 BGA13 與 CEA 表現細胞的結合之影響

【0147】 通過流式細胞術評估可溶性 CEA 的存在對各種 CEA 抗體與 CEA 表現細胞的特異性結合之影響。簡言之，在 20 µg/ml 額外的重組可溶性 CEA 蛋白的存在下，將表現人 CEA 的細胞（10⁵ 個細胞/孔）與 2 µg/ml 純化的 CEA 鼠單株抗體一起孵育，隨後與 Alexa Fluro-647 標記的山羊抗小鼠 IgG 抗體（目錄號 A0473，中國的碧雲天生物技術公司）結合。使用流式細胞儀（Guava easyCyte™ 8HT，美國的默克密理博公司）定量細胞螢光。如圖 4A 和圖 4B 所示，BGA13 與 CEA 表現細胞的結合不受可溶性 CEA 存在的影響。

實例 5. 鼠抗人 CEA 抗體的人源化

mAb 人源化和工程化

【0148】 對於 BGA13 的人源化，藉由在 IMGT 和 NCBI 的人免疫球蛋白基因數據庫中進行序列比較，搜索人種系 IgG 基因中與 BGA13 可變區的 cDNA 序列具有高度同源性的序列。選擇以高頻

率存在於人抗體庫（Glanville 等人，2009 PNAS [美國國家科學院院刊] 106:20216-20221）中並且與 BGA13 高度同源的人 IGVH 和 IGVL 基因作為人源化的模板。在人源化之前，將 BGA13 重鏈和輕鏈可變結構域分別與命名為人 IgG1wt 的野生型人 IgG1 恒定區（SEQ ID NO: 87）和人 κ 恒定（CL）區（SEQ ID NO: 88）融合。

[表 5]：胺基酸序列

SEQ ID NO: 87	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1wt
SEQ ID NO: 88	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	CL

【0149】藉由 CDR 移植進行人源化(Methods in Molecular Biology [分子生物學方法], 第 248 卷: Antibody Engineering, Methods and Protocols [抗體工程、方法和方案], Humana Press [胡馬納出版社]) 並將 BGA13 抗體以人 IgG1 形式工程化。在第一輪人源化中，框架區中從鼠到人胺基酸殘基的突變由模擬的 3D 結構指導，並且在人源化抗體 BGA13 的第一版本 BGA131 中保留了對於維持 CDR 的規範結構具有結構重要性的鼠框架殘基（重鏈和輕鏈的胺基酸序列在 SEQ ID NO: 89 和 90 中示出）。

[表 6]：胺基酸序列

SEQ ID NO: 89	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGL</p> <p>EWIGYINPNTGYTNYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAV</p> <p>YYCAREYGNVNYPLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</p> <p>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</p> <p>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</p> <p>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY</p> <p>VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVVS</p> <p>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY</p> <p>PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN</p> <p>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	BGA131 重鏈
SEQ ID NO: 90	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLLI</p> <p>YNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHHYGTPYT</p> <p>FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</p> <p>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHK</p> <p>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	BGA131 輕鏈

【0150】 具體地，將 BGA13 VL 的 CDR 移植到保留了 2 個鼠框架殘基（N66 和 V68）的人種系可變基因 IGVK1-27 的框架中（輕鏈可變結構域的胺基酸序列在 SEQ ID NO: 92 中示出）。將 BGA13 VH 的 CDR 移植到保留了 5 個鼠框架（L39、I53、Y55、N66、S68）殘基的人種系可變基因 IGVH1-46 的框架中（重鏈可變結構域的胺基酸序列在 SEQ ID NO: 91 中示出）。

[表 7]：胺基酸序列

SEQ ID NO: 91	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGL</p> <p>EWIGYINPNTGYTNYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAV</p>	BGA131 VH
---------------	---	--------------

	YYCAREYGNVNYPLDYWGQGLVTVSS	
SEQ ID NO: 92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLLI YNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQHHYGTPY TFGQGTKVEIK	BGA131 VL

【0151】 使用內部開發的表現載體將 BGA13-1 構建為人全長抗體形式，該等表現載體含有野生型人 IgG1 的恒定區，具有容易適應的亞選殖位點。藉由將上述兩種構建體共轉染到 293G 細胞中並使用蛋白 A 柱（目錄號 17543802，通用生命科學公司）純化來實現 BGA13-1 抗體的表現和製備。將純化的抗體在 PBS 中濃縮至 0.5-5 mg/mL 並以等分試樣儲存在 -80°C 冰箱中。

【0152】 使用 BGA131，進行額外數量的單個或多個胺基酸改變，將 VH 和 VL 框架區中的人殘基轉化為相應的鼠種系殘基，其分別包括 VH 中的 V68A、R72A 和 V79A 以及 VL 中的 V43S。這產生 BGA132（VH 中的 V68A、R72A）、BGA133（VH 中的 V79A）、BGA134（VH 中的 V68A、R72A、V79A）、BGA135（VL 中的 V43S）、BGA136（VH 中的 V68A、R72A 和 VL 中的 V43S）、BGA137（VH 中的 V79A、VL 中的 V43S）和 BGA138（VH 中的 V68A、R72A、V79A 和 VL 中的 V43S）。所有含有修飾的抗體都具有與 BGA131 相似的結合活性，並且沒有一種改變消除結合。

【0153】 為了去除翻譯後修飾（PTM）位點，藉由基於 BGA131 序列在 CDR 和框架區中引入突變來進行進一步工程化，該等突變包括 VH 區中的 N52T、N54Q、N59S、N102G、N104Q 和 S61A 胺基酸改變。這產生 BGA131A（N52T（VH））、BGA131B（N54Q（VH））、BGA131C（N59S（VH））、BGA131D（N102G（VH））、BGA131E（N104Q（VH））和 BGA131F（N54Q、N59S、S61A（VH）），並且所有抗體都具有與 BGA131 相似的結合特異性，沒有一種改變消

除結合。在保持特異性的同時，還考慮了胺基酸組成和表現水平。使用在特定位置含有突變的引物和定點誘變套組（目錄號 FM111-02，中國北京的全式金公司）進行所有人源化突變。藉由序列分析驗證所需的突變。與 BGA13-1 相比，BGA13-1F 具有顯著降低的結合親和力，沒有糖基化位點，但具有高表現水平（表 8）。

[表 8]：胺基酸序列

SEQ ID NO: 93	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLLI YNAKNLVEGVPSPRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHYGTPY TFGQGTKVEIK	BGA13-1 VL
SEQ ID NO: 94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGL EWIGYINPQTGYTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAV YYCAREYGNVNYPLDYWGQGLTVSS	BGA13-1F VH

實例 6. 親和力成熟文庫的產生

【0154】 藉由標準分子生物學技術使用噬菌粒載體 pCANTAB 5E（通用電氣醫療集團（GE Healthcare））構建噬菌粒，該噬菌粒被設計成在 M13 噬菌體的表面上展示 BGA13-1F Fab 片段作為與基因-3 次要外殼蛋白片段的 N 末端的融合體。在基因-3 序列之前有一個琥珀終止密碼子，以允許直接從噬菌粒殖株表現 Fab 片段。使用噬菌粒作為模板來構建含有 10^8 個獨特成員的噬菌體展示文庫。

【0155】 構建兩個文庫（H-AM、L-AM），分別隨機化重鏈和輕鏈中的 CDR 位置。所有三個 CDR 在每個文庫中隨機化，但每個 CDR 在每個殖株中具有最多一個突變，HCDR3 除外，其可具有兩個同時突變。每個位置用編碼任何胺基酸的 NNK 密碼子（IUPAC 編碼）或琥珀終止密碼子隨機化。組合的重鏈和輕鏈文庫設計具有 5.0×10^6 個獨特全長殖株的潛在多樣性，沒有終止密碼子或半胱

胺酸密碼子，並且預期分佈分別為約 0.02%、1.1%、17%和 82%的殖株分別具有 0、1、2 和 3 個突變。由於 HCDR3 區域中的引物設計，預期一小部分重鏈殖株具有 4 個突變。作為第一步，使用 pCANTAB 5E（作為模板）和含有隨機化 CDR3 位置的引物擴增 DNA 片段（參見圖 5A 和圖 5B）。然後將 PCR 產物凝膠純化並與含有隨機化 CDR2 位置的引物組裝。用針對隨機 CDR1 位置的引物重複該過程。然後藉由重疊 PCR 將所得的重鏈或輕鏈的 PCR 產物與其相應的 CH 片段或 CL 片段組裝。藉由重疊 PCR 將片段進一步與沒有突變的輕鏈或重鏈組裝。然後將所得片段凝膠純化，並在 NcoI/NotI 消化後與 pCANTAB 5E 連接。藉由電穿孔將純化的連接物轉化到 TG1 細菌中。來自每個文庫的 48 個殖株的定序證實了每個位置的隨機化（數據未示出），儘管由於取樣深度有限，並非在每個位置都觀察到所有的胺基酸突變。約 52%和 55%的輕鏈和重鏈文庫具有全長隨機殖株，足以覆蓋設計的所有潛在多樣性，即使在寡核苷酸合成和文庫構建中存在適度的摻入偏差，也會產生 10^8 個獨立殖株。

實例 7. 親和力成熟的人源化 BGA13 變體的產生

文庫選擇和篩選

【0156】 使用標準方案藉由噬菌體展示進行親和力成熟的人源化 BGA13 Fab 的產生（Silacci 等人, (2005) Proteomics [蛋白質組學], 5, 2340-50；Zhao 等人, (2014) PLoS One [公共科學圖書館：綜合], 9, e111339）。對於第一輪和第二輪選擇，在免疫管（目錄號 470319，賽默飛世爾科技公司（ThermoFisher））中對固定化的 CHIM 進行

競爭選擇。簡言之，免疫管用 1 ml CHIM (5 µg/ml 的 PBS 溶液) 在 4°C 下包被過夜。在各種濃度的 BGA13-1F IgG (第 1 輪, 1 µg/ml; 第 2 輪, 5 µg/ml) 存在下, 將所有親和力成熟文庫與包被的免疫管一起孵育 1 小時。對於第三輪和第四輪選擇, 使用 L929/huCEA 細胞 (第 3 輪) 或 LOVO 細胞 (ATCC CCL-229) (第 4 輪) 進行細胞淘選, 其中 HEK293 細胞作為耗竭細胞。在四輪選擇之後, 挑選單個殖株並使用標準方案製備含有噬菌體的上清液。對 ELISA 陽性殖株定序, 並分析突變位點。

CDR 中的突變頻率分析

【0157】 在四輪選擇之後, 每個 CDR 中的突變頻率相對較高, 範圍從 HCDR3 中的 17% 到 LCDR2 中的 95%。關於重鏈, 在 H-AM 文庫中鑒定的大約一半殖株與親本殖株相同。其他殖株在 HCDR2 中的 Q54N 處含有一個回復突變。

【0158】 在分析輕鏈時, 突變更加多樣化。兩個位點分別在 LCDR1 的幾乎所有殖株中都發生了突變。輕鏈殘基 29 和 31 分別在 47.09% 和 35.29% 的殖株中從 Ile 突變為 Gln 和從 Gly 突變為 Gln。位置 29 不僅具有高頻率的 Gln 突變, 而且具有突變為酪胺酸的殖片子集。位置 31 不僅具有高頻率的 Gln 突變, 而且有約 12.5% 的機會突變為 Leu。由於文庫設計限制, 沒有發現位置 29 和 31 的突變彼此結合。然而, 這兩個位點中的每一個中的突變通常與其他 CDR 中的突變組合。關於 LCDR2, 只有 A51 在至少 64.71% 的殖株中發生突變, 但沒有任何明顯的模式, 其包括大的疏水和極性殘基, 諸如 Tyr、Phe、Thr 和 Asn。關於 LCDR3, 兩個位點在至少 50% 的殖株中發生了突變。輕鏈殘基 90 和 92 分別在 11.76% 和 47.06% 的

殖株中從 His 突變為 Leu 和從 Tyr 突變為 Leu。圖 6 示出了四輪選擇後輕鏈 CDR 區的序列差異。

所選擇的人源化 BGA13 變體的表現

【0159】進行了突變的組合。將來自所選噬菌體殖株的輕鏈可變區亞選殖到人 κ 輕鏈表現哺乳動物表現載體中。將輕鏈表現載體與表現 BGA13-1F 重鏈的哺乳動物表現載體以 1:1 的比例共轉染到 293G 細胞中。藉由蛋白 A 親和層析法（目錄號 17543802，通用生命科學公司）從培養上清液中純化 CEA 抗體形式。將純化的抗體在 PBS 中濃縮至 0.5-5 mg/mL 並以等分試樣儲存在 -80°C 冰箱中。

親和力成熟的人源化 BGA13 變體的表徵

【0160】藉由使用 BIAcore™ T-200（通用生命科學公司）的 SPR 測定（表 9）和流式細胞術（圖 7）進行 BGA13-1F 和其他親和力成熟殖株的親和力比較。對於該實驗，將抗人 IgG (Fc) 抗體固定在活化的 CM5 生物感測器晶片（目錄號 BR100839，通用生命科學公司）上。抗 CEA 抗體流過晶片表面並被抗人 Fab 抗體捕獲。然後使 CHIM 的連續稀釋液（1.37 nM 至 333 nM）流過晶片表面，並藉由使用一對一 Langmuir 結合模型（BIA 評估軟體，通用生命科學公司）分析表面電漿共振信號的變化以計算締合速率 (k_{on}) 和解離速率 (k_{off})。對於流式細胞術，將表現 CEA 的細胞（ 10^5 個細胞/孔）與各種濃度的純化的親和力成熟抗體一起孵育，隨後與 Alexa Fluro-647 標記的抗 hu IgG Fc 抗體（目錄號 409320，美國的百進生化技術公司（BioLegend, USA））結合。使用流式細胞儀（Guava easyCyte™ 8HT，美國的默克密理博公司）定量細胞螢光。

將平衡解離常數 (K_D) 計算為比率 k_{off}/k_{on} 。BGA131F-ph-L (SEQ ID NO: 95) 和 BGA131F-ph-M (SEQ ID NO: 96) 顯示出對 huCEA 表面蛋白的親和力提高 (表 10)。

[表 9]：藉由 SPR 比較結合親和力

樣本ID	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)
1F-ph-E	3.4E+3	3.5E-3	1.0E-6	284
1F-ph-F	1.0E+2	1.2E-2	1.2E-4	4162
1F-ph-G	6.4E+1	2.6E-3	4.1E-5	3487
1F-ph-H	1.1E+2	2.8E-3	2.5E-5	1983
1F-ph-I	2.0E+2	2.2E-3	1.1E-5	2248
1F-ph-L	6.7E+3	3.0E-4	4.6E-8	184
1F-ph-M	2.5E+3	2.5E-4	9.9E-8	224
1F-ph-N	1.1E+3	1.0E-2	9.2E-6	1267
BGA13-1F	1.9E+3	1.5E-3	7.9E-7	367

[表 10]：胺基酸序列

SEQ ID NO: 95	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNFKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHHLGTPY TFGQGTKVEIK	BGA13- 1F-ph-L VL
SEQ ID NO: 96	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNTKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHHLGTPY TFGQGTKVEIK	BGA13- 1F-ph-M VL

實例 8. 親和力成熟的人源化 BGA13 變體的進一步工程化

【0161】 藉由在基於 BGA131F-ph-M 模板的 CDR 中引入突變進行了進一步的工程化，該模板包括 VH 中的 W33Y、Q54N 和 S59N 以及 VL 中的 T51Y。這產生 BGA1132A(W33Y(VH))、BGA1132B(Q54N(VH))、BGA 1132C(S59N(VH))、BGA 1131A(T51Y(VL))，它們都具有改進的與 BGA-1131F 的結合活性，其中改進最大的抗體最終產生具有 (W33Y(VH)、T51Y(VL)) 改變的

BGA113 抗體（表 11），序列在表 12 中示出。

[表 11]：藉由 SPR 比較與 CHIM 的結合親和力

樣本ID	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)
BGA1311F-ph-M	1.97E+04	2.48E-04	1.26E-08	97.2
1132A	1.99E+04	2.82E-04	1.42E-08	129.1
1132B	1.98E+04	3.80E-04	1.92E-08	71.1
1132C	1.84E+04	3.94E-04	2.15E-08	59.4
1131A	3.21E+04	4.63E-04	1.44E-08	92.9
113	3.15E+04	4.75E-04	1.51E-08	112.4

[表 12]：BGA113 的胺基酸和核酸序列

BGA113	SEQ ID NO: 97	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIF TSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYINPQTGY TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLR SEDTAVYYCAREYGNVNYPLDYWGQGLT VTVSS
	SEQ ID NO: 15	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENQY GYLAWYQQKPGKVPKLLIYNYKNLVEGV PSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQ HHLGTPYTFGQGTKVEIK
	SEQ ID NO: 98	VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGCCGCGC GAAGTGAAAAAACC GGGC'CGGAGCGTG AAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATA TTTTACCAGCTATTACCTGCATIGGGTG CGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAAT GGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGC TATACCAGCTATGCCAGAAATTCAGGG CCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGC ACCAGCACCGTGTATATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGIGTA TTATTGCGCGCGGAATATGGCAACTATA ACTATCCGCTGGATTATGGGGCCAGGGC ACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
	SEQ ID NO: 17	VL DNA	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCA GCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAAC

			CAGTATGGCTATCTGGCGTGGIATCAGCA GAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTGCT GATTATAACTATAAAAACCTGGTGGGAAG GCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGG CAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTA GCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGCGAC CTATTATTGCCAGCATCATCTGGGCACCC CGIATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGT GGAAATTA
--	--	--	---

實例 9. BGA113 的優化

【0162】 為了進一步改善生物化學/生物物理學性質，藉由在 CDR 和框架區中引入取代來優化 BGA113 (表 13)。選擇大的疏水殘基並將其改變為極性殘基，K13 和 Q53 除外，它們係基於觀察到的人 VH 種系之間的差異而選擇的。考慮因素包括胺基酸組成、熱穩定性 (Tm)、表面疏水性和等電點 (pI)，同時保持功能活性。如實例 6 所述，藉由選殖到載體 pCANTAB-5E 中以 Fab 形式表現變體。然後藉由 ELISA 和 SPR 分析篩選含有 Fab 的上清液的 CEA 結合。選擇沒有顯著親和力降低的變體並鑒定出可耐受取代的殘基。證明輕鏈中的 L92E，重鏈中的 K13E、Q54E、Y57D/E 和 Y57K 對親和力的影響極小。因此，表現和純化具有單個鑒定出的突變或組合的 IgG 形式的 BGA113 變體，如實例 8 中所述。進行 SPR 研究和 FACS 分析並總結在表 14 中。證實了特異性和表位沒有由於引入的胺基酸取代而發生改變 (數據未示出)。總之，結果表明該等單一或組合突變 (重鏈中的 K13E、Q54E、Y57D 和 Y57K，輕鏈中的 L92E) 對親和力的影響極小，L92E 除外，它略微降低了與 CEA 的結合親和力。總之，Y57K 改變優化了 BGA113 抗體的表現、CEA 結合和親和力，從而產生 BGA113K (表 1)。

[表 13]：用於取代的殘基的總結

殘基	AA取代
H : K13	E
H : Y32	H、N、Q、D、E、K
H : Y33	H、N、Q、D、E、K
H : Q53	A、D、G、N、S、T、Y、R、H
H : Y57	H、N、Q、D、E、K
H : Y100	H、N、Q、D、E、K
H : Y105	H、N、Q、D、E、K
L : V15	T、P、L
L : Y30	H、N、Q、D、E、K
L : Y32	H、N、Q、D、E、K
L : Y49	H、N、Q、D、E、K
L : P80	S、T、A
L : L92	H、N、Q、D、E、K

[表 14]：藉由 SPR 對 BGA113 變體的親和力測量之總結

BGA113變體	動力學 (huCEA)	親和力 (MKN45細胞)
----------	-------------	---------------

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	最高	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
L92E、Y57K	3.34E+04	1.77E-04	5.29E-09	969.9	1.09
L92E	4.17E+04	1.88E-04	4.50E-09	945.4	1.19
Q54E、Y57K	1.10E+05	2.60E-04	2.36E-09	901.9	0.58
Y57K	1.02E+05	1.81E-04	1.77E-09	934.6	0.52
K13E、Y57K	1.28E+05	1.72E-04	1.34E-09	959.9	0.48
Q54E、Y57E	1.17E+05	2.50E-04	2.14E-09	926.9	0.65
Y57D	1.07E+05	1.95E-04	1.82E-09	949.3	0.56
BGA113	1.13E+05	1.69E-04	1.49E-09	919.3	0.49

實例 10. 抗 CEA 抗體 BGA113K 之結合概況

【0163】 BGA113K 和先前揭露的 CEA 抗體(在 U.S. 2012/0251529 中命名為抗體 2F1) 以人 IgG1 形式產生並使用 BIAcore™ T-200 (通用生命科學公司) 藉由 SPR 測定表徵它們的結合動力學。

【0164】 為了獲得該數據，將抗人 IgG(Fc) 抗體固定在活化的 CM5 生物感測器晶片 (目錄號 BR100839, 通用生命科學公司) 上。BGA113K 抗體流過晶片表面並被抗人 Fab 抗體捕獲。然後使可溶性 huCEA 或 cynoCEA (目錄號: CE5-C52H5, 北京百普賽斯生物科技股份有限公司 (Acrobiosystem)) 的連續稀釋液 (1.37 nM 至 2150 nM) 流過晶片表面，並藉由使用一對一 Langmuir 結合模型 (BIA 評估軟體，通用生命科學公司) 分析表面電漿共振信號的變化以計算締合速率 (k_{on}) 和解離速率 (k_{off})。將平衡解離常數 (K_D) 計算為比率 k_{off}/k_{on} 。BGA113K 和 2F1 對照抗體表現出不同的結合親和力。BGA113K 對人 CEA 具有非常高的親和力，對 cynoCEA

也具有相當的親和力，如下**表 15** 所示。

【0165】 對於流式細胞術，將表現 CEA 的 MKN45 細胞（ 10^5 個細胞/孔）與各種濃度的純化的親和力成熟抗體一起孵育，隨後與 Alexa Fluro-647 標記的抗 hu IgG Fc 抗體（目錄號 409320，美國的百進生化技術公司）結合。使用流式細胞儀（Guava easyCyte™ 8HT，美國的默克密理博公司）定量細胞螢光。如**圖 8** 所示，BGA-113K 以劑量反應方式與活細胞上的天然 CEA 特異性結合，EC50 為 2.92 $\mu\text{g/ml}$ 。

[表 15]：藉由 SPR 比較抗 CEA 抗體的結合親和力

	BGA113K			2F1抗體		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
huCEA	1.02E+05	1.81E-04	1.77E-09	4.50E+4	3.00E-3	6.50E-8
cynoCEA	2.67E+04	5.34E-04	1.99E-08	ND	ND	ND

實例 11. 脫靶特異性的評估

【0166】 通過 ELISA 和流式細胞術評估 BGA113K 的脫靶特異性。對於流式細胞術，將 CEACAM3 (SEQ ID NO: 65)、CEACAM7 (SEQ ID NO: 66) 或 CEACAM8 (SEQ ID NO: 67) 瞬時轉染到 HEK293 細胞（ 10^5 個細胞/孔）中，然後與 2 $\mu\text{g/ml}$ 純化的 BGA113K 一起孵育，隨後與 Alexa Fluor-647 標記的抗 huIgG Fc 抗體（目錄號 409320，美國的百進生化技術公司）結合。使用流式細胞儀（Guava easyCyte™ 8HT，美國的默克密理博公司）定量細胞螢光。對於抗原 ELISA、CEACAM1 (SEQ ID NO: 64)（目錄號 10822-H08H，中國的義翹神州公司（Sino Biological, China））、CHIM (SEQ ID

NO: 63)、CEA (SEQ ID NO: 55) 或 CEACAM6 (SEQ ID NO: 57) 以 10 µg/ml 的濃度在 4°C 下包被在 96 孔板中過夜。使用 HRP-連接的抗人 Fc (Fc 特異性) IgG 抗體 (目錄號 A0170, 美國的西格瑪公司 (Sigma, USA)) 和底物 (目錄號 00-4201-56, 美國的伊生 物技術公司) 進行顯色, 並使用酶標儀 (SpectraMax Paradigm, 美 國的分子設備公司) 測量 450 nm 波長處的吸光度信號。如圖 9A 至圖 9B 所示, 沒有觀察到與其他 CEACAM 家族成員的交叉反應 性, 因此 BGA113K 僅表現出對 CEA 的特異性 (圖 9A-B 中的 CEACAM5)。

實例 12. 可溶性 huCEA 對 BGA113K 與 CEA 表現細胞的結合之 影響

【0167】 為了確定可溶性 CEA (sCEA) 是否對 BGA113K 的特異 性結合有任何影響, 將不同濃度 (0、0.5、1、2 µg/ml) 的重組可 溶性 CEA 與 (0.01-100 µg/ml) BGA113K 預混合並孵育 5 分鐘。 然後將混合物與 2×10^5 個 CEA 表現細胞諸如 MKN45 細胞在 4°C 下孵育 30 分鐘。將細胞用第二抗體抗 huFc-APC (目錄號 409320, 美國的百進生化技術公司) 染色並藉由流式細胞術分析。在 2 µg/ml 重組 sCEA 存在下, BGA113K 與 CEA 表現細胞的結合不受影響。 該結果針對 MKN45 細胞顯示 (圖 10), 並表明 BGA113K 對 CEA 的膜結合形式的特異性。

實例 13. BGA113 誘導對 CEA⁺腫瘤細胞的有效 ADCC 作用

【0168】 為了確定野生型 IgG1 形式的 BGA113 是否可以誘導抗體

依賴性細胞毒性 (ADCC)，將表現 CD16 (V158) 的 NK92MI 細胞 (NK92MI/CD16V) 用作效應細胞，並與表現 CEA 的小鼠結腸癌細胞 (CT26 - ATCC CRL-2638) 共培養。在指定濃度 (0.00005-5 $\mu\text{g/ml}$) 的 BGA113 存在下，以 1:1 的 E:T 比率進行共培養 5 小時，並藉由乳酸脫氫酶 (LDH) 釋放確定細胞毒性。使用 CytoTox™ 96 非放射性細胞毒性測定套組 (威斯康辛州麥迪森的普洛麥格公司 (Promega, Madison, WI)) 測量上清液中 LDH 的量，並根據製造商的說明計算特異性裂解的量。如圖 11 所示，BGA113 可在體外誘導 ADCC， EC_{50} 為約 6.7 ng/ml。

實例 14. BGA113 的體內抗腫瘤功效

【0169】 為了確定 BGA113 針對 CEA⁺腫瘤細胞的體內功效，將 NK92MI/CD16V 細胞 (5×10^6) 與 CT26/CEA 細胞 (10^6) 混合並皮下注射到 NCG 小鼠中。在腫瘤注射當天開始，每週兩次給予 BGA113 (0.12、0.62 或 3.1 mg/kg) 或媒介物對照 (每組 7 隻小鼠)。與媒介物相比，3.1 mg/kg 劑量的 BGA113 表現出少量的腫瘤抑制，儘管與媒介物對照的差異在統計學上不顯著 ($P > 0.05$) (圖 12)。

參考文獻

Abdul-Wahid, A., M. Cydzik, N. W. Fischer, A. Prodeus, J. E. Shively, A. Martel, S. Alminawi, Z. Ghorab, N. L. Berinstein & J. Gariépy (2018) Serum-derived carcinoembryonic antigen (CEA) activates fibroblasts to induce a local re-modeling of the extracellular matrix that favors the engraftment of CEA-expressing tumor

cells. *International Journal of Cancer*, 143, 1963-1977.

Abdul-Wahid, A., E. H. B. Huang, M. Cydzik, E. Bolewska-Pedyczak & J. Gariépy (2014) The carcinoembryonic antigen IgV-like N domain plays a critical role in the implantation of metastatic tumor cells. *Molecular Oncology*, 8, 337-350.

Augugliaro, R., S. Parolini, R. Castriconi, E. Marcenaro, C. Cantoni, M. Nanni, L. Moretta, A. Moretta & C. Bottino (2003) Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol*, 33, 1235-41.

Bacac, M., C. Klein & P. Umana (2016) CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors. *Oncoimmunology*, 5, e1203498.

Barrow, A. D., C.J. Martin & M. Colonna (2019) The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol*, 10, 909.

Beauchemin, N. 2017. CEA Gene Family. In *Encyclopedia of Cancer*, ed. M. Schwab, 870-874. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Beck, A., T. Wurch, C. Bailly & N. Corvaia (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol*, 10, 345-52.

Biron, C.A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens & T. P. Salazar-Mather (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17,

189-220.

Brocks, B., P. Garin-Chesa, E. Behrle, J. E. Park, W. J. Rettig, K. Pfizenmaier & D. Moosmayer (2001) Species-crossreactive scFv against the tumor stroma marker "fibroblast activation protein" selected by phage display from an immunized FAP^{-/-} knock-out mouse. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 7, 461-469.

Chau, I., M. J. Allen, D. Cunningham, A. R. Norman, G. Brown, H. E. Ford, N. Tebbutt, D. Tait, M. Hill, P. J. Ross & J. Oates (2004) The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 22, 1420-9.

de St Groth, S. F. & D. Scheidegger (1980) Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J Immunol Methods*, 35, 1-21.

Dotan, E., A. Starodub, J. Berlin, C.H. Lieu, M. J. Guarino, J. Marshall, J. R. Hecht, S. J. Cohen, W. A. Messersmith, P. P. Maliakal, W. A. Wegener, R. M. Sharkey & D. M. Goldenberg (2015) A new anti-CEA-SN-38 antibody-drug conjugate (ADC), IMMU-130, is active in controlling metastatic colorectal cancer (mCRC) in patients (pts) refractory or relapsing after irinotecan-containing chemotherapies: Initial results of a phase I/II study. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 2505-2505.

Durbin, H., S. Young, L. M. Stewart, F. Wrba, A. J. Rowan, D.

Snary & W. F. Bodmer (1994) An epitope on carcinoembryonic antigen defined by the clinically relevant antibody PR1A3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4313-7.

Engler, F. A., J. R. Polli, T. Li, B. An, M. Otteneder, J. Qu & J. P. Balthasar (2018) "Catch-and-Release" Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody Leads to Greater Plasma and Tumor Exposure in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *J Pharmacol Exp Ther*, 366, 205-219.

Fischer, E., K. Chaitanya, T. Wuest, A. Wadle, A. M. Scott, M. van den Broek, R. Schibli, S. Bauer & C. Renner (2012) Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies. *Clin Cancer Res*, 18, 6208-18.

Flamini, E., L. Mercatali, O. Nanni, D. Calistri, R. Nunziatini, W. Zoli, P. Rosetti, N. Gardini, A. Lattuneddu, G. M. Verdecchia & D. Amadori (2006) Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 6985-8.

Gangopadhyay, A., D. A. Lazure & P. Thomas (1997) Carcinoembryonic antigen induces signal transduction in Kupffer cells. *Cancer Letters*, 118, 1-6.

Gauthier, L., A. Morel, N. Anceriz, B. Rossi, A. Blanchard-Alvarez, G. Grondin, S. Trichard, C. Cesari, M. Sapet, F. Bosco, H. Rispaud-Blanc, F. Guillot, S. Cornen, A. Roussel, B. Amigues, G. Habif, F. Caraguel, S. Arrufat, R. Remark, F. Romagne, Y. Morel, E.

Narni-Mancinelli & E. Vivier (2019) Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. *Cell*, 177, 1701-1713 e16.

Gold, P. & S. O. Freedman (1965) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med*, 121, 439-62.

Goldenberg, D. M. (1992) Cancer imaging with CEA antibodies: historical and current perspectives. *Int J Biol Markers*, 7, 183-8.

Hammarström, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology*, 9, 67-81.

Hezareh, M., A. J. Hessel, R. C. Jensen, J. G. van de Winkel & P. W. Parren (2001) Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 75, 12161-8.

Hohenberger, P., P. M. Schlag, T. Gerneth & C. Herfarth (1994) Pre- and postoperative carcinoembryonic antigen determinations in hepatic resection for colorectal metastases. Predictive value and implications for adjuvant treatment based on multivariate analysis. *Ann Surg*, 219, 135-43.

Hudspeth, K., B. Silva-Santos & D. Mavilio (2013) Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol*, 4, 69.

Hurwitz, E., I. Stancovski, M. Sela & Y. Yarden (1995)

Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3353-7.

Igawa, T., H. Tsunoda, Y. Kikuchi, M. Yoshida, M. Tanaka, A. Koga, Y. Sekimori, T. Orita, Y. Aso, K. Hattori & M. Tsuchiya (2010) VH/VL interface engineering to promote selective expression and inhibit conformational isomerization of thrombopoietin receptor agonist single-chain diabody. *Protein Eng Des Sel*, 23, 667-77.

Koch, J., A. Steinle, C. Watzl & O. Mandelboim (2013) Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol*, 34, 182-91.

Kuespert, K., S. Pils & C.R. Hauck (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 565-571.

Kruse, P. H., J. Matta, S. Ugolini & E. Vivier (2014) Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*, 92, 221-9.

Lanier, L. L. (2015) NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*, 3, 575-82.

Lee, J. H. & S.-W. Lee (2017) The Roles of Carcinoembryonic Antigen in Liver Metastasis and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology Research and Practice*, 2017, 11.

Lee, K.-A., E.-A. Bae, Y. C. Song, E.-K. Kim, Y.-S. Lee, T.-G. Kim & C.-Y. Kang (2015) A multimeric carcinoembryonic antigen

signal inhibits the activation of human T cells by a SHP-independent mechanism: A potential mechanism for tumor-mediated suppression of T-cell immunity. *International Journal of Cancer*, 136, 2579-2587.

Lefranc, M. P., V. Giudicelli, C. Ginestoux, J. Bodmer, W. Muller, R. Bontrop, M. Lemaitre, A. Malik, V. Barbie & D. Chaume (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 27, 209-12.

Liersch, T., J. Meller, M. Bittrich, B. Kulle, H. Becker & D. M. Goldenberg (2007) Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with (131)I-labetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. *Ann Surg Oncol*, 14, 2577-90.

Liu, L., W. Zeng, M. A. Wortinger, S. B. Yan, P. Cornwell, V. L. Peek, J. R. Stephens, J. W. Tetreault, J. Xia, J. R. Manro, K. M. Credille, D. W. Ballard, P. Brown-Augsburger, V. Wacheck, C.K. Chow, L. Huang, Y. Wang, I. Denning, J. Davies, Y. Tang, P. Vaillancourt & J. Lu (2014) LY2875358, a neutralizing and internalizing anti-MET bivalent antibody, inhibits HGF-dependent and HGF-independent MET activation and tumor growth. *Clin Cancer Res*, 20, 6059-70.

Matsuoka, Y., Y. Matsuo, K. Sugano, H. Ohkura, M. Kuroki & M. Kuroki (1990) Characterization of Carcinoembryonic Antigen-related Antigens in Normal Adult Feces. *Japanese Journal of Cancer Research*, 81, 514-519.

Mechetner, E. (2007) Development and characterization of mouse hybridomas. *Methods Mol Biol*, 378, 1-13.

Moertel, C.G., T. R. Fleming, J. S. Macdonald, D. G. Haller, J. A. Laurie & C.Tangen (1993) An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *Jama*, 270, 943-7.

Nap, M., M. L. Hammarstrom, O. Bormer, S. Hammarstrom, C.Wagener, S. Handt, M. Schreyer, J. P. Mach, F. Buchegger, S. von Kleist & et al., (1992) Specificity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Cancer Res*, 52, 2329-39.

Nap, M., K. Mollgard, P. Burtin & G. J. Fleuren (1988) Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol*, 9, 145-53.

Oberst, M. D., S. Fuhrmann, K. Mulgrew, M. Amann, L. Cheng, P. Lutterbuese, L. Richman, S. Coats, P. A. Baeuerle & S. A. Hammond (2014) CEA/CD3 bispecific antibody MEDI-565/AMG 211 activation of T cells and subsequent killing of human tumors is independent of mutations commonly found in colorectal adenocarcinomas. *MAbs*, 6, 1571-84.

Pegram, H. J., D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy & M. H. Kershaw (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*, 89, 216-24.

Peng, L., M. D. Oberst, J. Huang, P. Brohawn, C. Morehouse, K.

Lekstrom, P. A. Baeuerle, H. Wu, Y. Yao, S. R. Coats, W. Dall'Acqua, M. Damschroder & S. A. Hammond (2012) The CEA/CD3-bispecific antibody MEDI-565 (MT111) binds a nonlinear epitope in the full-length but not a short splice variant of CEA. *PloS one*, 7, e36412-e36412.

Poul, M. A., B. Becerril, U. B. Nielsen, P. Morisson & J. D. Marks (2000) Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J Mol Biol*, 301, 1149-61.

Primrose, J. N., R. Perera, A. Gray, P. Rose, A. Fuller, A. Corkhill, S. George & D. Mant (2014) Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial. *Jama*, 311, 263-70.

Richman, P. I. & W. F. Bodmer (1987) Monoclonal antibodies to human colorectal epithelium: markers for differentiation and tumour characterization. *Int J Cancer*, 39, 317-28.

Ridgway, J. B., L. G. Presta & P. Carter (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng*, 9, 617-21.

Saito, G., S. Sadahiro, K. Okada, A. Tanaka, T. Suzuki & A. Kamijo (2016) Relation between Carcinoembryonic Antigen Levels in Colon Cancer Tissue and Serum Carcinoembryonic Antigen Levels at Initial Surgery and Recurrence. *Oncology*, 91, 85-9.

Sakurai, Y., S. Hirohashi, T. Ohishi, Y. Shimosato, S. Kodaira & O. Abe (1989) Conformational epitopes specific to carcinoembryonic

antigen defined by monoclonal antibodies raised against colon cancer xenografts. *J Surg Oncol*, 42, 39-46.

Sheahan, K., M. J. O'Brien, B. Burke, P. A. Dervan, J. C. O'Keane, L. S. Gottlieb & N. Zamcheck (1990) Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies. *Am J Clin Pathol*, 94, 157-64.

Shinmi, D., R. Nakano, K. Mitamura, M. Suzuki-Imaizumi, J. Iwano, Y. Isoda, J. Enokizono, Y. Shiraishi, E. Arakawa, K. Tomizuka & K. Masuda (2017) Novel anticarcinoembryonic antigen antibody-drug conjugate has antitumor activity in the existence of soluble antigen. *Cancer Med*, 6, 798-808.

Silacci, M., S. Brack, G. Schirru, J. Marlind, A. Ettore, A. Merlo, F. Viti & D. Neri (2005) Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics*, 5, 2340-50.

Stern, N., G. Markel, T. I. Arnon, R. Gruda, H. Wong, S. D. Gray-Owen & O. Mandelboim (2005) Carcinoembryonic Antigen (CEA) Inhibits NK Killing via Interaction with CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. *The Journal of Immunology*, 174, 6692-6701.

Stewart, L. M., S. Young, G. Watson, S. J. Mather, P. A. Bates, H. A. Band, R. W. Wilkinson, E. L. Ross & D. Snary (1999) Humanisation and characterisation of PR1A3, a monoclonal antibody specific for cell-bound carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol*

Immunother, 47, 299-306.

Takahashi, T., S. Minami, Y. Tsuchiya, K. Tajima, N. Sakai, K. Suga, S. I. Hisanaga, N. Ohbayashi, M. Fukuda & H. Kawahara (2019) Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6. *EMBO Rep*, 20.

Thompson, J. A., F. Grunert & W. Zimmermann (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 5, 344-366.

Wong, J. Y., D. Z. Chu, L. E. Williams, D. M. Yamauchi, D. N. Ikle, C.S. Kwok, A. Liu, S. Wilczynski, D. Colcher, P. J. Yazaki, J. E. Shively, A. M. Wu & A. A. Raubitschek (2004) Pilot trial evaluating an ¹²³I-labeled 80-kilodalton engineered anticarcinoembryonic antigen antibody fragment (cT84.66 minibody) in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 5014-21.

Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier & J. H. Phillips (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 285, 730-2.

Wu, T. T. & E. A. Kabat (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med*, 132, 211-50.

Zhang, T., B. A. Lemoi & C.L. Sentman (2005) Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. *Blood*,

106, 1544-1551.

Zhang, T., X. Song, L. Xu, J. Ma, Y. Zhang, W. Gong, Y. Zhang, X. Zhou, Z. Wang, Y. Wang, Y. Shi, H. Bai, N. Liu, X. Yang, X. Cui, Y. Cao, Q. Liu, J. Song, Y. Li, Z. Tang, M. Guo, L. Wang & K. Li (2018) The binding of an anti-PD-1 antibody to FcγRIIIa has a profound impact on its biological functions. *Cancer Immunol Immunother*, 67, 1079-1090.

Zhao, L., L. Qu, J. Zhou, Z. Sun, H. Zou, Y. Y. Chen, J. D. Marks & Y. Zhou (2014) High throughput identification of monoclonal antibodies to membrane bound and secreted proteins using yeast and phage display. *PLoS One*, 9, e111339.

【符號說明】

【0170】 無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗 CEA 抗體或其抗原結合片段，其包含在 SEQ ID NO:52 的胺基酸 596 至 674 處特異性結合人 CEA 的抗體或其結合片段。

【請求項2】 如請求項 1 所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段不與其他 CEACAM 家族成員結合。

【請求項3】 如請求項 1 所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其包含：

(i) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 7 的 HCDR1 (重鏈互補決定區 1)、(b) SEQ ID NO: 8 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 9 的 HCDR3，以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 10 的 LCDR1 (輕鏈互補決定區 1)、(e) SEQ ID NO: 11 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 6 的 LCDR3；

(ii) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 24 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 25 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 26 的 HCDR3；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 27 的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 28 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 23 的 LCDR3；或

(iii) 重鏈可變區，該重鏈可變區包含 (a) SEQ ID NO: 41 的 HCDR1、(b) SEQ ID NO: 42 的 HCDR2、(c) SEQ ID NO: 43 的 HCDR3；以及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含：(d) SEQ ID NO: 44 的 LCDR1、(e) SEQ ID NO: 45 的 LCDR2 和 (f) SEQ ID NO: 40 的 LCDR3。

【請求項4】 如請求項 3 所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其

包含：

(i) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 14 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列，以及輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 15 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列；

(ii) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 31 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列，以及輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 32 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列；或

(iii) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 48 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列，以及輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與 SEQ ID NO: 49 至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的胺基酸序列。

【請求項5】 如請求項 4 所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中 SEQ ID NO: 14、15、31、32、48 或 49 中已插入、缺失或取代一個、兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個胺基酸。

【請求項6】 如請求項 1 所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其包含：

(i) 包含 SEQ ID NO: 14 的重鏈可變區 (VH) 和包含 SEQ ID NO: 15 的輕鏈可變區 (VL)；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 31 的重鏈可變區 (VH) 和包含 SEQ ID NO: 32 的輕鏈可變區 (VL); 或

(iii) 包含 SEQ ID NO: 48 的重鏈可變區 (VH) 和包含 SEQ ID NO: 49 的輕鏈可變區 (VL)。

【請求項7】 如請求項 1 至 6 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其為單株抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人工程化抗體、單鏈抗體 (scFv)、Fab 片段、Fab'片段或 F(ab')₂ 片段。

【請求項8】 如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 或補體依賴性細胞毒性 (CDC)。

【請求項9】 如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段具有降低的糖基化或無糖基化或係低岩藻糖基化的。

【請求項10】 如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含增加的二等分 GlcNac 結構。

【請求項11】 如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該 Fc 結構域係 IgG1。

【請求項12】 如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段，其中該抗體軛合到毒素。

【請求項13】 一種藥物組成物，其包含如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或其抗原結合片段，進一步包含藥學上可接受的載劑。

【請求項14】 一種治療癌症之方法，其包括向有需要的患者投與

有效量的如請求項 1 所述之抗體或抗原結合片段。

【請求項 15】如請求項 14 所述之方法，其中該癌症係胃癌、結腸癌、胰臟癌、乳癌、頭頸癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巢癌、皮膚癌、間皮瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和肉瘤。

【請求項 16】如請求項 14 所述之方法，其中該抗體或抗原結合片段與另一種治療劑組合投與。

【請求項 17】如請求項 16 所述之方法，其中該治療劑係紫杉醇或紫杉醇藥劑、多西他賽、卡鉑、托泊替康、順鉑、伊立替康、多柔比星、來那度胺或 5-氮雜胞苷。

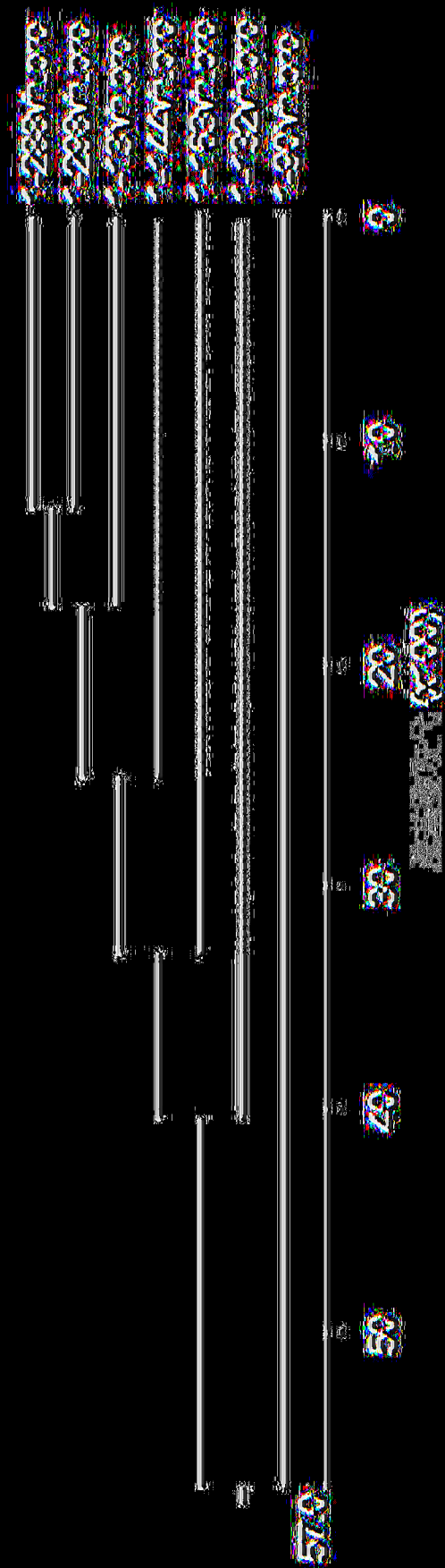
【請求項 18】如請求項 16 所述之方法，其中該治療劑係抗 PD1 或抗 PDL1 抗體。

【請求項 19】一種分離的核酸，其編碼如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CEA 抗體或抗原結合片段。

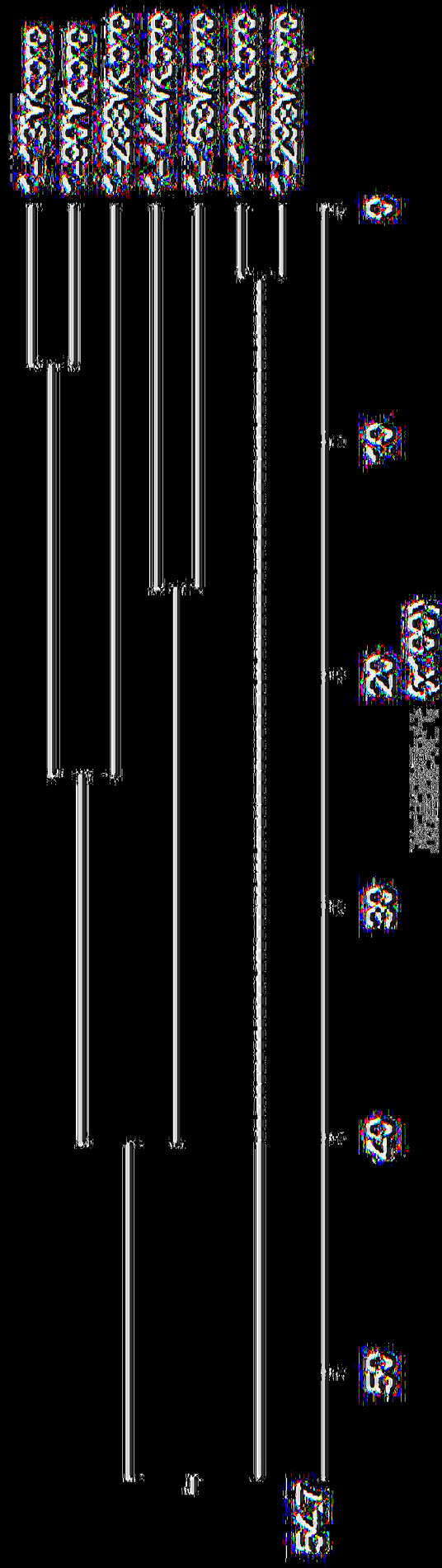
【請求項 20】一種載體，其包含如請求項 19 所述之核酸。

【請求項 21】一種宿主細胞，其包含如請求項 19 所述之核酸或如請求項 20 所述之載體。

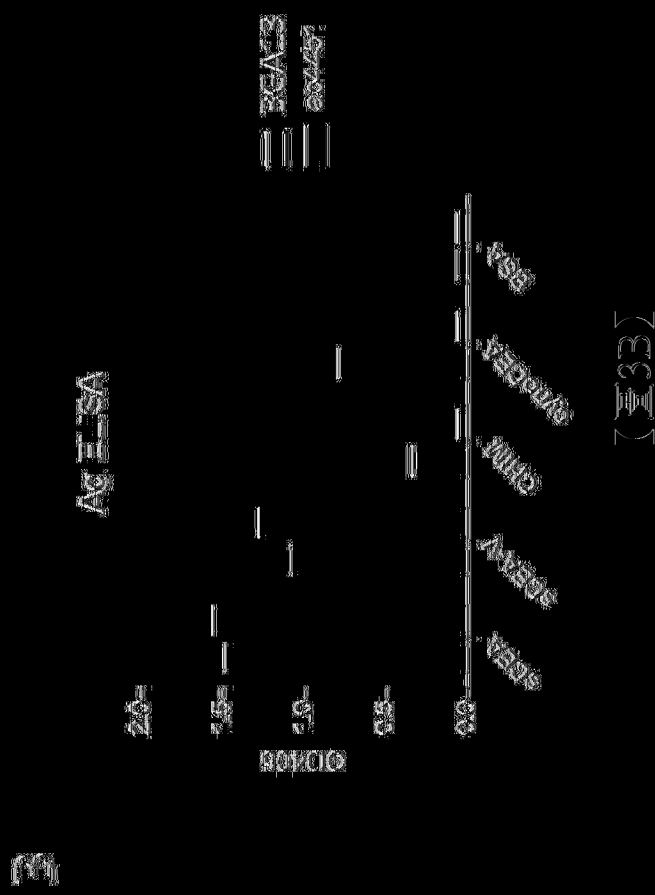
【請求項 22】一種用於生產抗 CEA 抗體或其抗原結合片段之方法，其包括培養如請求項 21 所述之宿主細胞以及從培養物中回收該抗體或抗原結合片段。



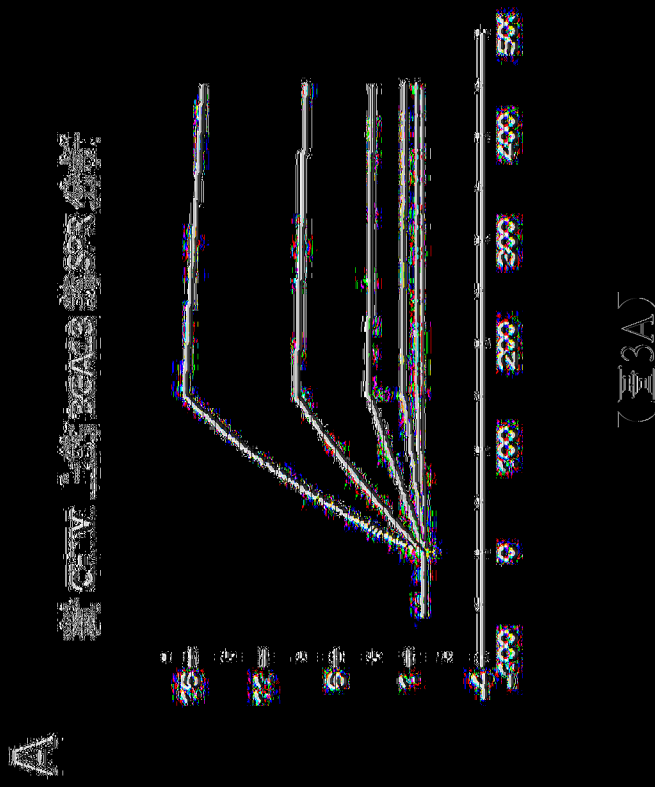
(圖2A)



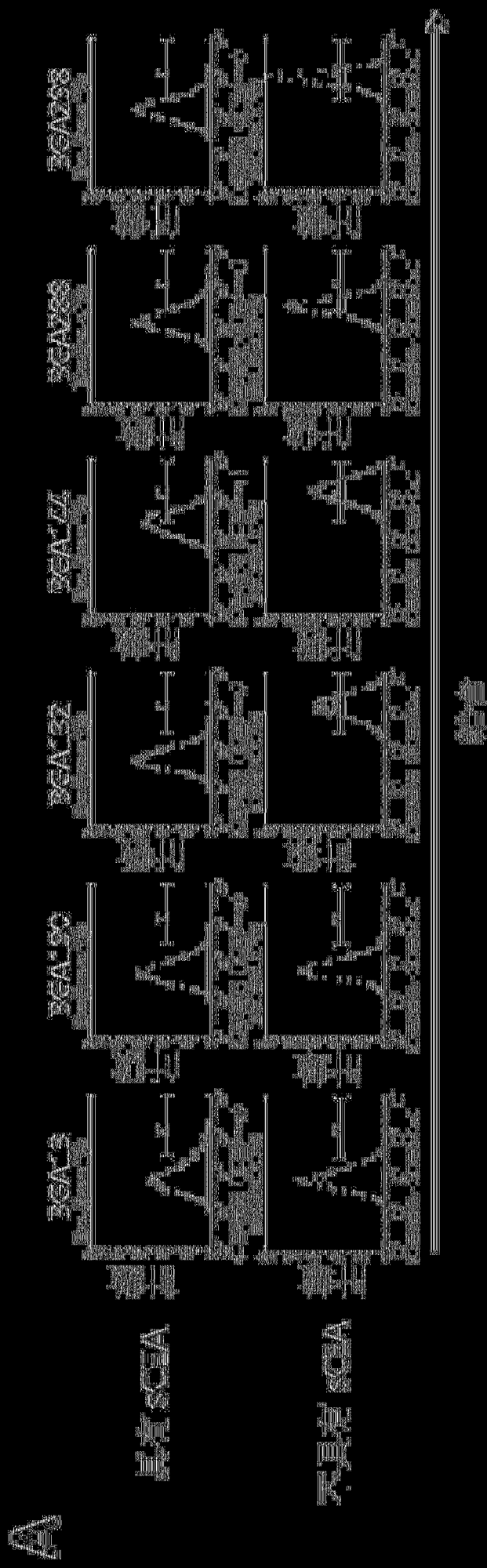
(E23)



3

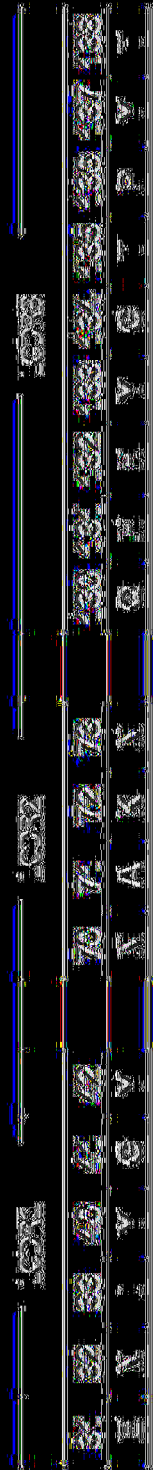


3A



[圖 1A]

A

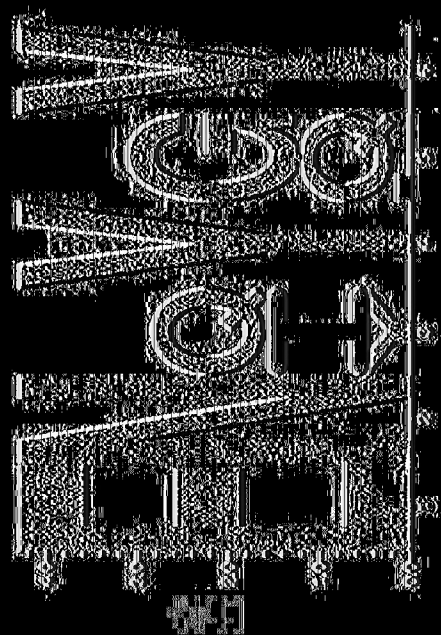
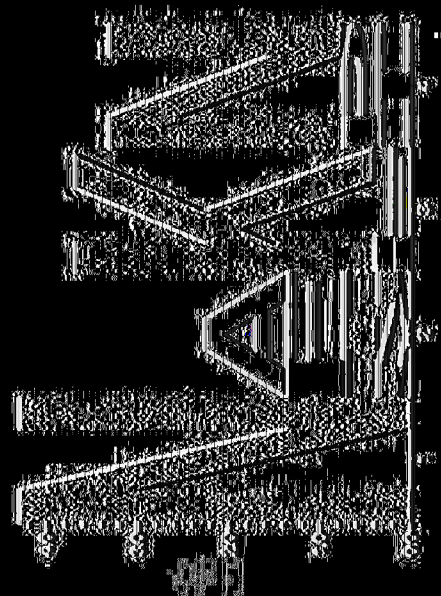
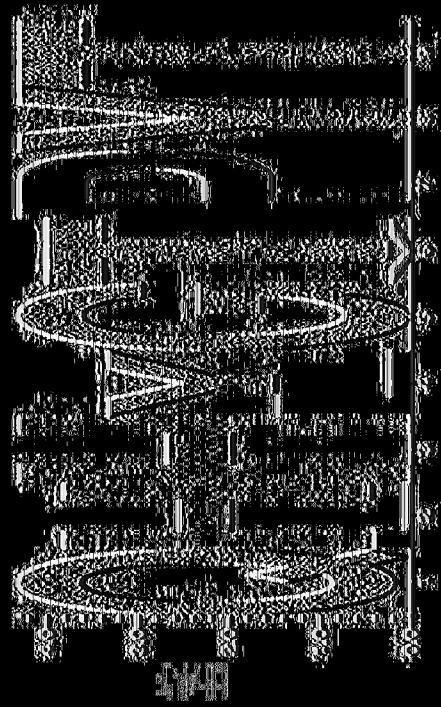


(圖5A)

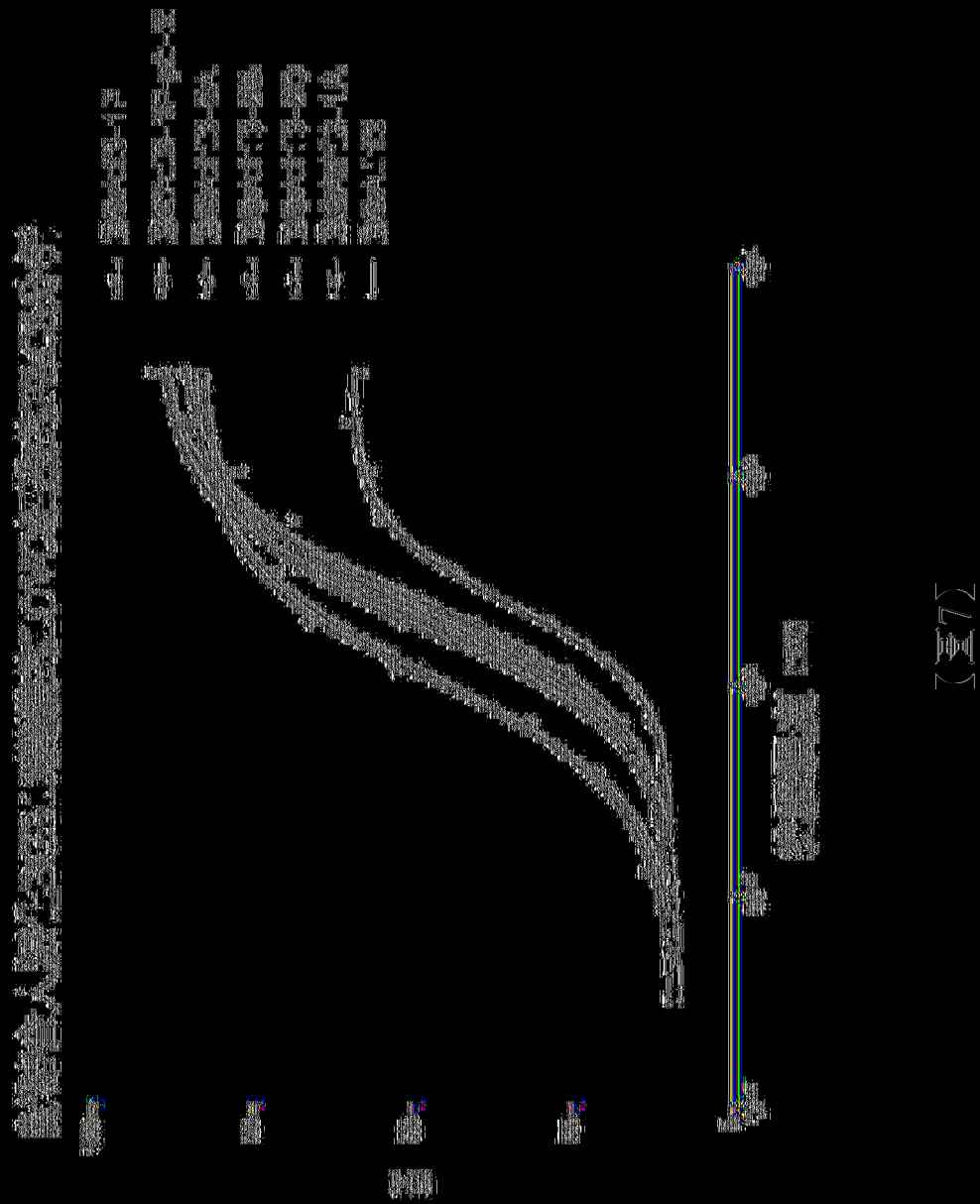
B

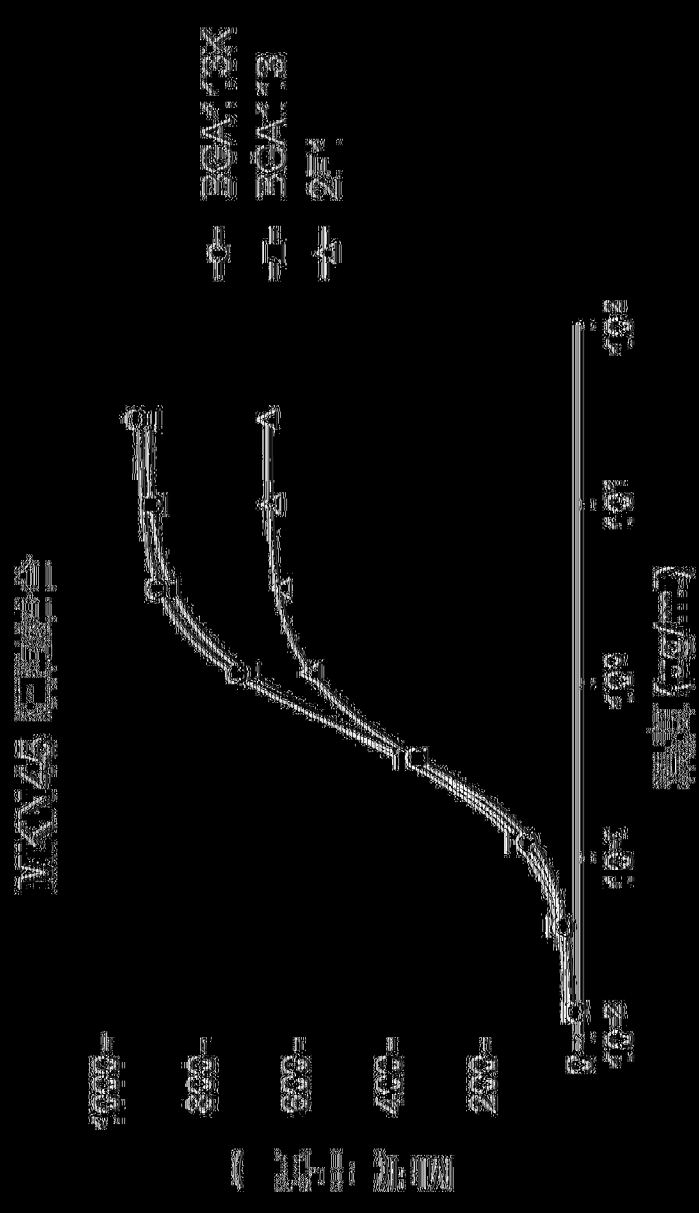


(圖5B)



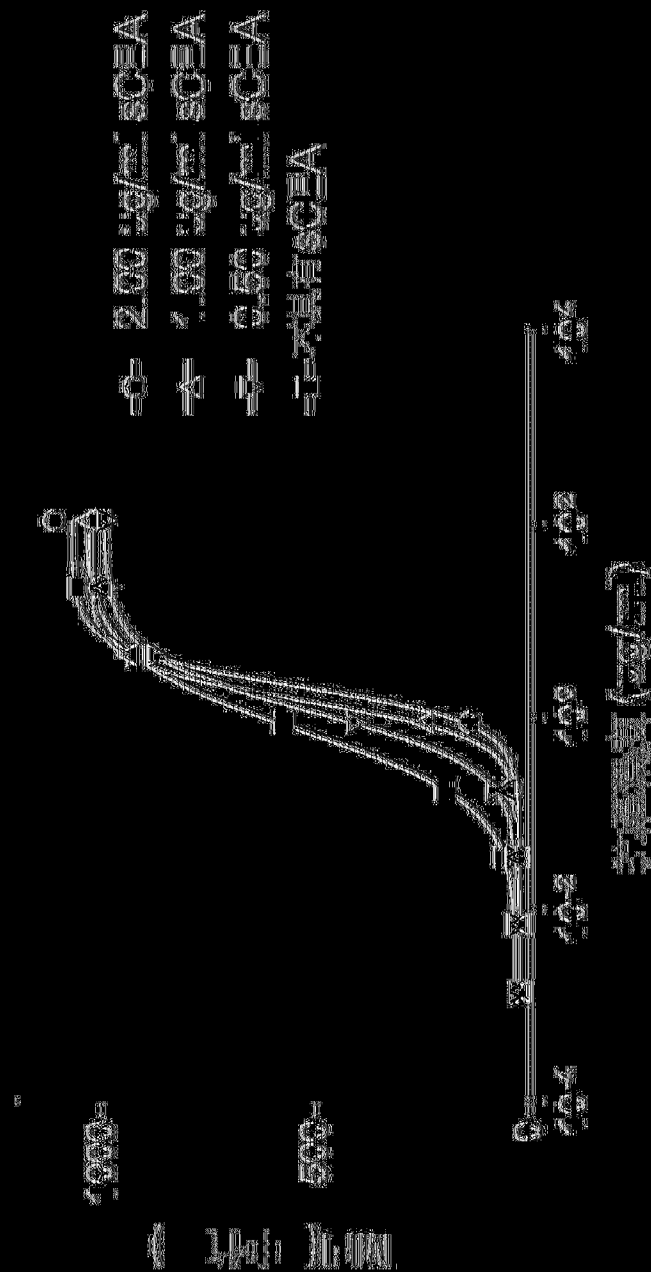
(9)



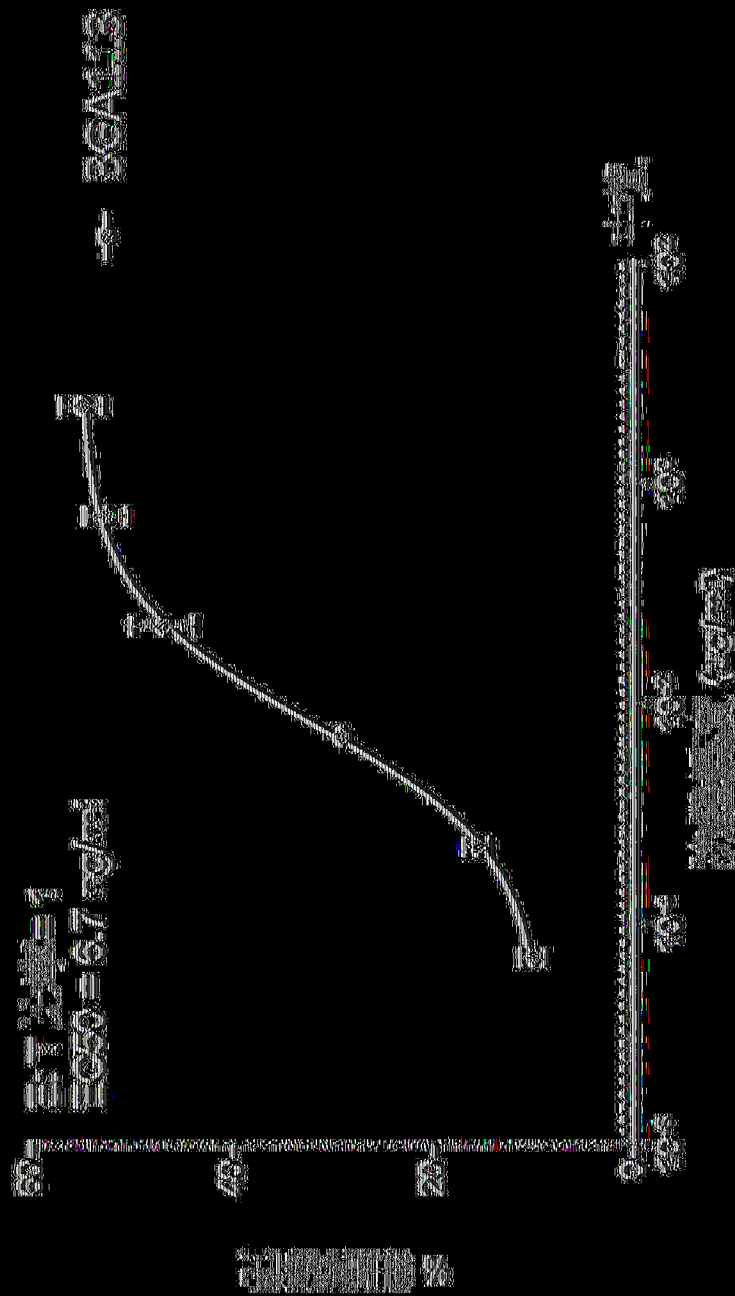


【8】

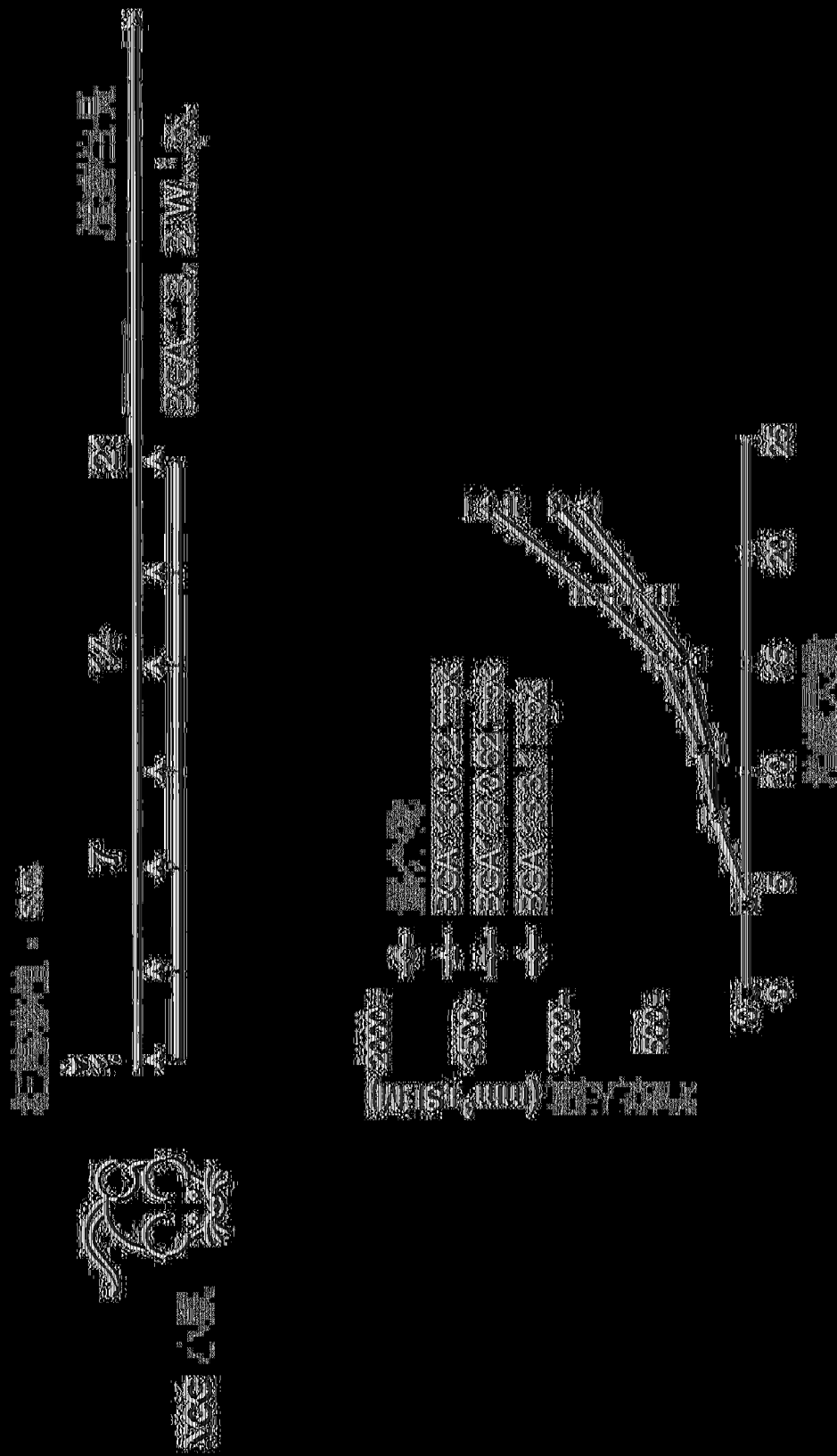
圖 10 (具有或不具有直徑 503A) 的殘渣



【圖 10】



(11)



(圖 2)