



(21)申請案號：109118629 (22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 03 日

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

(30)優先權：2019/06/04 中國大陸 201910481112.6

(71)申請人：大陸商普米斯生物技術（珠海）有限公司（中國大陸） (CN)
中國大陸

(72)發明人：莫世甫 (CN)；徐偉 (CN)；羅羿 (CN)；陳連娣 (CN)

(74)代理人：蔡清福；蔡駁理

(56)參考文獻：
CN 104918958A

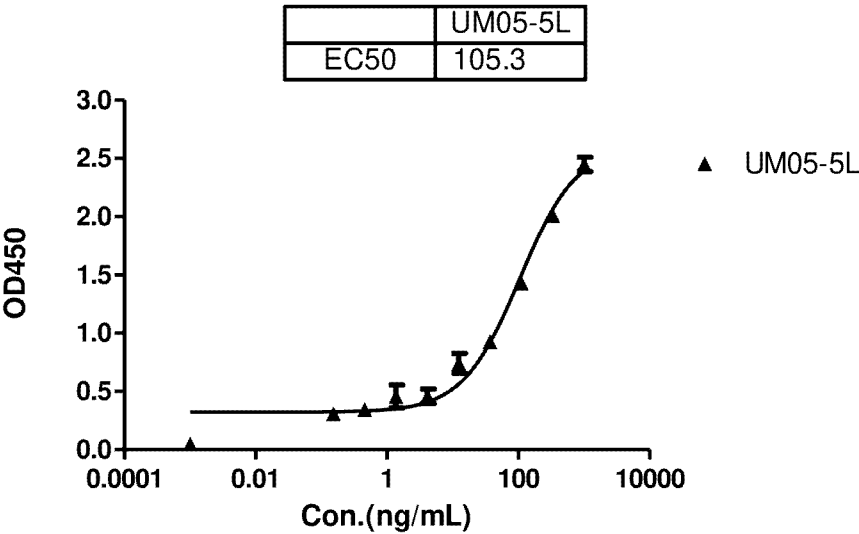
審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：66 項 圖式數：12 共 86 頁

(54)名稱
一種抗 CEACAM5 的單殖株抗體及其製備方法和用途

(57)摘要
本申請屬於生物免疫技術領域，具體涉及能特異性結合人癌胚抗原細胞黏附分子 5(CEACAM5)的單殖株抗體及其抗原結合片段，本申請還涉及該抗體及其抗原結合片段的製備方法和用途。

指定代表圖：



符號簡單說明：
EC50:半數結合濃度

圖 2

I844684

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 一種抗CEACAM5的單殖株抗體及其製備方法和用途**【中文】**

本申請屬於生物免疫技術領域，具體涉及能特異性結合人癌胚抗原細胞黏附分子5（CEACAM5）的單殖株抗體及其抗原結合片段，本申請還涉及該抗體及其抗原結合片段的製備方法和用途。

【指定代表圖】 圖2**【代表圖之符號簡單說明】**

EC50：半數結合濃度

【發明說明書】

【中文發明名稱】 一種抗CEACAM5的單殖株抗體及其製備方法和用途

【技術領域】

【0001】本申請屬於生物免疫技術領域，具體涉及能特異性結合人癌胚抗原細胞黏附分子 5（CEACAM5）的單殖株抗體及其抗原結合片段。本申請還涉及該抗體及其抗原結合片段的製備方法和用途。

【先前技術】

【0002】人癌胚抗原細胞黏附分子（CEACAM）基因家族早在上世紀 60 年代就被發現，包括位於 19 號染色體（q13.1-13.3 之間）的 35 個基因/偽基因，在這其中有 21 個編碼蛋白質。CEACAM 屬於免疫球蛋白超家族黏附分子，其結構域高度糖基化，通常包括 1-2 個免疫球蛋白可變區樣結構域（N domain）和 0-6 個免疫球蛋白恆定區樣結構域。CEACAM 蛋白位於細胞膜外，其中 CEACAM1、CEACAM3 和 CEACAM4 藉由疏水跨膜結構域與細胞膜連接；CEACAM5-8 則藉由糖基磷醯肌醇連接到細胞膜上。這些細胞外域通常作為細胞（例如上皮、內皮、樹突狀和白細胞）間的黏附分子。

【0003】CEACAM 涉及多種細胞功能，以細胞間的黏附功能為基礎，藉由訊號轉導調節細胞生長和分化，並在胰島素穩態、血管產生及免疫調節中發揮重要作用。CEACAM 基因家族成員參與各種各樣的病理生理作用，包括作為微生物病原體的受體。它們在致癌中起重要作用，特別是在癌症檢測、進展和轉移中。CEACAM5（簡稱為 CEA，又稱為 CD66e）是具有約 180kDa 分子量的糖蛋白。CEACAM5 含有經由糖基磷脂醯肌醇（GPI）錨與細胞膜連接的 7 個結構域。7 個結構域包括單一 N 端 Ig 可變域和與 Ig 恆定域同源的 6 個結構域

(A1-B1-A2-B2-A3-B3)。CEACAM5 最初被認為是在胎兒組織中表達的蛋白質，現在已經在幾種正常成年組織中被鑒定出來。CEACAM5 的過量表達在許多類型的癌症中被觀察到。例如，在結腸癌患者的血液中可以檢測到 CEACAM5。並且，進一步研究確定了它的過量表達與許多惡性腫瘤，通常是不良預後相關。在前列腺癌和結直腸癌中，CEACAM5 的過度表達被證明可以作為腫瘤生物標誌物。

【0004】此外，在多種惡性腫瘤，如乳房、胰腺、卵巢、結腸、肺和胃腺腫瘤中 CEACAM5/CEACAM6 亦被發現呈過度表達，並且與腫瘤的侵襲性和轉移有關。在肝轉移的起始過程中，CEACAM5 與其受體 CEAr 結合，它們的相互作用導致促炎細胞因數的活化和產生，主要是 IL-1、IL-6、IL-10 和 TNF- α 。總之，這些細胞因數改變肝細胞和 Kupffer 細胞的微環境，以及它們與肝竇細胞的相互作用。這些相互作用不僅影響腫瘤細胞或其他肝細胞，似乎也促進了腦脊髓液中 CSC 和其他迴圈腫瘤細胞的活力。

【0005】基於此，除了已知的 CEACAM5 被用作腫瘤標記，測量癌症患者血液中升高的 CEACAM5 的免疫學測定法已在臨床上用於癌症的預後和控制之外，更重要的是，CEACAM5 已成為用於標靶治療的潛在有用的腫瘤相關抗原。已經報導的使用 CEACAM5 標靶免疫治療癌症主要有 2 種主要方法。一種方法使用抗 CEACAM5 抗體引發免疫細胞的溶解活性，特別是藉由抗體依賴性細胞毒性 (ADCC) 或補體依賴性細胞毒性 (CDC)，以消除表達 CEACAM5 的腫瘤細胞；另一種方法是藉由抗 CEACAM5 抗體或抗體片段與例如藥物、毒素、放射性核苷酸、免疫調節劑或細胞因數等效應分子綴合，特異性標靶表達 CEACAM5 的腫瘤細胞，從而發揮效應分子的治療作用。鑒於 CEACAM5 更多地過量表達於一些諸如結腸直腸癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝細胞瘤、乳腺癌

和甲狀腺癌等實體腫瘤中，因此目前的研究集中在抗 CEACAM5 抗體的抗原識別能力。

【0006】總之，目前的研究表明，標靶 CEACAM5 的治療方法將有助於抑制腫瘤的轉移過程。特別地，對 CEACAM5 具有較強特異性的抗體，能夠更好的避免抗體脫靶而造成的毒副作用。例如 CEACAM1，CEACAM3，CEACAM8 廣泛分佈於人免疫系統及骨髓，例如中性粒細胞等，特異性的 CEACAM5 和/或 CEACAM6 抗體，可降低藥物可能存在的副作用，提高治療視窗。

【0007】基於此，目前對親和力更高，特異性更強的抗 CEACAM 抗體存在需求。

【發明內容】

【0008】在本申請中，除非另有說明，否則本文中使用的科學和技術名詞具有本領域技術人員所通常理解的含義。並且，本文中所用的細胞培養、分子遺傳學、核酸化學、免疫學實驗室操作步驟均為相應領域內廣泛使用的常規步驟。同時，為了更好地理解本申請，下面提供相關術語的定義和解釋。

術語定義

【0009】本申請中的"抗體"一詞包括任意可結合某特定抗原的免疫球蛋白、單殖株抗體、多殖株抗體、多特異性抗體或雙特異性（雙價）抗體。一個天然的完整抗體包含兩條重鏈和兩條輕鏈。每條重鏈由一可變區和第一、第二、第三恆定區組成；每條輕鏈由一可變區和一恆定區組成。哺乳動物的重鏈可分為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，哺乳動物的輕鏈可分為 λ 或 κ 。抗體呈"Y"型，Y 型結構的頸部由兩條重鏈的第二和第三恆定區組成，其藉由二硫鍵結合。"Y"型結構的每條臂包括其中一條重鏈的可變區和第一恆定區，其與一條輕鏈的可變區和恆定區結合。輕鏈和重鏈的可變區決定抗原的結合。每條鏈的可變區均含有三個高變區，稱互補決定區（CDR）。輕鏈（L）的 CDR 包含 VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3，

重鏈 (H) 的 CDR 包含 VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3。本申請中揭露的抗體和抗原結合片段的 CDR 邊界可藉由 Kabat, Chothia 或 Al-Lazikani 命名法命名或識別。(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 273 (4) : 927 (1997) ; Chothia, C.等, J. Mol. Biol., 186 (3) : 651-63 (1985) ; Chothia, C. and Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 196 : 901 (1987) ; Chothia, C.等, Nature, 342 (6252) : 877-83 (1989) ; Kabat, E. A.等, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。其中, 三個 CDR 由被稱為框架區 (FR) 的側面連續部分間隔開, 框架區比 CDR 更加高度保守並形成一個支架支撐超變環。重鏈和輕鏈的恆定區與抗原結合無關, 但具有多種效應功能。抗體依據重鏈恆定區的胺基酸序列可以分成幾類。根據是否含有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 重鏈, 抗體可分別分為五個主要的分類或異構體: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。幾個主要的抗體分類還可分為亞類, 如 IgG1 (γ 1 重鏈)、IgG2 (γ 2 重鏈)、IgG3 (γ 3 重鏈)、IgG4 (γ 4 重鏈)、IgA1 (α 1 重鏈) 或 IgA2 (α 2 重鏈) 等。

【0010】本申請中的"抗原結合片段"一詞, 指由含有一或複數 CDR 的抗體部分或者任何其它結合抗原但不具有完整抗體結構的抗體片段所形成的一種抗體片段。抗原結合片段的例子包括, 但不限於, 如雙功能抗體 (diabody)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、二硫鍵穩定的 Fv 片段 (dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性 dsFv (dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定的雙功能抗體 (ds diabody)、單鏈抗體分子 (scFv)、scFv 二聚體 (雙價的雙功能抗體)、雙價單鏈抗體 (BsFv)、多特異性抗體、駱駝化單域抗體 (camelized single domain antibody)、奈米抗體、域抗體和雙價域抗體。抗原結合片段可以與母體抗體結合相同的抗原。在某些實施方式中, 抗原結合片段可以含有來自某特定人抗體的一或複數 CDR, 移接至來自一或複數不同人抗體的框架區。

【0011】抗體的"Fab"片段是指由一條輕鏈（包括可變區和恆定區）和一條重鏈的可變區和部分恆定區經二硫鍵結合起來的那部分抗體分子。

【0012】"Fab'"片段是指包含了部分絞鏈區的 Fab 片段。

【0013】"F(ab')₂"指的是 Fab 的二聚體。

【0014】抗體的 Fc 段負責多種不同的效應功能如 ADCC 和 CDC，但不參與抗原的結合。

【0015】抗體的"Fv"段指的是含有完整抗原結合位點的最小抗體片段。Fv 片段由一條輕鏈的可變區和一條重鏈的可變區組成。

【0016】"單鏈 Fv 抗體"或"scFv"是指由輕鏈可變區與重鏈可變區直接相連或藉由一個肽鏈連接而成的工程抗體（Huston JS 等，Proc Natl Acad Sci USA，85：5879（1988））。

【0017】"單鏈抗體 Fv-Fc"或"scFv-Fc"是指由連接到某抗體 Fc 段的 scFv 組成的工程抗體。

【0018】"駱駝化單域抗體（Camelized single domain antibody）"，"重鏈抗體"或"HCAb（Heavy-chain-only antibodies，HCAb）"都是指含有兩個 VH 域而不含有輕鏈的抗體（Riechmann L.和 Muyldermans S.，J Immunol Methods. 231（1-2）：25-38（1999）；Muyldermans S.，J Biotechnol. 74（4）：277-302（2001）；W094/04678；W094/25591；U. S. Patent No.6,005,079）。重鏈抗體最初從駱科（駱駝、單峰駝和美洲駝）衍生得到。雖然缺失輕鏈，駱駝化抗體（camelized antibodies）有確證的抗原結合全部功能（Hamers Casterman C.等，Nature 363（6428）：446-8（1993）；Nguyen VK.等，"Heavy-chain antibodies in Camelidae：a case of evolutionary innovation，Immunogenetics. 54（1）：39-47（2002）；Nguyen VK.等，Immunology. 109（1）：93-101（2003））。重鏈抗體的可變區

(VH 域)是已知的最小的獲得性免疫產生的抗原結合單位 (Koch-Nolte F.等, FASEB J.21 (13) : 3490-8. Epub (2007)) 。

【0019】"奈米抗體"是指一種抗體片段,其由一個來自重鏈抗體的 VH 域和兩個恆定區 CH2 和 CH3 組成。

【0020】"雙功能抗體 (diabody)"包括帶有兩個抗原結合位點的小抗體片段,其中該片段含有在同一條多肽鏈上相連的 VH 域和 VL 域 (請參見, Holliger P. 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 90(14) : 6444-8(1993) ; EP404097 ; W093/11161) 。兩個域之間銜接物很短,使同一條鏈上的兩個域不能互相配對,從而迫使兩個域與另一條鏈的互補域配對,形成兩個抗體結合位點。這兩個抗體結合位點可標靶結合相同或不同的抗原 (或抗原表位) 。

【0021】"域抗體"是指僅含有一條重鏈可變區或一條輕鏈可變區的抗體片段。在某些情況下,兩個或複數 VH 域由一個多肽銜接物共價結合並形成雙價域抗體。雙價域抗體的兩個 VH 域可標靶作用於相同或不同的抗原。

【0022】在某些實施方式中, " $(dsFv)_2$ " 含有三條肽鏈: 兩個 VH 基因間藉由一條多肽銜接物相連, 並藉由二硫鍵與兩個 VL 基團結合。

【0023】在某些實施方式中"雙特異性 ds 雙功能抗體"含有 VL1-VH2 (由一個多肽銜接物相連) 和 VH1-VL2 (也是由一個多肽銜接物相連), 兩者在 VH1 和 VL1 間藉由二硫鍵結合。

【0024】"雙特異性 dsFv"或"dsFv-dsFv"含有三條多肽鏈: VH1-VH2 基團, 其中兩者的重鏈藉由多肽銜接物 (如: 長的彈性銜接物) 相連, 並藉由二硫鍵分別與 VL1 和 VL2 基團結合, 每對藉由二硫鍵配對的重鏈輕鏈具有不同的抗原特異性。

【0025】在某些實施方式中, "scFv 二聚體"是雙價雙功能抗體或雙價單鏈抗體 (BsFv), 含有二聚化的兩個 VH-VL (由多肽銜接物連接) 基團, 其中一個基

團的 VH 與另一基團的 VL 協作形成兩個結合位點，這兩個結合位點可標靶結合相同抗原（或抗原表位）或不同抗原（或抗原表位）。在另一些實施方式中，"scFv 二聚體"是雙特異性雙功能抗體，含有相互連接的 VL1-VH2（由多肽銜接物連接）和 VH1-VL2（由多肽銜接物連接），其中 VH1 和 VL1 協作，VH2 和 VL2 協作，且每個協作的配對具有不同的抗原特異性。

【0026】本申請中使用的術語"全人源"當用於抗體或抗原結合片段時，是指該抗體或抗原結合片段具有某胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，該胺基酸序列對應於由人或人免疫細胞生產的、或從例如利用人源抗體庫的轉基因非人動物等非人來源衍生的抗體的胺基酸序列，或者其他編碼人源抗體的序列。在某些實施方式中，全人源抗體不包含來源於非人抗體的胺基酸殘基（特別是抗原結合殘基）。

【0027】本申請中使用的術語"人源化"當用於抗體或抗原結合片段時，是指包括來源於非人動物的 CDR、來源於人的 FR 區，以及來源於人的恆定區（當適用時）的抗體或抗原結合片段。由於人源化的抗體或抗原結合片段具有降低的免疫原性，其在某些實施方式中可用作人的治療劑。在一些實施方式中，該非人動物是哺乳動物例如小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊、豚鼠或倉鼠。在一些實施方式中，該人源化抗體或抗原結合片段除了 CDR 序列是非人源的以外，基本上全部由人源序列組成。在一些實施方式中，該來源於人的 FR 區可以包括與其來自的人源抗體相同的胺基酸序列，或其可以包括一些胺基酸改變，例如，不超過 10，9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 個胺基酸改變。在一些實施方式中，該胺基酸改變可以僅存在於重鏈 FR 區、僅存在於輕鏈 FR 區或同時存在於兩個鏈中。在一些較佳實施方式中，該人源化抗體包括人源 FR1-3 和人源 JH 和 JK。

【0028】本申請中使用的術語"嵌合"是指具有來源於一種物種的重鏈和/或輕鏈的一部分，和該重鏈和/或輕鏈其餘部分來源於不同物種的抗體或抗原結合片段。

在一個示例性的例子中，嵌合抗體可以包括來源於人的恆定區和來源於非人動物例如小鼠的可變區。

【0029】術語“癌胚抗原細胞黏附分子 5”（CEACAM5，簡稱為 CEA，又稱為 CD66e；參見例如，AAA51967.1/GI：180223，702 個胺基酸）是具有約 180kDa 分子量的糖蛋白。CEACAM5 含有 7 個 Ig-like 結構域，這 7 個結構域包括單一 N 端 Ig 可變域和與 Ig 恆定域同源的 6 個結構域（A1-B1-A2-B2-A3-B3）。CEACAM 經由羧基端的糖基磷脂酰肌醇（GPI）錨與細胞膜連接。

【0030】本申請中的“特異性結合”或“特異性的結合”是指兩分子間的非隨機結合反應，如抗體和抗原間的反應。在某些實施方式中，本申請的抗體或其抗原結合片段與人和/或猴癌胚抗原細胞黏附分子 5 特異性結合，並且其結合親和力（KD） $\leq 10^{-6}$ M。本申請中的 KD 是指解離速度與結合速度的比值（ k_{off}/k_{on} ），可藉由表面電漿共振的方法測定，例如使用如 Biacore 的儀器。

【0031】本申請中的“選擇性結合”是指，本申請的抗體或其抗原結合片段與 CEACAM5 蛋白特異性結合，但基本上不結合或者以顯著更低的水準結合其他 CEACAM 蛋白，例如 CEACAM1 蛋白，CEACAM3 蛋白，CEACAM7 蛋白。

【0032】在某些實施方式中，本申請該的抗體的重鏈恆定區為人 IgG1 型。在某些實施方式中，本申請該的抗體的輕鏈恆定區為 κ 鏈。在某些實施方式中，本申請該的抗體的重鏈和輕鏈恆定區分別為人 IgG1 和 κ 鏈。

【0033】在本申請中當“保守置換”用於胺基酸序列時，是指將一個胺基酸殘基用另一具有相似理化性質的側鏈的胺基酸殘基替代。例如，可以在疏水側鏈胺基酸殘基間（例如 Met、Ala、Val、Leu 和 Ile）、中性親水側鏈殘基間（例如 Cys、Ser、Thr、Asn 和 Gln）、酸性側鏈殘基間（例如 Asp、Glu）、鹼性側鏈胺基酸間（例如 His、Lys 和 Arg）或芳香側鏈殘基間（例如 Trp、Tyr 和 Phe）進行保

守置換。本領域已知保守置換通常不會引起蛋白構象結構的顯著變化，因此能夠保留蛋白質的生物活性。

【0034】當"百分比序列同一性"用於胺基酸序列（或核酸序列）時，是指在進行序列比對，並且必要時引入間隔使相同胺基酸（或核酸）數目達到最多後，在候選序列中，與參比序列相同的胺基酸（或核酸）殘基占該候選序列的胺基酸（或核酸）殘基的百分比。該胺基酸殘基的保守置換可以認為或可以不認為是相同殘基。可以藉由本領域揭露的工具對序列進行比對以確定胺基酸（或核酸）序列的百分比序列同一性。本領域技術人員可以使用該工具的預設參數或根據比對的需要適當調整參數，例如藉由挑選合適的演算法。

【0035】本申請中使用的“T 細胞”包括 $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞、T 輔助 1 型 T 細胞、T 輔助 2 型 T 細胞、T 輔助 17 型 T 細胞和抑制性 T 細胞。

【0036】本申請中使用的"效應功能"是指抗體的 Fc 區與其效應器例如 C1 複合物和 Fc 受體結合的生物活性。示例性的效應功能包括抗體與 C1 複合物上的 C1q 相互作用誘導的補體依賴性細胞毒性（CDC）、抗體的 Fc 區與效應細胞上的 Fc 受體結合誘導的抗體依賴性細胞介導的細胞毒性（ADCC）以及吞噬。

【0037】本申請中的“癌症”或“癌病症”是指任何由腫瘤或惡性細胞生長、增殖或轉移所介導，並引發實體瘤和非實體瘤如白血病的醫學狀況。本申請中的"腫瘤"是指腫瘤和/或惡性細胞的實體物質。

【0038】對某種狀況的"治療"或"療法"包括預防或減輕某種狀況，降低某種狀況興起或發展的速度，減少發展出某種狀況的風險，預防或延遲與某種狀況相關的症狀發展，減少或終止與某種狀況相關的症狀，產生某種狀況的完全或部分的逆轉，治癒某種狀況，或以上的組合。對於癌症來說，"治療"或"療法"可以指抑制或減緩腫瘤或惡性細胞生長，繁殖，或轉移，或以上的某些組合。對於腫

瘤來說，"治療"或"療法"包括清除全部或部分的腫瘤，抑制或減緩腫瘤生長和轉移，預防或延緩腫瘤的發展，或以上的某些組合。

【0039】"被分離"的物質已經經人工由自然狀態改變。如果自然界中出現某種"被分離"的物質或成分，那麼其已經被改變或脫離其原始狀態，或二者均有發生。例如，某一活體動物體內天然存在的多核苷酸或多肽是未被分離的，但如果這些多核苷酸或多肽與之在天然狀態下共存的物質足夠分離並以足夠純的狀態存在，則可以認為是"被分離"。在某些實施方式中，抗體和抗原結合片段的純度為至少 90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%，其可由電泳方法（如 SDS-PAGE、等電聚焦、毛細管電泳），或色譜法（如離子交換色譜法或反相 HPLC）確定。

【0040】本申請中"載體"是指，可將編碼某蛋白的多核苷酸操作性地插入其中並使該蛋白獲得表達的一種運載工具。載體可用於轉化、轉導或轉染宿主細胞，使其攜帶的遺傳物質元件在宿主細胞內得以表達。舉例來說，載體包括：質粒、噬菌粒、柯斯質粒、人工染色體如酵母人工染色體（YAC）、細菌人工染色體（BAC）或 P1 衍生的人工染色體（PAC）、噬菌體如 λ 噬菌體或 M13 噬菌體，以及動物病毒等。用作載體的動物病毒種類有逆轉錄病毒（包括慢病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒（如單純疱疹病毒）、痘病毒、桿狀病毒、乳頭瘤病毒、乳頭多瘤空泡病毒（如 SV40））。載體可含有多種控制表達的元件，包括啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列、選擇元件及報告基因。另外，載體還可含有複製起始位點。載體還可包括協助其進入細胞的成分，包括但不限於，病毒顆粒、脂質體或蛋白外殼。

【0041】本申請中"宿主細胞"是指導入外源多核苷酸和/或載體的細胞。本申請該的宿主細胞包括但不限於，原核細胞例如大腸桿菌或枯草菌，真菌細胞例如酵母細胞或曲黴菌，昆蟲細胞例如 S2 果蠅細胞或 Sf9，或者動物細胞例如纖維

原細胞，CHO 細胞，COS 細胞，NSO 細胞，HeLa 細胞，BHK 細胞，HEK 293 細胞或人細胞。

【0042】本申請中"嵌合抗原受體"簡稱 CAR，是指可以識別特定抗原（例如腫瘤抗原）的細胞表面受體，其包含能夠識別特定抗原的胞外域（例如，識別並結合特定抗原的抗體的抗原結合片段）和能夠將細胞外的訊號傳遞到細胞內部的胞內域（也稱為胞內訊號轉導區，例如 CD3 的 δ 鏈或 Fc ϵ RI γ 的胞內部分）。攜帶並表達此類嵌合抗原受體的 T 細胞即被稱為 CAR-T 細胞，其能夠藉由胞外域識別並結合特定抗原以及表達該特定抗原的細胞（例如腫瘤細胞），並藉由胞內域的訊號轉導作用，啟動免疫應答，釋放大量的多種效應因數，高效殺傷表達該特定抗原的細胞（例如腫瘤細胞），從而發揮治療作用（例如治療腫瘤）。

【0043】基於先前技術的不足，本申請的主要目的之一在於，提供一種特異性更強、選擇性更好的抗 CEACAM5 抗體。本申請還提供了該抗體的製備方法和用途，本申請的抗 CEACAM5 抗體可以用於檢測和/或治療腫瘤。

本申請的抗體

【0044】在一個方面，本申請提供了一種特異性結合 CEACAM5 蛋白的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 包含下述 3 個互補決定區（CDRs）的重鏈可變區（VH）：

(i) VH CDR1，其由下述序列組成：SEQ ID NO: 1，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，

(ii) VH CDR2，其由下述序列組成：SEQ ID NO: 2，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，和

(iii) VH CDR3，其由下述序列組成：SEQ ID NO: 3，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；

和/或，

(b) 包含下述 3 個互補決定區（CDRs）的輕鏈可變區（VL）：

(iv) VL CDR1，其由下述序列組成：SEQ ID NO: 4，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，

(v) VL CDR2，其由下述序列組成：SEQ ID NO: 5，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列，和

(vi) VL CDR3，其由下述序列組成：SEQ ID NO: 6，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列。

【0045】在某些實施方案中，(i)-(vi)任一項中所述的置換為保守置換。

【0046】在某些實施方案中，(i)-(vi)任一項中所述的 CDR 根據 Kabat 編號系統定義。

【0047】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：如下 3 個重鏈 CDRs：序列為 SEQ ID NO：1 或 SEQ ID NO: 20 的 VH CDR1，序列為 SEQ ID NO：2 或 SEQ ID NO: 21 的 VH CDR2，序列為 SEQ ID NO：3 的 VH CDR3；和/或，如下 3 個輕鏈 CDRs：序列為 SEQ ID NO：4 的 VL CDR1，序列為 SEQ ID NO：5 或 SEQ ID NO: 22 的 VL CDR2，序列為 SEQ ID NO：6 的 VL CDR3。

【0048】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含如下 3 個重鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH CDR2、如 SEQ

ID NO: 3 所示的 VH CDR3；和/或，如下 3 個輕鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 5 所示的 VL CDR2、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VL CDR3。

【0049】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含如下 3 個重鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH CDR2、如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH CDR3；和/或，如下 3 個輕鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VL CDR2、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VL CDR3。

【0050】在某些實施方案中，所述的重鏈 CDR 和輕鏈 CDR 根據 Kabat 編號系統定義。

【0051】在一個方面，本申請提供了一種特異性結合 CEACAM5 蛋白的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

(i) 如 SEQ ID NO: 7 所示的重鏈可變區 (VH) 中含有的 CDR1，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個，2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；

(ii) 如 SEQ ID NO: 7 所示的重鏈可變區 (VH) 中含有的 CDR2，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；和

(iii) 如 SEQ ID NO: 7 所示的重鏈可變區 (VH) 中含有的 CDR3，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；和/或，

(iv) 如 SEQ ID NO: 8 所示的輕鏈可變區 (VL) 中含有的 CDR1，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；

(v) 如 SEQ ID NO: 8 所示的輕鏈可變區 (VL) 中含有的 CDR2，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；和

(vi) 如 SEQ ID NO: 8 所示的輕鏈可變區 (VL) 中含有的 CDR3，或與其相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個或 3 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列。

【0052】在某些實施方案中，該 VH 中含有的 3 個 CDR 和/或該 VL 中含有的 3 個 CDR 由 Kabat、IMGT 或 Chothia 編號系統定義。在某些實施方案中，該 VH 中含有的 3 個 CDR 和/或該 VL 中含有的 3 個 CDR 由 Kabat 編號系統定義。

【0053】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO：7 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO：7 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO：7 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO：8 所示的序列；

(v) 與 SEQ ID NO：8 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加（例如 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸的置換、缺失或添加）的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO: 8 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

【0054】在某些實施方案中，(ii) 或 (v) 中所述的置換是保守置換。

【0055】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含來源於人免疫球蛋白的重鏈框架區序列和/或輕鏈框架區序列。

【0056】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：人重鏈胚系基因編碼的重鏈框架區序列，和/或人輕鏈胚系基因編碼的輕鏈框架區序列。

【0057】在某些示例性實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：包含如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 19 所示的序列的 VH 和包含如 SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL。

【0058】在某些示例性實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL。在某些示例性實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 18 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL。在某些示例性實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 16 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL。在某些示例性實施方案中，該抗體或其抗原結合片段包含：具有如 SEQ ID NO: 19 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL。

【0059】本申請的抗體或其抗原結合片段可以包含來源於哺乳動物（例如，鼠或人）免疫球蛋白的恆定區序列或其變體，該變體與其所源自的序列相比具有一或複數胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如，至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個、或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。

【0060】在某些實施方案中，本申請的抗體或其抗原結合片段的重鏈包含人免疫球蛋白的重鏈恆定區（CH）或其變體，該變體與其所源自的序列相比具有一或複數胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如，至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個、或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）；和/或，

在某些實施方案中，本申請的抗體或其抗原結合片段的輕鏈包含人免疫球蛋白的輕鏈恆定區（CL）或其變體，該變體與其所源自的序列相比具有一或複數胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合（例如，至多 20 個、至多 15 個、至多 10 個、或至多 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；例如 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合）。

【0061】在一些實施方案中，該重鏈恆定區（CH）的變體與其所源自的序列相比可以具有一或複數胺基酸的保守置換（例如 1 個，2 個，3 個，4 個或 5 個胺基酸的保守置換）。

【0062】在一些實施方案中，該輕鏈恆定區（CL）的變體與其所源自的序列相比可以具有一或複數胺基酸的保守置換（例如 1 個、2 個、3 個、4 個或 5 個胺基酸的保守置換）。

【0063】在某些實施方案中，該重鏈恆定區是 IgG 重鏈恆定區，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重鏈恆定區。在某些實施方案中，該重鏈恆定區是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重鏈恆定區。

【0064】在某些實施方案中，該輕鏈恆定區是 κ 輕鏈恆定區。在某些實施方案中，該輕鏈恆定區是人 κ 輕鏈恆定區。

【0065】在某些示例性實施方案中，本申請的抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO: 9 所示的重鏈恆定區（CH）；和/或，SEQ ID NO: 11 所示的輕鏈恆定區（CL）。

【0066】在某些實施方案中，該抗原結合片段選自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫鍵連接的 Fv、scFv、雙抗體(diabody)和單域抗體(sdAb)。

【0067】在某些實施方案中，該抗體為鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。

【0068】本申請的抗體或其抗原結合片段具有選自下列的一種或多種活性：

- (1) 特異性結合 CEACAM5 蛋白或表達 CEACAM5 蛋白的細胞；
- (2) 基本上不與 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM7、CEACAM8 蛋白或表達 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM7、CEACAM8 蛋白的細胞結合；
- (3) 與 CEACAM6 蛋白或表達 CEACAM6 蛋白的細胞僅具有微弱的結合，其結合親和力顯著低於與 CEACAM5 蛋白或表達 CEACAM5 蛋白的細胞的結合親和力；
- (4) 具有 ADCC 活性；
- (5) 能夠抑制或殺傷表達 CEACAM5 蛋白的腫瘤細胞（例如結腸癌細胞，胃癌細胞），具有治療腫瘤的活性。

【0069】在某些實施方案中，本申請的抗體或其抗原結合片段帶有標記。在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記，例如酶（例如辣根過氧化酶）、放射性核素、螢光染料、發光物質（如化學發光物質）或生物素。

【0070】在某些實施方式中，本申請提供了示例性的抗 CEACAM5 抗體 UM05-5L 和 hUM05-3。

【0071】本領域技術人員應理解可以將前述 CDR 序列進行修飾以包含一個或更多胺基酸的取代，由此得到提高的生物學活性例如提高的與人癌胚抗原細胞黏附分子 5 的結合親和性。例如，可以利用噬菌體展示技術生產並表達抗體變體庫（例如 Fab 或 FcFv 變體），隨後篩選與 CEACAM5 有親和性的抗體。另一例

子中，可以用電腦軟體類比該抗體與 CEACAM5 的結合並鑒別抗體上形成結合介面的胺基酸殘基。可以避免這些殘基的替代以防止結合親和性降低，或可以標靶這些殘基進行替代以形成更強的結合。在某些實施方式中，CDR 序列中的至少一個（或全部）取代是保守替代。

【0072】在某些實施方式中，該抗體或抗原結合片段包括一或複數 CDR 序列，這些序列具有與 SEQ ID NO: 1-6 的序列至少 80%（例如至少 85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）的序列同一性，並且同時保留了與其親本抗體相似或甚至更高的與 CEACAM5 的結合親和性。該親本抗體具有基本相同的序列，但其相應的 CDR 序列與 SEQ ID NO: 1-6 所列的序列具有 100%序列同一性。

【0073】在一些實施方式中，本申請該的抗體或抗原結合片段能夠以 $\leq 10^{-7}$ M 的結合親和性（KD）與 CEACAM5 特異性結合，其可藉由表面電漿共振法測量。結合親和性值可以用 KD 值表示，其藉由當抗原和抗原結合分子的結合達到平衡時的解離速率與結合速率的比值（ k_{off}/k_{on} ）計算得到。該抗原結合親和性（例如 KD）可以藉由本領域已知的適宜方法適宜地確定，例如包括使用儀器如 Biacore 的電漿共振結合法。

【0074】在某些實施方式中，本申請該抗體或抗原結合片段與 CEACAM5 以 1ng/mL-10 μ g/mL 的 EC50（即半數結合濃度）結合。抗體或抗原結合片段與 CEACAM5 的結合可以藉由本領域已知的方法如夾心法如 ELISA，Western 印跡，FACS 或其他結合試驗測定。在示例性的例子中，將待測抗體（即一抗）與固定化的 CEACAM5 或表達 CEACAM5 的細胞結合，隨後洗掉未結合抗體，引入標記的二抗，其能夠與一抗結合，因此能夠檢測出結合的二抗。當使用固定化的癌胚抗原細胞黏附分子 5 時，可在酶標儀板上進行該檢測，或當使用表達 CEACAM5 的細胞時，可使用 FACS 分析進行該檢測。

【0075】在某些實施方式中，本申請所述的抗體或抗原結合片段以 10ng/mL-10 μ g/mL（使用 FACS 分析測定）的 EC₅₀（即 50%的有效濃度）與 CEACAM5 結合。

【0076】該抗體是 CEACAM5 特異性的。在某些實施方式中，該抗體任選地不與 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM7、CEACAM8 結合，且以顯著低於與 CEACAM5 的結合親和性結合 CEACAM6。

【0077】在一些實施方式中，本申請所述的抗體能與具有免疫原性的物質聯用，如腫瘤細胞、純化的腫瘤抗原和用編碼免疫刺激因數轉染的細胞、腫瘤疫苗。此外，該抗 CEACAM5 抗體和其抗原結合片段可以包括在聯用治療中，包括標準化學療法和放射療法、基於靶點的小分子療法、其他新興免疫檢查點調節劑療法。在一些實施方式中，該抗體和其抗原結合片段可以用作抗體-藥物綴合物、雙特異性或多價抗體的基礎分子。

【0078】在一些實施方式中，本申請所述的抗體和其抗原結合片段是駱駝化單域抗體（camelized single chain domain antibody）、雙功能抗體（diabody）、scFv、scFv 二聚體、BsFv、dsFv、（dsFv）₂、dsFv-dsFv'、Fv 片段、Fab、Fab'、F（ab'）₂、ds 雙功能抗體（ds diabody）、奈米抗體、域抗體或雙價域抗體。

【0079】在一些實施方式中，本申請所述的抗體包括免疫球蛋白恆定區。在一些實施方式中，免疫球蛋白恆定區包括重鏈和/或輕鏈恆定區。該重鏈恆定區包括 CH1、CH1-CH2 或 CH1-CH3 區。在一些實施方式中，免疫球蛋白恆定區可以進一步包括一或複數修飾以獲得所需的性質。例如，可以將該恆定區修飾，以降低或消除一種或多種效應功能，增強 FcRn 受體結合或引入一或複數半胱氨酸殘基。

【0080】在某些實施方式中，該抗體及其抗原結合片段進一步包含綴合物。可以設想，本申請中的抗體或其抗原結合片段可與多種綴合物連接（見例如

"Conjugate Vaccines"、Contributions to Microbiology and Immunology、J. M. Cruse and R. E. Lewis、Jr. (eds.)、Carger Press、New York (1989))。這些綴合物可以藉由共價結合、親和結合、嵌入、同等結合 (coordinate binding)、絡合、結合、混合或加入等其他方式與該抗體或抗原結合片段連接。在某些實施方式中，本申請揭露的抗體和抗原結合片段可以藉由工程的方法使其含有表位元結合部分以外的特定位元點，這些位點可用來結合一種或多種綴合物。例如，這樣的位點可包含一種或多種反應性胺基酸殘基，例如半胱氨酸殘基和組氨酸殘基，用於協助與結合物的共價連接。在某些實施方式中，抗體可間接連於綴合物，或藉由另一綴合物相連。例如，該抗體或其抗原結合片段可結合生物素，然後間接結合第二個綴合物，其與親和素相連。該綴合物可以是可檢測的標記、藥代動力學修飾部分、純化部分或細胞毒性部分。可檢測的標記的例子可以包括螢光標記 (例如螢光素、羅丹明、丹醯、藻紅蛋白或德克薩斯紅)、酶底物標記物 (例如辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、螢光素酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或 β -D 半乳糖苷酶)、穩定同位素或者放射性同位素、發色團部分、地高辛、生物素/親和素、DNA 分子或金以進行檢測。在某些實施方式中，該綴合物可以是藥代動力學修飾部分如 PEG，其說明延長抗體的半衰期。其他適宜的聚合物包括例如羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇/丙二醇共聚物等。在某些實施方式中，該綴合物可以是純化部分例如磁珠。"細胞毒性部分"可以是對細胞有害的或可能損壞或殺死細胞的任何試劑。細胞毒性部分的示例包括，但不限於，紫杉醇、細胞鬆弛素 B、短桿菌肽 D、溴化乙錠、吐根鹼、絲裂黴素、依託泊昔、替尼泊甘、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、阿黴素、柔紅黴素、二氫基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神黴素、放線菌素 D、1-去氫羰酮、糖皮質激素、普魯卡因、丁卡因、利多卡因、普茶洛爾、嘌呤黴素及其類似物、抗代謝物 (例如，甲氨喋呤、6-巰基嘌呤、6-巰鳥嘌呤、阿糖胞苷、

5 氟尿嘧啶達卡巴）、烷化劑（例如氮芥、塞替派、苯丁酸氮芥、美法侖、卡莫司汀（BSNU）和洛莫司汀（CCNU）、環磷醯胺、白消安、二溴甘露醇、鏈脲黴素、絲裂黴素 C 和順-二氯二胺鉑（DDP）順鉑）、蒽環類抗生素（例如柔紅黴素（以前的道諾黴素）和阿黴素）、抗生素（例如更生黴素（以前稱為放線菌素）、博來黴素、光神黴素和氨基黴素（AMC））以及抗有絲分裂劑（例如長春新鹼和長春鹼）。

核酸分子和重組方法

【0081】本申請的抗體可以以本領域已知的各種方法來製備，例如藉由基因工程重組技術來獲得。例如，可藉由化學合成或 PCR 擴增獲得編碼本申請抗體或其抗原結合片段的 DNA 分子。將所得 DNA 分子插入表達載體內，然後轉染宿主細胞。然後，在特定條件下培養轉染後的宿主細胞，並表達本申請的抗體或其抗原結合片段。

【0082】本申請的抗原結合片段可以藉由水解完整的抗體分子獲得（參見 Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)）。另外，這些抗原結合片段也可以直接由重組宿主細胞產生（reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)）。比如，Fab' 片段可以直接從宿主細胞中獲得；可以將 Fab' 片段化學偶聯形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992))。另外，Fv、Fab 或 F(ab')₂ 片段也可以直接從重組宿主細胞培養液中直接分離得到。本領域的普通技術人員完全知曉製備這些抗原結合片段的其它技術。

【0083】在某些具體的實施方案中，本申請提供的抗 CEACAM5 抗體或其抗原結合的製備方法包括以下步驟：

1) 以過表達癌胚抗原細胞黏附分子 5 的 CHO 細胞株為抗原免疫的 Balb/c 小鼠為材料，提取脾細胞，與小鼠骨髓瘤細胞系 SP2/0-AG14 融合，獲得可表達抗 CEACAM5 抗體或其抗原結合片段的雜交瘤細胞株；

2) 在由步驟 1) 得到的雜交瘤細胞株中殖株表達抗 CEACAM5 抗體或其抗原結合片段的基因；

3) 提供表達載體，該表達載體包含步驟 2) 所殖株得到的基因以及與該基因操作性相連的表達調控序列；

4) 用步驟 3) 該的表達載體轉化宿主細胞；

5) 培養步驟 4) 得到的宿主細胞；

6) 分離純化得到單殖株抗體。

【0084】在另一方面，本申請提供了用於上述製備方法的雜交瘤細胞株。

【0085】本申請製備了分泌特異性抗 CEACAM5 抗體的人-鼠雜交瘤，利用分子生物學技術殖株了該抗體的重鏈和輕鏈序列（百分之百人的基因），建構了抗人癌胚抗原細胞黏附分子 5 人源單殖株抗體，並由 CHO 細胞來表達生產抗體。這些抗體作為藥物與現有抗體比較，具有更強的結合能力和特異性。

【0086】在另一方面，本申請提供了一種分離的核酸分子，其包含編碼本申請的抗體或其抗原結合片段，或其重鏈可變區和/或輕鏈可變區的核苷酸序列。在某些實施方案中，該核酸分子包含如 SEQ ID NO: 14 和/或 SEQ ID NO: 15 所示的核苷酸編碼序列。

【0087】在另一方面，本申請提供了一種載體（例如殖株載體或表達載體），其包含如上所述的分離的核酸分子。在某些實施方案中，本申請的載體是質粒、黏粒、噬菌體等。

【0088】在某些實施方案中，該載體包含編碼本申請的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區的第一核苷酸序列，和/或編碼本申請的抗體或其抗原結合片段的

輕鏈可變區的第二核苷酸序列。在某些實施方案中，該第一核苷酸序列和第二核苷酸序列被提供在相同或不同的載體上。

【0089】在另一方面，本申請提供了一種宿主細胞，其包含如上所述的分離的核酸分子或載體。在某些實施方案中，該宿主細胞是哺乳動物細胞。在某些實施方案中，該宿主細胞是人、鼠、羊、馬、狗或貓的細胞。在某些實施方案中，該宿主細胞是中國倉鼠卵巢細胞。

【0090】在另一方面，提供了製備本申請的抗體或其抗原結合片段的方法，其包括，在允許該抗體或其抗原結合片段表達的條件下，培養如上所述的宿主細胞，和從培養的宿主細胞培養物中回收該抗體或其抗原結合片段。

【0091】在另一方面，本申請還提供了雙特異性或多特異性分子，其包含該的抗體或其抗原結合片段。在某些實施方案中，該雙特異性或多特異性分子特異性結合 CEACAM5，並且額外地特異性結合一或複數其他靶標。在某些實施方案中，該雙特異性或多特異性分子還包含至少一種具有針對第二靶標的第二結合特異性的分子（例如第二抗體）。

【0092】在另一方面，本申請還提供了免疫綴合物，其包含該的抗體或其抗原結合片段以及連接於該抗體或其抗原結合片段的治療劑。在某些實施方案中，該治療劑選自細胞毒劑。在某些實施方案中，該治療劑選自烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑，及其任意組合。在某些實施方案中，該免疫綴合物是抗體-藥物偶聯物（ADC）。

【0093】使用本領域公知的遺傳工程學技術，可以將本申請該抗體及其抗原結合片段的胺基酸序列轉換成相應的 DNA 編碼序列。由於遺傳密碼的簡並性，轉換所得的 DNA 序列可以不完全一致，而編碼的蛋白序列保持不變。

【0094】使用本領域公知的重組技術，可以將包括編碼該抗體及其抗原結合片段的多核苷酸的載體引入宿主細胞用於複製（擴增 DNA）或基因表達。在另一實施方式中，該抗體及其抗原結合片段可藉由本領域公知的同源重組的方法製得。多種載體可供選擇。載體組分通常包括，但不限於，以下的二種或多種：訊號序列、複製起始點、一種或多種標記基因、增強序列、啟動子（例如：SV40、CMV、EF-1a）和轉錄終止序列。

【0095】在一些實施方式中，該載體系統包括哺乳動物、細菌、酵母系統等，並將包括質粒例如但不限於 pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pELpGEMEX、pGEX、pCLpCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2 等其他可從實驗室獲得或市售的載體。適宜的載體可以包括質粒或病毒載體（例如複製缺陷型逆轉錄病毒、腺病毒和腺相關病毒）。

【0096】可以將包括編碼該抗體及其抗原結合片段的多核苷酸的載體引入宿主細胞用於殖株或基因表達。本申請中適用於殖株或表達該載體中的 DNA 的宿主細胞為原核細胞、酵母或上述高級真核細胞。適用於本申請用途的原核細胞包括真細菌，如革蘭氏陰性菌或革蘭氏陽性菌，例如腸桿菌科（如大腸桿菌），腸桿菌屬，歐文氏菌屬，克雷白氏桿菌屬，變形桿菌屬，沙門氏菌屬，如，鼠傷寒沙門（氏）桿菌，沙雷氏菌屬，如黏質沙雷氏菌，以及志賀氏菌屬，及桿菌屬如枯草芽孢桿菌和地衣芽孢桿菌，假單胞菌如綠肽桿菌和鏈黴菌。

【0097】除了原核細胞以外，真核微生物如絲狀真菌或酵母也可作宿主細胞殖株或表達編碼抗體的載體。釀酒酵母，或麵包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。但是，許多其他屬、種和株都比較常用且在本申請中適用，如粟酒裂殖酵母；克魯維酵母屬宿主如，乳酸克魯維酵母、脆壁克魯維酵母（ATCC12424）、

保加利亞克魯維酵母 (ATCC16045)、魏氏克魯維酵母 (ATCC24178)、克魯雄酵母 (ATCC56500)、果蠅克魯維酵母 (ATCC36906)、耐熱克魯維酵母和馬克斯克魯維酵母：解脂耶氏酵母 (EP402226)；巴斯德畢赤酵母 (EP183070)；假絲酵母：裡氏木黴 (EP244234)；鏈孢黴；西方許旺酵母，如：西方許旺酵母；和絲狀真菌，如：脈孢菌、青黴菌、彎頸黴和曲黴菌，如：鉤巢麴黴和黑麴黴。

【0098】本申請中提供的適用於表達糖基化抗體或其抗原結合片段的宿主細胞由多細胞生物衍生得到。無脊椎細胞的實例包括植物和昆蟲細胞。已發現多種桿狀病毒株 (baculoviral strains) 及其變體以及對應的許可性昆蟲宿主細胞 (permissive insect host cells)，來自於諸如以下的宿主：草地夜蛾 (毛蟲)、埃及斑蚊 (蚊子)、白紋伊蚊 (蚊子)、黑腹果蠅 (果蠅) 及家蠶。多種用於轉染的病毒株為公眾可得，例如苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒和家蠶核型多角體病毒的 Bm-5 變種，這些病毒都可在本申請中使用，特別是用於轉染草地夜蛾細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛花、番茄和煙草的植物細胞培養也可用作宿主。

【0099】但是，最感興趣的是脊椎細胞，且脊椎細胞的培養 (組織培養) 已經成為常規操作。可用的哺乳動物宿主細胞實例有，SV40 轉化的猴腎細胞 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651)；人胚胎腎細胞系 (293 或懸浮培養的 293 細胞次選殖複製，Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59 (1977))；幼地鼠腎細胞 (B 血，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))；小鼠睪丸支援細胞 (TM4, Mather J.P., Biol. Reprod. 23:243-252 (1980))；猴腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；人宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人肺細胞 (W138,

ATCC CCL75)；人肝細胞(Hep G2,HB 8065)；小鼠乳腺癌(MMT 060562,ATCC CCL51)；TRI 細胞(Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci.383：44-68 (1982))；MRC 5 細胞；FS4 細胞；及人肝癌細胞系 HepG2)。在某些較佳的實施方式中，該宿主細胞是 293F 細胞。

【0100】用上述的可產生該抗體及其抗原結合片段的表達或殖株載體轉化宿主細胞，並將其常規的營養培養基中培養，該營養培養基經修飾後適宜於誘導啟動子、選擇轉化細胞或擴增編碼目的序列的基因。

【0101】本申請中用於產生該抗體及其抗原結合片段的宿主細胞可在多種本領域公知的培養基中培養。該培養基還可含有本領域公知的適當濃度的任何其他必要的添加劑。該培養基的條件，如溫度、pH 值等類似條件，為選擇用於表達的宿主細胞此前所使用的條件，為普通技術人員所熟知。

【0102】在使用重組技術時，該抗體可在胞內、壁膜空間產生，或直接分泌到培養基中。如果該抗體在胞內產生，首先除去宿主細胞或裂解片斷的顆粒殘骸，例如，可藉由離心或超音波的方法。Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) 描述了將分泌到大腸桿菌壁膜空間的抗體分離的方法。簡要地說，在醋酸鈉(pH 3.5)、EDTA 和苯甲磺酰氟(PMSF)存在的條件下化開細胞糊(cell paste)約 30 分鐘以上。離心除去細胞碎片。如該抗體分泌到培養基中，則通常首先使用市售的蛋白濃度篩檢程式，如 Amicon 或 Millipore Pellicon ultrafiltration unit，濃縮該表達系統的上清液。在任何前述的步驟中都可加入蛋白酶抑制劑如 PMSF 以抑制蛋白降解，以及抗生素以防止偶然污染物的生長。

【0103】從該細胞中製得的抗體可採用純化方法進行純化，例如經磷灰石色譜、凝膠電泳、透析、DEAE-纖維素離子交換色譜柱、硫酸銨沉澱、鹽析以及親和色譜，其中親和色譜為較佳的純化技術。該抗體的種類以及該抗體中存在任何免疫球蛋白的 Fc 結構域決定了蛋白 A 作為親和配體是否適合。蛋白 A 可用於純

化基於人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈的抗體(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:13(1983))。蛋白 G 適用於所有鼠源異構體和人 $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J.5:1567 1575(1986))。瓊脂糖是最常用的親和配體附著基質，但也可選用其他基質。機械力穩定的基質如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯) 苯與用瓊脂糖相比可實現更快的流速和更短的處理時間。如該抗體含有 CH3 結構域，則可用 Bakerbond ABX.TM 樹脂進行純化(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)。也可根據需要獲得的抗體確定其他蛋白純化的技術，如離子交換柱中的分餾、乙醇沉澱、反相 HPLC、矽膠色譜、基於陰離子或陽離子交換樹脂的肝素瓊脂糖凝膠色譜(如聚天冬氨酸柱)、層析聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸銨沉澱。

【0104】在任意初步純化步驟之後，可用低 pH 疏水相互作用色譜的方法處理含有感興趣的抗體和雜質的混合物，用 pH 約 2.5-4.5 的洗脫緩衝液，較佳地在低鹽濃度下進行(例如，從約 0 到 0.25M 鹽濃度)。

藥物組合物及治療用途

【0105】在另一方面，本申請提供了一種藥物組合物，其含有本申請的抗體或其抗原結合片段、本申請的雙特異性或多特異性分子或者本申請的免疫綴合物以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【0106】在某些實施方案中，該藥物組合物還可以包含另外的藥學活性劑。

【0107】在某些實施方案中，該另外的藥學活性劑是具有抗腫瘤活性的藥物，例如烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑、放射增敏劑、抗血管產生劑、細胞因數、分子標靶藥物、免疫檢查點抑制劑或溶瘤病毒。

【0108】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段、雙特異性或多特異性分子或免疫綴合物與該另外的藥學活性劑作為分離的組分或作為同一組合物的

組分提供。本申請的抗體或其抗原結合片段與該另外的藥學活性劑可以同時、分開或相繼施用。

【0109】本申請進一步提供了包括該抗體的藥物組合物和一或複數藥學上可接受的載體。

【0110】用在本申請揭露的藥物組合物中的藥用可接受載劑可包括，例如，藥用可接受的液體、凝膠或固體載劑、水相介質、非水相介質、抗微生物物質、等滲物質、緩衝液、抗氧劑、麻醉劑、懸浮劑/分散劑、整合劑、稀釋劑、佐劑、輔料或無毒輔助物質，其他本領域公知的組分或以上的多種組合。

【0111】適用的組分可包括，例如，抗氧劑、填充劑、黏合劑、崩解劑、緩衝液、防腐劑、潤滑劑、矯味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或穩定劑例如糖和環糊精。適用的抗氧劑可包括，例如，甲硫氨酸、抗壞血酸、EDTA、硫代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱氨酸、巰基甘油、巰基乙酸、巰基山梨醇、丁基甲基茴香醚、丁基化羥基甲苯和/或沒食子酸丙酯。在一種含有本申請揭露的抗體的組合物中包括一種或多種抗氧劑如甲硫氨酸，可將降低該抗體的氧化。對氧化作用的減少可防止或減少結合親和力的降低，從而提高抗體穩定性並延長保質期。

【0112】進一步的說，藥用可接受的載劑可包括，例如，水相介質如氯化鈉注射液、林格氏液注射液、等滲葡萄糖注射液、無菌水注射液、或葡萄糖和乳酸林格注射液、非水介質例如：植物來源的不揮發性油、棉花籽油、玉米油、芝麻油、或者花生油、細菌抑制或真菌抑制濃度下的抗菌物質、等滲劑如氯化鈉或葡萄糖、緩衝液如磷酸鹽或枸橼酸鹽緩衝液，抗氧化劑如硫酸氫鈉，局部麻醉劑如鹽酸普魯卡因，助懸劑和分散劑如羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙炔吡咯烷酮，乳化劑如聚山梨醇酯 80（吐溫-80）、整合試劑如 EDTA（乙二胺四乙酸）或 EGTA（乙二醇雙（2-氨基乙基醚）四乙酸）、乙醇、聚乙二醇、

丙二醇、氫氧化鈉、鹽酸、檸檬酸或乳酸。作為載劑的抗菌劑可加入多次劑量容器中的藥物組合物中，其包括酚類或甲酚、汞製劑、苯甲醇、氯代丁醇、甲基和丙基對羥基苯甲酸酯、噻汞撒、氯苯甲烷銨和氯苯乙銨。適用的輔料可包括，例如，水、鹽、葡萄糖、甘油或乙醇。適用的無毒輔助物質可包括，例如，乳化劑、pH 值緩衝劑、穩定劑、增溶劑，或者醋酸鈉、去水山梨糖醇月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或者環糊精之類的物質。

【0113】該藥物組合物可以是液體溶液、懸浮液、乳劑、丸劑、膠囊、片劑、持續釋放製劑或粉末。口服製劑可以包括標準載體如藥物級的甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烯吡咯烷酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。

【0114】在某些實施方式中，該藥物組合物被製劑成可注射的組合物。可注射的藥物組合物可以任何常規的形式製備，例如，液體溶劑、懸浮劑、乳化劑或適用於產生液體溶劑、懸浮劑或乳化劑的固體形式。注射製劑可包括現用的無菌和/或無熱原溶液、使用前現與溶劑結合的無菌乾燥的可溶物，如凍乾粉，包括皮下片、注射即用的無菌懸浮劑、使用前現與介質結合的無菌乾燥不溶產品，和無菌和/或無熱原的乳劑。溶劑可以為水相或非水相。

【0115】在某些實施方式中，單位劑量的注射製劑包裝在一個安瓿、一支管或一支帶有針的針筒中。本領域悉知，所有注射給藥的製劑應為無菌無熱原。

【0116】在某些實施方式中，藉由將本申請揭露的抗體或其抗原結合片段溶解於某適當的溶劑中可製備無菌凍乾的粉末。該溶劑可含有一種可提高粉或由粉末製得的重組溶液的穩定性，或改善粉末或重組溶液的其他藥理組分。適用的輔料包括，但不限於，水、葡萄糖、三梨糖醇、果糖、玉米糖漿、木糖醇、甘油、葡萄糖、黑糖或其他適用的物質。溶劑可含有緩衝液，如枸橼酸緩衝液、磷酸鈉或磷酸鉀緩衝液或其他本技術熟練人員公知的緩衝液，在一種實施方式中，緩衝液的 pH 為中性。在本領域公知的標準條件下進行對該溶液進行隨後的

過濾除菌，然後凍乾製得理想的製劑。在一種實施方式中，將所得的溶劑分裝至小管中凍乾。每支小管可容納單次劑量或多次劑量的該抗 CEACAM5 抗體或其抗原結合片段或其組合物。每支小管中的裝入量可略微高於每次劑量所需或多次劑量所需（例如 10%過量），從而保證取樣精確和給藥精確。凍乾粉可在適當的條件下儲存，如在約 4°C到室溫範圍。

【0117】用注射用水將凍乾粉重溶得到用於注射給藥的製劑。在一種實施方式中，可將凍乾粉加至無菌無熱原水或其他適用的液體載劑中重溶。精確的量由選擇的療法決定，可根據經驗值決定。

抗體衍生化和免疫綴合物

【0118】本申請的抗體或其抗原結合片段可進行衍生化，例如被連接至另一分子（例如另一多肽或蛋白）。通常，抗體或其抗原結合片段的衍生化（例如，標記）不會不利影響其對 CEACAM5 的結合。因此，本申請的抗體或其抗原結合片段還意欲包括此類衍生化的形式。例如，可以將本申請的抗體或其抗原結合片段功能性連接（藉由化學偶合、基因融合、非共價連接或其它方式）於一或複數其它分子基團，例如另一抗體（例如，形成雙特異性抗體），檢測試劑，藥用試劑，和/或能夠介導抗體或抗原結合片段與另一分子結合的蛋白或多肽（例如，抗生物素蛋白或多組氨酸標籤）。此外，本申請的抗體或其抗原結合片段還可以用化學基團進行衍生，例如聚乙二醇（PEG），甲基或乙基，或者糖基。這些基團可用於改善抗體的生物學特性，例如增加血清半衰期。

【0119】因此，在一個方面，本申請提供一種免疫綴合物，其包含本申請該的抗體或其抗原結合片段以及連接於該抗體或其抗原結合片段的治療劑；

在某些實施方案中，該治療劑選自細胞毒劑；

在某些實施方案中，該治療劑選自烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑，及其任意組合；

較佳地，該免疫綴合物是抗體-藥物偶聯物（ADC）。

試劑盒及檢測用途

【0120】本申請的抗體或其抗原結合片段能夠特異性結合 CEACAM5 蛋白，並且基本上不與 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM7、CEACAM8 蛋白結合，僅與 CEACAM6 蛋白有較弱的結合，因此，本申請的抗體或其抗原結合片段在檢測中具有更高的特異性和準確性。

【0121】因此，在另一方面，本申請提供了一種試劑盒，其包括本申請的抗體或其抗原結合片段、或本申請的綴合物。

【0122】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記，例如酶（例如辣根過氧化酶）、放射性核素、螢光染料、發光物質（如化學發光物質）或生物素。

【0123】在某些實施方案中，該試劑盒還包括第二抗體，其特異性識別所述的抗體或其抗原結合片段。

【0124】在某些實施方案中，該第二抗體還包括可檢測的標記，例如酶（例如辣根過氧化酶）、放射性核素、螢光染料、發光物質（如化學發光物質）或生物素。

【0125】在某些實施方案中，本申請的試劑盒可以進一步包含用於使相應可檢測的標記被檢測到的試劑。例如，當該可檢測的標記為酶時，該試劑盒還可以包含相應酶的顯色底物，例如用於辣根過氧化酶的鄰苯二胺（OPD）、四甲基聯苯胺（TMB）、ABTS 或魯米諾類化合物，或用於鹼性磷酸酶的對硝基苯磷

酸酯 (p-NPP) 或 AMPPD。例如當該可檢測的標記為化學發光試劑 (例如吡啶酯類化合物) 時, 該試劑盒還可以包含用於化學發光的預激發液和/或激發液。

【0126】在另一方面, 本申請還提供了所述的抗體或其抗原結合片段在製備試劑盒中的用途, 該試劑盒用於檢測腫瘤是否能夠藉由標靶 CEACAM5 的抗腫瘤療法來治療。

【0127】在某些實施方案中, 該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記。

【0128】在某些實施方案中, 該 CEACAM5 是人 CEACAM5。

【0129】在某些實施方案中, 該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕁樣肉芽腫 (mycosis fungoids)、默克爾細胞癌和其它惡性血液病、如經典型何杰金氏淋巴瘤 (CHL)、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTLD 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 (DLBCL)、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤, 中樞神經系統 (CNS) 腫瘤, 例如原發性 CNS 淋巴瘤, 脊軸腫瘤, 腦幹神經膠質瘤。

【0130】本申請提供了包括該抗體或其抗原結合片段的試劑盒。在一些實施方式中, 該試劑盒用於檢測在生物樣品中的 CEACAM5 的存在情況或水準。該生物樣品可以包括細胞或組織。

【0131】在一些實施方式中, 該試劑盒包括與可檢測標記綴合的抗體或其抗原結合片段。在一些實施方式中, 該試劑盒包括未標記的抗體, 並進一步包括能夠與未標記的抗體結合標記的二抗。該試劑盒可以進一步包括使用說明和在試劑盒中將每個元件分隔開的包裝。

【0132】在一些實施方式中，該抗體與底物或儀器連接用於夾心測定如 ELISA 或免疫色譜測定。適用的底物或儀器可以是例如微孔板和試紙。

嵌合抗原受體

【0133】在另一方面，本申請還提供了嵌合抗原受體，其包含所述的抗體或其抗原結合片段的抗原結合結構域。

【0134】在某些實施方案中，該抗原結合結構域包含所述的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區和輕鏈可變區。

【0135】在某些實施方案中，該抗原結合結構域是 scFv。

【0136】在某些實施方案中，該抗原結合受體包含所述的抗體的抗原結合片段。

【0137】在某些實施方案中，該抗原結合受體由免疫效應細胞（例如 T 細胞）所表達。

【0138】在另一方面，本申請還提供了分離的核酸分子，其編碼所述的嵌合抗原受體。

【0139】在另一方面，本申請還提供了載體，其包含所述的分離的核酸分子；在某些實施方案中，其用於製備嵌合抗原受體 T 細胞。

【0140】在另一方面，本申請還提供了宿主細胞，其包含所述的分離的核酸分子或載體；

較佳地，該宿主細胞是免疫效應細胞（例如，T 細胞或 NK 細胞）；

較佳地，該宿主細胞是嵌合抗原受體 T 細胞（CAR-T）。

檢測方法與治療方法

【0141】在許多惡性腫瘤中，CEACAM5 的過度表達可以作為腫瘤生物標誌物。因此，測量患者血液中的 CEACAM5 可用於癌症的預後和控制，CEACAM5 的標靶治療也成為潛在的癌症治療方法。而本申請的抗體（例如，UM05-5L 和

hUM05-3) 能夠高親和、高特異的結合 CEACAM5 蛋白，並具有 ADCC 活性，能夠抑制腫瘤生長，殺滅腫瘤細胞。

【0142】因此，在另一方面，本申請還提供了一種抑制表達 CEACAM5 的腫瘤細胞生長和/或殺傷該腫瘤細胞的方法，其包括將該腫瘤細胞與有效量的所述的抗體或其抗原結合片段，或所述的雙特異性或多特異性分子，或所述的免疫綴合物，或所述的藥物組合物，或所述的嵌合抗原受體，或所述的宿主細胞接觸。

【0143】在另一方面，本申請還提供了一種用於降低 CEACAM5 在細胞表面的表達水準的方法，其包括將該細胞與所述的抗體或其抗原結合片段，或所述的雙特異性或多特異性分子，或所述的免疫綴合物，或所述的藥物組合物，或所述的嵌合抗原受體，或所述的宿主細胞接觸，使得 CEACAM5 在該細胞表面的表達水準降低；其中，該細胞在其表面表達 CEACAM5。

【0144】在某些實施方案中，該細胞是表達 CEACAM5 的腫瘤細胞。

【0145】在另一方面，本申請還提供了一種用於在受試者（例如人）中預防和/或治療腫瘤的方法，該方法包括向有此需要的受試者施用有效量的所述的抗體或其抗原結合片段，或所述的雙特異性或多特異性分子，或所述的免疫綴合物，或所述的藥物組合物，或所述的嵌合抗原受體，或所述的宿主細胞。

【0146】在某些實施方案中，該腫瘤表達 CEACAM5。

【0147】在某些實施方案中，該腫瘤涉及表達 CEACAM5 的腫瘤細胞。在某些實施方案中，該 CEACAM5 在該腫瘤細胞表面上表達。

【0148】在某些實施方案中，該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈樣肉芽腫（mycosis fungoids）、默克爾細胞癌和其它惡性血液病、如經典型何杰金氏淋巴瘤（CHL）、原發性縱膈大 B

細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTLD 和 EBV 相關瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤 (DLBCL)、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤，中樞神經系統 (CNS) 腫瘤，例如原發性 CNS 淋巴瘤，脊軸腫瘤，腦幹神經膠質瘤。

【0149】在某些實施方案中，該受試者為哺乳動物，例如人。

【0150】在某些實施方案中，該方法還包括施用另外的具有抗腫瘤活性的藥物，例如烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑、放射增敏劑、抗血管產生劑、細胞因數、分子標靶藥物、免疫檢查點抑制劑或溶瘤病毒。

【0151】在某些實施方案中，該方法還包括施用另外的抗腫瘤療法，例如手術、化學治療、放射治療、標靶治療、免疫治療、激素治療、基因治療或姑息治療。

【0152】在另一方面，本申請還提供了所述的抗體或其抗原結合片段，或所述的雙特異性或多特異性分子，或所述的免疫綴合物，或所述的藥物組合物，或所述的嵌合抗原受體，或所述的宿主細胞，在製備藥物中的用途，該藥物用於在受試者（例如人）中預防和/治療腫瘤。

【0153】在某些實施方案中，藥物還包含另外的藥學活性劑。

【0154】在某些實施方案中，該另外的藥學活性劑是具有抗腫瘤活性的藥物，例如烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑、放射增敏劑、抗血管產生劑、細胞因數、分子標靶藥物、免疫檢查點抑制劑或溶瘤病毒。

【0155】在某些實施方案中，該腫瘤表達 CEACAM5。

【0156】在某些實施方案中，該腫瘤涉及表達 CEACAM5 的腫瘤細胞；較佳地，該 CEACAM5 在該腫瘤細胞表面上表達。

【0157】在某些實施方案中，該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕁樣肉芽腫（mycosis fungoids）、默克爾細胞癌和其它惡性血液病、如經典型何杰金氏淋巴瘤（CHL）、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTLD 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤（DLBCL）、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤，中樞神經系統（CNS）腫瘤，例如原發性 CNS 淋巴瘤，脊軸腫瘤，腦幹神經膠質瘤。

【0158】某些實施方案中，該受試者為哺乳動物，例如人。

【0159】在另一方面，本申請還提供了一種檢測 CEACAM5（例如人 CEACAM5）在樣品中的存在或其量的方法，其包括以下步驟：

(1) 將該樣品與所述的抗體或其抗原結合片段接觸；

(2) 檢測該抗體或其抗原結合片段與 CEACAM5 之間複合物的形成或檢測該複合物的量。

【0160】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記。

【0161】在某些實施方案中，該 CEACAM5 是人 CEACAM5。

【0162】在另一方面，本申請還提供了一種用於檢測腫瘤是否能夠藉由標靶 CEACAM5 的抗腫瘤療法來治療的方法，其包括以下步驟：

(1) 將含有該腫瘤細胞的樣品與所述的抗體或其抗原結合片段接觸；

(2) 檢測該抗體或其抗原結合片段與 CEACAM5 之間複合物的形成。

【0163】在某些實施方案中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記。

【0164】在某些實施方案中，該 CEACAM5 是人 CEACAM5。

【0165】在某些實施方案中，該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕁樣肉芽腫（mycosis fungoids）、默克爾細胞癌和其它惡性血液病、如經典型何杰金氏淋巴瘤（CHL）、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTLTD 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤（DLBCL）、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤，中樞神經系統（CNS）腫瘤，例如原發性 CNS 淋巴瘤，脊軸腫瘤，腦幹神經膠質瘤。

【0166】本申請還提供了治療方法，包括將治療有效量的本申請所述的抗體施用給需要其的受試者。

【0167】本申請中提供的抗體的治療有效劑量依賴於本領域公知的多種因素，例如體重、年齡、過往病史、現用治療、物件的健康狀況和交叉感染的潛力、過敏、超敏和副作用，以及給藥途徑和腫瘤發展的程度。本領域熟練人員（例如醫生或獸醫）可根據這些或其它條件或要求按比例降低或升高劑量。

【0168】在某些實施方式中，本申請提供的抗體可在治療有效劑量約 0.01mg/kg 到約 100mg/kg 之間給藥。在某些實施方式中，該抗體以約 50mg/kg 或更少的劑量給藥，在某些實施方式中，給藥劑量為 10mg/kg 或更少、5mg/kg 或更少、1mg/kg 或更少、0.5mg/kg 或更少或 0.1mg/kg 或更少。某特定劑量可在複數間隔給藥，例如每天一次、每天兩次或更多、每月兩次或更多、每週一次、每兩週一次、每三週一次、每月一次或每兩月或更多月一次。在某些實施方式中，給藥劑量可隨治療進程變化。例如，在某些實施方式中，初始給藥劑量可比後續給藥劑量高。在某些實施方式中，給藥劑量在治療進程中根據給藥物件的反應進行調整。

【0169】給藥方案可藉由調整達到最佳反應（如治療反應）。例如，可進行單劑量給藥或在一段時間分複數分隔的劑量給藥。

【0170】本申請中揭露的抗體可藉由本領域公知的給藥方式給藥，例如注射給藥（如，皮下注射、腹腔注射、靜脈注射，包括靜脈滴注，肌肉注射或皮內注射）或非注射給藥（如，口服給藥、鼻腔給藥、舌下給藥、直腸給藥或外用給藥）。

【0171】在某些實施方式中，該抗體可用於治療與其分子機制相關的病症，包括腫瘤和癌症，例如非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕁樣肉芽腫（mycosis fungoids）、默克爾細胞癌和其它惡性血液病、如經典型何杰金氏淋巴瘤（CHL）、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTLD 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤（DLBCL）、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤，中樞神經系統（CNS）腫瘤，例如原發性 CNS 淋巴瘤，脊軸腫瘤，腦幹神經膠質瘤。

使用方法

【0172】本申請進一步提供了使用該抗體的方法。

【0173】在一些實施方式中，本申請提供了在個體中治療與該抗體機制相關的狀況或病症的方法，包括施用治療有效量的本申請所述的抗體。

【0174】本申請揭露的抗體可單獨給藥或與一種或多種其他治療手段或物質聯合給藥。例如，本申請揭露的抗體可與化療、放療、癌症治療手術（如腫瘤切除術）、抗病毒藥物、一種或多種抗嘔吐藥或其他化療導致的併發症的療法、或任何其他用於癌症或病毒的治療物質進行聯用。在某些這樣的實施方式中，

本申請揭露的抗體與一種或多種治療物質聯用時，可與所述的一種或多種治療物質同時給藥，在某些這樣的實施方式中，所述的抗體可作為同一個藥物組合物的一部分同時給藥。但是，與其他治療物質"聯用"的抗體不需要同時給藥或與該治療物質在同一組合物中給藥。本申請中"聯用"的含義還包括在另一治療物質之前或之後給藥的抗體也被認為是與該治療物質"聯用"，即使該抗體與第二種物質藉由不同給藥方式給藥。在可能的情況下，與本申請揭露的抗體聯用的其他治療物質可參照該其他治療物質的產品說明書的方法用藥，或參照、外科醫生的案頭參考書 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 第 57 版 (2002 年 11 月))，或參照其他本領域公知的方法。

【0175】在某些實施方式中，該治療物質能夠誘導或增強針對癌症的免疫反應。例如，腫瘤疫苗可以用於誘導對某些腫瘤或癌症的免疫應答。細胞因數治療可以用於提高將腫瘤抗原向免疫系統的遞呈。細胞因數治療的示例包括但不限於干擾素如干擾素 α 、 β 和 γ ，集落刺激因數如巨噬細胞 CSF、粒細胞巨噬細胞 CSF 和粒細胞 CSF，白介素如 IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11 和 IL-12，腫瘤壞死因數如 TNF- α 和 TNF- β 。還可以使用滅活免疫抑制目標的試劑，如 PD-1 抗體、TGF- β 抑制劑、IL-10 抑制劑和 Fas 配體抑制劑。另一組試劑包括啟動針對腫瘤或癌細胞的免疫回應的那些試劑，例如，提高 T 細胞啟動（如 T 細胞共刺激訊號通路如 CTLA-4、ICOS、OX40、4-1BB 等通路）的那些，以及提高樹突細胞功能和抗原遞呈的那些。

【0176】以下實施例旨在更好地說明本申請，且不應理解為限制本申請的範圍。所有下述的特定組合物、材料和方法，其整體或部分都在本申請的範圍內。這些特定的組合物、材料和方法不是為了限制本申請，而只是為說明在本申請的範圍內的特定的實施方式。本領域熟練技術人員可不添加創造性及不偏離本申

請範圍而開發出等同的組合物、材料和方法。應理解，在對本申請的方法作出的多種改動可以仍然包括在本申請範圍內。發明人意在將這樣的變動包括在本申請的範圍內。

序列資訊

【0177】本申請所涉及的部分序列的資訊如下面的表 1 所示。

表 1. 部分序列的資訊

SEQ ID NO:	序列描述	序列資訊
1	UM05-5L VH CDR1	DHTIH
2	UM05-5L VH CDR2	YIYPRDGNTKYNEKFKG
3	UM05-5L VH CDR3	PIYDGYSFDY
4	UM05-5L VL CDR1	RASSSVSYMH
5	UM05-5L VL CDR2	DTSKLAS
6	UM05-5L VL CDR3	QQWTRNPPT
7	UM05-5L VH	QVQLQQSDADLVKPGASVKISCKVSGYFTDHTIHWMKRPEQGLECIGYIYPRDGNTKYNEKFKGKATLTADRSSITAYMQLNSLTSEDSAVYFCARPIYDGYSFDYWGQGTTLTVSS
8	UM05-5L VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHVYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMAAEDAATYYCQQWTRNPPTFGAGTKLELK
9	IgG1 重鏈恆定區	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
10	編碼 IgG1 重鏈恆定區的核苷酸序列	GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAACTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGTCTCTGGGGGACCGTCAAGTCTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCGAGGTGCATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAGCGTCTGACCGAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAAC AACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGCTTCTCATGCTCGGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA
11	κ 鏈的恆定區	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
12	編碼 κ 鏈恆定區的核苷	CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACG

	酸序列	CCCTCCAATCGGGTAAGTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
13	VH-G4S3-VL	QVQLQQSDADLVKPGASVKISCKVSGYTFTDHTIHWMKQRPEQGLECIGYIYPRDGNTKYNEKFKGKALTADRSSITAYMQLNSLTSEDSAVYFCARPIYDGYSFDYWGGTTLTVSSGGGSGGGSGGGSGI VLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMAAEDAATYYCQQWTRNPPTFGAGTKLELK
14	UM05-5L VH 基因	CAGGTTGAGCTGCAACAGTCTGACGCTGACTTGGTGAAACCTGGAGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGTCTCTGGCTACACCTTCACTGACCATACTATTCACTGGATGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAATGCATTGGATATATTATCCTAGAGATGGTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAGATCCTCCATCAGAGCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACCCATCTATGATGGTACTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGTCTCCTCA
15	UM05-5L VL 基因	CAAAATTGTTCTACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTGCCGTGCCAGCTCAAGTGTTAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGCGGCTGAAGATGCTGCCACTATTACTGCCAGCAGTGGACTCGTAACCCACCTACCTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
16	hUM05-3 VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWMQAPGQGLEWIGLIYPRDGSTIYNEKFQGRA TLTADRSTDTAYMELSSLRSEDYAVYFCARPIYDGYSFDYWGGTTLTVSS
17	hUM05-3 VL	QIVLTQSPATLSASPERATLSCRASSSVSYMHYQQKPGQAPKRWIYDTSNRATGVPARFSGSGSGTDYTLTISSMEPEDAAVYYCQQWTRNPPTFGQGTKLELK
18	UM05-5L C47W VH	QVQLQQSDADLVKPGASVKISCKVSGYTFTDHTIHWMKQRPEQGLEWIGYIYPRDGNTKYNEKFKGKALTADRSSITAYMQLNSLTSEDSAVYFCARPIYDGYSFDYWGGTTLTVSS
19	hUM05-3 W47C VH	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDHTMHWMQAPGQGLECIGLIYPRDGSTIYNEKFQGRA TLTADRSTDTAYMELSSLRSEDYAVYFCARPIYDGYSFDYWGGTTLTVSS
20	hUM05-3 VH CDR1	DHTMH
21	hUM05-3 VH CDR2	LIYPRDGSTIYNEKFQG
22	hUM05-3 VL CDR2	DTSNRAT

有益效果

【0178】本申請的單殖株抗體（例如 UM05-5L、hUM05-3 抗體）能夠以高特異性和高選擇性與 CEACAM5 蛋白或表達 CEACAM5 蛋白的細胞結合，並且其基本不與 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM7、CEACAM8 蛋白結合，僅與 CEACAM6 蛋白有較弱的結合。同時，抗體 UM05-5L 還具有 ADCC 活性。基於抗體 UM05-5L 所建構的 UM05-5L-CAR 能夠表達於人 T 細胞表面，在體內能夠識別腫瘤細胞，分泌細胞因數，具有強烈的抑制腫瘤作用。因此，本申請的單殖株抗體（例如 UM05-5L、hUM05-3 抗體）較高的臨床應用價值。

【圖式簡單說明】

【0179】

圖 1 顯示了本申請建構的過表達 CEACAM5 的 CHO 細胞株的過表達倍數；與常規的 CHO 細胞相比，本申請建構的 CHO 細胞株過表達倍數達 904 倍。

圖 2 顯示了抗體 UM05-5L 與 CEACAM5 蛋白結合的 ELISA 實驗結果圖。

圖 3 顯示了抗體 UM05-5L 與 LOVO 細胞結合能力的檢測結果。

圖 4a 至圖 4b 顯示了抗體 UM05-5L 的 ADCC 報告基因活性；其中，圖 4a 顯示了陽性對照（Erbix 抗體）和陰性對照的 ADCC 報告基因活性，圖 4b 顯示了 UM05-5L 的 ADCC 報告基因活性。

圖 5a 至圖 5b 顯示了流式細胞的檢測結果；圖 5a 為對照 T 細胞（Mock T）的表達效率，圖 5b 為 UM05-5L-CAR 的表達效率。

圖 6 顯示了 UM05-5L-CAR-T 與腫瘤細胞混合後細胞因數 IFN γ （左圖）和 IL-2（右圖）的分泌結果。

圖 7 顯示了 UM05-5L-CAR-T 細胞對腫瘤細胞 KATO3 的殺傷結果。

圖 8 顯示了 UM05-5L-CAR-T 細胞經腫瘤細胞 LS174T 刺激後的擴增結果。

圖 9 顯示了 UM05-5L-CAR-T 在小鼠體內對腫瘤的抑制結果。

圖 10 顯示了接受 UM05-5L-CAR-T 的小鼠體內 IFN γ 的釋放情況。

圖 11 顯示了人源化抗體 hUM05-3 與 LS174T 細胞結合能力的檢測結果。

圖 12 顯示了抗體 UM05-5L、UM05-5L C47W、hUM05-3 和 hUM05-3 W47C 與 LS174T 細胞結合能力的檢測結果。

【實施方式】

【0180】現參照下列意在舉例說明本申請(而非限定本申請)的實施例來描述本申請。

【0181】除非特別指明，本申請中所使用的分子生物學實驗方法和免疫檢測法，基本上參照 J. Sambrook 等人，分子殖株：實驗室手冊，第 2 版，冷泉港實驗室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精編分子生物學實驗指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc.，1995 中所述的方法進行；限制性內切酶的使用依照產品製造商推薦的條件。實施例中未注明具體條件者，按照常規條件或製造商建議的條件進行。所用試劑或儀器未注明生產廠商者，均為可以藉由市購獲得的常規產品。本領域技術人員知曉，實施例以舉例方式描述本申請，且不意欲限制本申請所要求保護的範圍。

實施例 1：抗人 CEACAM5 蛋白的單殖株抗體的獲得

【0182】本申請建構了過表達 CEACAM5 蛋白的 CHO 細胞株。簡言之，將 CEACAM5 的質粒（北京義翹神州科技有限公司，HG11077-UT）轉染入 CHO 細胞株（ATCC）並表達。該質粒帶有潮黴素（Hygromycin）抗性，因此穩定轉染具有該質粒的細胞可以在含有 Hygromycin 的培養基中穩定傳代。挑取細胞並測量 CEACAM5 的表達量，如圖 1 所示，經 FACS 檢測得到的 CHO-CEACAM5 細胞，其 CEACAM5 的過表達倍數達 904 倍。

【0183】用 CHO-CEACAM5 細胞和從腫瘤病人中提純的 CEACAM5 蛋白（上海領潮生物，L2C01001）按表 2 的免疫方案對 6 隻 5-8 週齡 Balb/c mice 小鼠（上海斯萊克）進行免疫。

表 2. 小鼠免疫方案

日期	操作	抗原	佐劑
第 1 天	腹腔注射免疫	CHO-CEACAM5 細胞	CFA
第 26 天	腹腔注射免疫	CHO-CEACAM5 細胞	IFA
第 49 天	腹腔注射免疫	CHO-CEACAM5 細胞	IFA
第 91 天	腹腔注射免疫	CEACAM5 蛋白	Gerbu(MM3001)
第 104 天	腹腔注射免疫	CEACAM5 蛋白	Gerbu(MM3001)

第 105 天	腹腔注射免疫	CEACAM5 蛋白	Gerbu(MM3001)
第 106 天	腹腔注射免疫	CEACAM5 蛋白	Gerbu(MM3001)

【0184】免疫結束後第二天，取免疫小鼠的脾細胞與 SP2/0-AG14 細胞（ATCC）進行雜交瘤細胞融合，並取適量融合後的細胞鋪至 96 孔板。融合後 10 天左右取各孔上清，以 ELISA 法檢測雜交瘤細胞分泌的小鼠抗體與人 CEACAM5 的結合活性。

【0185】進一步的，取 ELISA 檢測得到的強陽性孔中的上清，以流式細胞術檢測與 LOVO 細胞（中國科學院上海細胞生物學研究所）的結合活性，得到了具有較高 LOVO 細胞結合活性的雜交瘤細胞。將這部分細胞進行次選殖複製獲得單殖株細胞。表 3 所示的是部分雜交瘤細胞的檢測資料。

表 3. 雜交瘤細胞與 CEACAM 的結合結果

雜交瘤細胞	ELISA OD 值	LOVO FACS 結合
1-2C5	1.0690	12.1
1-9G3	1.0390	7.01
3-2F3	1.4480	11
3-6F5	1.3520	6.51
3-8C10	2.3030	137
3-8G8	1.9270	82.9
2A10A5	2.392	/
2A10C4	2.434	/

【0186】選擇其中結合活性較好的雜交瘤細胞 3-8C10 進行測序，經測序獲得了一株抗體，命名為 UM05-5，使用 Kabat 編號系統（Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，Public Health Service，美國國立衛生研究院，貝塞斯達、馬里蘭州(1991)，第 647-669 頁）確定了 UM05-5 抗體的 CDR 序列，具體如表 4 所示。

表 4. UM05-5 可變區序列

單抗	SEQ ID NO:								
	VH	VL	編號系統	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
UM05-5	7	8	Kabat	1	2	3	4	5	6

實施例 2：人鼠嵌合抗體的製備

【0187】根據表 4 中 UM05-5 的序列，設計並表達了人鼠嵌合抗體，將其命名為 UM05-5L。簡言之，將編碼小鼠抗體的 VH 和 VL 序列分別連接至編碼人 IgG1 重鏈的恆定區序列（其胺基酸序列如 SEQ ID NO: 9，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，）和 κ 鏈的恆定區序列（其胺基酸序列如 SEQ ID NO: 11，核苷酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示），得到人鼠嵌合抗體 UM05-5L。

【0188】將編碼抗體重鏈、輕鏈的核苷酸序列分別殖株到哺乳動物細胞表達載體 pcDNA3.4 上。將重鏈表達載體和輕鏈表達載體按 2：1 的摩爾比用 Lipofectamine 2000 轉染試劑（Invitrogen）轉染入 HEK293 細胞，並在 37℃、5% 二氧化碳條件下培養 7 天。收集培養液上清，並用 Protein A 親和層析法提純上清中的抗體。純化後的抗體經 PBS 溶液透析和冷凍乾燥濃縮後，保存於-20℃。

實施例 3：抗體與 CEACAM5 蛋白的結合

【0189】將濃度為 1μg/mL 的人 CEACAM5 蛋白溶液以 100μL/well 包被 96 孔高親和力板，4℃，振盪過夜。第二天先以 300μL PBST（Tween20：0.5%）洗滌 3 次，之後用 100μL/well 的 5% BSA/PBS 封閉 1 小時，室溫振盪。300μL PBST 洗滌 3 次。用 PBS 配製抗體樣品的梯度稀釋溶液。以 100μL/孔加入 96 孔板，室溫振盪 1 小時。300μL PBST 洗滌 3 次。配製二抗羊抗人（goat anti-human）IgG HRP 溶液，以 100μL/孔加入 96 孔板，室溫振盪 30min。300μL PBST 洗滌 4 次。加入 100μL/孔 TMB，顯色 20min。加入 100μL/孔 0.6N H₂SO₄，終止顯色，檢測 OD450nm。經檢測，結果如圖 2 所示，嵌合抗體 UM05-5L 與 CEACAM5 蛋白結合的 EC50 為 105.3ng/mL。

實施例 4：抗體與表達 CEACAM5 的細胞的結合

【0190】用流式細胞儀(FACS)檢測抗體與天然表達人 CEACAM5 蛋白的 LOVO 腫瘤細胞或過表達不同 CEACAM 蛋白細胞的結合情況。簡單來說，首先收集細胞，PBS 洗滌一遍後計數，稀釋成 2×10^6 /ml 細胞懸液；分別取 10 μ l 抗體工作液加入 100 μ l 細胞懸液中，4℃避光孵育 30min；PBS 洗滌 2 次後，加入對應的螢光標記二抗 Goat-anti-Human IgG (H+L) (Invitrogen)，4℃避光孵育 30min，PBS 洗滌 2 次後，以 400 μ l FACS buffer 懸起，以 FACS 檢測抗體與細胞的結合情況。

【0191】檢測了嵌合抗體 UM05-5L 和對照抗體 UM05-8（本實驗室藉由雜交瘤法自製的抗 CEACAM5 抗體）的上清在濃度為 3 μ g/mL 時與不同細胞的結合情況。其中，SW620-CEACAM1 為過表達 CEACAM1 蛋白的細胞，SW620-CEACAM3 為過表達 CEACAM3 蛋白的細胞，CHO-CEACAM6 為過表達 CEACAM6 蛋白的細胞，CHO-CEACAM7 為過表達 CEACAM7 蛋白的細胞，CHO-CEACAM8 為過表達 CEACAM8 蛋白的細胞。以抗體與 LOVO 細胞（其表達 CEACAM5）的結合活性（即，FACS 的檢測值）為 100%作為基準，計算抗體與不同細胞（其表達不同 CEACAM 蛋白）的相對結合活性，檢測結果如表 5 所示。

表5. 抗體與LOVO細胞和過表達不同CEACAM蛋白的細胞的結合情況

細胞名稱	UM05-5L	UM05-8
LOVO	100.00%	100.00%
SW620-CEACAM1	2.01%	120.47%
SW620-CEACAM3	1.29%	91.56%
CHO-CEACAM6	26.60%	69.61%
CHO-CEACAM7	0.38%	13.71%
CHO-CEACAM8	0.40%	61.60%

【0192】從表 5 中可以看到，嵌合抗體 UM05-5L 具有尤為突出的選擇性：其以高親和力結合 CEACAM5，但與 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM7、CEACAM8 均無明顯結合，且與 CEACAM6 僅有較弱的結合。而普通的抗體（如對照抗體

UM05-8)，在與 CEACAM5 結合的同時，能夠以較高水準與 CEACAM1、CEACAM3、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM8 結合，不具有選擇性。

【0193】進一步的，我們用 FACS 檢測了嵌合抗體 UM05-5L 與天然表達人 CEACAM5 的 LOVO 腫瘤細胞的 EC50。結果如圖 3 所示，嵌合抗體 UM05-5L 與 LOVO 細胞結合 EC50 為 3173ng/mL。綜合上述結果，嵌合抗體 UM05-5L 具有非常優良的與 CEACAM5 結合的親和力、特異性和選擇性。

實施例 5：抗體的 ADCC 活性

【0194】使用 LOVO 細胞為靶細胞，將 LOVO 細胞按 20000 個/孔密度接種於 96 孔細胞培養板，37°C，5%CO₂ 孵育過夜。第二天，將抗體 UM05-5L 和陽性對照抗體 Erbitux 按照 20μg/ml 配製於培養基中，並按 3 倍倍比稀釋 8 個濃度。吸盡 LOVO 細胞上清培養基，將以指定濃度稀釋的抗體（陽性對照抗體 Erbitux，嵌合抗體 UM05-5L 或陰性對照無關抗體）按照 30μL/孔加入 LOVO 細胞中。接著，將效應細胞 Jurkat/ADC（南京諾艾新生物技術有限公司）按照 120000 個/30μL/孔鋪到 LOVO 細胞孔中，37°C，5%CO₂ 孵育 16-20h。孵育結束後以 Bright-Glo 試劑盒（Promega，cat.E2620）檢測效應細胞中 luciferase 表達水準。該 luciferase 水準代表了效應細胞的 ADCC 活化程度。圖 4a 顯示了陽性對照 Erbitux 抗體和陰性對照的 ADCC 報告基因活性，圖 4b 顯示了 UM05-5L 的 ADCC 報告基因活性。綜合上述結果可知，UM05-5L 的 ADCC 活性非常強，EC50 為 0.85μg/mL。

實施例 6：標靶 CEACAM5 的 CAR-T 細胞的建構

【0195】我們基於第二代及第三代的 CAR-T 結構，以抗 CEACAM5 單鏈抗體作為 CAR-T 識別抗體，採用 1 個或複數 41BB，CD28，OX40 等共刺激原件進行了不同 CEA-CAR 的結構設計，並建構相應的慢病毒質粒用於產生可感染細胞並表達相應 CAR 的慢病毒。該慢病毒可以用於感染自腫瘤病人外周血分離到的 T

細胞，產生在細胞膜表面表達相應 CAR 受體的 CAR-T 細胞。這種 CAR-T 細胞可以有效識別和殺傷表達 CEACAM5 的腫瘤細胞。在體外和體內實驗中都看到了該細胞免疫療法具有非常好的安全性和有效性。

【0196】將如 SEQ ID NO：13 所示的單鏈抗體 UM05-5L scFv（以 VH-G4S3-VL 順序）與序列 CD8 α -CD137-CD3 ζ -p2A-tEGFR 相連接，從而建構嵌合抗原受體 CAR，然後將編碼該 CAR 的核苷酸序列殖株至慢病毒載體（吉凱基因，GV401）中，將載體命名為 UM05-5L-CAR。表達框為 EF1a 啟動子-CAR-2A-tEGFR-WPRE。

【0197】將 UM05-5L-CAR 慢病毒載體與包裝質粒暫態轉染 293T 細胞 16 小時，更換培養基，繼續培養 24-48 小時，收集培養基上清（含慢病毒），於-80°C 保存。

【0198】將來源於健康人的 PBMC 細胞，用 CD3/28 抗體啟動 24 小時後；按照 MOI=3:1 將慢病毒與 T 細胞混合培養 96 小時，用 PE 螢光標記的 Cetuximab 檢測 UM05-5L-CAR 的表達。結果如圖 5 所示，與對照相比（圖 5a），UM05-5L-CAR（圖 5b）可很好的表達於人 T 細胞表面。

實施例 7：標靶 CEACAM5 的 CAR-T 細胞的功能檢測

1、細胞因數釋放檢測

【0199】將 UM05-5L-CAR-T 細胞和表達 CEACAM5 的腫瘤細胞（例如 KATO3 和 LS174T）混合，並設置培養基對照（即僅使用 UM05-5L-CAR-T 細胞）和 CEACAM5 陰性細胞對照（即使用 UM05-5L-CAR-T 細胞和不表達 CEACAM5 的細胞，例如 RKO 細胞）；將兩種細胞按照 1:1 混合培養 16 小時後，檢測上清中 IFN γ 和 IL2 的釋放。結果如圖 6 所示，UM05-5L-CAR-T 可以識別表達 CEACAM5 的細胞系並釋放細胞因數 IFN γ 和 IL-2。

2、腫瘤細胞殺傷檢測

【0200】將 UM05-5L-CAR-T 與表達 CEACAM5 的腫瘤細胞（例如 KATO3）按照指定的 E:T 比例（30:1, 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1）混合培養於 96 孔培養板中。利用 Promega LDH 檢測試劑盒檢測培養上清中乳酸脫氫酶（LDH）的釋放記錄資料。腫瘤細胞殺傷計算結果圖 7 所示，由圖中可以看出 UM05-5L-CAR-T 可以高效的、劑量依賴的殺傷腫瘤細胞。

3、腫瘤細胞刺激的增殖實驗

【0201】將 UM05-5L-CAR-T 細胞與表達 CEACAM5 的腫瘤細胞（例如 LS174T），按照 E:T=1:1 混合培養 72 小時（without IL2 supplement），藉由細胞計數檢測其增殖。結果如圖 8 所示，UM05-5L-CAR-T 在經過表達 CEACAM5 的腫瘤細胞刺激時，可高效擴增。

實施例 8：LS174T 腫瘤模型的體內藥效實驗

【0202】將 LS174T 細胞（ATCC CL-187）按照 1×10^7 /隻接種於 NSG 小鼠（百奧賽圖）皮下，待腫瘤體積達到 $200-400\text{mm}^3$ 時，經尾靜脈分別給予 PBS 對照、未經修飾的 T 細胞對照（Mock T）或 UM05-5L CAR-T，給與的劑量分別為 $100\mu\text{l}$ 、 1×10^7 個細胞、 1×10^7 tEGFR+ 個細胞，記錄瘤體積變化並分析外周血中 $\text{IFN}\gamma$ 的釋放。結果如圖 9 和圖 10 所示，UM05-5L 在小鼠體內識別 LS174T 腫瘤細胞，並釋放大量 $\text{IFN}\gamma$ ，產生強烈的腫瘤抑制作用。

實施例 9：人源化抗體的製備

【0203】使用 IMGT 資料庫中的人抗體序列，對 UM05-5L 抗體進行人源化改造，獲得了 1 種人源化抗體，將其命名為 hUM05-3，其具體序列如表 6 所示。按照實施例 2 所述，進行抗體的製備。簡言之，合成編碼 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 的核苷酸序列，分別殖株至表達載體並暫態表達於 HEK293 細胞，培養後收集培養液上清，並用 Protein A 親和層析法提純上清中的抗體。純化後的抗體經 PBS 溶液透析和冷凍乾燥濃縮後，保存於 -20°C 。

表 6. hUM05-3 可變區序列

單抗	SEQ ID NO:							
	VH	VL	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
hUM05-3	16	17	20	21	3	4	22	6

實施例 10：人源化抗體的結合能力

【0204】將 LS174T 細胞（高表達 CEACAM5 的腫瘤細胞）培養於含 10% FBS RPMI1640 培養基。將 LS174T 細胞用 TrypLE 胰酶消化後，離心，重懸於含 2% BSA 的 DPBS 溶液（FACS 緩衝液，4°C）中；然後，按照 5×10^5 /100 μ l/孔的濃度，將其加入 U 型底 96 孔板中，並加入濃度梯度稀釋的抗體，於 4°C 孵育 1 小時。孵育後，離心，棄掉上清；每孔加入 100 μ l 含有抗人 IgG Fc-APC 二抗，並於 4°C 孵育 1 小時。孵育後，細胞用 FACS 緩衝液清洗 1 次，重懸於 200 μ l FACS 緩衝液中，於 BD C6 plus 讀取螢光訊號值。

【0205】實驗結果如圖 11 所示。結果顯示，人源化抗體 hUM05-3 能夠以劑量依賴的方式結合 LS174T 細胞。

實施例 11：抗體的突變

【0206】將人鼠嵌合抗體 UM05-5L 的 VH 的第 47 位胺基酸（即 Cys）突變為 Trp，突變後的抗體命名為 UM05-5L C47W；將人源化抗體 hUM05-3 的 VH 的第 47 位胺基酸（即 Trp）突變為 Cys，突變後的抗體命名為 hUM05-3 W47C。突變後的抗體的可變區序列如表 7 所示。按照實施例 10 所述，檢測抗體與 LS174T 細胞的結合能力。實驗結果如圖 12 和表 8 所示。結果顯示，人鼠嵌合抗體 UM05-5L 和人源化抗體 hUM05-3 在突變前後，均能夠結合表達 CEACAM5 的細胞。

表 7. 突變抗體的序列

	VH	VL
UM05-5L C47W	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 8
hUM05-3 W47C	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 17

表8. 與抗原結合的能力

克隆	EC50 $\mu\text{g/ml}$	E _{max} MFI（平均螢光強度）
UM05-5L	0.81	79739
UM05-5L C47W	2.46	55153
hUM05-3	0.53	52929
hUM05-3 W47C	1.47	34403

【符號說明】

【0207】

CEACAM5：人癌胚抗原細胞黏附分子5

EC50：半數結合濃度

SEQUENCE LISTING

<110> 上海吉倍生物技術有限公司

<120> 一種抗 CEACAM5 的單殖株抗體及其製備方法和用途

<130> IEC200021PCT

<150> 201910481112.6

<151> 2019-06-04

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VH CDR1

<400> 1

Asp His Thr Ile His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VH CDR2

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VH CDR3

<400> 3

Pro Ile Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VL CDR1

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VL CDR2

<400> 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VL CDR3

<400> 6

Gln Gln Trp Thr Arg Asn Pro Pro Thr

1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L VH

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Cys Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Ile Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

- <210> 8
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> artificial

- <220>
- <223> UM05-5L VL

<400> 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Ala Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Arg Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 9

<211> 330

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> IgG1 重鏈恒定區

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20					25					30						
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
35					40					45						
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
50					55					60						
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70					75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
85					90					95						
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
100					105					110						
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
115					120					125						
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
130					135					140						
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
165					170					175						
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
180					185					190						
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
195					200					205						

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 10

<211> 993

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> 編碼 IgG1 重鏈恒定區的核苷酸序列

<400> 10

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgttcct acagtccctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcattgatct ccggaccccc	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcggggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag	720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	993

- <210> 11
- <211> 107
- <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> κ 鏈的恒定區

<400> 11

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 12

<211> 324

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> 編碼 κ 鏈恒定區的核苷酸序列

<400> 12
cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagttcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg ttga 324

<210> 13
<211> 240
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> VH-G4S3-VL

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Cys Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Ile Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
180 185 190

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
195 200 205

Ser Ser Met Ala Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
210 215 220

Thr Arg Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
225 230 235 240

<210> 14

<211>	357	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	UM05-5L VH 基因	
<400>	14	
caggttcagc	tgcaacagtc	tgacgtgac
ttggtgaaac	ctggagcttc	agtgaagata
		60
tcctgcaagg	tctctggcta	caccttcact
gaccatacta	ttcactggat	gaagcagagg
		120
cctgaacagg	gcctggaatg	cattggatat
atttatecta	gagatggtaa	tactaagtac
		180
aatgagaagt	tcaagggcaa	ggccacattg
actgcagaca	gacccctccat	cacagcctac
		240
atgcagctca	acagcctgac	atctgaggac
tctgcagtct	atttctgtgc	aagacccatc
		300
tatgatggtt	actcctttga	ctactggggc
caaggcacca	ctctcacagt	ctctctca
		357
<210>	15	
<211>	318	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	UM05-5L VL 基因	
<400>	15	
caaattgttc	tcacccagtc	tccagcaatc
atgtctgcat	ctccagggga	gaaggtcacc
		60
atgacctgcc	gtgccagctc	aagtgttagt
tacatgcact	ggtaccagca	gaagtcaggc
		120
acctccccca	aaagatggat	ttatgacaca
tccaaactgg	cttctggagt	ccctgctcgc
		180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaciaa tcagcagcat ggcggctgaa

240

gatgctgccca cttattactg ccagcagtgg actcgtaacc cacctacctt cgggtgctggg

300

accaagctgg agctgaaa

318

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hUM05-3 VH

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

202530

Thr Met His Trp Met Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

354045

Gly Leu Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe

505560

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65707580

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

859095

Ala Arg Pro Ile Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

I844684

110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

⟨213⟩ artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> hUM05-3 VL

<400> 17

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

45

Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Arg Asn Pro Pro Thr

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

105

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> UM05-5L C47W VH

<400> 18

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Thr Ile His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ile Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Ile Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hUM05-3 W47C VH

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His
20 25 30

Thr Met His Trp Met Gln Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Cys Ile
35 40 45

Gly Leu Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Ile Tyr Asp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hUM05-3 VH CDR1

<400> 20

Asp His Thr Met His

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hUM05-3 VH CDR2

<400> 21

Leu Ile Tyr Pro Arg Asp Gly Ser Thr Ile Tyr Asn Glu Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hUM05-3 VL CDR2

<400> 22

Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】一種特異性結合 CEACAM5 蛋白的抗體或其抗原結合片段，該抗體或其抗原結合片段包含：

如下 3 個重鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 1 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 2 所示的 VH CDR2、如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH CDR3；和，如下 3 個輕鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 5 所示的 VL CDR2、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VL CDR3；或者，

如下 3 個重鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 20 所示的 VH CDR1、如 SEQ ID NO: 21 所示的 VH CDR2、如 SEQ ID NO: 3 所示的 VH CDR3；和，如下 3 個輕鏈 CDRs：如 SEQ ID NO: 4 所示的 VL CDR1、如 SEQ ID NO: 22 所示的 VL CDR2、如 SEQ ID NO: 6 所示的 VL CDR3。

【請求項 2】如請求項 1 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 重鏈可變區（VH），其包含選自下列的胺基酸序列：

(i) SEQ ID NO: 7 所示的序列；

(ii) 與 SEQ ID NO: 7 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加的序列；或

(iii) 與 SEQ ID NO: 7 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列；

和/或

(b) 輕鏈可變區（VL），其包含選自下列的胺基酸序列：

(iv) SEQ ID NO: 8 所示的序列；

(v) 與 SEQ ID NO: 8 所示的序列相比具有一個或幾個胺基酸的置換、缺失或添加的序列；或

(vi) 與 SEQ ID NO: 8 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

【請求項 3】如請求項 2 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，(ii)或(v)中所述的置換是保守置換。

【請求項 4】如請求項 2 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含來源於人免疫球蛋白的重鏈框架區序列和/或輕鏈框架區序列。

【請求項 5】如請求項 2 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含：

(1) 具有如 SEQ ID NO: 7 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL；

(2) 具有如 SEQ ID NO: 18 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 8 所示的序列的 VL；

(3) 具有如 SEQ ID NO: 16 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL；或者

(4) 具有如 SEQ ID NO: 19 所示的序列的 VH 和具有如 SEQ ID NO: 17 所示的序列的 VL。

【請求項 6】如請求項 1 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含來源於人免疫球蛋白的恆定區或其變體。

【請求項 7】如請求項 1 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含：

(a) 人免疫球蛋白的重鏈恆定區 (CH) 或其變體，該變體與其所源自的序列相比具有一或複數胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合；和/或

(b) 人免疫球蛋白的輕鏈恆定區 (CL) 或其變體，該變體與其所源自的序列相比具有一或複數胺基酸的置換、缺失或添加或其任意組合。

【請求項 8】如請求項 7 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該重鏈恆定區是 IgG 重鏈恆定區。

【請求項 9】如請求項 7 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO: 9 所示的重鏈恆定區 (CH)。

【請求項 10】如請求項 7 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該輕鏈恆定區是 κ 輕鏈恆定區。

【請求項 11】如請求項 7 所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO: 11 所示的輕鏈恆定區 (CL)。

【請求項 12】如請求項 1 至請求項 11 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗原結合片段選自 Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、二硫鍵連接的 Fv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、scFv、scFv 二聚體、駱駝化單域抗體 (camelized single chain domain antibody)、雙抗體(diabody)、ds 雙功能抗體 (ds diabody)、奈米抗體、單域抗體 (sdAb)、雙價域抗體；和/或，該抗體為鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體、雙特異性抗體或多特異性抗體。

【請求項 13】如請求項 1 至請求項 11 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段，其中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記；其中，該可檢測的標記選自酶、放射性核素、螢光染料、發光物質或生物素。

【請求項 14】一種分離的核酸分子，其編碼如請求項 1 至請求項 13 任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

【請求項 15】如請求項 14 所述的分離的核酸分子，其中，該核酸分子包含如 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 中所示的核苷酸序列。

【請求項 16】一種載體，其包含如請求項 14 或請求項 15 所述的核酸分子。

【請求項 17】如請求項 16 所述的載體，其中，該載體為殖株載體或表達載體。

【請求項 18】一種宿主細胞，其包含如請求項 14 或請求項 15 所述的核酸分子或如請求項 16 或請求項 17 所述的載體。

【請求項 19】一種製備如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段的方法，其包括，在允許該抗體或其抗原結合片段表達的條件下，培養如請求項 18 所述的宿主細胞，和從培養的宿主細胞培養物中回收該抗體或其抗原結合片段。

【請求項 20】如請求項 19 所述的方法，其中，該宿主細胞是哺乳動物細胞。

【請求項 21】一種雙特異性或多特異性分子，其包含如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

【請求項 22】如請求項 21 所述的雙特異性或多特異性分子，其中，該雙特異性或多特異性分子特異性結合 CEACAM5，並且額外地特異性結合一或複數其他靶標。

【請求項 23】如請求項 21 所述的雙特異性或多特異性分子，其中，該雙特異性或多特異性分子還包含至少一種具有針對第二靶標的第二結合特異性的分子。

【請求項 24】一種免疫綴合物，其包含如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段以及連接於該抗體或其抗原結合片段的治療劑。

【請求項 25】如請求項 24 所述的免疫綴合物，其中，該治療劑選自烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑，及其任意組合。

【請求項 26】如請求項 24 或請求項 25 所述的免疫綴合物，其中，該免疫綴合物是抗體-藥物偶聯物（ADC）。

【請求項 27】一種藥物組合物，其包含如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段、或如請求項 21 至請求項 23 中任一項所述的雙特異性或多特異性分子或者如請求項 24 至請求項 26 中任一項所述的免疫綴合物、以及藥學上可接受的載體和/或賦形劑。

【請求項 28】如請求項 27 所述的藥物組合物，其中，該藥物組合物還包含另外的藥學活性劑，其中該另外的藥學活性劑是具有抗腫瘤活性的藥物。

【請求項 29】如請求項 27 所述的藥物組合物，其中，該藥物組合物還包含烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑、放射增敏劑、抗血管產生劑、細胞因數、分子標靶藥物、免疫檢查點抑制劑或溶瘤病毒。

【請求項 30】一種試劑盒，其含有如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

【請求項 31】如請求項 30 所述的試劑盒，其中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記，該可檢測的標記選自酶、放射性核素、螢光染料、發光物質或生物素。

【請求項 32】如請求項 30 所述的試劑盒，其中，該試劑盒還包括第二抗體，其特異性識別請求項 1 至請求項 13 任一項所述的抗體或其抗原結合片段。

【請求項 33】如請求項 32 所述的試劑盒，其中，該第二抗體還包括可檢測的標記，該可檢測的標記選自酶、放射性核素、螢光染料、發光物質或生物素。

【請求項 34】一種嵌合抗原受體，其包含如請求項 1 至請求項 13 任一項中所述的抗體或其抗原結合片段的抗原結合結構域。

【請求項 35】如請求項 34 所述的嵌合抗原受體，其中，該抗原結合結構域包含如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區和輕鏈可變區。

【請求項 36】如請求項 34 所述的嵌合抗原受體，其中，該抗原結合結構域由免疫效應細胞所表達。

【請求項 37】如請求項 34 所述的嵌合抗原受體，其中，該抗原結合結構域由 T 細胞所表達。

【請求項 38】一種分離的核酸分子，其編碼如請求項 34 至請求項 37 中任一項所述的嵌合抗原受體。

【請求項 39】一種載體，其包含如請求項 38 所述的分離的核酸分子。

【請求項 40】一種宿主細胞，其包含如請求項 38 所述的分離的核酸分子或請求項 39 所述的載體。

【請求項 41】如請求項 40 所述的宿主細胞，其中，該宿主細胞是免疫效應細胞。

【請求項 42】如請求項 40 所述的宿主細胞，其中，該宿主細胞是嵌合抗原受體 T 細胞。

【請求項 43】一種如請求項 1 至請求項 13 中任一項所述的抗體或其抗原結合片段、或請求項 21 至請求項 23 中任一項所述的雙特異性或多特異性分子、或請求項 24 至請求項 26 中任一項所述的免疫綴合物、或請求項 27 至請求項 29 中任一項所述的藥物組合物、或請求項 34 至請求項 37 中任一項所述的嵌合抗原受體、或請求項 40 至請求項 42 中任一項所述的宿主細胞在製備一藥物中的用途，該藥物用於在受試者中預防和/治療腫瘤。

【請求項 44】如請求項 43 所述的用途，其中，該藥物還包含一另外的藥學活性劑。

【請求項 45】如請求項 44 所述的用途，其中，該另外的藥學活性劑是具有抗腫瘤活性的藥物，其中該具有抗腫瘤活性的藥物選自烷化劑、有絲分裂抑制劑、抗腫瘤抗生素、抗代謝物、拓撲異構酶抑制劑、酪氨酸激酶抑制劑、放射性核素劑、放射增敏劑、抗血管產生劑、細胞因數、分子標靶藥物、免疫檢查點抑制劑或溶瘤病毒。

【請求項 46】如請求項 43 所述的用途，其中，該腫瘤表達 CEACAM5。

【請求項 47】如請求項 43 所述的用途，其中，該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕁樣肉芽腫 (mycosis fungoids)、默克爾細胞癌和其它惡性血液病。

【請求項 48】如請求項 43 所述的用途，其中，該腫瘤選自經典型何杰金氏淋巴瘤 (CHL)、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTL D 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 (DLBCL)、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、中樞神經系統 (CNS) 腫瘤。

【請求項 49】如請求項 43 所述的用途，其中，該腫瘤選自原發性 CNS 淋巴瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤。

【請求項 50】如請求項 43 所述的用途，其中，該受試者為哺乳動物。

【請求項 51】如請求項 43 所述的用途，其中，該受試者為人。

【請求項 52】一種檢測 CEACAM5 在樣品中的存在或其量的方法，其包括以下步驟：

(1) 將該樣品與如請求項 1 至請求項 13 任一項中所述的抗體或其抗原結合片段接觸；

(2) 檢測該抗體或其抗原結合片段與 CEACAM5 之間複合物的形成或檢測該複合物的量。

【請求項 53】如請求項 52 所述的方法，其中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記。

【請求項 54】如請求項 52 所述的方法，其中，該 CEACAM5 是人 CEACAM5。

【請求項 55】一種用於檢測腫瘤是否能夠藉由標靶 CEACAM5 的抗腫瘤療法來治療的方法，其包括以下步驟：

(1) 將含有該腫瘤細胞的樣品與如請求項 1 至請求項 13 任一項中所述的抗體或其抗原結合片段接觸；

(2) 檢測該抗體或其抗原結合片段與 CEACAM5 之間複合物的形成。。

【請求項 56】如請求項 55 所述的方法，其中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記。

【請求項 57】如請求項 55 所述的方法，其中，該 CEACAM5 是人 CEACAM5。

【請求項 58】如請求項 55 所述的方法，其中，該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕁樣肉芽腫 (mycosis fungoids)、默克爾細胞癌和其它惡性血液病。

【請求項 59】如請求項 55 所述的方法，其中，該腫瘤選自經典型何杰金氏淋巴瘤 (CHL)、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTLD 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 (DLBCL)、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、中樞神經系統 (CNS) 腫瘤。

【請求項 60】如請求項 55 所述的方法，其中，該腫瘤選自原發性 CNS 淋巴瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤。

【請求項 61】一種如請求項 1 至請求項 13 中任一項中所述的抗體或其抗原結合片段在製備一試劑盒中的用途，該試劑盒用於檢測腫瘤是否能夠藉由標靶 CEACAM5 的抗腫瘤療法來治療。

【請求項 62】如請求項 61 所述的用途，其中，該抗體或其抗原結合片段帶有可檢測的標記。

【請求項 63】如請求項 61 所述的用途，其中，該 CEACAM5 是人 CEACAM5。

【請求項 64】如請求項 61 所述的用途，其中，該腫瘤選自非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、胰臟癌、胃癌、膀胱癌、食管癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸部癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、成膠質細胞瘤、子宮頸癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、蕈樣肉芽腫（mycosis fungoids）、默克爾細胞癌和其它惡性血液病。

【請求項 65】如請求項 61 所述的用途，其中，該腫瘤選自經典型何杰金氏淋巴瘤（CHL）、原發性縱膈大 B 細胞淋巴瘤、T 細胞/組織細胞的富 B 細胞淋巴瘤、EBV 陽性和陰性 PTL D 和 EBV 相關彌漫性大 B 細胞淋巴瘤（DLBCL）、漿母細胞性淋巴瘤、結外 NK/T 細胞淋巴瘤、鼻咽癌和 HHV8 相關原發性滲出性淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、中樞神經系統（CNS）腫瘤。

【請求項 66】如請求項 61 所述的用途，其中，該腫瘤選自原發性 CNS 淋巴瘤、脊軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤。

【發明圖式】

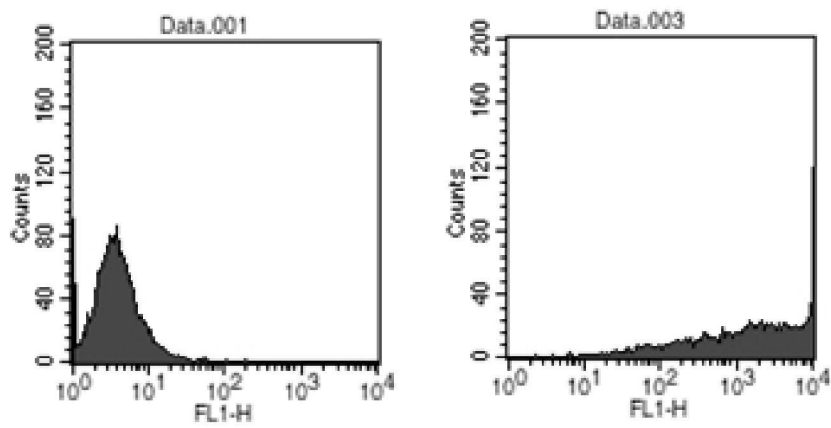


圖 1

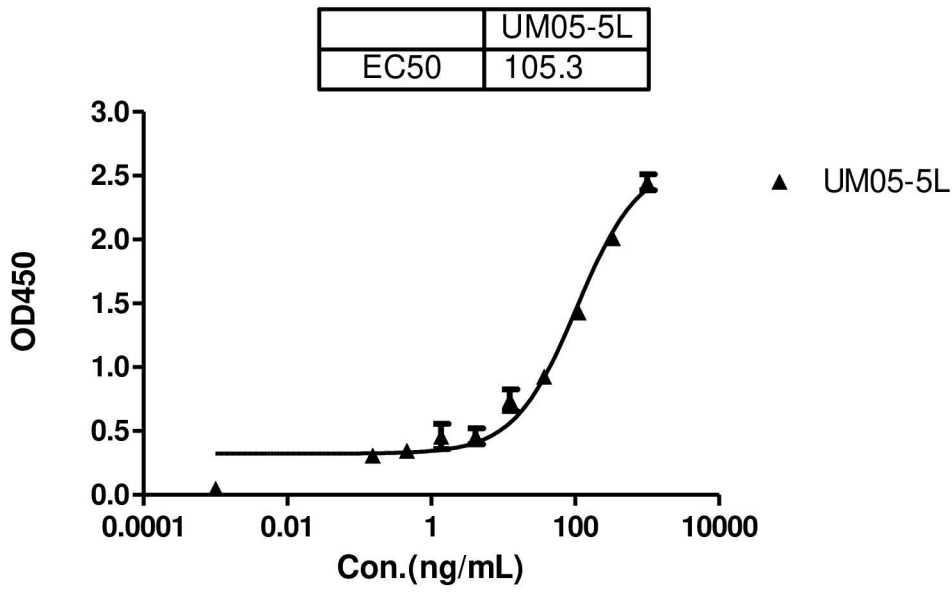


圖 2

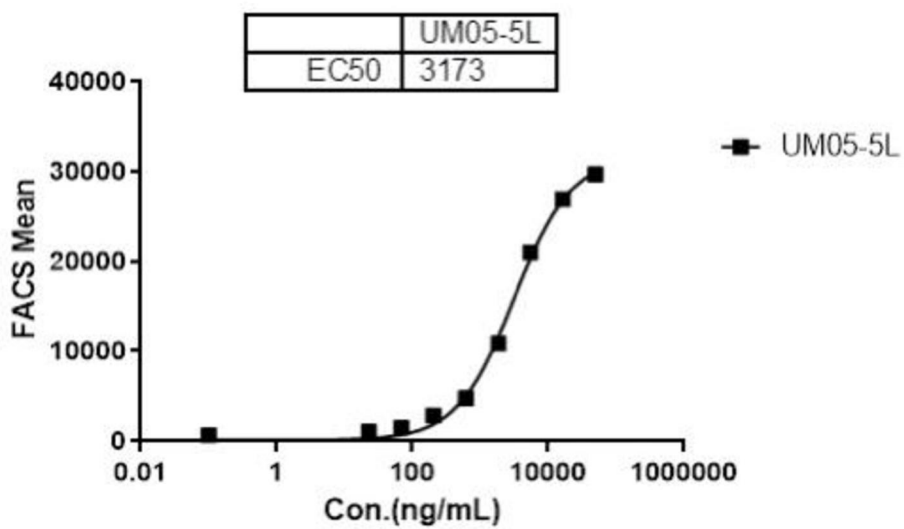


圖 3

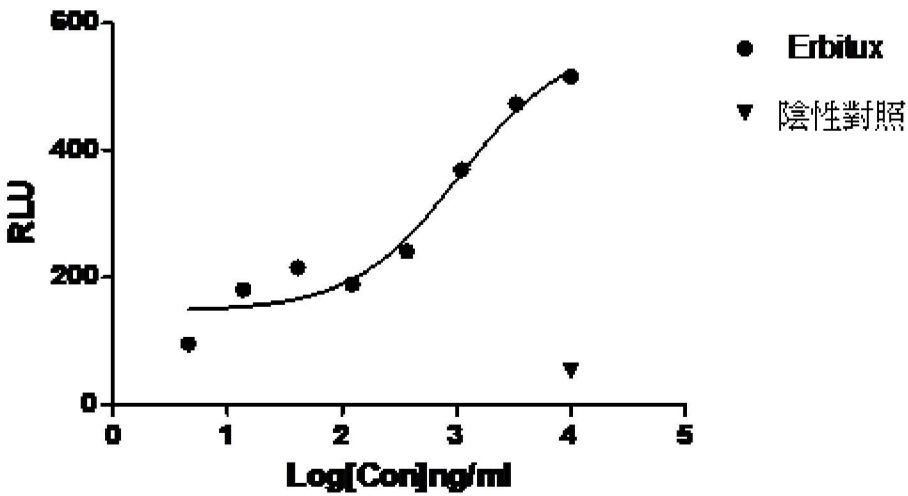


圖 4a

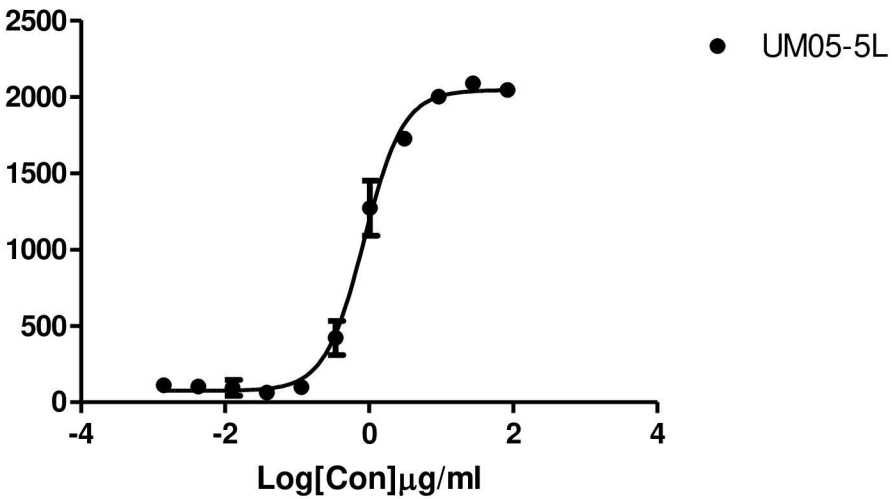


圖 4b

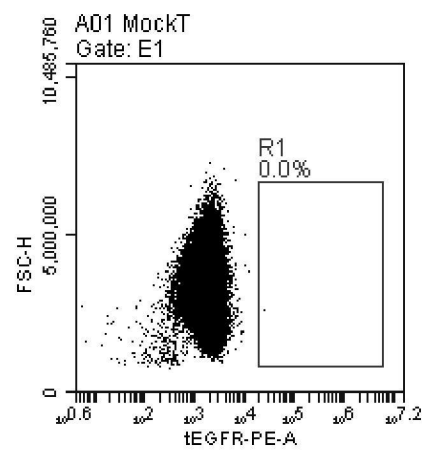


圖 5a

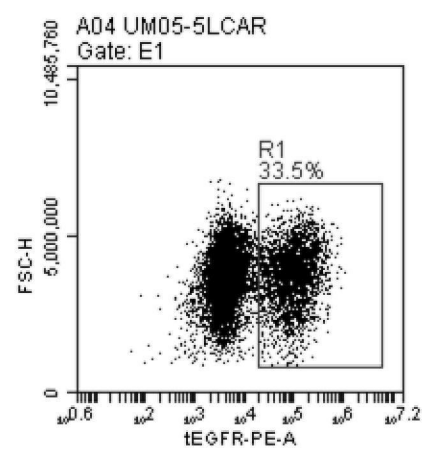


圖 5b

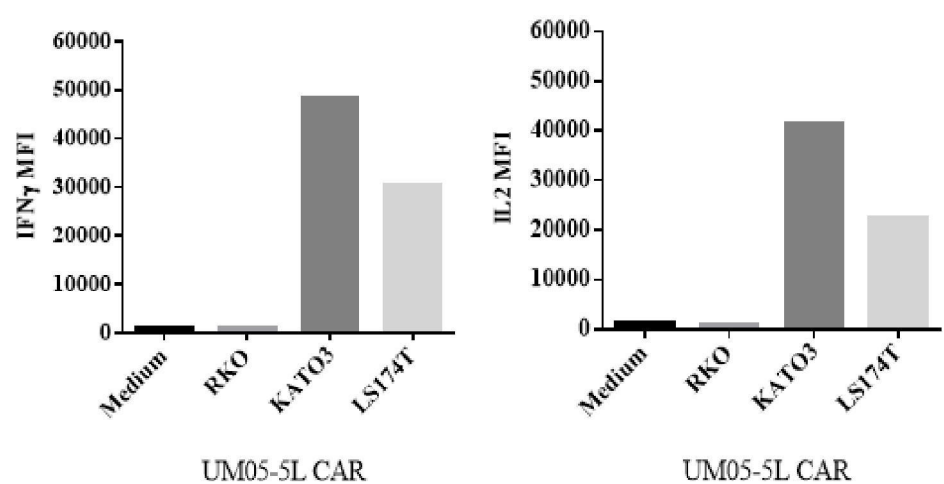


圖 6

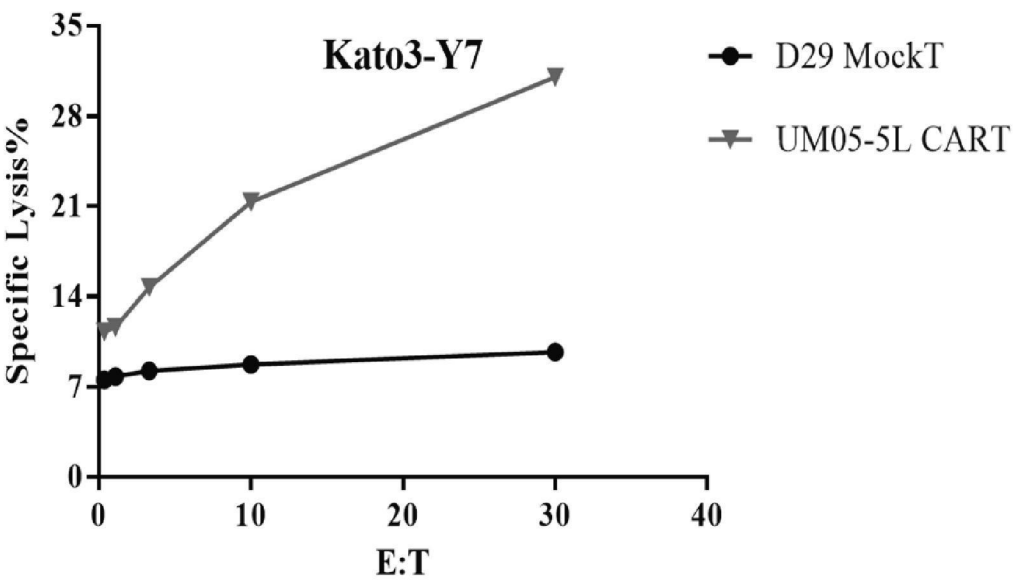


圖 7

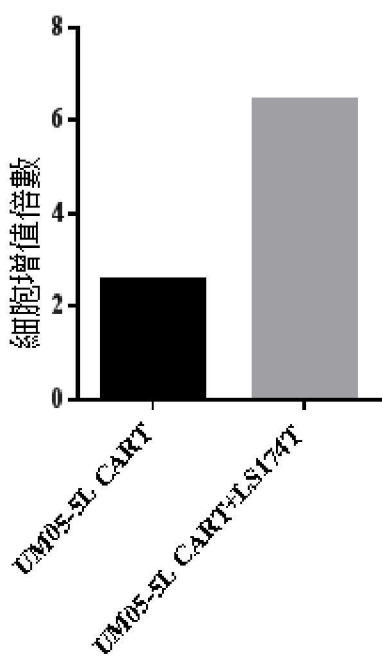


圖 8

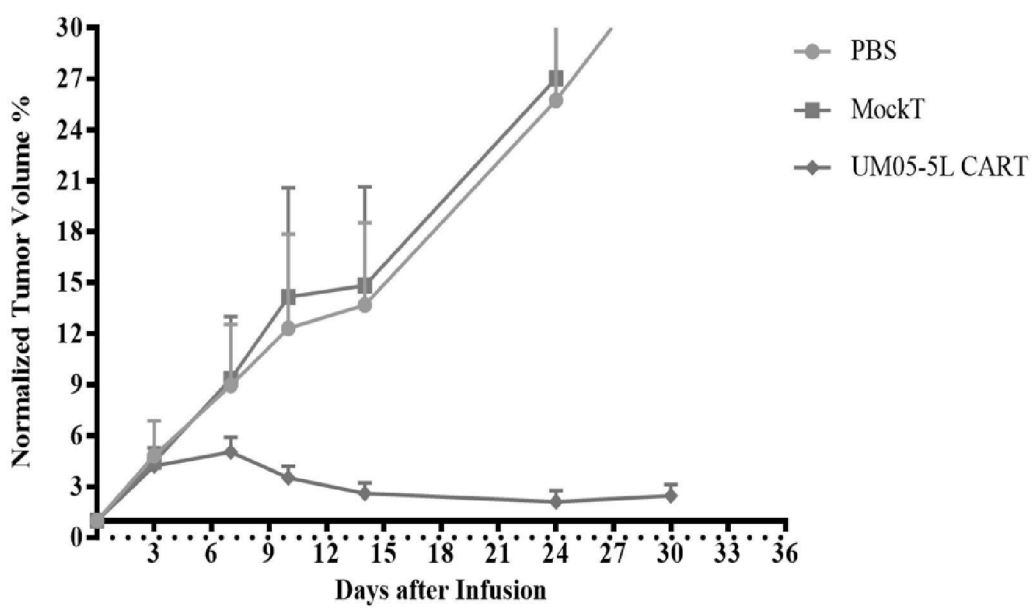


圖 9

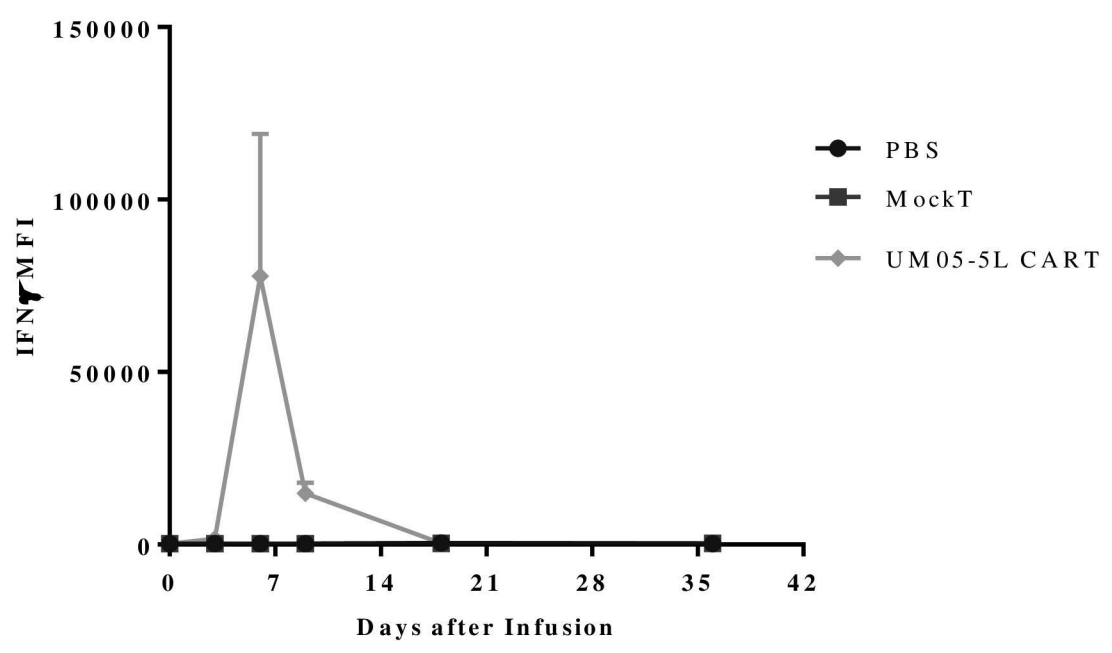


圖 10

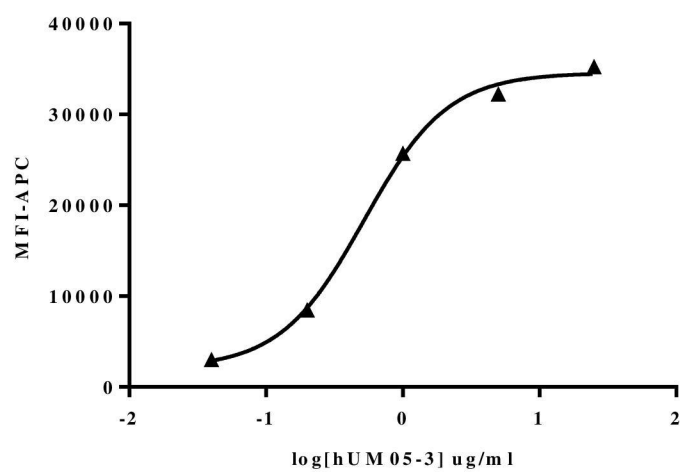


圖 11

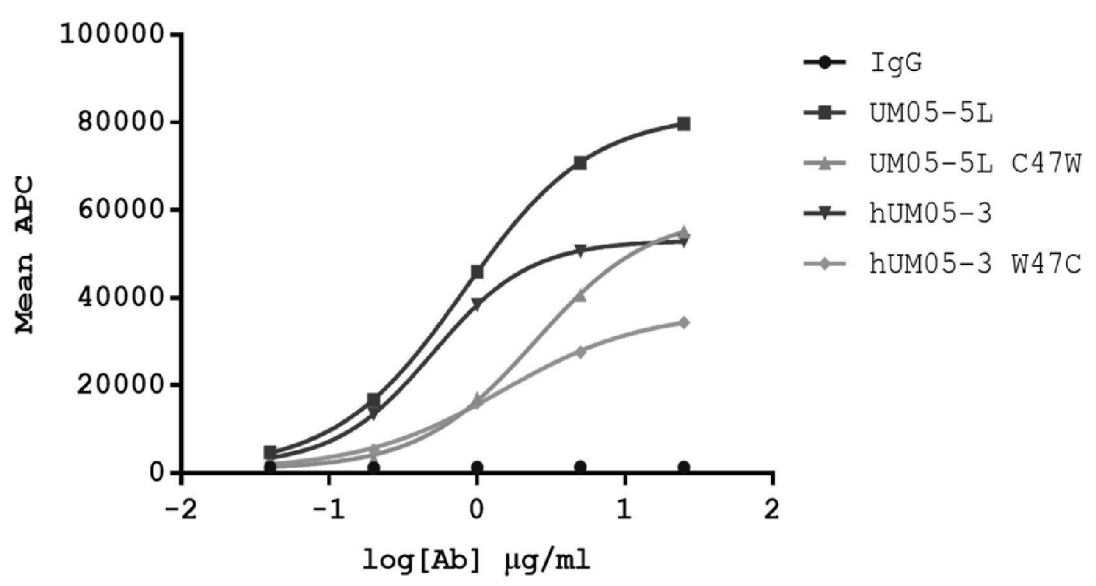


圖 12