

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2024 年 7 月 18 日 (18.07.2024)



(10) 国际公布号
WO 2024/149232 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/30 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/071306

(22) 国际申请日: 2024 年 1 月 9 日 (09.01.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202310028399.3 2023年1月9日 (09.01.2023) CN

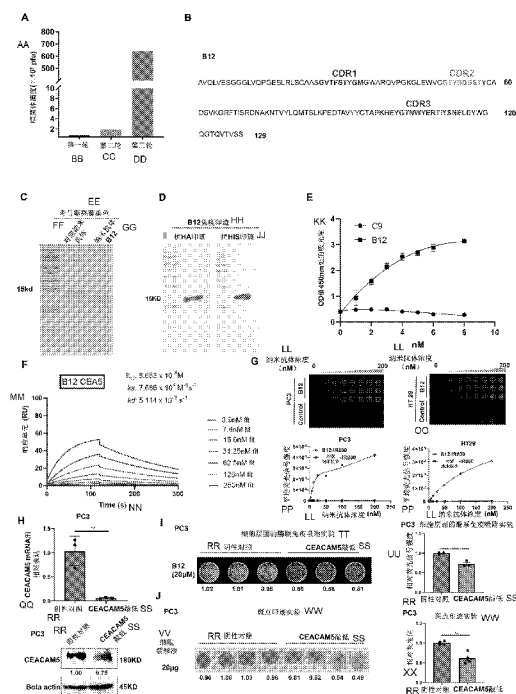
(71) 申请人: 南方医科大学第三附属医院 (广东省骨科研究院) (**THE THIRD AFFILIATED HOSPITAL OF SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY (ACADEMY OF ORTHO-**

PEDICS GUANGDONG PROVINCE)) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。

(72) 发明人: 赵善超 (**ZHAO, Shanchao**); 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。李志杰 (**LI, Zhijie**); 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。肖兆铭 (**XIAO, Zhaoming**); 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。王继刚 (**WANG, Jigang**); 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。刘亚伟 (**LIU, Yawei**); 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。石广为 (**SHI, Guangwei**); 中国广东省广州市天河区中山大道西 183 号, Guangdong 510631 (CN)。张晓东 (**ZHANG, Xiaodong**); 中国广东省广州市天河区

(54) **Title:** NANOANTIBODY B12 TARGETING CEACAM5 AND USE OF NANOANTIBODY B12

(54) 发明名称: 靶向CEACAM5的纳米抗体B12及其应用



AA Phage titer (×10⁷ pfu)
BB First round
CC Second round
DD Third round
EE Coomassie brilliant blue staining
FF Control nanoantibody
GG Nanoantibody B12
HH B12 immunoblotting
II Anti-HA blotting
JJ Anti-HIS blotting
KK Absorbance at an OD value of 450 nm
LL Nanoantibody concentration (nM)
MM Response unit (RU)
NN Time(s)
OO Control
PP Average fluorescence signal intensity
QQ Relative expression of CEACAM5 mRNA
RR Negative control
SS CEACAM5 knock-down
TT Enzyme-linked immunosorbent assay at cellular level
UU Relative fluorescence signal intensity
VV Cell lysis buffer
WW Dot blot experiment
XX Relative gray scale
YY Beta actin

图 3

(57) **Abstract:** A nanoantibody B12 targeting CEACAM5 and a use of the nanoantibody B12. The nanoantibody B12 comprises three complementarity-determining regions (CDRs), which are respectively CDR1, CDR2, and CDR3; the amino acid sequence of CDR1 is as shown in SEQ ID NO. 6, the amino acid sequence of CDR2 is as shown in SEQ ID NO. 7, and the amino acid sequence of CDR3 is as shown in SEQ ID NO. 8. The nanoantibody B12 and CEACAM5 have relatively high affinity and binding force, and the nanoantibody B12 targets a neuroendocrine prostate cancer specific membrane marker CEACAM5, so that development of nanoantibody related drugs

中山大道西183号, Guangdong 510631 (CN)。 杨诚(YANG, Cheng); 中国广东省广州市天河区中山大道西183号, Guangdong 510631 (CN)。

(74) 代理人: 深圳壹舟知识产权代理事务所(普通合伙) (PRECISE INTELLECTUAL PROPERTY FIRM); 中国广东省深圳市福田区沙头街道天安社区深南大道6007号安徽大厦3018, Guangdong 518000 (CN)。

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

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

of the neuroendocrine prostate cancer specific membrane marker CEACAM5 is facilitated, and targeted treatment on castration-resistant neuroendocrine prostate cancer is achieved; and additionally, development of drugs for CEACAM5-related diseases is also facilitated, and diagnosis and treatment of CEACAM5-related diseases are achieved. In addition, the nanoantibody can be widely applied due to a small molecular weight.

(57) 摘要: 一种靶向CEACAM5的纳米抗体B12及其应用, 其中, 纳米抗体B12包含3个互补决定区, 分别为CDR1、CDR2和CDR3; CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示, CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示, CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示。纳米抗体B12与CEACAM5具有较高的亲和力和结合力, 通过纳米抗体B12靶向作用于神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物CEACAM5, 有利于开发与神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物CEACAM5的纳米抗体相关药物, 实现对去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌进行靶向治疗; 同时也有利于开发与CEACAM5相关的疾病的药物, 实现对CEACAM5相关的疾病的诊断和治疗。另外, 纳米抗体由于分子量小, 有利于进行广泛应用。

靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12 及其应用

技术领域

本申请涉及生物技术领域，尤其涉及一种靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12 及其应用。

背景技术

在中国，前列腺癌(Prostate cancer, PCa)患者于确诊时，多数已处于疾病进展阶段，其伴有肿瘤远处转移或存在高危因素(Gleason 评分大于 7、血清前列腺特异性抗原超过 20ng/ml 或肿瘤分期大于 T2b)。以雄激素剥夺及雄激素受体拮抗为代表的内分泌治疗是此类患者的首选(具有转移性病灶患者)或重要的术后辅助治疗措施(局限高危前列腺癌患者)。但不同于在西方人群中常见的局限性低危前列腺癌患者，此类患者随着内分泌治疗时间的延长，均不可避免的发生治疗抵抗，导致疾病进展至去势抵抗性前列腺癌阶段(Castration resistant prostate cancer, CRPC)。

雄激素受体信号扩增，如雄激素受体基因及启动子扩增、雄激素受体剪切变异体 AR-V7 形成，是导致去势抵抗性前列腺癌发生的重要因素。对此，有效阻断内源性雄激素合成(阿比特龙)或雄激素受体入核(恩杂鲁胺)的二线内分泌治疗是当前主要治疗方式。上述治疗虽可延长 CRPC 患者的生存周期，但仍有 25% 的 CRPC 临床病例在治疗后发生疾病进展并在短时间内迅速发生肿瘤远处转移及周围组织侵袭致使患者中位生存期限仅为 7 个月，故而被称为侵袭变异性前列腺癌(Aggressive variant prostate cancer)。

病理学研究发现侵袭变异性前列腺癌在组织病理层面具有极大的异质性。首先，侵袭变异性前列腺癌缺乏前列腺腺癌组织所具有的腺癌组织特征并呈现出包括神经内分泌癌、小细胞癌、鳞癌、导管癌等诸多病理表型。其中，侵袭变异前列腺癌在多数临床病例呈现神经内分泌癌及小细胞癌表型。类同于组织病理学所见，免疫组化证实侵袭变异性前列腺癌同样不表达前列腺腺癌所表达的一些列组织标志物，如常见的 PSMA、ERG、AR 以及 PSA 等。这导致现有用于前列腺癌诊断的常规诊疗措施难以有效识别这种疾病。例如，侵袭变异性前列腺癌患者血清学检测几乎不能检出 PSA，致使常用于前列腺癌诊断与病情分析评估的血清 PSA 难以充分描述此类疾病的发生和进展。影像学诊断是诊断侵袭变异性前列腺癌的唯一有效手段。但前列腺特异性膜抗原(Prostate specific membrane antigen)在侵袭变异性前列腺癌组织中的膜表达缺失而导致影像学诊断缺乏敏感性与特异性。此外，侵袭变异性前列腺癌对现有抗肿瘤治疗措施均存在强大的抵抗性，包括放疗与免疫治疗。以紫杉醇为基础或顺铂联合依托泊苷的化疗方案是此类患者的主要治疗措施，但在改善患者预后方面效果仍然有限。因此，亟需开发针对的有效治疗与诊断措施。

谱系可塑性 (Lineage plasticity) 指细胞通过表观遗传学重塑调控细胞发育以获取生存优势表型的逆分化或转分化进程。同时,也是导致肿瘤耐药的重要机制。当前研究揭示,前列腺癌通过谱系可塑性途径获得包括神经内分泌化表型在内的一系列生存优势表型,并导致疾病进展至侵袭变异性前列腺癌阶段。表观遗传学重塑是驱动上述进程的核心因素。在前列腺癌内,雄激素受体信号转导相关的多种表观遗传学因子存在显著重塑。这导致雄激素受体信号缺失并异常激活干细胞、神经发育等生存优势表型相关的信号通路。因此,侵袭变异性前列腺癌可重新表达胚胎以及器官发育相关的膜抗原。因此,有效识别 CRPC-NE 特异性膜蛋白并开发相关的抗体偶联药物 (Antibody conjugated drug, ADC) 对此类疾病的诊疗具有重大的潜在意义。

CEACAM5 是一类哺乳动物免疫球蛋白相关糖蛋白,在以消化道与呼吸道肿瘤中呈高表,并开发用于肠道肿瘤相关的 ADC 治疗中。近期研究发现,CEACAM5 可作为神经发育相关转录因子 ASCL1 的下游靶基因,而表达于侵袭变异性前列腺组织膜表面。肿瘤细胞表面 CEACAM5 可脱落入血形成血清 CEA 而被用于临床诊断。相关研究亦证实 CEACAM5 基因的表达产物 CEA 在发生侵袭变异性前列腺癌患者血清升高并密切相关于肿瘤脏器转移。以上研究提示 CEACAM5 适用于侵袭变异性前列腺癌患者临床诊断与治疗的潜在靶点。

发明内容

为了克服现有技术的不足,本申请的目的在于提供一种纳米抗体 B12,纳米抗体 B12 具有较高的亲和活性与结合活性,能够有效地检测 CEACAM5、防治 CEACAM5 相关疾病。

为了实现上述目的,本申请采用如下技术方案:

本申请的第一方面提供了一种靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12,所述纳米抗体 B12 包含 3 个互补决定区,分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3;其中,所述 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示,所述 CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示,所述 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

进一步,所述纳米抗体 B12 还包含 4 个框架区,分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4;所述 FR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示,所述 FR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示,所述 FR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示,所述 FR4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

进一步,所述纳米抗体 B12 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

本申请的第二方面提供了一种核酸分子,所述核酸分子包含编码本申请第一方面所述的纳米抗体 B12 的核苷酸序列。本申请的核酸分子可以例如通过标准化学合成方法和/或重组方法合成,或半合成地产生,例如通过组合化学合成和重组方法。编码序列与转录调控元件和/

或与其他氨基酸编码序列的连接可以使用已确立的方法进行，例如限制酶切消化、连接和分子克隆。

进一步地，编码所述纳米抗体 B12 的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 9 所示的核苷酸序列。

本申请的第三方面提供了一种载体，所述载体包含本申请第二方面所述的核酸分子。

本申请的第四方面提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞包含本申请第二方面所述的核酸分子，或者包含本申请第三方面所述的载体。

本申请的第五方面提供了一种药物偶联物，所述药物偶联物含有：

本申请第一方面所述的纳米抗体 B12，以及

选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子或酶。

进一步，所述药物偶联物含有所述纳米抗体 B12 和毒素；

所述毒素为 PE38 毒素。

本申请的第六方面提供了一种组合物，所述组合物包括本申请第一方面所述的纳米抗体 B12、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述的载体、本申请第四方面所述的宿主细胞或本申请第五方面所述的药物偶联物。

本申请的第七方面提供了本申请第一方面所述的纳米抗体 B12、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述的载体、本申请第四方面所述的宿主细胞或本申请第五方面所述的药物偶联物在制备检测去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌的产品中的应用。

本申请的第八方面提供了本申请第一方面所述的纳米抗体 B12、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述的载体、本申请第四方面所述的宿主细胞或本申请第五方面所述的药物偶联物在制备治疗、预防去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌的药物中的应用。

进一步，所述药物包括 CART 相关药物、CAR NK 相关药物、双特异性抗体相关药物、纳米药物中的至少一种。

本申请的第九方面提供了本申请第一方面所述的纳米抗体 B12、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述的载体、本申请第四方面所述的宿主细胞或本申请第五方面所述的药物偶联物在制备识别去势抵抗性前列腺癌神经内分泌化阶段成像的药物中的应用。

本申请的第十方面提供了本申请第一方面所述的纳米抗体 B12、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述的载体、本申请第四方面所述的宿主细胞或本申请第五方面所述的药物偶联物在制备检测 CEACAM5 的产品中的应用。

本申请的第十一方面提供了本申请第一方面所述的纳米抗体 B12、本申请第二方面所述的核酸分子、本申请第三方面所述的载体、本申请第四方面所述的宿主细胞或本申请第五方面所述的药物偶联物在制备诊断、治疗、预防 CEACAM5 相关疾病的产品中的应用。

本申请的优点和有益效果：

本申请提供了一种靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12, 纳米抗体 B12 与 CEACAM5 具有较高的亲和力和结合力, 通过纳米抗体 B12 靶向作用于神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物 CEACAM5, 有利于开发与神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物 CEACAM5 的纳米抗体相关药物, 实现对去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌进行靶向治疗, 具有非常大的临床应用价值; 同时也有利于开发与 CEACAM5 相关的疾病的药物, 实现对 CEACAM5 相关的疾病的诊断和治疗。另外, 纳米抗体由于分子量小, 有利于进行广泛应用。

附图说明

图 1 和图 2 为本申请实施例一中确认 CEACAM5 是侵袭变异性前列腺癌的膜标志物的实验结果图;

图 3A 和图 3B 为本申请实施例二中纳米抗体筛选的结果图;

图 3C 和图 3D 为本申请实施例二中纳米抗体的纯化表达结果图;

图 3E 至图 3G 为本申请实施例二中纳米抗体 B12 的亲和力验证结果图;

图 3H 至图 3I 为本申请实施例二中纳米抗体 B12 的特异性验证结果图;

图 4 为本申请实施例三中纳米抗体 B12 的体内成像结果图;

图 5A 至图 5D 为本申请实施例四中免疫毒素 B12-PE38 的制备与鉴定结果图;

图 5E 和图 5F 为本申请实施例四中 PC3 体外吞噬和摄取免疫毒素 B12-P38 的实验结果图;

图 5G 至图 5I 为本申请实施例四中免疫毒素 B12-PE38 体外杀伤 PC3 细胞的实验结果图;

图 6 至图 8 为本申请实施例四中免疫毒素 B12-PE38 治疗 CEACAM5 阳性细胞系移植物的体内实验结果图;

图 9 为本申请实施例四中免疫毒素 B12-PE38 联合多西他赛治疗 PC3 细胞系移植物的体内实验结果图;

图 10 为本申请实施例四中免疫毒素 B12-PE38 治疗侵袭性前列腺癌细胞系 PC3 胫骨原位移植瘤的实验结果图。

具体实施方式

本申请通过广泛而深入地研究, 经过大量的筛选, 成功获得一条纳米抗体 B12。实验结果表明, 纳米抗体 B12 与神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物 CEACAM5 有较高的结合力, 通过该抗体可靶向作用于神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物 CEACAM5, 有利于开发与神经内分泌化前列腺癌特异性膜标志物 CEACAM5 的纳米抗体相关药物, 实现对去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌进行靶向治疗, 具有非常大的临床应用价值; 同时也有利于开发

与 CEACAM5 相关的疾病的药物，实现对 CEACAM5 相关的疾病的诊断和治疗。另外，纳米抗体由于分子量小，有利于进行广泛应用。

术语“亲和力”是指大分子与其结合的抗原之间的结合能力，特别是纳米抗体与其结合的抗原之间的结合能力，例如本申请的纳米抗体 B12 和如上所定义的病理形式的 CEACAM5 蛋白之间的结合能力。

本申请的纳米抗体 B12 的亲和力，可以通过几种方法在体外测量，包括表面等离子体共振或通过 ELISA 测定，如实施例所述。

如本领域技术人员所知，免疫偶联物及融合表达产物包括：药物、毒素、细胞因子 (cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本申请的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本申请还包括与所述的纳米抗体 B12 或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

本申请提供了一种靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12，纳米抗体 B12 包含 3 个互补决定区，分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3；其中，CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示，CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示，CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

其中，SEQ ID NO. 6 为：GVTFSTYGMG；SEQ ID NO. 7 为：GTYS DGST；SEQ ID NO. 8 为：APKHEYGTN WYERTIYSNELDY。

如本领域技术人员所熟知的，CDR1、CDR2 和 CDR3 的组合足以定义抗原结合位点。本领域技术人员还已知，识别相同抗原的两个纳米抗体竞争结合该抗原。

本申请还提供了纳米抗体 B12 的框架区，纳米抗体 B12 包含 4 个框架区，分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4；FR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示，FR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示，FR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示，FR4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

其中，SEQ ID NO. 2 为：AVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAAS；

SEQ ID NO. 3 为：WARQVPGKGLEWVC；

SEQ ID NO. 4 为：

YCADSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMTSLKPEDTAVYYCT；

SEQ ID NO. 5 为：WGQGTQVTVSS。

在本申请中，术语“框架区”、“框架”或“FR”是指插入在 CDR 之间的氨基酸序列。

在本申请的具体实施方案中，纳米抗体 B12 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。其中，SEQ ID NO. 1 为：

AVQLVESGGGLVQPGESLRLSCAASGVTFSTYGMGWARQVPGKGLEWVCGTYS DGST
YCADSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMTSLKPEDTAVYYCTAPKHEYGTN WYERTIYSNELD

YWGQGTQVTVSS。

本申请另一方面提供了一种核酸分子，核酸分子包含编码本申请的纳米抗体 B12 的核苷酸序列。

在一具体实施方案中，编码纳米抗体 B12 的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 9 所示的核苷酸序列。其中，SEQ ID NO. 9 为：

GCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAGCCTGGGGAGTCTCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGTGTACCTTCAGTACATATGGGATGGGCTGGGCCCCGCC
AGGTTCCAGGGAAGGGACTCGAGTGGGTGTGCGGAAGTTATAGTGATGGTAGCACATAT
TGTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGG
TGTATTTGCAAATGACTAGCCTGAAACCTGAAGATACGGCCGTTTATTACTGTACAGCCC
CCAAACATGAATACGGGACTAACTGGTACGAGAGGACAATTTACTCGAATGAACTTGAT
TACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA。

通常，核酸分子是 DNA 或 RNA 分子，其可以包含在任何合适的载体中，例如质粒、粘粒、附加体、人工染色体、噬菌体或病毒载体。

术语“载体”、“克隆载体”和“表达载体”是指可以将 DNA 或 RNA 序列引入宿主细胞的载体，其方式是转化宿主并促进引入的序列的表达（例如，转录和翻译）。

因此，本申请在一个方面提供了包含本申请的核酸的载体。

质粒载体的非限制性实例包括 pQE-12、pUC-系列、pBluescript (Stratagene)、pET-系列表达载体 (Novagen) 或 pCRTOP0 (Invitrogen)、λ gt11、pJOE、pBBR1-MCS 系列、pJB861、pBSMuL、pBC2、pUCPKS、pTACT1、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT、E-027 pCAG Kosak-Cherry(L45a)载体系统、pREP (Invitrogen)、pCEP4 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2neo、pBPV-1、pBPVMMTneo、pRSVgpt、pRSVneo、pSV2-dhfr、pIZD35、Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen)、pcDNA3.1、pSPORT1 (GIBCO BRL)、pGEMHE (Promega)、pLXIN、pSIR (Clontech)、pIRES-EGFP (Clontech)、pEAK-10 (EdgeBiosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) 和 pCINeo (Promega)。适合于巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 的质粒载体的非限制性实例包括例如质粒 pAO815、pPIC9K 和 pPIC3.5K (全部为 Invitrogen)。适合于在爪蟾属 (*Xenopus*) 胚胎、斑马鱼胚胎以及各种各样的哺乳动物和禽类细胞中表达蛋白质的另一种载体是多用途表达载体 pCS2+。

通常，载体可含有一种或多种用于克隆或表达的复制起点 (ori) 和遗传系统、一种或多种用于在宿主中选择的标记（例如，抗生素抗性）和一种或多种表达盒。另外，可以使用已

确立的方法将载体中包含的编码序列与转录调控元件和/或其他氨基酸编码序列连接。这种调控序列是本领域技术人员众所周知的，并且包括但不限于确保转录起始的调控序列、内部核糖体进入位点（IRES）和任选的确保转录终止和转录物稳定的调控元件。确保转录起始的这种调控元件的非限制性实例包括启动子、翻译起始密码子、增强子、绝缘子和/或确保转录终止的调控元件，其包括在本申请的核酸分子的下游。进一步的例子包括 Kozak 序列和侧翼为用于 RNA 剪接的供体和受体位点的间插序列，编码分泌信号的核苷酸序列，或取决于所用的表达系统的信号序列，其能够将表达的蛋白质引导至细胞区室或培养基。载体也可含有编码一种或多种蛋白伴侣的另外的可表达多核苷酸，以促进正确的蛋白质折叠。

病毒载体的其他实施例包括腺病毒、逆转录病毒、疱疹病毒和 AAV 载体。此类重组病毒可通过本领域技术人员熟知的技术生产，例如通过包装细胞的转染或通过辅助质粒或病毒的瞬时转染。病毒包装细胞的典型实施例包括 PA317 细胞、PsiCRIP 细胞、GPenv+细胞、293 细胞等。

因此，本申请另一方面提供了根据本申请的核酸和/或载体转染、转导或转化的宿主细胞。术语“转化”是指将“外来的”（即，外在的或细胞外的）基因或 DNA 或 RNA 序列引入宿主细胞中，以便宿主细胞表达所引入的基因或序列以产生感兴趣的物质，通常是由基因或引入的序列编码的蛋白质。接收并表达引入的 DNA 或 RNA 的宿主细胞已经“转化”。

可以设计本申请的核酸分子和/或载体以通过例如基于化学的方法（聚乙烯亚胺、磷酸钙、脂质体，DEAE-葡聚糖、核转染、非化学方法（电穿孔、声孔效应、光转染、基因电转移、流体递或细胞与本申请的核酸分子接触时自然发生的转化）、基于粒子的方法（基因枪、磁转染、穿刺转染）、基于噬菌体载体的方法和病毒方法引入细胞。例如，衍生自诸如反转录病毒、牛痘病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、Semliki 病毒或牛乳头瘤病毒的表达载体可用于将核酸分子递送至靶向的细胞群体中。另外，杆状病毒系统也可以用作本申请核酸分子的真核表达系统中的载体。

根据本申请的核酸可用于在合适的表达系统中产生本申请的纳米抗体 B12。术语“表达系统”是指在适当条件下相容的宿主细胞和载体，例如，用于表达由载体携带的外源 DNA 编码的蛋白质并导入宿主细胞中。

常规表达系统包括大肠杆菌宿主细胞和质粒载体、昆虫宿主细胞和杆状病毒载体，以及哺乳动物宿主细胞及其载体。宿主细胞的其他实施例包括原核细胞（例如，细菌）和真核细胞（例如，酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等）。具体实施例包括但不限于大肠杆菌、克鲁维酵母菌属或酵母属酵母，哺乳动物细胞系（例如，Vero 细胞、CHO 细胞、3T3 细胞、COS 细胞、BHK 细胞、Bowes 黑色素瘤细胞、HeLa 细胞、911 细胞、AT1080 细胞、

A549 细胞、HEK293 细胞和 HEK293T 细胞等)以及原代或已建立的哺乳动物细胞培养物(例如,由淋巴母细胞、纤维母细胞、上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等产生)。

在本申请中,任何适当的宿主细胞/载体系统可用于编码本申请的抗体分子的 DNA 序列的表达。可使用细菌(例如大肠杆菌)及其它微生物系统,或还可使用真核生物(例如哺乳动物)宿主细胞表达系统。上述细胞包含(但并不限于)哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、真菌细胞或细菌来源的细胞。作为哺乳动物细胞,可优选使用选自(但并不限于)由 CHO 细胞、F2N 细胞、CSO 细胞、BHK 细胞、Bowes 黑色素瘤细胞、HeLa 细胞、911 细胞、AT1080 细胞、A549 细胞、HEK293 细胞和 HEK293T 细胞组成的组中的一种作为宿主细胞。在本领域中可使用本领域的技术人员已知的可用作哺乳动物宿主细胞的任何细胞。

本申请还涉及与可检测标记物结合的纳米抗体 B12。

“与可检测标记物结合的纳米抗体 B12”在本文中意指可检测标记物直接或间接结合至纳米抗体 B12,例如通过可切割或不可切割的接头肽,或掺入纳米抗体 B12 中。可检测标记物尤其可以通过替换(例如通过用酪氨酸残基水平的 I 替换 H),通过复合或通过整合与纳米抗体 B12 结合。

术语“可检测标记物”在本文中意指产生可检测信号的化合物。当它连接到示踪剂时,它可以监视体内示踪剂变成什么。可检测标记物可以是 MRI 造影剂、闪烁扫描造影剂、X 射线成像造影剂、超声造影剂、光学成像造影剂。可检测标记物的实施例包括放射性元素,荧光团如荧光素、Alexa 或花青;化学发光化合物,如鲁米诺;生物发光化合物,如荧光素酶或碱性磷酸酶;和造影剂,如纳米颗粒或钆。合适的可检测标记物的选择取决于所用的检测系统,在本领域技术人员的能力范围内。例如,当检测系统是 MRI 时,可检测标记物优选是氧化铁纳米颗粒或钆;当检测系统是荧光成像时,可检测标记物优选为荧光素, Alexa 或花青;当检测系统为化学发光成像时,可检测标记物优选为鲁米诺;当检测系统是生物发光成像时,可检测标记物优选为荧光素酶或碱性磷酸酶;当检测系统是核成像时,可检测标记物优选是放射性元素,例如用于 PET 成像的镓 (^{68}Ga),或用于 SPECT 成像的锝 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

在一些实施方案中,可检测标记物是放射性元素。更具体地用于核成像技术的放射性元素的实施例包括锝 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、碘 123 (^{123}I)、碘 125 (^{125}I)、氟 18 (^{18}F)、镓 68 (^{68}Ga)和可以用在人类身上的任何其他放射性元素。因此,优选地,放射性元素选自 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{18}F 和 ^{68}Ga 。最优选地,放射性元素是 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{68}Ga ,更优选为 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

本申请所述的靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12 也可缀合至治疗剂以形成免疫缀合物,例如抗体-药物缀合物(ADC)。适宜治疗剂包括抗代谢物、烷基化剂、DNA 小沟结合剂、DNA 嵌入剂、DNA 交联剂、组蛋白去乙酰酶抑制剂、出核抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶

I 或 II 抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在 ADC 中，抗体和治疗剂优选是经由可切割接头（例如肽基、二硫化物或脰接头）缀合。

本申请还提供了其他多肽，如包含纳米抗体 B12 或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外，本申请还包括了本申请纳米抗体 B12 的片段。通常，该片段具有本申请抗体的至少约 50 个连续氨基酸，较佳地至少约 50 个连续氨基酸，更佳地至少约 80 个连续氨基酸，最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

可以使用本领域技术人员已知的任何施用方法将根据本申请的纳米抗体 B12 施用于患者。特别地，纳米抗体 B12 可以例如口服、通过吸入或肠胃外施用（特别是通过静脉内注射）。

当选择肠胃外途径时，纳米抗体 B12 可以是可注射溶液和悬浮液的形式，包装在小瓶或瓶中。肠胃外施用形式通常通过将根据本申请的纳米抗体 B12 与缓冲剂、稳定剂、防腐剂、增溶剂、等渗剂和悬浮剂混合而获得。根据已知技术，这些混合物可以静脉内注射的形式进行灭菌和包装。本领域技术人员可以例如使用基于磷酸盐的缓冲液作为缓冲剂。悬浮剂的实施例包括甲基纤维素、阿拉伯树胶和羧甲基纤维素钠。稳定剂的实施例包括亚硫酸钠和偏亚硫酸钠，防腐剂的实施例包括对羟基苯甲酸钠、山梨酸、甲酚和氯甲酚。

自然施用的纳米抗体 B12 的量取决于施用途径，患者的身高和/或体重，以及所使用的检测技术。

术语“患者”表示呈现与 CEACAM5 相关疾病相关的症状的人类。取决于 CEACAM5 相关疾病，所述疾病包括实体瘤或血液恶性肿瘤、炎性疾病等。

用于治疗的癌症的非限制性实例包括去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌。本文所述的方法亦可用于治疗转移性癌症、不可切除的癌症、难治性癌症和/或复发性癌症。

诊断用途本申请涉及将所述的纳米抗体 B12 用于诊断或预后的方法中。

术语“诊断方法”或“诊断”在本文中意指可以确定个体是否患有病理状况的方法。

术语“预后方法”或“预后”在本文中意指一种方法，该方法使得可以确定个体是否有发展病理状况的风险。

优选地，如上定义的纳米抗体 B12 用于诊断或预测 CEACAM5 相关疾病。

治疗用途本申请还涉及纳米抗体 B12 在制备药物，特别是用于治疗 CEACAM5 相关疾病的药物中的用途。包括向有此需要的患者施用治疗有效量的如上定义的纳米抗体 B12 的治疗方法也是本申请的一部分。

术语 CEACAM5 相关疾病的“治疗”旨在表示对 CEACAM5 相关疾病的“治疗性治疗”（或治愈性治疗），其包括减缓或抑制 CEACAM5 相关疾病的进展。它还旨在表示对 CEACAM5 相关疾病的“预防性治疗”。术语“预防”旨在表示预防或延迟与 CEACAM5 相

关疾病相关的临床或生化表现的强度的发生或降低。

本领域技术人员凭借其一般知识知道如何确定与给定的 CEACAM5 相关疾病相关的临床或生化表现，并且其能够改善（治疗）或者预防、延迟或降低强度（预防）。在 CEACAM5 相关疾病的情况下，感兴趣的生物学参数可以是病理形式的 CEACAM5 的存在和定位。

本申请更具体地涉及如上定义的纳米抗体 B12，其用于治疗 CEACAM5 相关疾病和/或预防 CEACAM5 相关疾病，优选用于治疗 and/或预防去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌。

本申请还涉及纳米抗体 B12 用于制备药物的用途，所述药物旨在用于治疗 CEACAM5 相关疾病和/或预防可能出现 CEACAM5 相关疾病的患者中的 CEACAM5 相关疾病。

本申请还涉及治疗 CEACAM5 相关疾病和/或预防有此需要的患者中的 CEACAM5 相关疾病的方法，包括向有需要的患者施用治疗有效量的如上定义的纳米抗体 B12。

根据本申请的纳米抗体 B12 可以例如口服，通过吸入，肠胃外（特别是通过静脉内注射）以合适的形式施用。当设想肠胃外途径时，纳米抗体 B12 可以是包装在小瓶或瓶中的可注射溶质和悬浮液的形式。通常，通过将纳米抗体 B12 与缓冲剂、稳定剂、防腐剂、增溶剂、等渗剂和悬浮剂混合来获得肠胃外施用的形式。根据已知技术，随后将这些混合物灭菌，然后以静脉内注射剂的形式包装。通过缓冲剂，本领域技术人员可以使用基于有机磷酸盐的缓冲剂。悬浮剂的实施例包括甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、阿拉伯树胶和羧甲基纤维素钠。此外，根据本申请使用的稳定剂是亚硫酸钠和偏亚硫酸氢钠，而可以提及对羟基苯甲酸钠、山梨酸、甲酚和氯甲酚作为防腐剂。本申请还涉及药物组合物，其包含纳米抗体 B12 与药学上可接受的载体的组合。

术语“药学上”或“药学上可接受的”是指分子实体和组合物，当它们施用于哺乳动物，特别是人时，不产生副反应、过敏反应或否则麻烦的反应。

在本申请的上下文中，表述“药学上可接受的载体”包括任何溶剂、分散介质、包衣、抗细菌或抗真菌剂、等渗剂或吸收延迟剂等。这些介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域技术人员公知的。除了常规介质或试剂与活性成分不相容的情况之外，可以设想其在药物组合物中的用途。另外的活性成分也可以掺入组合物中。

本申请还涉及纳米抗体 B12 在体外检测样品中的 CEACAM5 的用途。

术语“样品”在本文中意指较大元件的一部分。优选地，样品是生物来源的物质。其包含有待根据例如物理，生化，化学和/或生理特点来表征和/或鉴定的细胞和/或其它分子实体例如，短语“疾病样品”或其变体指得自感兴趣的受试者的任何样品，预计或已知其包含待表征的细胞和/或分子实体。样品包括但不限于，组织样品(例如肿瘤组织样品)，原代或培养的细胞或细胞系，细胞上清，细胞裂解物，血小板，血清，血浆，玻璃体液，淋巴液，滑液，

滤泡液(follicular fluid), 精液, 羊水, 乳, 全血, 血液衍生的细胞, 尿液, 脑脊髓液, 唾液, 痰, 泪, 汗液, 粘液, 肿瘤裂解物, 和组织培养液(tissue culture medium), 组织提取物如匀浆化的组织, 肿瘤组织, 细胞提取物, 及其组合。

下面结合附图和实施例对本申请作进一步详细的说明。

以下实施例仅用于说明本申请而不用限制本申请的范围。

实施例 1

确认 CEACAM5 是侵袭变异性前列腺癌的标志物 (组织/细胞水平)

试验过程:

1、细胞免疫荧光分析

AR 表达缺失是侵袭变异性前列腺癌重要病理特征。以此作为标准并根据文献报道, 选取激素敏感性前列腺腺癌细胞系 LNCAP、去势抵抗性前列腺腺癌来源细胞 22RV1 与 C4-2、具有小细胞癌特征的侵袭变异性前列腺癌 PC3 和 DU145。上述细胞系植入多聚赖氨酸包被的 Perkin Elmer ultra cell 96 孔板内。具体步骤如下:a), 将细胞置于冰上, 用 PBS 洗涤 3 次, 0.25% 多聚甲醛固定 10 分钟; b), 用 PBS 洗涤 3 次, 4%BSA 封闭 1 小时; c), 用封闭液按 1: 100 稀释 CEACAM5 抗体, 室温下与细胞共孵育 1 小时; d), 预冷 PBS 洗涤 3 次, 用封闭液按 1: 1000 稀释 Alexa 594 偶联的二抗, 与细胞共孵育 1 小时; e), 预冷 PBS 洗涤 3 次, Hoechst 33342 核染, 荧光倒置显微镜检测 CEACAM5 蛋白的表达情况。

2、流式细胞术膜表面抗原检测

选取免疫荧光所用细胞系、激素敏感性前列腺腺癌细胞系 VCAP 以及具有神经内分泌化表型特征的侵袭变异性前列腺癌来源细胞系 NCI-H660。胰酶消化后收集细胞并使用 PBS 清洗。4%PFA 固定 10 分钟后, 再次 PBS 清洗。本次使用抗体为直标流式抗体 (Biolegend 公司, cat. 392805)。按照 1:100 比例使用 4% BSA 溶液稀释 CEACAM5 抗体并在室温下孵育 1 小时并 PBS 清洗 3 遍。直标流式抗体直接上机。间标抗体则再次加入 1:1000 稀释的 Alexa 594 偶联的二抗并于室温下孵育 1 小时。充分 PBS 清洗后上机, 检测细胞系膜表面抗原特征。

3、组织免疫组化染色

神经内分泌癌是侵袭变异性前列腺癌最为常见的病理类型。因此, 按照国际前列腺癌基金会所推荐的以 SYN、CHGA 以及 CD56 标志物中任意一个阳性作为标准, 于南方医科大学第三附属医院收集临床标本 4 例。同样方法收集 PDX 模型组织 3 例。同时使用前期实验收集的 PC3 细胞系 CDX 模型 (OCT 包埋)。正常人体组织、前列腺癌、良性前列腺增生及正常前列腺组织来源于组织芯片 (中科光华)。石蜡包埋组织脱蜡水化进行抗原修复。OCT 包埋组织, 切片后使用 PBS 清除 OCT 并使用丙酮/甲醇溶液 (4: 1) 固定 10 分钟。所有组织用 3%

过氧化氢溶液封闭内源性过氧化物酶活性。用 TBS 清洗 2~3 次后, 4% 驴血清封闭 1 小时。之后用封闭液按 1: 100 稀释 CEACAM5 抗体, 与芯片共孵育 1 小时。再次用 TBS 清洗 2~3 次, 用封闭液按 1: 200 稀释生物素标记的二抗, 与芯片共孵育 1 小时。TBS 清洗 2~3 次后滴加适量的辣根过氧化物酶标记的亲和素工作液, 室温孵育 30 分钟。TBS 冲洗 2~3 次。DAB 显色剂显色 2 分钟后自来水充分冲洗, 脱水, 透明, 封片。

结果分析:

利用细胞免疫荧光分析与流式细胞术膜表面抗原检测对前列腺癌来源的全细胞谱系进行 CEACAM5 抗原膜表达分析。如图 1A 和图 1B 所示, 可以发现 CEACAM5 仅表达于呈现非上皮表征的去势抵抗性前列腺癌细胞系。其在具有神经内分泌化特征的 NCI-H660 细胞系的阳性率为 100%, 而在呈现小细胞分化特征的 PC3 细胞阳性率为 24%。至于呈腺上皮分化的前列腺癌细胞系均为阴性表达。其中, 上述实验选取 CEACAM5 呈阳性表达的人结肠癌细胞系 Ht29 作为阳参照。

利用组织免疫组化染色分析, 请参阅图 1C, 发现 CEACAM5 表达于具有神经内分泌化特征的侵袭性变异性前列腺癌临床标本、PDX 模及 PC3 CDX 模型。但是在前列腺腺癌组织 (按照国际泌尿病理协会前列腺癌病理分级系统, ISUP 分级, 进行分组处理)、前列腺增生及正常前列腺组织中未见显著表达。

另外, 请参阅图 2, 利用组织免疫组化染色分析方式检测中科光华来源的正常组织芯片发现, 除部分消化道脏器如食管和结肠, 人体正常组织内的 CEACAM5 染色均为阴性。

综上, 提示 CEACAM5 是 CRPC-NE 重要的膜蛋白标志物, 并可作为抗体靶向治疗的潜在靶点。

实施例 2

靶向 CEACAM 纳米抗体噬菌体文库筛选、纯化与亲和力鉴定

试验过程:

1、纳米抗体筛选

CEACAM5-FC 蛋白购买自 ACROBiosystems 公司。采用免疫管法对天然的羊驼源噬菌体展示纳米抗体文库进行筛选, 所选择的噬菌体展示库容量为 2×10^9 。筛选步骤如下: a), 将目的蛋白按 $50 \mu\text{g/mL}$ 浓度包被在免疫管上, 进行 3 轮富集筛选; b), 使用第三轮噬菌体洗脱液铺板, 随机挑取 192 个单克隆进行 ELISA 验证。使用第三轮噬菌体洗脱液铺板挑取单克隆做 ELISA, 以 CEACAM5 的 ELISA 读数大于对应 BSA 读数 3 倍, 且 FC 抗原的 ELISA 读数对应 BSA 读数低于 2 倍为阳性标准; c), 经过二次噬菌体 ELISA 鉴定的阳性单克隆送公

司测序确定序列信息；d)，根据测序信息设计并合成筛选到的纳米抗体，通过大肠杆菌进行表达纯化；e)，利用 ELISA 亲和性实验来初步鉴定纳米抗体的亲和力。

2、纳米抗体的纯化表达

将纳米抗体基因序列克隆入 PET-22B 载体，同时融合表达血凝素标签 (hemagglutinin HA tag) 与 HIS TAG 用于后续检测。表达纯化步骤如下：a)，由于为周质表达系统，在 30°C, 250rpm 条件下，使用 1.0mM 浓度的 ITPG 诱导过夜；b)，离心收集菌体、PBS 清洗并使用含有 10mM 咪唑的磷酸盐溶液重悬菌体；c)，按照每 50ml 菌液对应 50 万单位的比例加入多粘菌素，37°C 条件下摇床裂菌 1 小时；d)，17000 g, 4°C 离心 30 min，取上清与 Ni 填料 4°C 共孵育 1 小时；e)，使用梯度咪唑/磷酸盐溶液 (10mM 和 20mM) 清洗去除菌体蛋白。15% SDS-PAGE 胶电泳分离，考马斯亮蓝染色及蛋白免疫印迹分析鉴定。

3、纳米抗体 B12 的亲和力验证

1) 纳米抗体的 ELISA 实验

ELISA 板包被 CEACAM5-FC 蛋白。同时，包被 FC 抗原与 BSA 作为阴性参照。4%BSA 封闭，之后加入各种浓度的纳米抗体在室温孵育 1 小时，PBS 漂洗 3 次，anti-HA 抗体室温孵育 1 小时后，辣根过氧化物酶标记的抗 HA 抗体放大信号，TMB 显色。

2) 表面等离子共振实验

此实验用来验证在体外表达纯化的纳米抗体与体外纯化的抗原蛋白直接相互作用，并计算二者的平衡常数。纯化抗原蛋白被固定在芯片上，不同浓度的纳米抗体被顺序加入来分析其与抗原蛋白的亲和力，记录 360 秒内的反应信号，制作动力学曲线，计算各相关参数。

3) Cell elisa 实验

将纳米抗体与 IR800-Mal 按照 5:1 的投料比，4°C 条件下反应过夜。之后进行 SDS-PAGE 凝胶分析纯度，并于荧光模式下检测蛋白的标记效果。如 4%多聚甲醛固定种植于 96 孔板中 CEACAM5 阳性的 HT29 及 PC3 细胞。4%BSA 封闭 1 小时。用封闭液将纳米抗体稀释为梯度工作液并与细胞在室温下孵育 1 小时。PBST 洗涤 3 次。全自动电泳荧光免疫分析仪检测细胞表面纳米抗体的结合情况。

4、纳米抗体 B12 的特异性验证

1) CEACAM5 敲低的 PC3 细胞系构建

所用慢病毒由维真生物公司合成，其核苷酸序列如下 (SEQ ID NO. 10)：

5'-CCGGGCAGTATTCTTGGCGTATCAACTCGAGTTGATACGCCAAGAATACTGCTTT
TTG-3'。

将 0.5×10^6 细胞种植于六孔板内。12 小时后更换 OPTI-MEM 培养基并按照 MOI 值为 30

加入慢病毒以及聚酰胺 (10 μ g/ml) 以促进病毒感染。48 小时后移除 OPTI-MEM 培养基并加入含有 2 μ g/ml 嘌呤霉素的完全培养基以筛选高拷贝的感染细胞。连续筛选 4 天直至无死细胞漂浮。更换全陪并扩大培养。使用 qRT-PCR 以及免疫印迹实验分析 CEACAM5 敲低效率。

2) 斑点印迹实验

使用含有 PMSF、蛋白酶及磷酸酶抑制剂的 RIPA 强效裂解液提取细胞总蛋白, BCA 定量。取硝酸纤维膜, 使用铅笔画出 1cm² 小格。按照 20.0 μ g 的加样蛋白浓度配制 5 μ L 待检溶液并滴入小格内。室温晾干。10%脱脂奶粉封闭 1 小时后, 使用 4% BSA 按照 20 μ g/ml 浓度配制纳米抗体工作液 15ml。将纳米抗体工作液与硝酸纤维膜置入 10cm 皿内, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBST 清洗 3 遍, 按照 1:1000 比例加入与辣根过氧化物偶联的 anti-HA 抗体室温孵育 1 小时。再次 PBST 清洗。ECL 显影曝光。

3) Cell elisa 实验

4%多聚甲醛固定种植于 96 孔板中的阴性对照与 CEACAM5 敲低 PC3 细胞。4%BSA 封闭 1 小时。用封闭液将纳米抗体稀释为梯度工作液并与细胞在室温下孵育 2 小时。PBST 洗涤 3 次。加入按照 1:100 稀释的 Anti-HA 鼠单克隆抗体并室温孵育 2 小时, 再次 PBST 清洗 3 次。最后加入 1:200 稀释的 Alexa 488 偶联的抗鼠二抗并室温孵育 1 小时, PBST 清洗三次以去除未结合抗体。使用荧光免疫分析仪以分析结果。

结果分析:

参阅图 3A, 通过三轮噬菌体纳米抗体文库筛选, 文库富集度超过 50 倍。随后, 从第三轮所得文库中挑选 192 个克隆进行二次噬菌体 ELISA 初步验证, 获得阳性克隆一个, 命名为纳米抗体 B12 (如图 3B 所示), 其对 CEACAM5 抗原具有良好亲和力。经测序所得纳米抗体 B12 基因序列如下:

GCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGGTGCAGCCTGGGGAGTCTCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGTGTACCTTCAGTACATATGGGATGGGCTGGGCCCCGCC
AGGTTCCAGGGAAGGGACTCGAGTGGGTGTGCGGAACCTTATAGTGATGGTAGCACATAT
TGTGCAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATACGG
TGTATTTGCAAATGACTAGCCTGAAACCTGAAGATACGGCCGTTTATTACTGTACAGCCC
CCAAACATGAATACGGGACTAACTGGTACGAGAGGACAATTTACTCGAATGAACTTGAT
TACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA。

同时, 上述基因序列所对应的纳米抗体 B12 的氨基酸序列如下:

AVQLVESGGGLVQPGESLRISCAASGVTFSTYGMGWARQVPGKGLEWVCGTYSYGST
YCADSVKGRFTISRDNKNTVYQLQMTSLKPEDTAVYYCTAPKHEYGTNHWYERTIYSNELD

YWGQGTQVTVSS。

进一步,根据 B12 序列优化密码子后,导入 PET. 22B 载体并在大肠杆菌中进行诱导表达。多粘菌素裂菌后, Ni 柱捕获带有 His 标记蛋白的 B12 纳米抗体。梯度咪唑/磷酸盐溶液(10mM 和 20mM)清洗去除菌体蛋白。获得高纯度纳米抗体 B12。参阅图 3C 和图 3D,通过使用考马斯蓝染色和蛋白免疫印迹方式验证纳米抗体所带 HIS 及 HA tag,确定纯化所得为纳米抗体 B12。

图 3E 为纳米抗体 B12 的亲合力验证试验中纳米抗体的 ELISA 实验结果图,图 3F 为纳米抗体 B12 的亲合力验证试验中表面等离子共振实验结果图,图 3G 为纳米抗体 B12 的亲合力验证试验中 Cell elisa 实验结果图。参阅图 3E、图 3F 和图 3G 可以看出,纳米抗体 B12 在识别 CEACAM5 抗原的过程中,具有高度的特异性及亲和力,纳米抗体 B12 可有效识别 CEACAM5 抗原。本实施例通过 ELISA、SPR 及 Cell ELISA 证实了纳米抗体 B12 靶向 CEACAM5 分子及阳性细胞系的效能。

图 3H 为纳米抗体 B12 的特异性验证试验中 CEACAM5 敲低的 PC3 细胞系构建结果图,图 3I 为纳米抗体 B12 的特异性验证试验中的 Cell elisa 实验结果图,图 3J 为纳米抗体 B12 的特异性验证试验中的斑点印迹实验结果图。请参阅图 3H,通过慢病毒转染的方式构建 CEACAM5 抗原稳定调低的侵袭变异性前列腺癌细胞系 PC3,使用 qRT-PCR 与免疫印迹确认敲低效率,在蛋白水平可降低至对照组的 75%。请参阅图 3I 和图 3J,分别利用 Cell ELISA 与 Dot blot 实验证实 CEACAM5 敲除可降低结合至 PC3 细胞系膜表面及靶向其细胞裂解液的纳米抗体 B12 信号达 30%。以上结果与敲低细胞系的免疫印记表征相一致,证实纳米抗体 B12 对 CEACAM5 抗原阳性前列腺癌细胞系的靶向作用具有良好的特异性。

实施例 3

靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12 的体内成像

试验过程:

1、纳米抗体 B12 荧光标记

将纳米抗体 B12 与 IR800-Mal 按照 2:1 的投料比,以及将对照纳米抗体 C9 与 IR800-Mal 按照 2:1 的投料比,4°C 条件下反应过夜。

2、裸鼠皮下瘤模型构建

体外扩大培养侵袭变异性前列腺癌细胞系 PC3 并制备 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液。使用 5-6 周龄的雄性裸鼠与右侧肢体皮下注射 100 μl 的细胞悬液。待瘤体生长至 300-500 mm^3 时进行体内成像。

3、体内成像研究

将荧光分子标记的纳米抗体通过尾静脉注射的方式注入裸鼠循环内。分别在 2、4、8、12 及 24 小时进行成像。随后处死裸鼠，收集裸鼠重要脏器并再次进行成像以确认纳米抗体 B12 在体内的成像能力。

结果分析：

纳米抗体 B12 可在体内有效靶向识别表达 CEACAM5 抗原的前列腺癌细胞系 PC3。将荧光染料 IR800 标记于纳米抗体 B12 与无靶向性纳米抗体 C 通过尾静脉注入已构建 PC3 异种移植物的雄性裸鼠循环内。参阅图 4A，结果显示 24 小时后，IR800 标记的纳米抗体在 PC3 异种移植植物中存在显著富集。

参阅图 4B，切除裸鼠脏器与 PC3 异种移植物的荧光信号检测分析，确认纳米抗体 B12 在 CEACAM5 阳性的 PC3 瘤体内存在显著富集。

进一步，进行组织纳米抗体检测分析，参阅图 4C，通过靶向 VHH 抗体检测纳米抗体并使用免疫荧光作为技术手段分析，发现接受 B12 注射的 PC3 异种移植植物中存在显著的荧光信号。

因此，纳米抗体 B12 可在体内有效识别侵袭变异性前列腺癌细胞系 PC3 所构建的移植植物。

实施例 4

靶向 CEACAM5 免疫毒素 B12-PE38 的制备与治疗实验

试验过程：

1、免疫毒素 B12-PE38 的制备与鉴定

将免疫毒素 B12-PE38 基因序列 (SEQ ID NO. 11) 克隆入 PET-15B 载体，同时融合表达血凝素标签 (hemagglutinin HA tag) 与 HIS TAG 用于后续检测。表达纯化步骤如下：a)，在 30°C, 220rpm 条件下，使用 1.0mM 浓度的 ITPG 诱导过夜；b)，离心收集菌体、PBS 清洗并使用含有 10nM 咪唑的磷酸盐溶液重悬菌体并使用超声裂菌处理；c)，17000 g, 4°C 离心 30 min，取上清与 Ni 填料 4°C 共孵育 1 小时；d)，使用梯度咪唑/磷酸盐溶液 (10mM 和 20mM) 清洗去除菌体蛋白。15% SDS-PAGE 胶电泳分离，考马斯亮蓝染色及蛋白免疫印迹分析鉴定。使用 Elisa 及 Cell Elisa 实验鉴定免疫毒素在分子与细胞层面上靶向 CEACAM5 抗原的亲合力。

其中，B12-PE38 基因序列为 B12-PE38 氨基酸序列 (SEQ ID NO. 12) 通过 EMBOS Backtranseq (<https://www.ebi.ac.uk/>) 在线数据库转化生成，生成核苷酸序列对应种属为 (*Escherichia coli*)。

2、免疫毒素 B12-PE38 体外治疗效果分析

1) PC3 体外吞噬和摄取免疫毒素 B12-P38 的分析

离心超滤除盐、除咪唑后，免疫毒素 B12-PE38 使用荧光分子 Cy5 标记（比例 2: 1），并使用凝胶电泳确认。将标记好的免疫毒素分子使用 0.22 μm 滤器过滤除菌并加入 PC3 培养基（设置不同浓度/时间梯度以及处理条件）。

在吞噬实验中，PC3 细胞种植于多聚赖氨酸包被的 Perkin Elmer ultra cell 96 孔板内并使用 PBS 清洗 3 次以去除未摄取的免疫毒素。而后 4%PFA 固定并使用 BSA 溶液封闭。荧光显微镜下拍摄吞噬结果并使用 Image J 软件分析。

摄取实验采用流式细胞术分析。细胞收集后使 PBS 清洗 3 次并使用 PFA 固定。随后上机检测，使用 APC 通道分析。

2) 免疫毒素 B12-PE38 体外杀伤 PC3 细胞的实验分析

实验所用蛋白均离心超滤以去除咪唑。

CCK8: 将 2000 细胞种植于 96 孔内。使用培养基梯度稀释免疫毒素并加入 96 孔，每组设置至少 3 个复孔。72 小时后更换含有 CCK8 检测液的培养基，酶标仪测定 450nm 处的读数。设置阴性对照组 B12-PE38 mutant。

Edu 实验: 5×10^4 细胞种板并加入 $1 \mu\text{M}$ 浓度的免疫毒素。12 小时后，使用 PFA 固定细胞并使用 PBS 清洗 3 次。按照试剂盒要求染色细胞，并使用荧光显微镜拍照。计数 EDU 阳性细胞数目。

Transwell 实验: 将 0.5×10^6 细胞种植于 6 孔板内，并使用 $1 \mu\text{M}$ 的免疫毒素预先处理 12 小时。随后，胰酶消化并收集细胞。按照 6×10^4 数量种入 Transwell 小室内并加入不含血清的空培。与之相反，下室则提供含有 20%FBS 的完全培养基。24 小时后取出小室并使用甲醇固定。结晶紫染色，拍照。

3、靶向 CEACAM5 免疫毒素体内治疗效果分析

1) 免疫毒素 B12-PE38 治疗 CEACAM5 阳性细胞系移植物的体内实验分析

使用入侵性前列腺癌细胞系 PC3 以及人结肠癌细胞系 HT29 分别构建在 5-6 周龄裸鼠，通过皮下注射的方式构建移植物模型。待移植物体积达到 100mm^3 左右时，通过尾静脉注射的形式注入免疫毒素 B12-PE38 进行治疗。治疗组共分为 2 个治疗剂量。大剂量组按照 0.6mg/kg 的剂量给药，小剂量组按照 0.4mg/kg 的方式接受治疗。阴性对照组则分别接受 B12 与 PBS 尾静脉注射治疗。总计予以 6 次治疗。间隔 1 天测量肿瘤体积并称量小鼠体重。

对于 PC3 移植物组，在治疗完成予以安乐死处死。切取瘤体并测量。收集肿瘤与重要脏器组织标本并使用 PFA 固定、乙醇梯度脱水与石蜡包埋。组织 HE 染色观察病变情况。同时，肿瘤组织标本进一步进行 ki67 免疫组化与 TUNEL 染色分析增殖与凋亡情况。

Ht29 组则进行生存分析，以评估免疫毒素 B12-PE38 治疗对于预后的影响。

2) 免疫毒素 B12-PE38 联合紫杉醇类化疗药物多西他赛治疗 PC3 细胞系移植物的体内实验分析

以紫杉醇类为基础或顺铂联合依托泊苷的化疗方案对于侵袭变异性前列腺癌患者生存周期延长有限。故测试免疫毒素 B12-PE38 联合多西他赛的治疗效能。根据实施例 3 所述的方法构建 PC3 裸鼠异种移植模型，并构建 PDX 组织来源的 NSG 小鼠模型。尾静脉给药免疫毒素 B12-PE38，总计 6 针。多西他赛则予以腹腔给药 (2.5mg/kg 计算)，总计 4 针。通过生存分析方式评估治疗效果。

3) 免疫毒素 B12-PE38 治疗侵袭性前列腺癌细胞系 PC3 胫骨原位移植瘤的效能分析

骨转移为前列腺癌的重要病理特征与预后不良因素。因此，构建胫骨原位瘤模型评估治疗效果。通过胫骨平台穿刺注入 50 μ l PC3 细胞悬液。3 周后待 X 分析见溶骨性改变，则开始予以治疗。总计予以 6 针。

结果分析：

图 5 为基于靶向 CEACAM5 纳米抗体 B12 的免疫毒素构建与鉴定结果图。

请参阅图 5A，通过考马斯蓝染色鉴定，合成的 B12-PE38 融合免疫毒素野生型与突变型的表征结果。请参阅图 5B，ELISA 实验确认 B12-PE38 免疫毒素体外靶向 CEACAM5 抗原的亲合力。

Cell ELISA 实验进一步证实 B12-PE38 免疫毒素可特异性靶向 CEACAM5 阳性的小细胞前列腺癌细胞系 PC3，其中所用免疫毒素预先标记荧光分子 Cy5 染料。图 5C 示出了靶向 PC3 细胞系的亲和力，其中，使用 CEACAM5 阳性的人结肠癌细胞系 HT29 作为阳性参照，CEACAM5 阴性的人前列腺癌 22RV1 和 VCAP 细胞系作为阴性参照。图 5D 为靶向效应的特异性结果图，如图中所示，使用纳米抗体 B12 可有效阻断 B12-PE38 对 PC3 细胞系的靶向效应，无靶向性的 C9-PE38 免疫毒素组则缺乏荧光信号。

图 5E 和图 5F 为 PC3 体外吞噬和摄取免疫毒素 B12-PE38 的分析结果图。如图中所示，CEACAM5 抗原阳性的 PC3 细胞系可有效摄取免疫毒素 B12-PE38，其中，所用免疫毒素均预先标记荧光染料分子 Cy5。图 5E 为荧光显微镜拍摄结果，图中荧光信号使用 Image J 软件进行测量。图 5F 为流式细胞实验分析结果，图中荧光信号使用 Cy5 细胞阳性率进行表征。结果发现免疫毒素 B12-PE38 的摄取具有显著的时间与浓度依赖性且可被靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12 阻断。同时，非靶向性免疫毒素 C9-PE38 处理组的摄取率低于 B12-PE38 处理组。

图 5G、图 5H 和图 5I 为免疫毒素 B12-PE38 体外杀伤 PC3 细胞的实验分析结果图，实验

证实 B12-PE38 可有效杀伤 CEACAM5 阳性的小细胞前列腺癌细胞系 PC3。其中，图 5G 为 CCK8 实验结果图，图 5H 为 Edu 增殖实验结果图，图 5I 为 Transwell 实验结果图。参阅图 5G 和图 5H 中，免疫毒素 B12-PE38 处理可显著降低 CEACAM5 阳性细胞系 PC3 增殖细胞比例；参阅图 5I，免疫毒素 B12-PE38 处理可显著抑制 PC3 细胞系体外迁移，表现为 Transwell 实验中 PC3 迁移细胞数量显著降低。

图 6 示出免疫毒素 B12-PE38 可在体内有效杀伤 CEACAM5 阳性肿瘤细胞系。图 6A 和图 6B 示出 B12-PE38 免疫毒素突变体可有效靶向 PC3 裸鼠异种移植物。所用 B12-PE38 免疫毒素突变体预先使用荧光染料分子 IR800 标记，并使用无靶向免疫毒素 C9-PE38 突变体蛋白作为阴性对照（备注：突变部分为毒素 PE38，避免对裸鼠造成伤害）。将荧光标记完成的蛋白经过尾静脉注入裸鼠循环内。结果发现 B12-PE38 突变体蛋白在注入裸鼠循环 12 小时后显著富集于 PC3 异种移植物内。请参阅图 6B，切除裸鼠脏器和 PC3 异种移植物的检测同样证实上述改变。

图 6C、图 6D、图 6E 和图 6F 为通过构建裸鼠 PC3 移植物模型并经尾静脉予以 B12-PE38 治疗的结果图。结果发现 B12-PE38 可在体内有效抑制 PC3 异种移植物的生长。其中，图 6C 为治疗周期图。移植物模型通过皮下瘤接种的形式构建，以 2 天为间隔进行尾静脉注射给药，总计予以 6 次免疫毒素 B12-PE38 注射治疗。图 6E 和图 6F 分别为不同治疗组瘤体的生长曲线图。其中，图 6E 示出了各治疗组中不同瘤子的生长曲线。结果显示，B12-PE38 治疗组 PC3 异种移植物生长曲线较 PBS 组和 B12 组显著受抑制。同时，接受较大剂量 B12-PE38 治疗组（0.6mg）的预后优于接受较小剂量组的预后。图 6G 和图 6H 为免疫毒素 B12-PE38 在裸鼠模型中治疗人结肠癌异种移植物效能的分析图。结果显示 B12-PE38 治疗可以显著抑制人结肠癌 HT29 的生长并改善裸鼠的预后。以上结果证实 B12-PE38 是适用于 CEACAM5 阳性肿瘤的有效治疗方式。

图 7 为免疫毒素 B12-PE38 治疗 CEACAM5 阳性细胞系移植物的体内实验分析中，不同治疗组 PC3 异种移植物的病理分析结果。图 7A 为组织 HE 染色结果，图 7B 为细胞增殖与凋亡标志物检测结果。图 7A 和图 7B 所示的结果与前期动物实验相一致，即免疫毒素 B12-PE38 治疗组优于未接受治疗组，接受免疫毒素 B12-PE38 大剂量治疗组（0.6mg）优于小剂量治疗组（0.4mg）。

图 8 为免疫毒素 B12-PE38 治疗 CEACAM5 阳性细胞系移植物的体内实验分析中，接受免疫毒素治疗小鼠的器官病理、血常规及生化指标分析结果图。其中图 8A 为脏器病理分析结果图，结果未发现接受免疫毒素治疗小鼠的重要脏器存在显著病变。图 8B 和图 8C 为血常规和生化指标分析结果图，显示接受 B12-PE38 小鼠生理状况无显著异常。

图9为免疫毒素B12-PE38协同多西他赛的治疗效果图。其中,图9A和图9B为B12-PE38协同多西他赛在PC3异种移植物的治疗效果图。图9C和图9D为B12-PE38协同多西他赛治疗人源前列腺癌PDX模型的效果图。结果均显示免疫毒素与多西他赛具有良好的协同效能。

图10为免疫毒素B12-PE38治疗PC3胫骨原位移植瘤的效能分析图。其中,图10A为建模与给药分说明,图10B为治疗周期中胫骨原位瘤X分析结果图,图10C为胫骨原位瘤的CT检查结果图,图10D为骨病理分析图。图10C所示的冠状位及CT重建结果显示,大剂量B12-PE38可显著抑制PC3胫骨移植瘤的生长;图10D所示的骨病理分析显示,免疫毒素B12-PE38可显著抑制胫骨移植瘤的生长。

上述实施方式仅为本申请的优选实施方式,不能以此来限定本申请保护的范围,本领域的技术人员在本申请的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本申请所要求保护的

范围。

权利要求书

1. 一种靶向 CEACAM5 的纳米抗体 B12，其特征在于，所述纳米抗体 B12 包含 3 个互补决定区，分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3；

其中，所述 CDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示，所述 CDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示，所述 CDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的纳米抗体 B12，其特征在于，所述纳米抗体 B12 还包含 4 个框架区，分别为 FR1、FR2、FR3 和 FR4；

所述 FR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示，所述 FR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示，所述 FR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示，所述 FR4 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的纳米抗体 B12，其特征在于，所述纳米抗体 B12 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

4. 一种核酸分子，其特征在于，所述核酸分子包含编码权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12 的核苷酸序列。

5. 根据权利要求 4 所述的核酸分子，其特征在于，编码所述纳米抗体 B12 的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 9 所示的核苷酸序列。

6. 一种载体，其特征在于，所述载体包含权利要求 4 或 5 所述的核酸分子。

7. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包含权利要求 4 或 5 所述的核酸分子，或者包含权利要求 6 所述的载体。

8. 一种药物偶联物，其特征在于，所述药物偶联物含有：

权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12，以及

选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子或酶。

9. 根据权利要求 8 所述的药物偶联物，其特征在于，所述药物偶联物含有所述纳米抗体 B12 和毒素；

所述毒素为 PE38 毒素。

10. 一种组合物，其特征在于，所述组合物包括权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12、权利要求 4 或 5 所述的核酸分子、权利要求 6 所述的载体、权利要求 7 所述的宿主细胞或权利要求 8 或 9 所述的药物偶联物。

11. 权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12、权利要求 4 或 5 所述的核酸分子、权利要求 6 所述的载体、权利要求 7 所述的宿主细胞或权利要求 8 或 9 所述的药物偶联物在制备检测去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌的产品中的应用。

12. 权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12、权利要求 4 或 5 所述的核酸分子、权利要求 6 所述的载体、权利要求 7 所述的宿主细胞或权利要求 8 或 9 所述的药物偶联物在制备治疗、预防去势抵抗性神经内分泌化阶段前列腺癌的药物中的应用。

13. 根据权利要求 12 所述的应用, 其特征在于, 所述药物包括 CAR T 相关药物、CAR NK 相关药物、双特异性抗体相关药物、纳米药物中的至少一种。

14. 权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12、权利要求 4 或 5 所述的核酸分子、权利要求 6 所述的载体、权利要求 7 所述的宿主细胞或权利要求 8 或 9 所述的药物偶联物在制备识别去势抵抗性前列腺癌神经内分泌化阶段成像的药物中的应用。

15. 权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12、权利要求 4 或 5 所述的核酸分子、权利要求 6 所述的载体、权利要求 7 所述的宿主细胞或权利要求 8 或 9 所述的药物偶联物在制备检测 CEACAM5 的产品中的应用。

16. 权利要求 1 至 3 任一项所述的纳米抗体 B12、权利要求 4 或 5 所述的核酸分子、权利要求 6 所述的载体、权利要求 7 所述的宿主细胞或权利要求 8 或 9 所述的药物偶联物在制备诊断、治疗、预防 CEACAM5 相关疾病的产品中的应用。

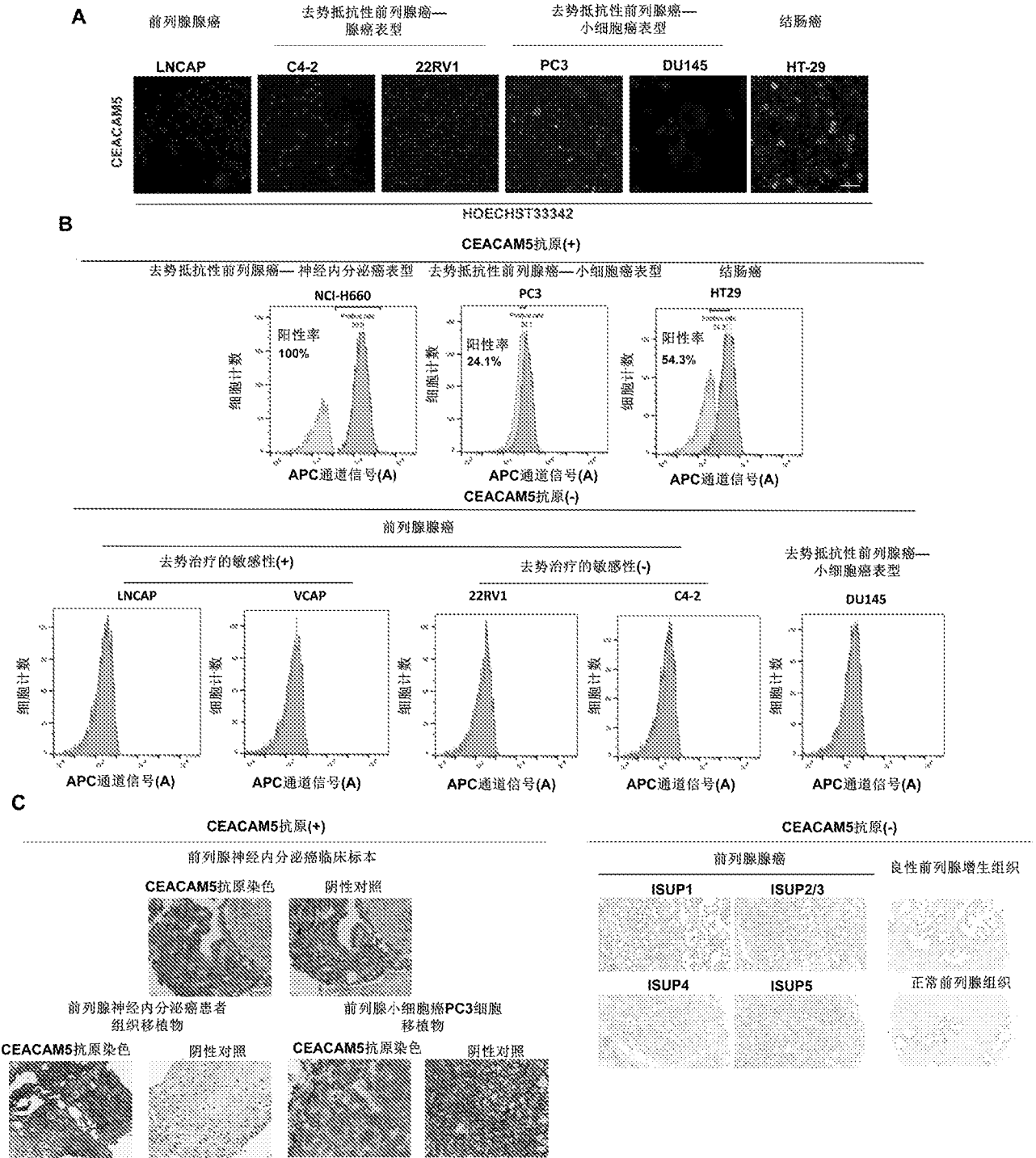


图 1

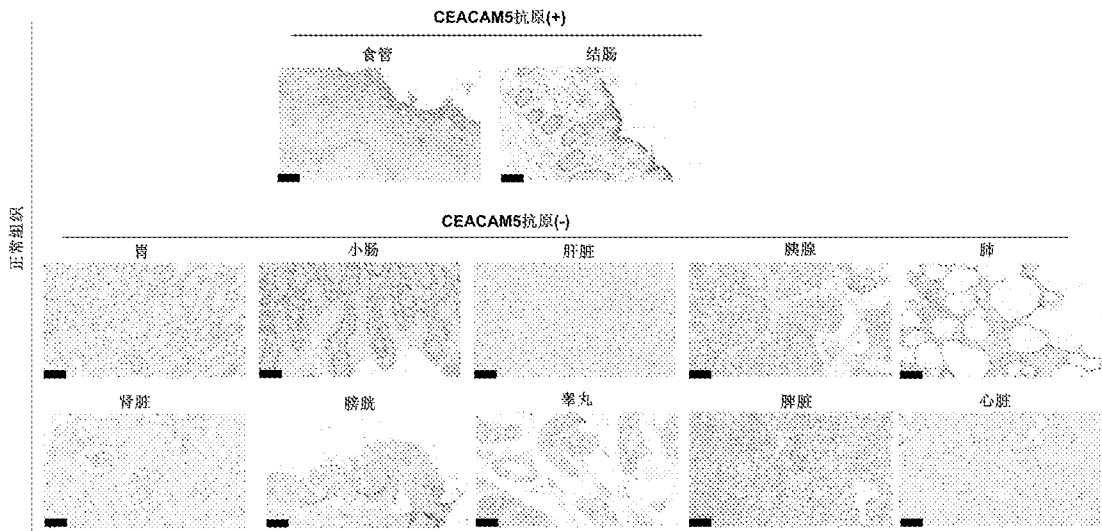


图 2

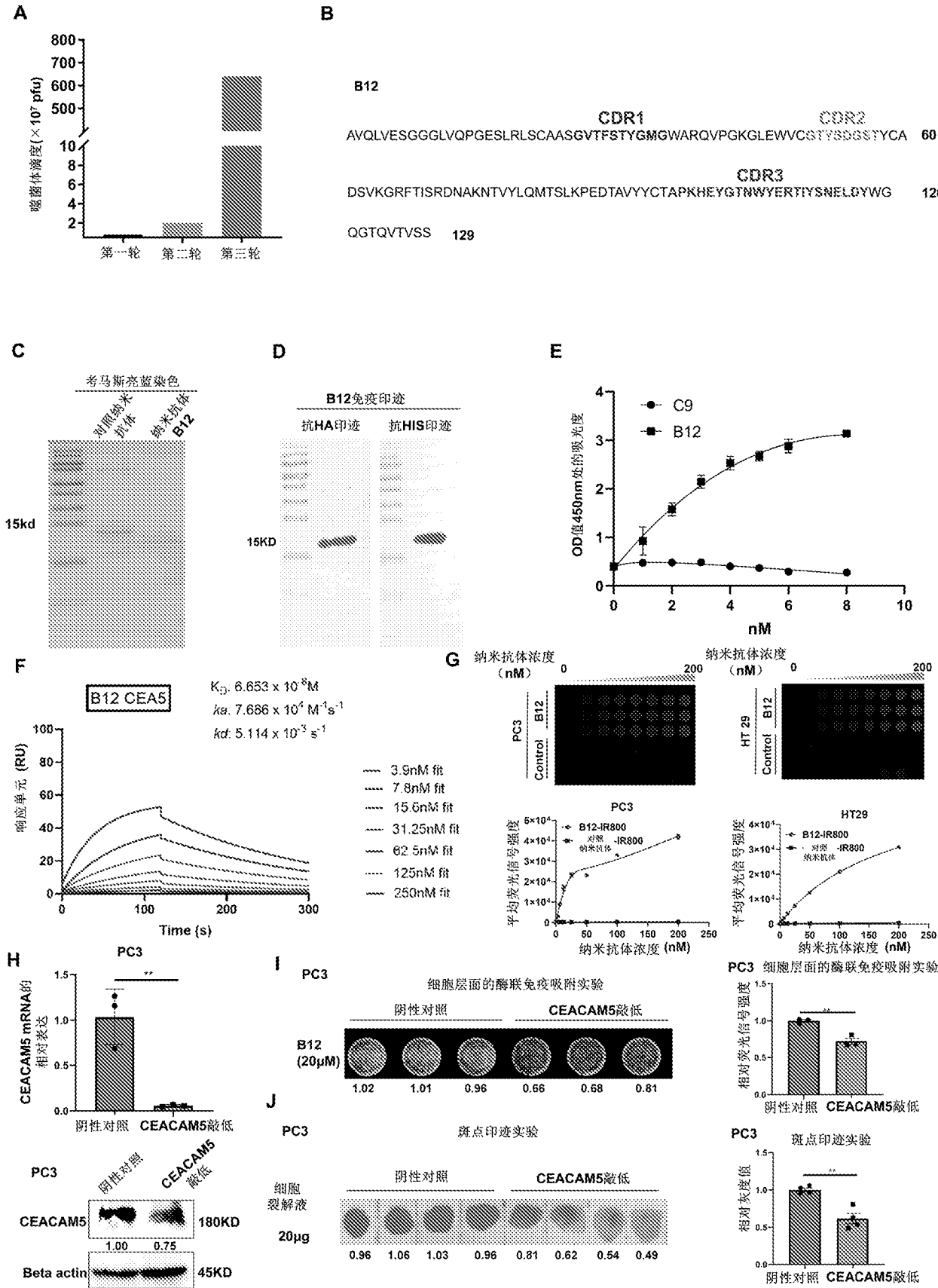


图 3

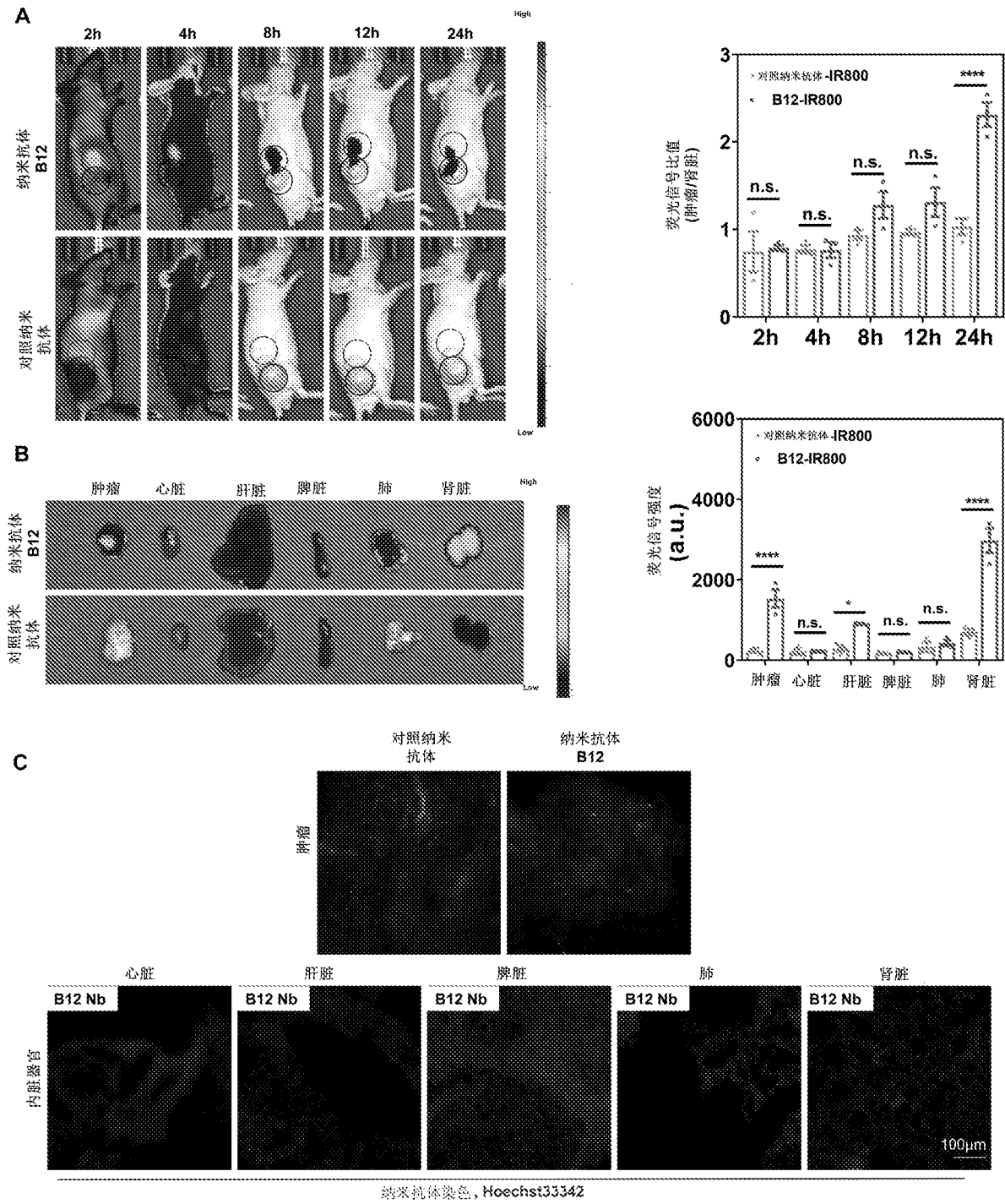


图 4

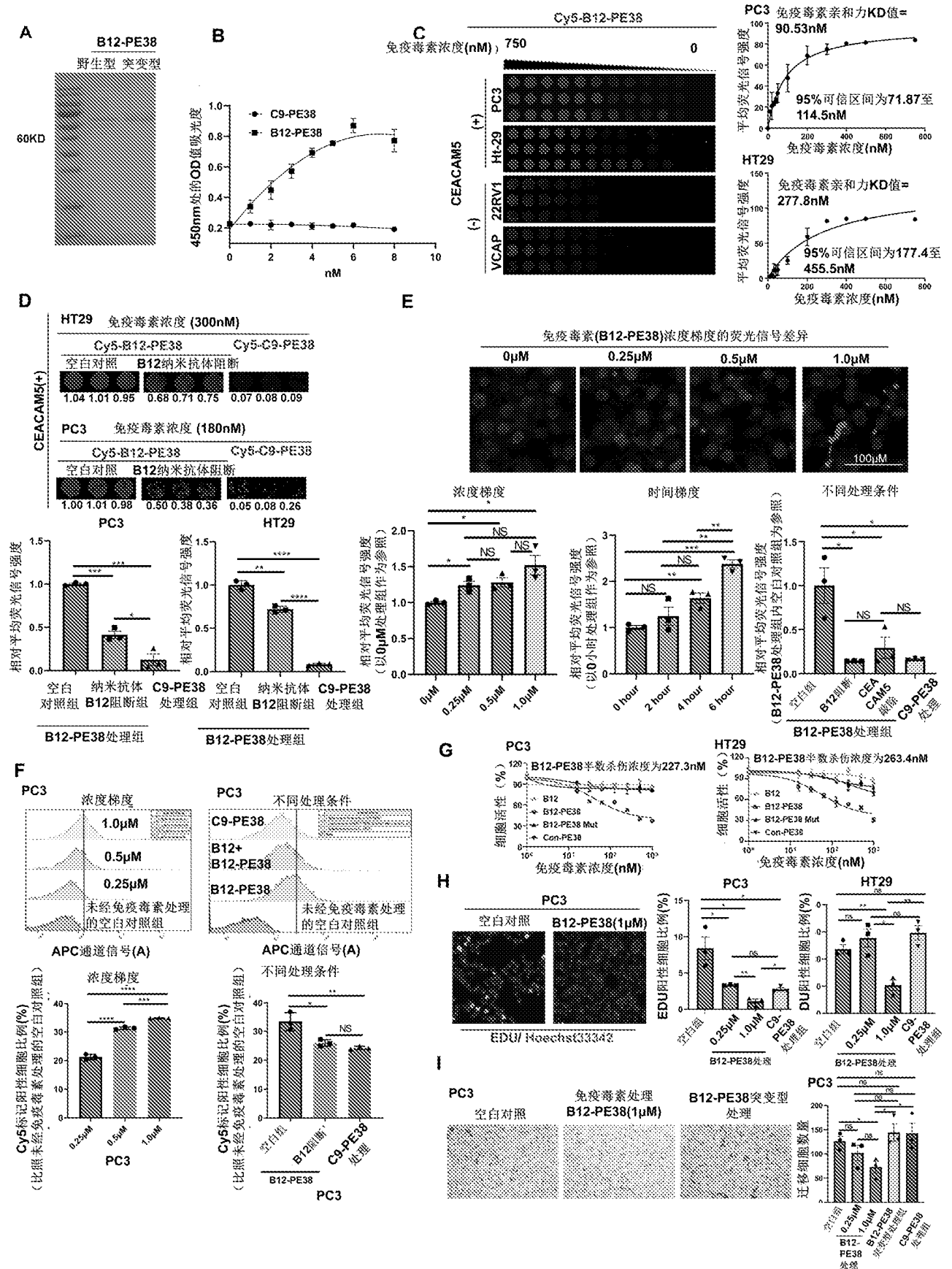


图 5

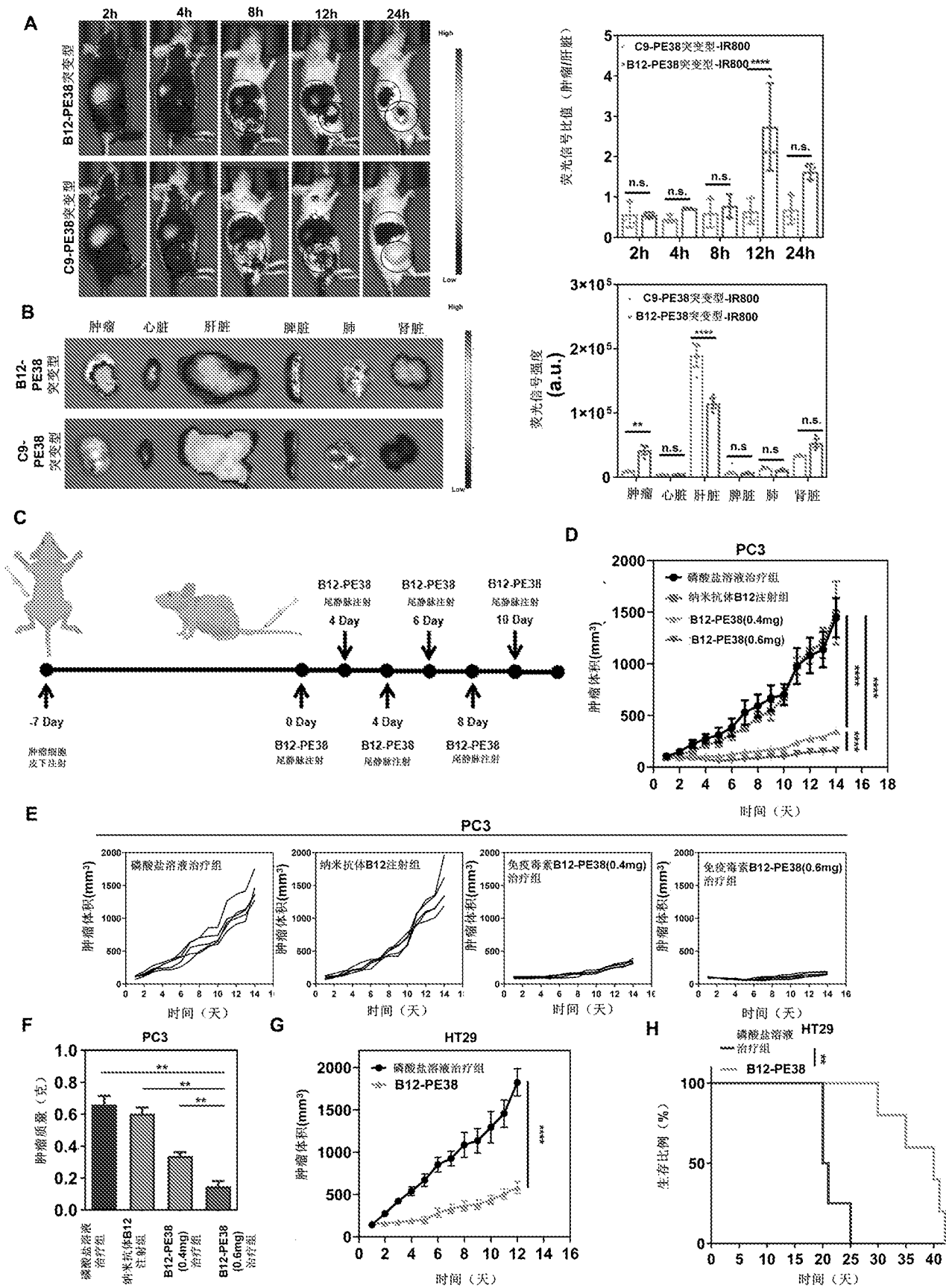


图 6

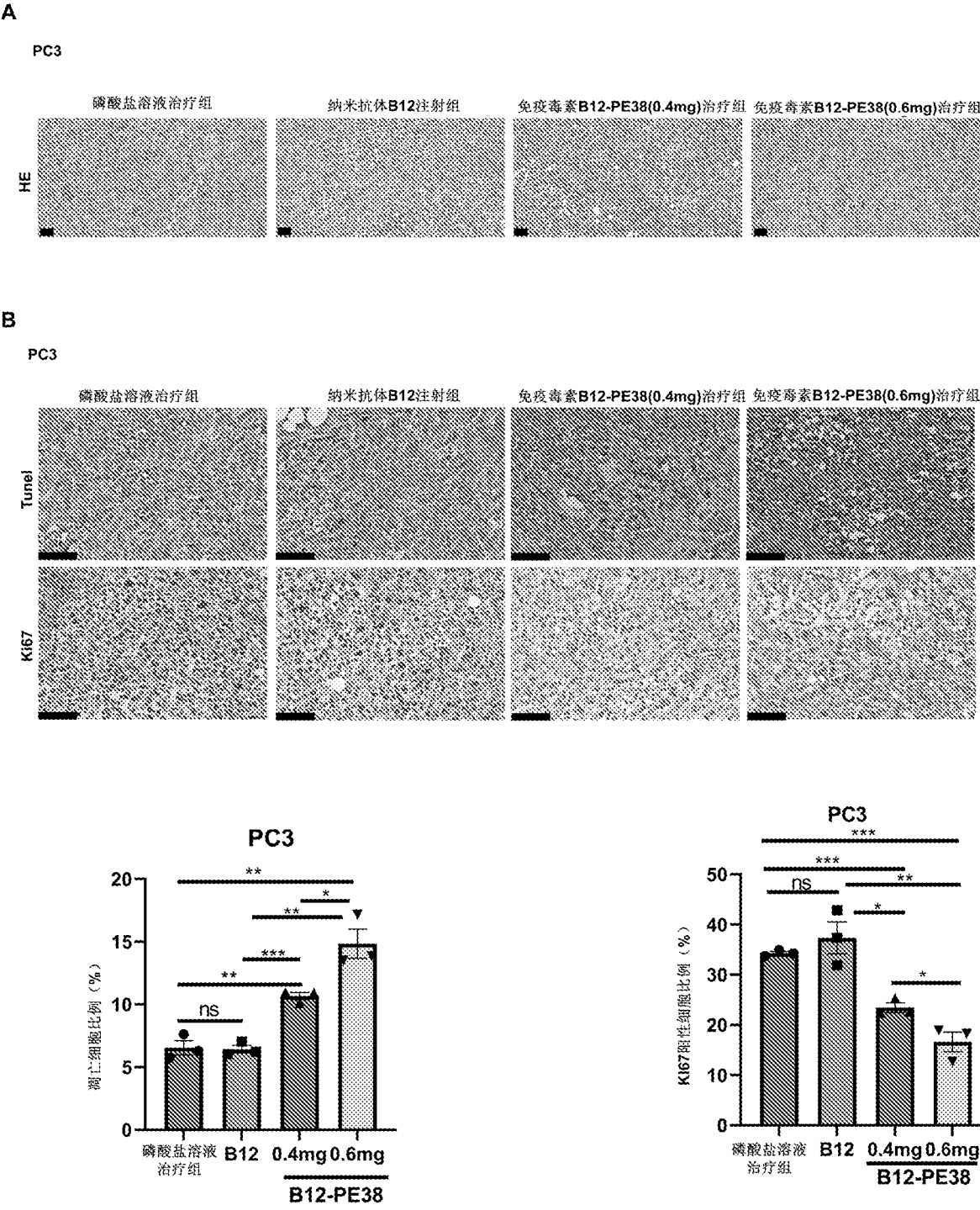
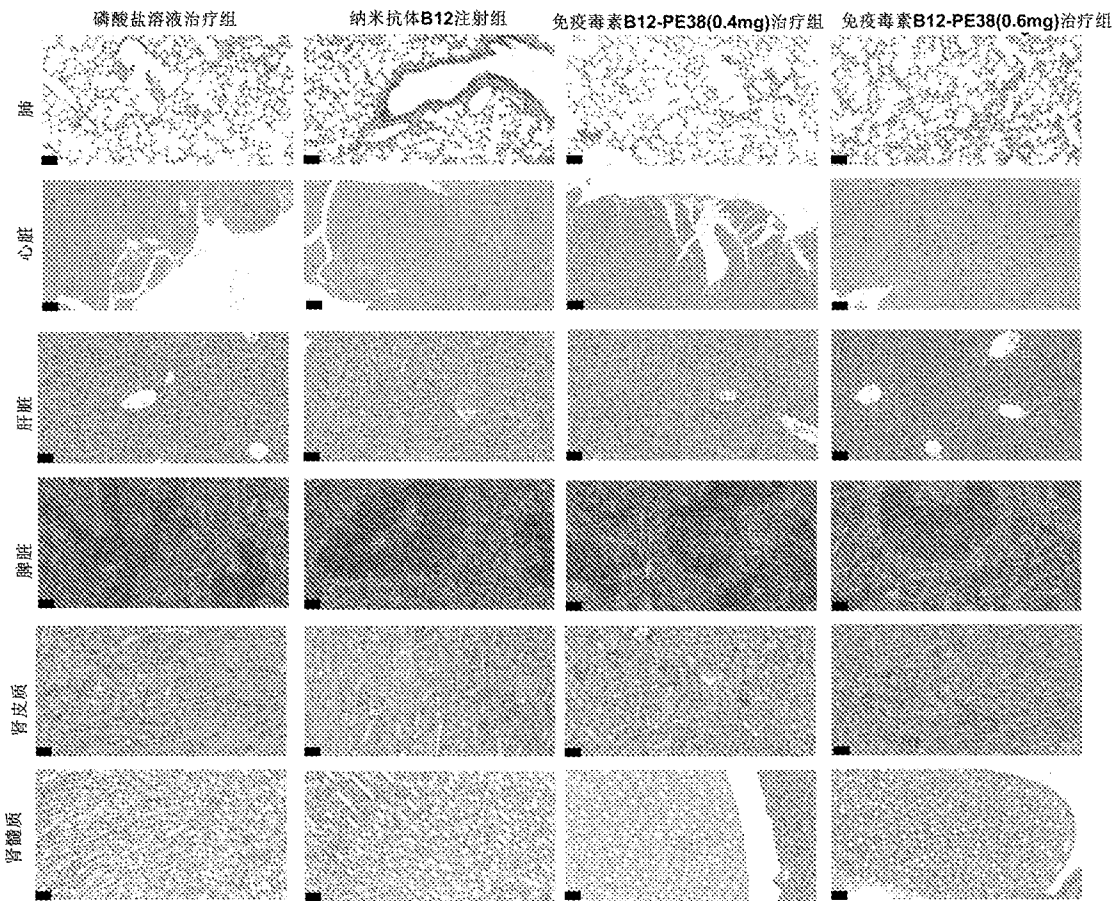


图 7

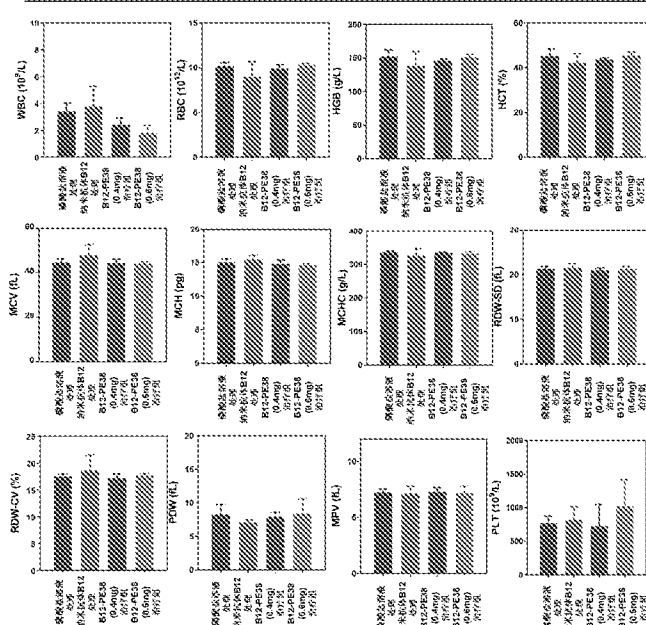
A

脏器病理



B

血常规



C

血液生化参数

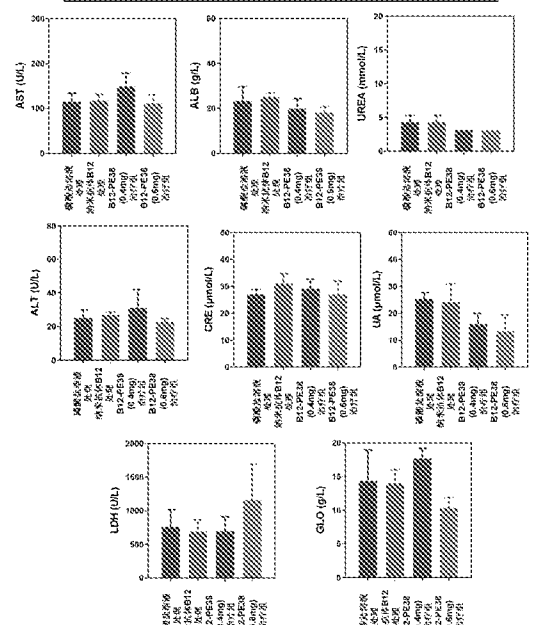


图 8

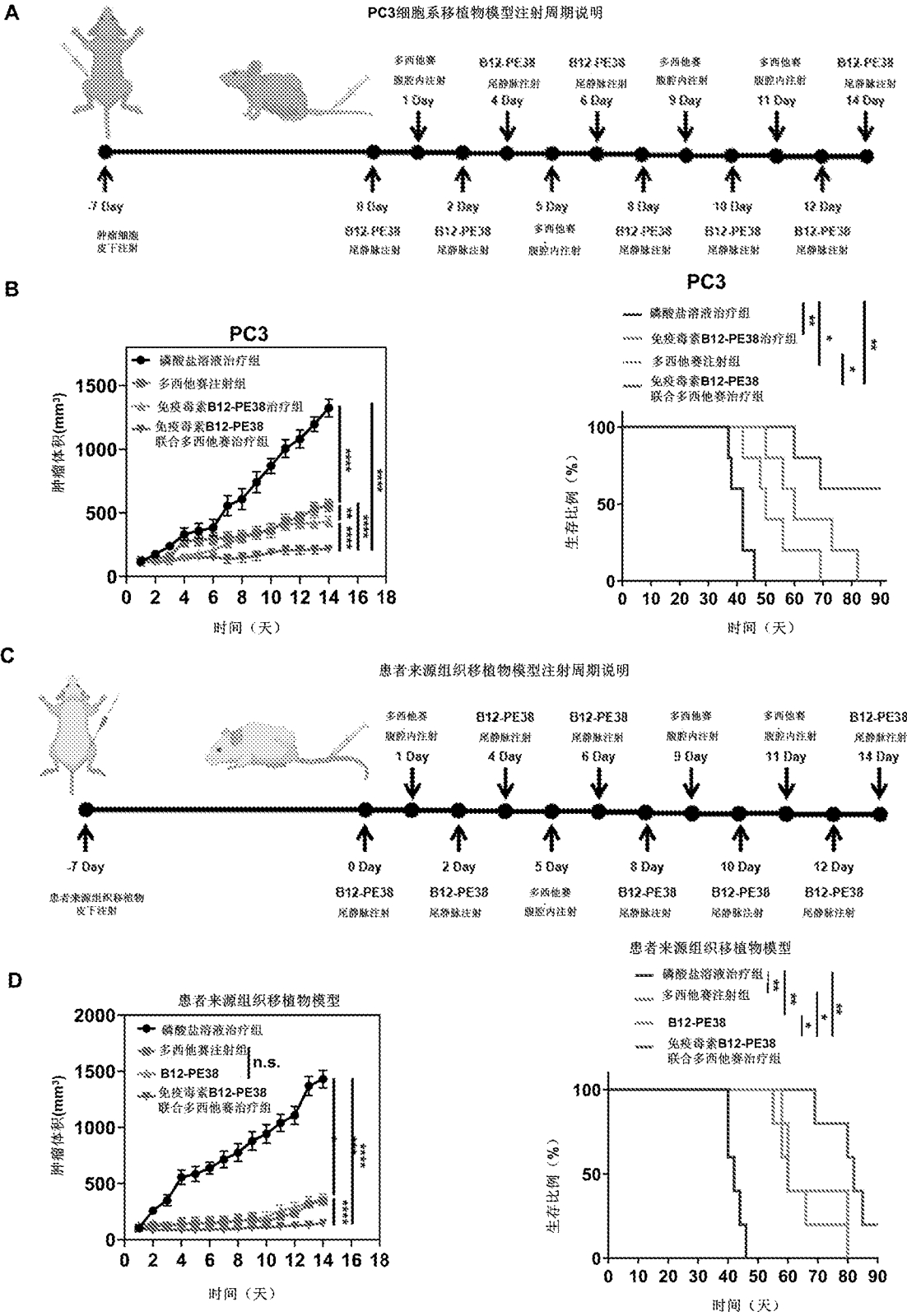


图 9

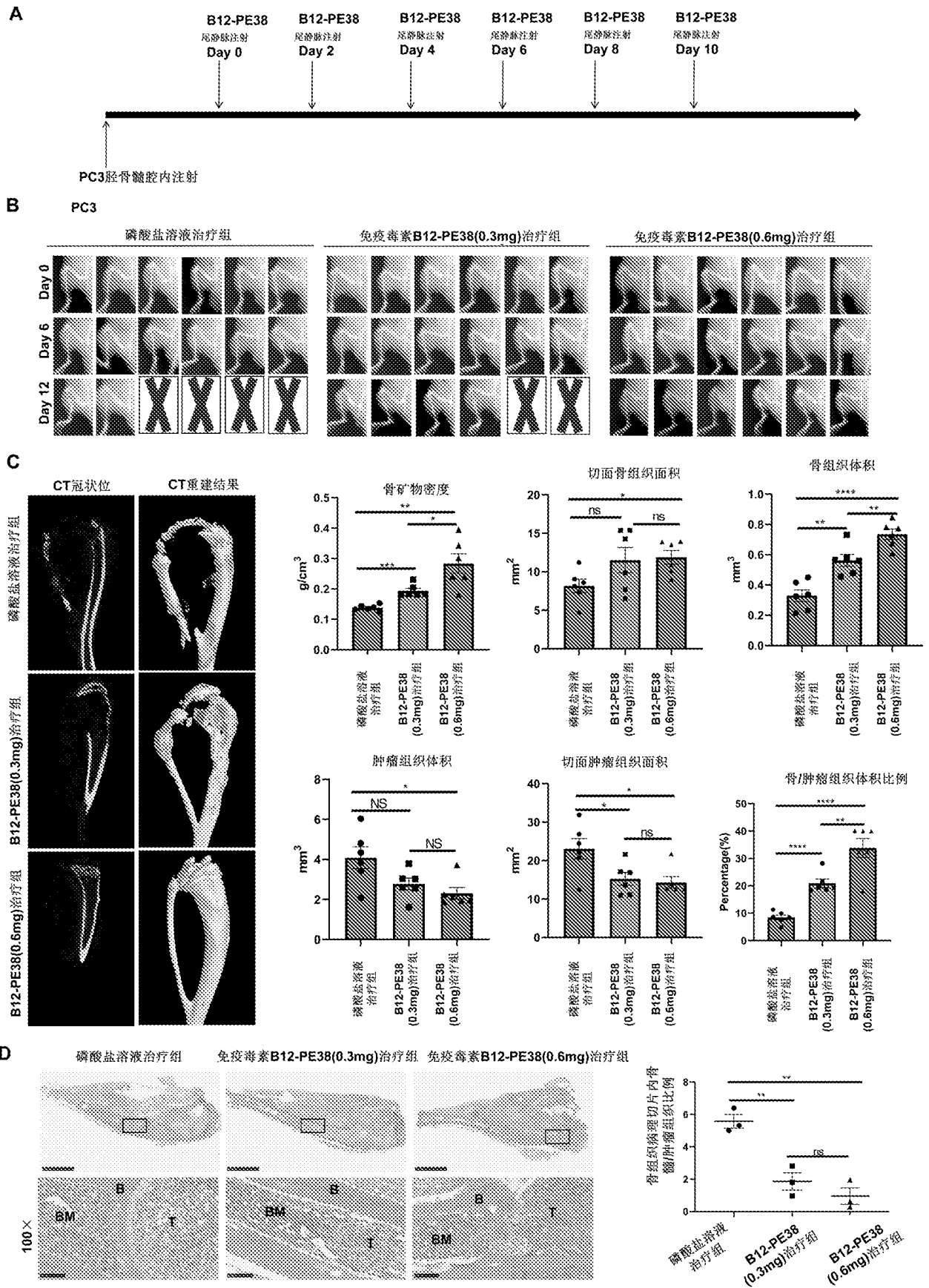


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071306

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/30(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; G01N33/574(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K,C12N,A61K,A61P,G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CJFD, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, STN, PUBMED, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, Nature, Science, GENBANK, CNKI, 万方, WANFNAG, 中国专利生物序列检索库, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval Library: CEACAM5, CD66e, nano antibody, antibodies, SEQ ID NO: 1, 6, 7, 8, 纳米抗体.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116178556 A (THE THIRD AFFILIATED HOSPITAL OF SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY (ACADEMY OF ORTHOPAEDICS, GUANGDONG PROVINCE)) 30 May 2023 (2023-05-30) description, paragraphs 36-64	1-16
A	CN 107880130 A (SHENZHEN GUOCHUANG NANO ANTIBODY TECHNOLOGY CO., LTD.) 06 April 2018 (2018-04-06) claims 1-10, and abstract	1-16
A	CN 112028997 A (THE FIFTH AFFILIATED HOSPITAL, SUN YAT-SEN UNIVERSITY) 04 December 2020 (2020-12-04) claims 1-12, and abstract	1-16
A	WO 2022040506 A2 (YALE UNIVERSITY) 24 February 2022 (2022-02-24) entire document	1-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 March 2024		Date of mailing of the international search report 28 March 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAEK, D. S. et al. "A highly-specific fully-human antibody and CAR-T cells targeting CD66e/CEACAM5 are cytotoxic for CD66e-expressing cancer cells in vitro and in vivo" <i>CANCER LETTERS</i> , Vol. 525, 03 November 2021 (2021-11-03), pages 97-107	1-16
A	刘亚文等 (LIU, Yawen et al.). "抗癌胚抗原纳米抗体展示文库的构建与筛选 (Construction and Identification of Nanobody Display Libraries Recognizing Arcinoembryonic Antigen)" <i>科学技术与工程 (Science Technology and Engineering)</i> , Vol. 18, No. 28, 31 October 2018 (2018-10-31), pages 189-194	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/071306

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/071306

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116178556	A	30 May 2023	None			
CN	107880130	A	06 April 2018	None			
CN	112028997	A	04 December 2020	None			
WO	2022040506	A2	24 February 2022	WO	2022040506	A3	07 April 2022
				US	2023416942	A1	28 December 2023

A. 主题的分类

C07K16/30(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i; G01N33/574(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K,C12N,A61K,A61P,G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CJFD,CNTEXT,ENTEXT,ENTXTC,STN,PUBMED,SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, Nature, Science, GENBANK, CNKI,万方,中国专利生物序列检索库:CEACAM5, CD66e, nano antibody,antibodies,SEQ ID NO:1、6、7、8,纳米抗体。

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 116178556 A (南方医科大学第三附属医院(广东省骨科研究院)) 2023年5月30日 (2023 - 05 - 30) 说明书第36-64段	1-16
A	CN 107880130 A (深圳市国创纳米抗体技术有限公司) 2018年4月6日 (2018 - 04 - 06) 权利要求1-10、摘要	1-16
A	CN 112028997 A (中山大学附属第五医院) 2020年12月4日 (2020 - 12 - 04) 权利要求1-12、摘要	1-16
A	WO 2022040506 A2 (YALE UNIVERSITY) 2022年2月24日 (2022 - 02 - 24) 全文	1-16
A	BAEK, D.S.等. "A highly-specific fully-human antibody and CAR-T cells targeting CD66e/CEACAM5 are cytotoxic for CD66e-expressing cancer cells in vitro and in vivo" CANCER LETTERS, 第525卷, 2021年11月3日 (2021 - 11 - 03), 第97-107页	1-16

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

★ 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年3月22日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张丽玮

电话号码 (+86) 010-53962036

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	刘亚文等. "抗癌胚抗原纳米抗体展示文库的构建与筛选" 科学技术与工程, 第18卷, 第28期, 2018年10月31日 (2018 - 10 - 31), 第189-194页	1-16

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/071306

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	116178556	A	2023年5月30日	无			
CN	107880130	A	2018年4月6日	无			
CN	112028997	A	2020年12月4日	无			
WO	2022040506	A2	2022年2月24日	WO	2022040506	A3	2022年4月7日
				US	2023416942	A1	2023年12月28日