

技術報告

A Novel Heavy-Chain Antibody-Drug Conjugate Targeting
Glycosylated CEACAM6 for GI and Lung Cancer therapy

新型針對糖基化 CEACAM6 之重鏈抗體藥物複合體於
胃腸道與肺癌治療之應用

吳明恒

目錄

Abstract	1
中文摘要	2
一、研發理念	3
二、學理基礎	4
三、主題內容	6
四、方法技巧	8
五、成果貢獻	9
六、結論與未來展望	21
七、參考資料	23

Abstract

Background: Aberrant glycosylation in cancer can alter epitope exposure, affecting antibody recognition and limiting the efficacy of conventional antibody-based therapies. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) is an aberrantly glycosylated protein in gastrointestinal and lung cancers and represents a promising therapeutic target. Therefore, antibodies that specifically recognizing glycosylated CEACAM6 can increase tumor-targeting efficacy and avoid off-target side effects on normal cells.

Materials and Methods: We developed a llama-derived heavy-chain antibody (HCAb) that selectively binds glycosylated CEACAM6. HCAb-drug conjugates (HCAb-ADCs) were constructed by linking MMAE or exatecan via hydrophilic linkers. Binding affinity and stability were evaluated by SPR, ELISA, and IHC. Antitumor efficacy was assessed using MTT assays and CEACAM6⁺ cell-derived xenograft (CDX), patient-derived xenograft (PDX), and intracranial brain metastasis mouse models.

Results: The HCAb exhibited superior affinity ($K_d \sim 10^{-13}$ M), thermal/pH stability, and selective recognition of glycosylated CEACAM6 compared to conventional antibodies. HCAb-ADCs selectively killed CEACAM6⁺ colorectal, lung, pancreatic, and bile duct cancer cells at sub-nanomolar concentrations while sparing normal epithelial and immune cells. In vivo, low-dose HCAb-ADC (0.04–1 mg/kg) suppressed tumor growth and achieved complete responses in CDX and PDX models, outperforming current therapeutic regimens. HCAb-ADCs also crossed the blood-brain barrier and significantly inhibited brain metastasis lung cancer progression.

Conclusions: Our study demonstrates that anti-CEACAM6 HCAb-ADCs provide enhanced specificity and efficacy against glycosylated CEACAM6-expressing cancers, including brain metastases, supporting their development as next-generation ADCs.

中文摘要

背景

癌症中的異常糖基化現象會改變表位 (epitope) 的暴露程度，影響抗體的辨識能力，進而限制傳統抗體治療的療效。癌胚抗原相關細胞黏附分子 6 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, CEACAM6) 在消化系統癌症與肺癌中呈現異常糖基化，是具潛力的治療靶點。因此，能專一辨識糖基化 CEACAM6 的抗體可望提升腫瘤標靶效率，並減少對正常細胞的非特異性毒性。

材料與方法

本研究開發了一株源自駱駝 (llama) 的重鏈抗體 (heavy-chain antibody, HCAb)，能選擇性結合糖基化 CEACAM6。進一步以親水性連接子 (hydrophilic linkers) 將微管抑制劑 MMAE 或拓撲異構酶 I 抑制劑 exatecan 偶聯，製備成 HCAb-藥物複合體 (HCAb-drug conjugates, HCAb-ADCs)。透過表面電漿共振儀 (SPR)、酵素連結免疫吸附分析 (ELISA) 及免疫組織化學染色 (IHC) 評估其結合親和力與穩定性，並以 MTT 細胞增生抑制試驗、CEACAM6 陽性細胞衍生異種移植 (cell-derived xenograft, CDX)、病人來源異種移植 (patient-derived xenograft, PDX) 及腦轉移小鼠模型，評估其抗腫瘤效果。

結果

所開發之 HCAb 展現優異的結合親和力 (K_d 約 10^{-13} M)、熱穩定性與 pH 穩定性，且較傳統抗體能更專一辨識糖基化 CEACAM6。HCAb-ADCs 能在亞奈米莫耳 (sub-nanomolar) 濃度下選擇性殺死 CEACAM6 陽性的結直腸癌、肺癌、胰臟癌與膽管癌細胞，同時避免對正常上皮細胞及免疫細胞造成損傷。在體內實驗中，低劑量 HCAb-ADCs (0.04–1 mg/kg) 能有效抑制腫瘤生長，並在 CDX 及 PDX 模型中達成完全緩解，療效優於現行治療方案。此外，HCAb-ADCs 可穿越血腦障壁 (BBB)，並顯著抑制肺癌腦轉移的進程。

結論

本研究證實，針對糖基化 CEACAM6 之 HCAb-ADCs 具備優異的專一性與治療效果，能有效對抗表達糖基化 CEACAM6 的各類癌症，包括腦轉移腫瘤，支持其作為次世代抗體藥物複合體 (ADC) 之發展潛力。

一、 研發理念

糖基化影響抗體辨識能力

癌症中的異常糖基化現象不僅促進腫瘤的生長、侵犯和轉移能力，亦大幅改變了抗原表位的暴露，進而影響抗體辨識與治療效果(1)。糖基化變異可導致原本隱藏的表位被暴露，或使原有表位屏蔽，這種微小但系統性的變化，使得傳統具有重鍊和輕鍊的抗體常出現辨識力下降、特異性不足甚至產生非預期的交叉反應。因此，開發能針對異常糖基化結構產生高度特異性辨識的抗體，成為提升腫瘤靶向治療選擇性的關鍵策略之一。例如:PD-L1 異常糖基化會進一步影響 anti-PD-L1 抗體辨識抗原及免疫治療反應效果(2, 3)。

傳統抗體的大尺寸和抗原辨識特性

癌症治療雖持續進步，但針對轉移性與難治型腫瘤，仍存在療效不足與副作用過大的挑戰。抗體藥物複合體 (Antibody-drug conjugates, ADCs) 以其高專一性與定點殺傷特性，在近年癌症精準治療中嶄露頭角。然而，目前市售或臨床開發中的 ADC 多數仍基於傳統 IgG 骨架，其分子量較大 (約 150 kDa)，限制了其在腫瘤組織內的深層滲透，在處理大實體瘤或是高間質含量 (desmoplastic stroma) 的腫瘤如胰臟癌與膽管癌中治療成效受限，除此之外，對於腦轉移癌症通過血腦障壁的能力受限，因此對腦轉移癌症治療效果有限。為突破上述限制，我們以駱駝免疫庫為基礎，成功研發出針對 CEACAM6 的重鍊抗體 (Heavy Chain Antibody, HCAb)，並進一步製備為抗體藥物複合體 (HCAb-drug conjugate, HCAb-ADC)。透過結合其小分子特性、可辨識糖基化 CEACAM6、高親和力與優異穩定性，期望開發出一種新型、具有較佳組織穿透能力的 ADC，用以治療腸胃道、胰臟、肺癌及其轉移病灶，提升療效並降低副作用，實現更具潛力的臨床應用。

二、 學理基礎

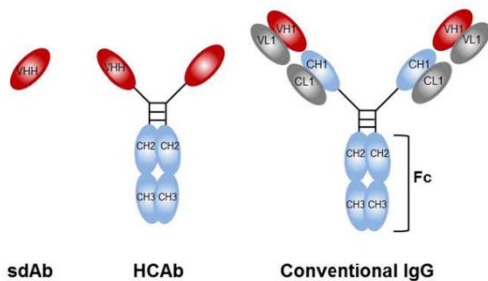
癌胚抗原相關細胞粘附分子 6 (CEACAM6)

CEACAM6 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6) 是一種免疫球蛋白超家族的細胞表面醣蛋白，透過 GPI(glycosylphosphatidylinositol)錨定於細胞膜上，是一種在消化系統癌症與肺癌中高度表現及醣基化異常表達的分子(4)。雖然只有 266 個胺基酸(amino acid)並且預估分子量約 37KDa，但是在腫瘤或癌細胞中通常顯示為 75-100kDa，顯示 CEACAM6 是一種表達於細胞膜表面的高度醣化的分子，CEACAM6 經由醣基磷脂醯肌醇 A(glycosyl phosphatidyl inositol-A,GPI-A)連接到細胞膜上，並且可和其他細胞膜蛋白產生交互作用或是增加細胞與細胞外基質(extracellular matrix, ECM)的黏附而促進癌細胞的惡性程度(4-7)。我們之前的研究顯示，CEACAM6 的 N-醣基化，特別是在 Asn256 位點，由 MGAT5 (α -1,6-甘露糖醣蛋白 6- β -N-乙醯葡萄糖胺轉移酶)催化，對其功能具有關鍵影響。這種複雜的 N-醣基化形式促進了 CEACAM6 與表皮生長因子受體 (EGFR) 的交互作用，增強了 EGFR 的活化與下游訊號傳導，進而促進腫瘤細胞的侵襲與轉移能力(5)，因此針對醣基化 CEACAM6 發展精準辨識的抗體，具有高度臨床應用潛力。

抗體藥物複合物 (Antibody drug conjugate; ADC)

抗體藥物複合物(antibody-drug conjugate; ADC)是一種透過設計的化學連接劑(chemical linker)將單株抗體(monoclonal antibodies; mAbs)與細胞毒性藥物與結合的”巡弋飛彈”技術，使其同時具備精準腫瘤標靶和高效毒殺腫瘤特性的能力，特別的是，ADC 可以利用其旁觀者效應(bystander effect)影響周圍未直接受到標靶的細胞，導致它們也受到一定程度的損害或死亡。因此 ADC 近年來成功大幅提升並且改善了許多對化療和標靶治療抗藥性病人預後，例如: trastuzumab deruxtecan (T-DXd; enhertu)這個在 2019 年批准的 ADC，針對 Her2 陽性或弱陽性的乳癌病人，在 DESTINY-Breast03 及 DESTINY-Breast04 為的臨床試驗中，enhertu 不論是在無惡化存活率或是疾病反應率都優於化療或是第一代 ADC(T-DM1)(8-10)，足見 ADC 在癌症治療的發展潛力。目前已有 12 個經過 FDA 核准的 ADC 藥物，並且有超過 400 個 ADC 藥物正在臨床試驗中。

Anti-CEACAM6 HCAb-ADC 重鍊抗體 (Anti-CEACAM6 heavy chain antibody drug conjugate)



羊駝類動物的血液中包含了一種特殊的抗體，稱為重鍊抗體 (HCAbs)，其中有一半的抗體是由缺少輕鏈的重鍊二聚體組成 (參見 Fig. 1)。重鍊抗體 (heavy-chain antibody, HCAb) 源自駱駝科動物，是一種天然缺失輕鏈且由單一重鏈組成的抗體分子，具有體積小 (~80 kDa)、高熱穩定性、pH 耐受性佳、以及優異組織穿透能力的特點

Figure 1. 各種不同抗體的結構 HCAb: heavy-chain antibody. sdAb: single domain antibody. VHH: variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody

(11)。相較於傳統 IgG 抗體，HCAb 更易於穿越緻密腫瘤組織屏障 (tumor stroma)，可顯著提升腫瘤滲透性，並且由於其特殊的結構可以辨識一般抗體無法辨識的抗原決定位(epitope)(12, 13)，由於 CEACAM6 能夠促進許多癌症進程並且大量表現在癌細胞膜上，因此我們研發出特殊的 CEACAM6 重鍊抗體 (HCAb) 來辨識糖基化 CEACAM6。我們從羊駝的免疫庫中篩選出一株特殊的 anti-CEACAM6 HCAb，它能夠同時辨識糖基化的 CEACAM6。這種抗體能夠明顯區分正常組織和癌組織，而一般的傳統抗體(9A6)卻無法達到相同的效果 (見 Fig. 2A 和 B)。原因在於 CEACAM6 的糖鍊遮蔽了傳統抗體所能辨識的 epitope (見 Fig. 2C)。利用此抗體做免疫組織染色和細胞表現測試發現糖基化 CEACAM6 大量表現在膽管、大腸直腸、肺臟、胰臟線癌細胞 (Fig.3)，但是在許多正常組織低度表達 (Fig. 4)，因此，所以我們發展出一個新穎的 anti-CEACAM6 HCAb-drug conjugate (HCAb-ADC) 來做更有效的癌症治療。

三、主題內容

本研究旨在開發一種針對 CEACAM6 的重鏈抗體藥物複合體 (HCAb-ADC)，並評估其生化特性與抗癌效果，與傳統 ADC 進行比較，探討其在原發性腫瘤與腦轉移腫瘤中的應用潛力。

主要研究目標如下：

1. 評估 HCAb 對細胞表面醣基化 CEACAM6 之辨識能力、熱與酸鹼穩定性

目的說明：

由於癌症細胞表面的 CEACAM6 常帶有異常的 N-醣基化修飾，這種醣基化會改變抗原表位 (epitope) 暴露，進而影響抗體辨識效果。因此，本研究首要目的是確認所開發之 HCAb 能有效辨識細胞表面醣基化 CEACAM6，且在不同物理條件下 (如高溫、不同 pH 值) 仍能維持結合能力，確保其應用於體內環境時的穩定性。

實驗設計：

● 結合能力測定：

- 透過西方墨點法 (Western blot) 與流式細胞儀 (Flow cytometry)，確認 HCAb 能辨識在細胞表面醣基化的 CEACAM6。
- 進行免疫組織化學染色 (IHC)，比較癌症組織與正常組織中 HCAb 的辨識強度。
- 使用表面電漿共振儀 (SPR) 測量 HCAb 和 HCAb-ADC 與重組 CEACAM6 蛋白之親和力 (Kd 值)。
- 熱與酸鹼穩定性測試：使用 ELISA 將 HCAb 暴露於不同溫度 (4–45°C) 及不同 pH 值 (3–13) 條件下，再測量其與 CEACAM6 的結合能力，評估結構與功能穩定性。

2. 製備 HCAb-ADC 與傳統 ADC，並透過細胞與動物模型評估其抗癌效果

目的說明：

為將 HCAb 應用於癌症治療，本研究將其結合細胞毒性小分子藥物，製成抗體藥物複合體 (ADC)。同時製備傳統抗體 ADC 作為對照，比較其抗腫瘤效果。

實驗設計：

- **ADC 製備：**

- 使用親水性可裂解 linker（如 VC-based cleavable linker）將 MMAE（微管抑制劑）或 exatecan（拓撲異構酶抑制劑）偶聯至 HCAb 與傳統 IgG 抗體上。
- 確認藥物載量（Drug-to-Antibody Ratio, DAR）、純度與偶聯效率（以 HPLC 與質譜分析）。
- 體外抗癌效果測試：選用表達和不表達的 CEACAM6 的癌細胞株與正常細胞進行 MTT 細胞存活分析，測定 IC₅₀值。
- 體內抗腫瘤效果測試：在免疫缺陷小鼠中建立 CDX（cell-derived xenograft 細胞衍生異種移植）與 PDX（patient-derived xenograft 病人衍生異種移植）模型。施打不同劑量之 HCAb-ADC 或傳統 ADC，定期測量腫瘤體積並記錄體重變化與毒性反應。與標準臨床療法（如 FOLFIRI+cetuximab、gemcitabine）比較療效。

3. 探討 HCAb-ADC 對腦轉移腫瘤的治療潛力與血腦障壁（BBB）穿透能力

目的說明：

腦轉移是晚期癌症病人常見且預後極差的併發症，但多數大型抗體難以穿透血腦障壁（BBB）。本研究特別設計實驗評估小分子量 HCAb-ADC 是否能穿越 BBB 並有效控制腦部腫瘤。

實驗設計：

- **腦轉移模型建立：**

- 透過顱內注射法，將 CEACAM6 高表達的癌細胞注入小鼠大腦皮質，建立腦內腫瘤模型。
- 使用生物發光影像系統（IVIS）或 MRI 成像追蹤腦內腫瘤生長情況
- 治療效果評估：隨機分組施打 HCAb-ADC、傳統 ADC 或對照組（PBS），評估生存時間（Kaplan–Meier 曲線）、腦部腫瘤體積抑制率與腦部藥物分布情況（可搭配免疫染色或 LC-MS 藥物濃度分析）。比較 HCAb-ADC 與傳統 ADC 在腦轉移腫瘤治療上的差異。

四、方法技巧

1. 抗體特性分析

採用以下方法進行抗體特性驗證：

- **表面電漿共振儀 (SPR)**：量測抗體與 CEACAM6 之結合親和力
- **西方墨點法 (Western blot) 與免疫組織化學染色 (IHC)**：確認抗體可辨識細胞與組織中之 CEACAM6。
- **酵素免疫分析 (ELISA)**：測試抗體在不同溫度與 pH 環境下的穩定性。

2. ADC 製備與藥物偶聯

將兩類細胞毒素 (MMAE 與 exatecan) 分別利用親水性 linker 接合至 HCAb 與傳統抗體，形成 HCAb-ADC 與傳統 ADC。確保藥物裝載率與偶聯均勻性達臨床級標準。

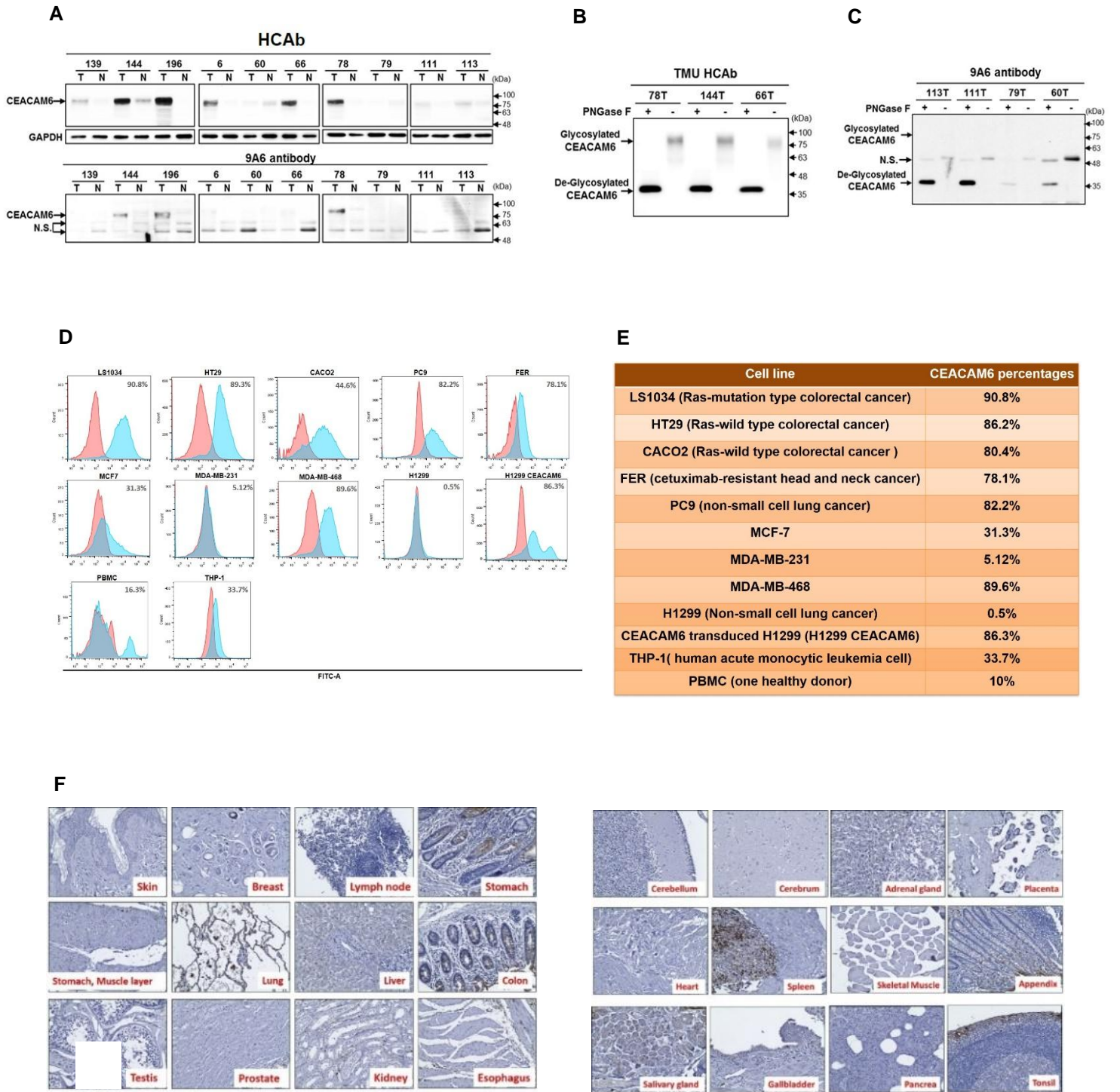
3. 體外抗癌實驗

透過 MTT 細胞存活分析，評估 ADC 對表達 CEACAM6 的腸癌、肺癌、胰臟癌與膽道癌細胞株之殺傷效果。並比較其對正常上皮細胞與外周血單核球之毒性。

4. 體內動物實驗模型

- **CDX (Cell-Derived Xenograft) 與 PDX (Patient-Derived Xenograft) 小鼠模型**：評估單劑量 (0.04–1 mg/kg) 與多劑量 HCAb-ADC 之腫瘤抑制效果。
- **腦轉移模型**：藉由顱內注射癌細胞建立，檢驗 HCAb-ADC 穿透 BBB 並抑制腦部腫瘤生長的能力。

五、成果貢獻



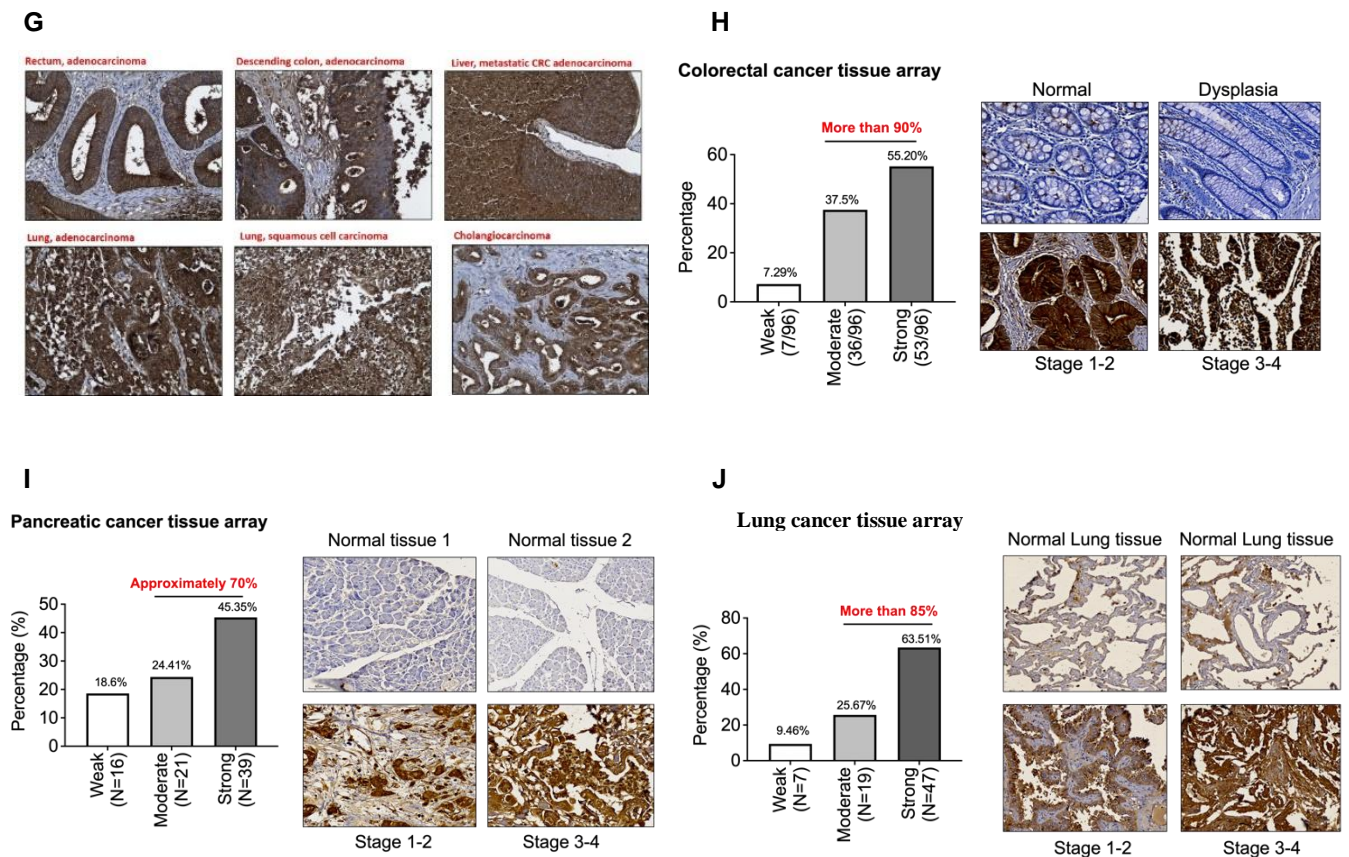


圖 2. 抗 CEACAM6 重鏈抗體 (HCAb) 辨識癌細胞上的糖基化 CEACAM6

(A) CEACAM6 在口腔癌組織中相較於正常組織表現量明顯升高。利用 HCAb 與傳統抗體 9A6 進行西方墨點法 (Western blot) 檢測 CEACAM6 表現。N.S.代表非特異性結合；T：腫瘤組織；N：對應的正常組織。(B) HCAb 能辨識糖基化與去糖基化的 CEACAM6 蛋白。將組織裂解液分別以或不以 PNGase F 處理 (去除 N-糖基化修飾)，再以 HCAb 進行西方墨點法分析。(C) 傳統抗體 9A6 主要辨識去糖基化的 CEACAM6 蛋白。此結果引用自己發表文獻 (Oncogene, 2018, 37, 116–127)。(D) 流式細胞儀 (Flow cytometry) 分析顯示，HCAb 可廣泛辨識多種癌細胞株表面的 CEACAM6。(E) 不同癌細胞株中 CEACAM6 陽性細胞比例的統計總結。(F, G) 抗 CEACAM6 HCAb 對原發性腫瘤組織的親和力高於正常組織。使用 HCAb 染色一組包含 30 個正常組織樣本 (F) 與 29 個癌症組織樣本 (G) 的人體組織微陣列 (Tissue Microarray)，並進行比較。(H, I, J) CEACAM6 在大腸直腸癌、胰臟癌及肺癌的表現情形。右側圖示為不同染色強度的染色結果；左側圖表則為染色結果的量化分析。

Cancer type	Cell line	CEACAM6 positive percentages	IC ₅₀ (nM)
Colorectal cancer	HT29	89.3%	0.1510
	CACO2	80.4%	0.3591
	T84	99.13%	3.645
	HCT116	29.5%	157.5
	HCT15	0.29%	55.41
Lung cancer	NCI-H1299	0.5%	129.3
	NCI-H1299 CEACAM6 ^{OE}	86.3%	0.2393
	A549	37.87%	8.760
	PC9	77.4%	3.25
	PC9-Br (Brain metastasis)	90.18%	3.145
Pancreatic cancer	HPAC	70.38%	0.0422
	AsPC1	74.19%	0.44
	BxPC3	89.76%	0.0337
	PNAC1	2.93%	15.36
Human AML	THP-1 monocytes	33.7%	25.87
	Neutrophil-like HL60	1.1%	>1000
PBMC	PBMCs (one healthy donor)	10%	>1000
Immune cells	CD177+ Normal Neutrophil (one healthy donor)	1.44%	>1000

圖 3. HCAb-ADC 對不同 CEACAM6 表現量細胞株的毒性分析。
以 IC₅₀ 濃度顯示不同細胞對 HCAb-ADC 毒殺效果的敏感性。

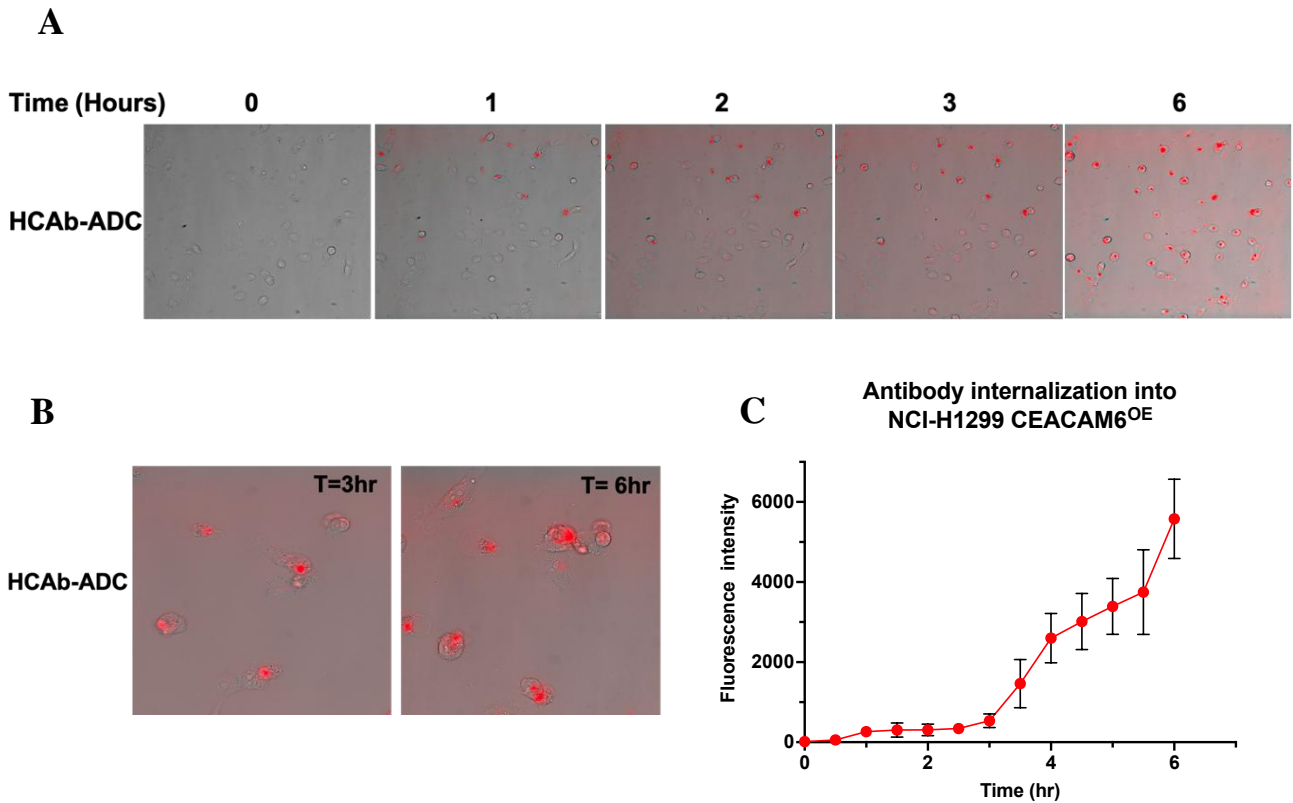


圖 4. HCAb-ADC 能夠內吞(endocytosed)到溶酶體(lysosome)

HCAb-ADC 可內吞至 NCI-H1299 CEACAM6 過度表達細胞內，(A) 將 NCI-H1299 CEACAM6 過度表達 (CEACAM6OE) 細胞與標記有 Incucyte® Fabfluor pH 敏感探針的 HCAb-ADC 共同培養。隨著 HCAb-ADC 內化至細胞內酸性溶酶體，偵測到時序性螢光訊號變化。(B) 內化過程在 3 小時與 6 小時的放大影像，顯示 HCAb-ADC 進入細胞內部的情形。(C) HCAb-ADC 內化的動態變化趨勢。

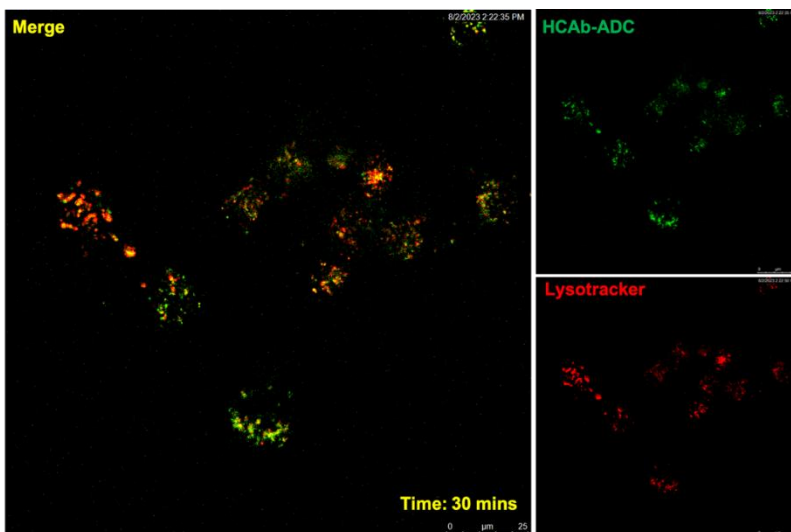
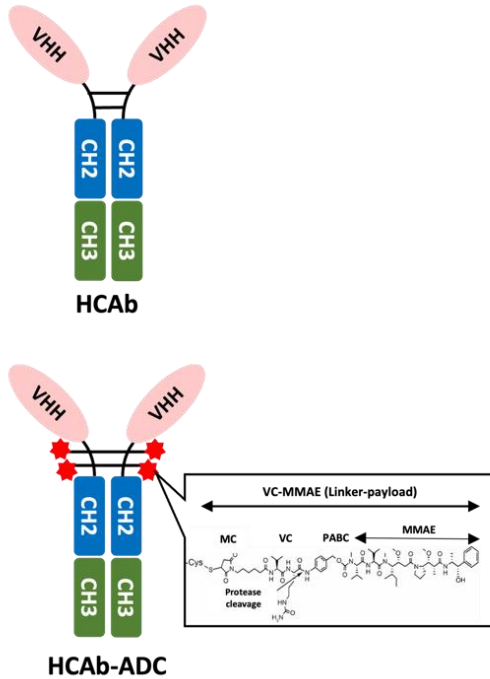
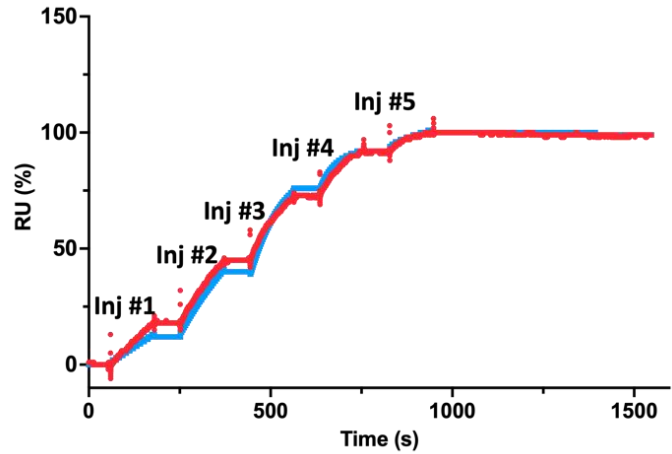


圖 5. HCAb-ADC 於內吞化後 0.5 小時進入溶酶體

(A) 在 NCI-H1299 CEACAM6 過度表達 (CEACAM6OE) 細胞中，使用 Lysotracker (紅色) 標記溶酶體，並與綠色螢光標記的 HCAb-ADC 共同觀察。於培養 30 分鐘後，可觀察到 HCAb-ADC 與溶酶體的共定位現象 (呈橘色螢光)，顯示 HCAb-ADC 在短時間內成功進入並累積於溶酶體中。

A**Designs of HCAb and HCAb-ADC****B**

• HCAb
 • HCAb-ADC

	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	KD (M)
HCAb	2.37E+05	3.04E-05	1.29E-10
HCAb-ADC	8.81E+05	3.53E-05	4.01E-10

圖 6. HCAb 與 HCAb-ADC 的設計與結合親和力分析

HCAb 及其藥物偶聯體 (HCAb-ADC) 均能以高親和力結合 CEACAM6。(A) HCAb 與 HCAb-ADC 的設計示意圖。上方為 HCAb 的結構設計，下方為 HCAb 於鉸鏈區域的半胱氨酸 (Cysteine) 與可切割型 VC-linker-MMAE 藥物載體進行偶聯的設計。(B) 利用表面電漿共振儀 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 分析，確認 HCAb 與 HCAb-ADC 具有相似的結合親和力與結合動力學模式。上方為 HCAb 與 HCAb-ADC 的單循環動力學 (single cycle kinetics) 測量圖，下方為其對應的 K_{on} 、 K_{off} 與 KD 值。

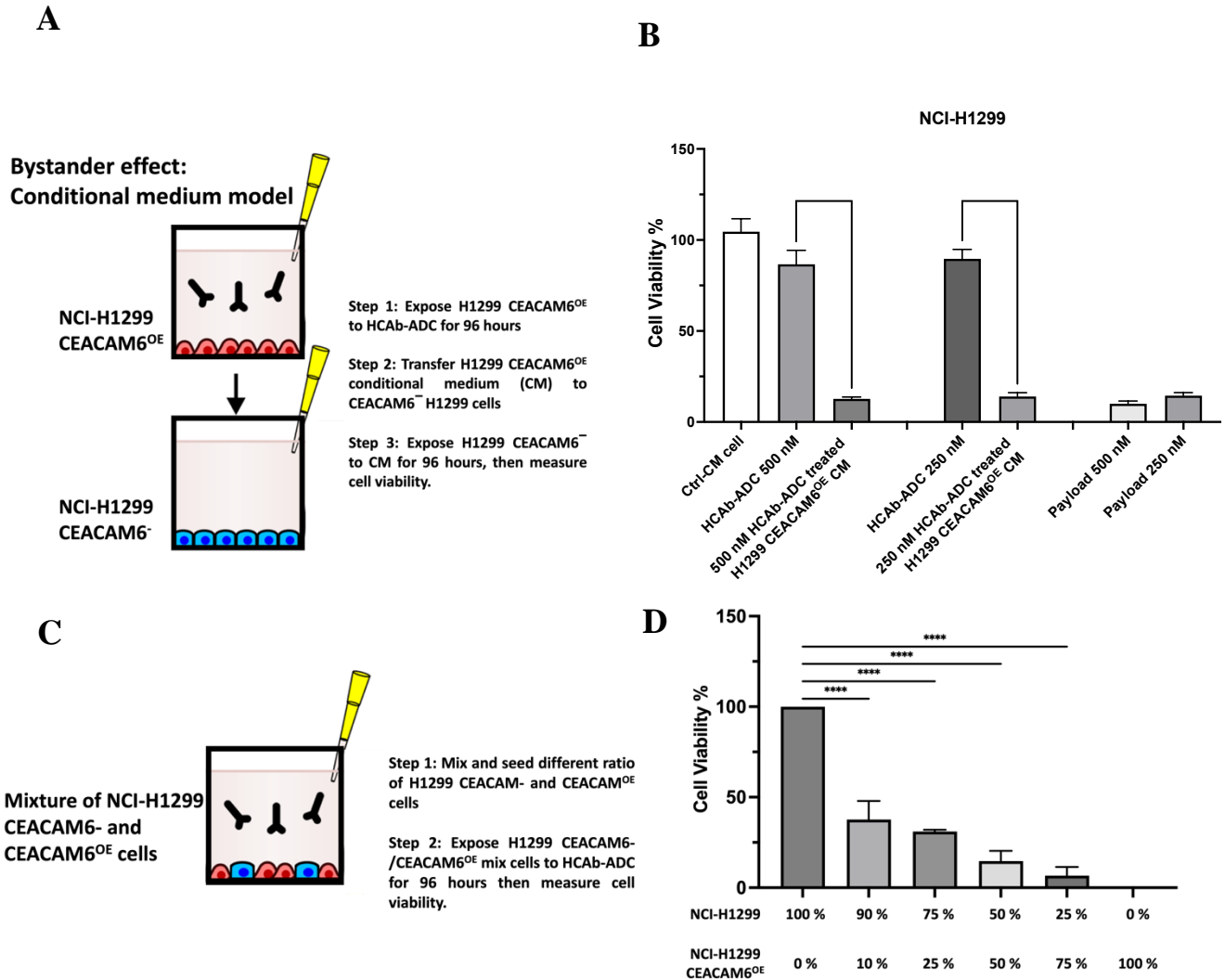


圖 7. HCAb-ADC 的旁觀者效應 (Bystander Killing Effect)

本研究於體外條件培養液模型與共培養模型中，評估抗 CEACAM6 HCAb-ADC 的旁觀者殺傷效應。(A) HCAb-ADC 旁觀者殺傷效應的條件培養液模型示意圖。(B) NCI-H1299 CEACAM6 陰性細胞 (H1299 CEACAM6⁻) 經條件培養液處理 96 小時後的細胞存活率分析。條件培養液來自於 H1299 CEACAM6 過度表達 (CEACAM6^{OE}) 細胞，並與 HCAb-ADC 共同孵育 96 小時後收集。(C) HCAb-ADC 旁觀者殺傷效應的共培養模型示意圖。(D) 將 NCI-H1299 CEACAM6⁻ 與 NCI-H1299 CEACAM6^{OE} 細胞按不同比例混合共培養 [CEACAM6⁻ : CEACAM6^{OE} = (100:0)、(90:10)、(75:25)、(50:50)、(25:75)、(0:100)]，並處理 250 nM HCAb-ADC 96 小時。細胞存活率透過 MTT 分析進行評估。每個數據條代表平均值及標準差 (SD) (n = 3)。

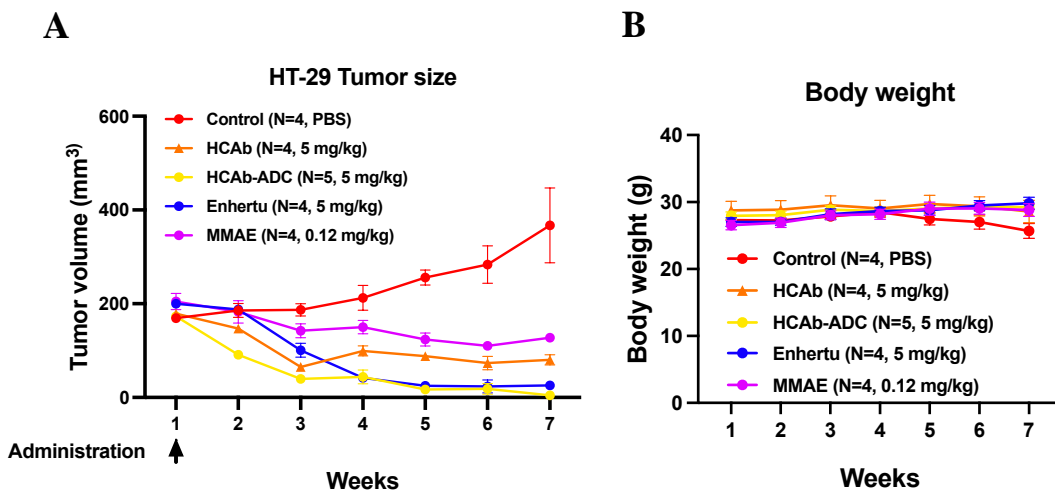


圖 8. HCAB-ADC 在體內的抗腫瘤療效

HCAB-ADC 能完全消除 HT29 腫瘤，且療效優於單獨 HCAB，其療效與臨床用抗 anti-HER2 ADC (Enhertu) 接近。(A) 腫瘤生長曲線。於第一週經尾靜脈注射給予不同處理組別，包括 PBS、HCAB-ADC (5 mg/kg)、HCAB (5 mg/kg)、Enhertu (5 mg/kg) 及 MMAE (0.12 mg/kg)。箭頭標示給藥次數。(B) 不同處理組別小鼠的體重變化趨勢。

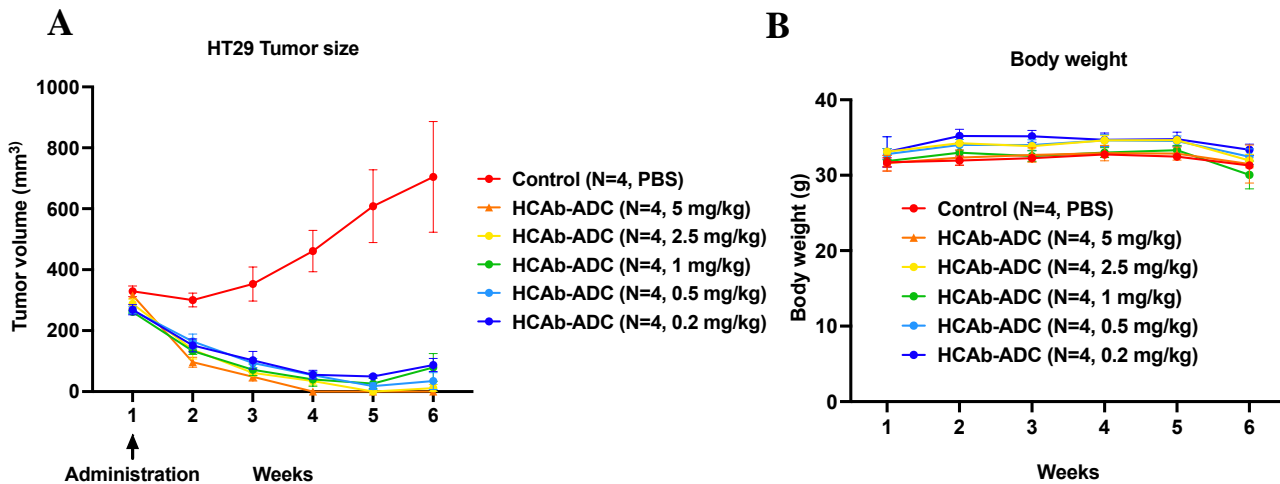
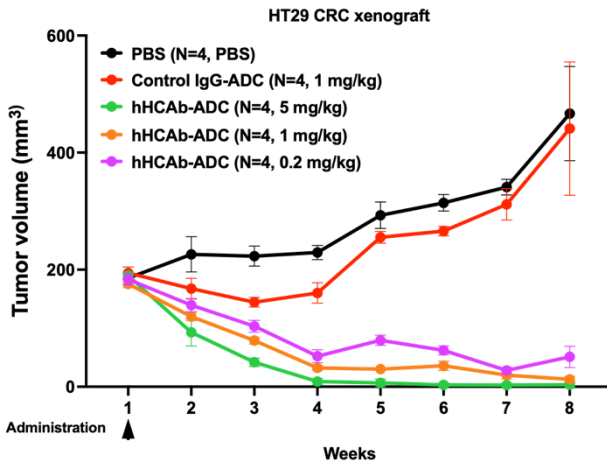


圖 9. 低劑量 HCAB-ADC 有效抑制 HT29 腫瘤生長

(A) 腫瘤生長曲線。於第一週透過尾靜脈注射給予 PBS 或不同劑量的 HCAB-ADC (5、2.5、1、0.5、0.2 mg/kg)。箭頭標示給藥次數。(B) 不同處理組別小鼠的體重變化趨勢。

A



B

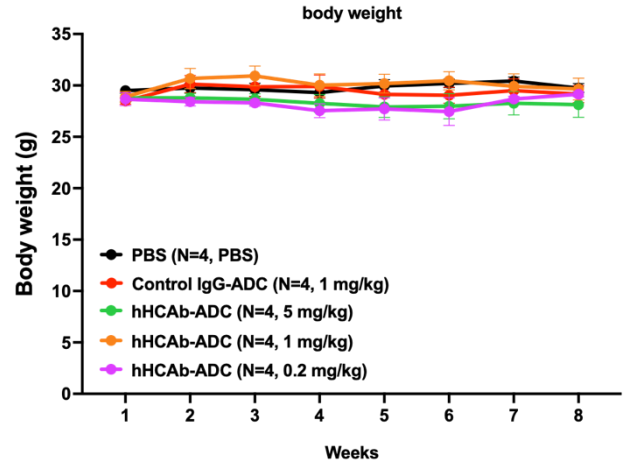
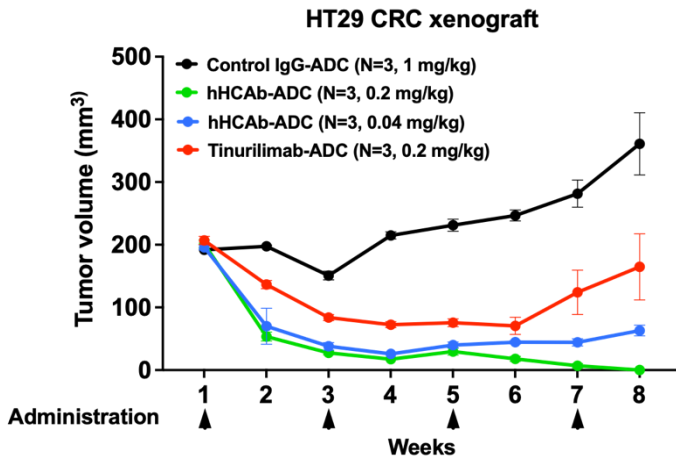


圖 10. 低劑量人源化 HCAb-ADC 有效抑制 HT29 腫瘤生長

(A) 腫瘤生長曲線。於第一週透過尾靜脈注射給予 PBS 或不同劑量的 hHCAB-ADC (5、2.5、1、0.5、0.2 mg/kg)。箭頭標示給藥次數。(B) 不同處理組別小鼠的體重變化趨勢。

A



B

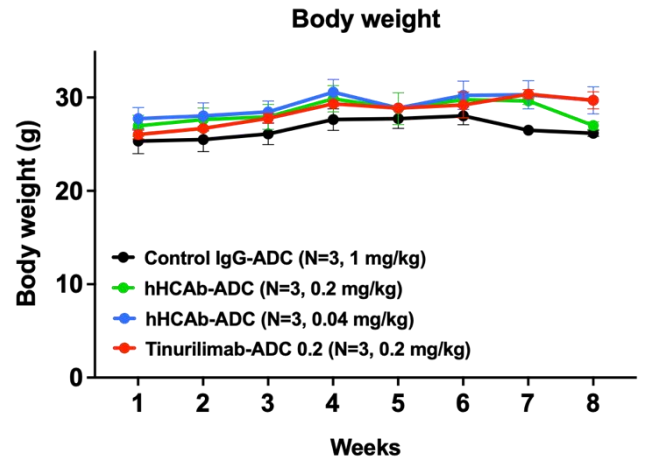


圖 11. 人源化 HCAb-ADC 展現優於傳統 ADC 的抗腫瘤療效

(A) 腫瘤生長曲線。分別以人源化 IgG-ADC (1 mg/kg)、hHCAB-ADC (0.2 與 0.04 mg/kg) 及傳統 ADC (Tinurilimab-ADC)，每兩週透過尾靜脈注射一次。箭頭標示各組的給藥次數(共 4 次)。(B) 不同處理組別小鼠的體重變化情形。

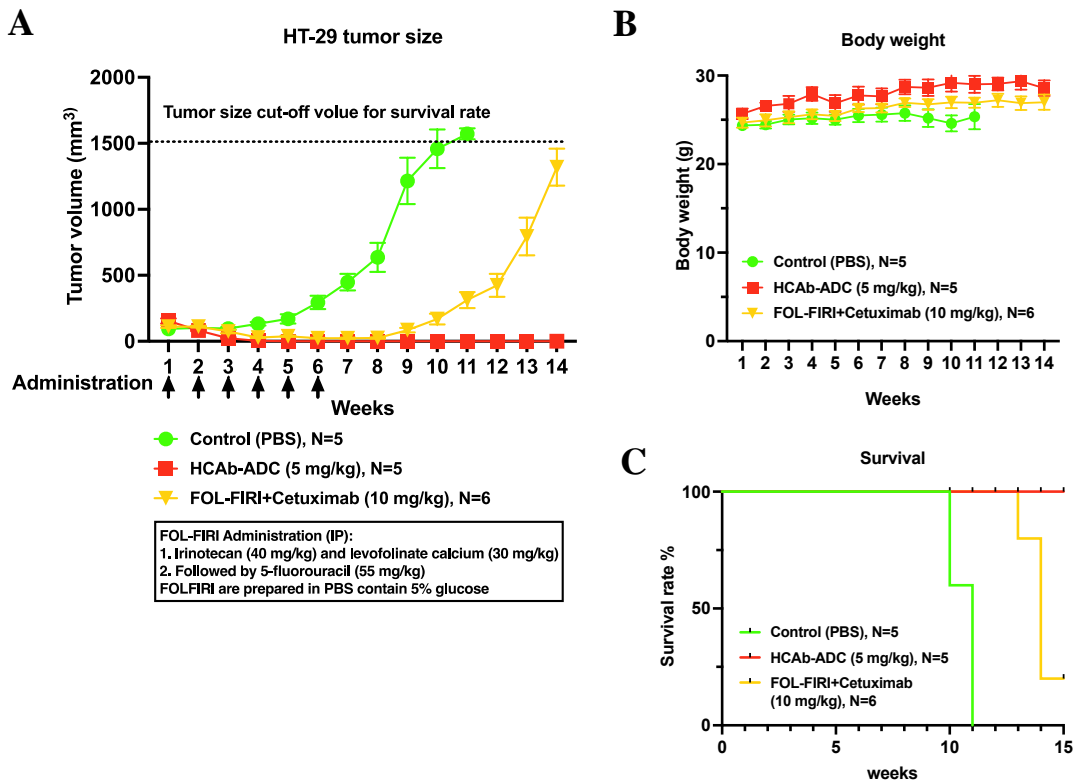


圖 12. HCAb-ADC 可完全消除 CEACAM6 表達的腫瘤，且療效優於現行 RAS 野生型大腸癌治療方案

(A) 腫瘤生長曲線。HCAb-ADC 以每週尾靜脈注射方式給予，劑量為 5 mg/kg。作為對照組，臨床常用的大腸癌治療方案 FOLFIRI 聯合 cetuximab 則以每週腹腔注射 (FOLFIRI) 及尾靜脈注射 (cetuximab) 方式給藥。箭頭表示各組的給藥次數 (共 6 次)。(B) 不同處理組別小鼠的體重變化情形。(C) 小鼠存活率分析。當腫瘤體積達到 1500 mm³時，即視為小鼠死亡。

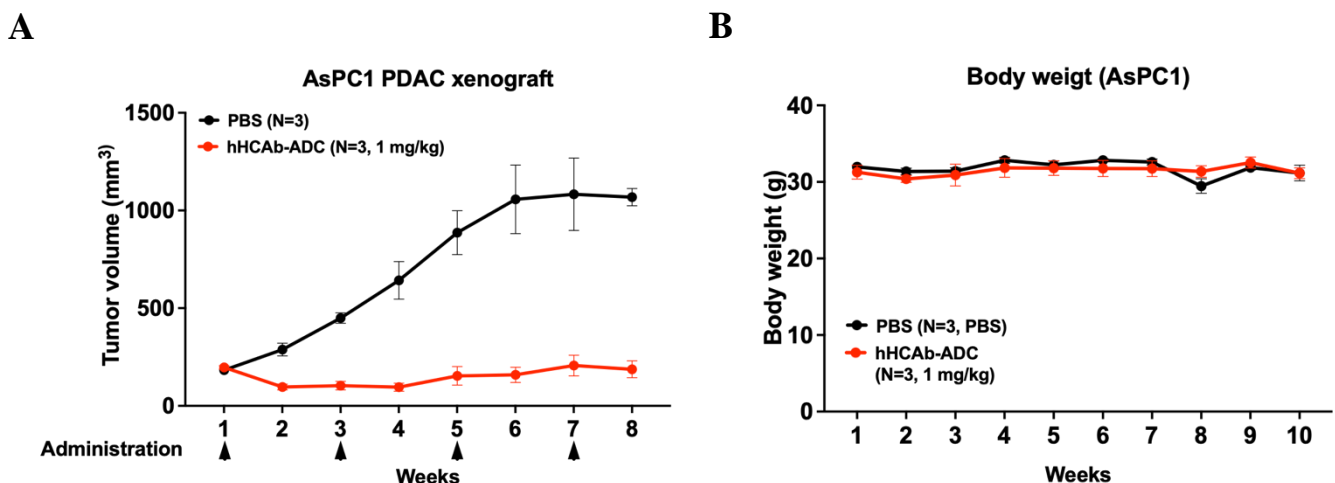
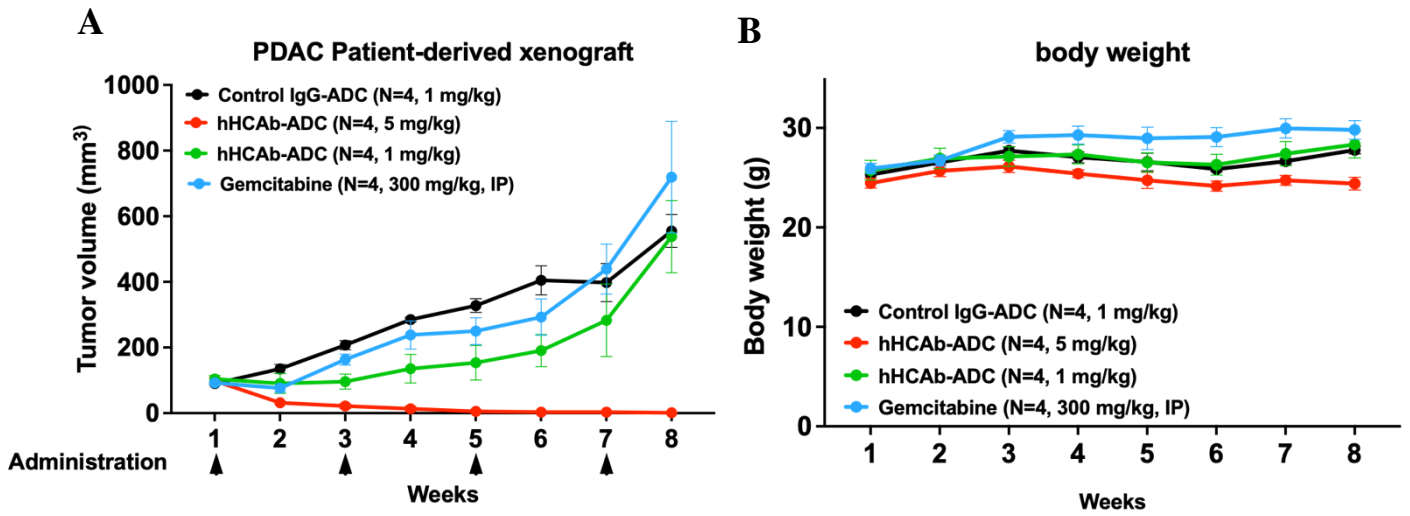


圖 13. 人源化 HCAb-ADC 抑制 AsPC1 胰臟癌腫瘤生長

(A) 腫瘤生長曲線。控制組 (PBS) 與人源化 hHCAb-ADC 以每兩週一次的尾靜脈注射方式給藥，劑量為 1 mg/kg。箭頭表示各組的給藥次數 (共 4 次)。(B) 不同處理組別小鼠的體重變化情形。

圖 14. 人源化 HCAb-ADC 抑制胰臟癌病人衍生異種移植腫瘤(PDX)的生長



(A) 腫瘤生長曲線。Control IgG-ADC 與人源化 hHCAb-ADC 以每兩週一次的尾靜脈注射方式給藥。Gemcitabine 則以每週一次的腹腔注射方式給藥。箭頭表示各組的給藥次數 (共 4 次)。
 (B) 不同處理組別小鼠的體重變化情形。

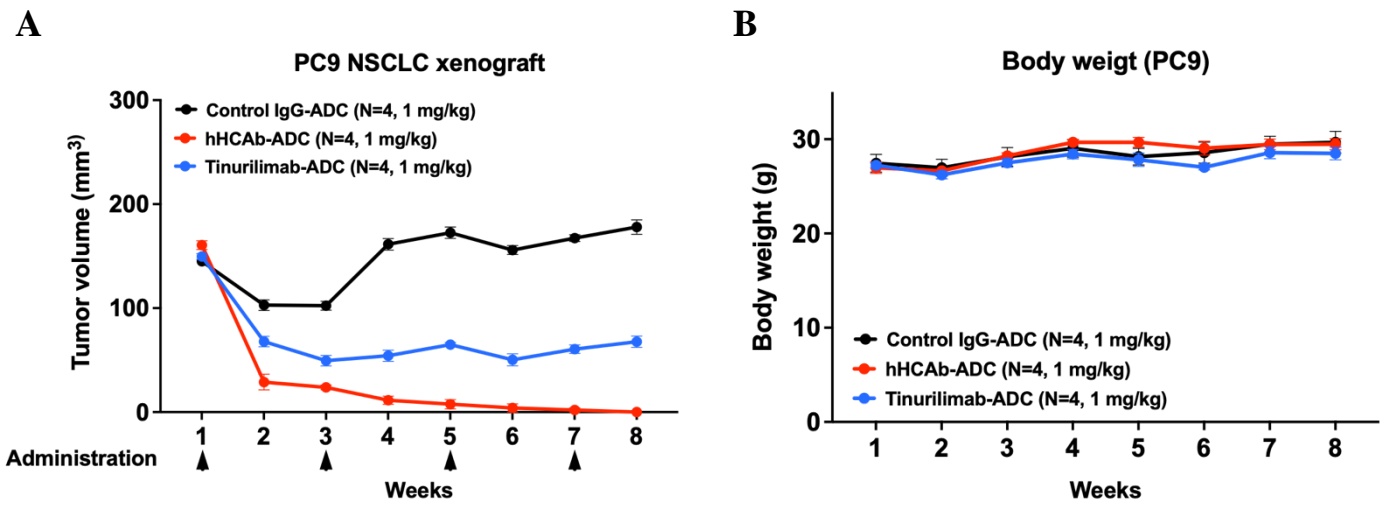
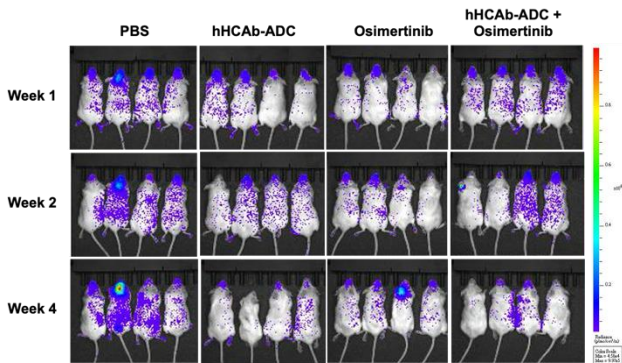


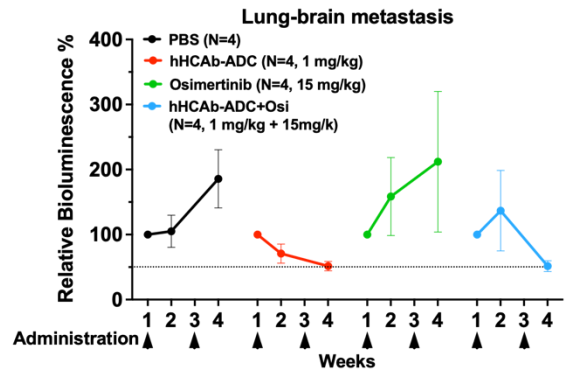
圖 15. 人源化 HCAb-ADC 抑制肺癌 PC9 腫瘤生長，且療效優於傳統抗 CEACAM6 ADC

(A) 腫瘤生長曲線。Control IgG-ADC、人源化 hHCAb-ADC 以及傳統抗 CEACAM6 ADC 皆以每兩週一次的尾靜脈注射方式給藥，劑量為 1 mg/kg。箭頭表示各組的給藥次數 (共 4 次)。
 (B) 不同處理組別小鼠的體重變化情形。

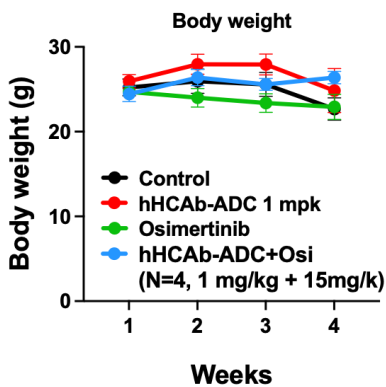
A



B



C



D

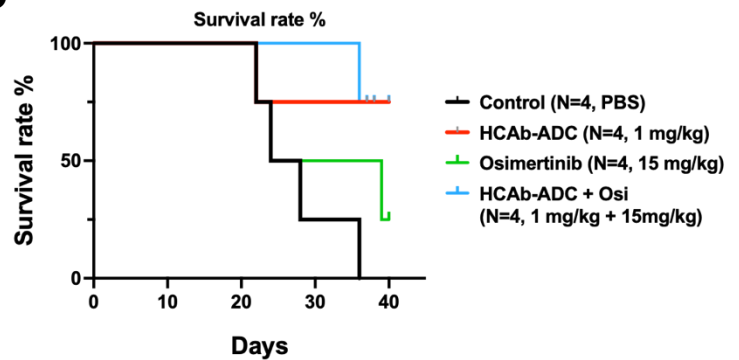


圖 16. 人源化 HCAb-DC 具有抑制肺癌腦轉移 (BM) 腫瘤的效果

(A) 利用生物發光影像 (bioluminescence imaging) 監測 PC9-Br 腦腫瘤生長情形，在 1, 2, 4 週進行影像監測。治療組別包括 PBS 對照組、1 mg/kg 人源化 hHCAb-ADC、15 mg/kg 奧希替尼 (Osimertinib, IP, 每日給藥) 及人源化 hHCAb-ADC 聯合奧希替尼治療組。(B) 各組相對生物發光強度百分比的定量分析。箭頭表示 ADC 給藥次數 (共 2 次)。(C) 不同處理組別小鼠的體重變化情形。(D) 腦轉移腫瘤小鼠的存活率百分比分析。

本研究取得多項重要成果，顯示 HCAb-ADC 相較傳統 ADC 具有顯著優勢：

1. 分子與生化特性優化

HCAb 分子量小（約 80 kDa）、親和力高（ $K_d \sim 10^{-13}$ M）、熱與酸鹼穩定性皆優於傳統抗體，並且更專一辨識 CEACAM6 的 N-糖基化形式。此特性有助於提升腫瘤辨識準確度與治療效益。

2. 良好的腫瘤組織辨識與選擇性毒殺

IHC 顯示 HCAb 可明確標記腸胃道與肺癌組織，而對正常組織背景反應低；HCAb-ADC 在體外對 CEACAM6 表達細胞展現 sub-nM 等級之細胞毒殺活性，對正常細胞則毒性低，顯示其靶向選擇性佳。

3. 顯著的腫瘤抑制效果

在 CDX 與 PDX 動物實驗中，低劑量單次注射即可有效抑制腫瘤生長；多劑量施打甚至達到腫瘤完全消退，療效優於目前臨床標準療程（FOLFIRI + cetuximab）。

4. 優越的中樞神經系統穿透能力

HCAb-ADC 可穿透血腦障壁，並有效控制腦轉移腫瘤進展，此為傳統 ADC 難以達成的治療挑戰，突顯 HCAb 平台在腦部腫瘤應用之潛力。

六、結論與未來展望

新創技術分析

重鍊抗體藥物複合物(HCAb-ADC)一個全新構型的 ADC，目前美國 FDA 核可的 ADC 藥物都是具有重鍊和輕鍊所組成分子量約 150kD 的傳統抗體，因此分子量小的 HCAb (80kD)能夠有較佳的組織穿透性，另外羊駝類重鍊抗體的特殊 CDR3 構型，使得本專利技術重鍊抗體藥物複合物具有獨特的抗原決定位識別能力、高親和力、熱穩定性。本技術另一特點是靶點的選擇，

當前的 ADC 只能特定標靶某些癌症亞型(subtypes)，且不能準確地辨識癌症特異性蛋白，這些缺點限制適合治療族群人數並引起一些非預期的副作用。CEACAM6 是一種廣泛存在於上皮型癌症的細胞表面生物標記並且在正常細胞表現量極低，因此靶向 CEACAM6 的 HCAb-ADC 可以廣泛的治療 80% 以上的晚期上皮癌症，包含:大腸直腸癌、肺癌、胰臟癌、膽管癌等。

本專利技術 HCAb-ADC 目前選定大腸直腸癌(Colorectal cancer, CRC)為第一個適應症，晚期大腸直腸癌平均存活率只有 10~20%，但是病患若可經由化學、放射、標靶治療等方法把腫瘤縮小從無法切除到能夠手術切除，其存活率就能大幅提升。目前的一線療法以 Anti-EGFR、Anti-VEGF、Raf-inhibitors 合併化學治療為主要的方法，Anti-EGFR 抗體藥(cetuximab and panitumumab)適用於治療具表皮生長因子受體表現型(EGFR expressing)，RAS 野生型(wild-type) 之轉移性直腸結腸癌患者，與 FOLFIRI(Folinic acid/5-FU/Irinotecan)或 FOLFOX 合併使用之第一線治療。然而在 Anti-EGFR(例如:cetuximab)治療後 8-10 月內，約有 80% 的機率產生抗藥性。除此之外，Anti-VEGF 藥物(例如:bevacizumab)適用於 RAS 突變型(mutant-type)之轉移性直腸結腸癌患者治療效果也平均只能延長晚期 CRC 病人 2-3 個月的存活時間。第二、三線治療藥物也是以 Anti EGFR 及 Anti-VEGF 訊息傳遞為主，若前述病患產生抗藥性後可以使用免疫治療，但是也僅有一部分(20-30%)病人對有效，因此目前仍在研發新的療法來提升存活率。

根據日商 GII Global Information 分析，全球大腸癌藥物市場在 2022 年達到 136 億美元，預計到 2030 年將出現達到 181 億美元，目前大腸癌一線的治療以化療合併標靶治療(anti-EGFR, anti-VEGF mAb or the Raf inhibitor) 或是 MSI-H 病人給予免疫療法(PD-1 和 PD-L1 mAb)，以上約佔整體藥物銷售額 80%，二或三線療法以 Regorafenib (TKI)或其他的抗血管新生藥物為主，目前約佔總銷售額 10%，由於 HCAb-ADC 能夠在低於 nanomolar 濃度下特異性殺死表達 CEACAM6 的多種上皮細胞癌，並且抗癌效果優於 benchmark ADC 藥物

Enhertu 及標準大腸直腸癌療法。除此之外，在異種移植模型中，HCAb-ADC 完全消除了大腸癌腫瘤，並且治療效果優於目前化療加抗 EGFR 的標準療法。本專利技術之產品可望在二線療法中具有高度成長機會。

總結來說，本研究成功開發出以重鏈抗體為平台的抗 CEACAM6 HCAb-ADC，並證明其具備卓越的靶向性、治療效果與安全性，特別是在腦轉移腫瘤治療方面具突破性進展。相較傳統 ADC，HCAb-ADC 展現更強的穿透力與組織分布能力，有望應用於其他難治型實體瘤或中樞轉移癌症的治療。未來研究可進一步優化藥物載量與偶聯方式、擴展至更多臨床腫瘤亞型，並進行 GLP 級毒理實驗與 IND 申請，邁向臨床一期試驗。本平台亦可應用於其他高糖基化標的，建立一套可擴展之精準治療平台。

七、參考資料

1. Pinho SS RC. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15:540-555.
2. Granica M, Laskowski G, Link-Lenczowski P, Graczyk-Jarzynka A. Modulation of N-glycosylation in the PD-1: PD-L1 axis as a strategy to enhance cancer immunotherapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2025;1880:189274.
3. Benicky J, Sanda M, Brnakova Kennedy Z, Grant OC, Woods RJ, Zwart A, Goldman R. PD-L1 Glycosylation and Its Impact on Binding to Clinical Antibodies. *J Proteome Res* 2021;20:485-497.
4. Zhao D, Cai F, Liu X, Li T, Zhao E, Wang X, Zheng Z. CEACAM6 expression and function in tumor biology: a comprehensive review. *Discover Oncology* 2024;15:186.
5. Chiang WF, Cheng TM, Chang CC, Pan SH, Changou CA, Chang TH, Lee KH, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) promotes EGF receptor signaling of oral squamous cell carcinoma metastasis via the complex N-glycosylation. *Oncogene* 2018;37:116-127.
6. Kim EY, Cha YJ, Jeong S, Chang YS. Overexpression of CEACAM6 activates Src-FAK signaling and inhibits anoikis, through homophilic interactions in lung adenocarcinomas. *Translational Oncology* 2022;20:101402.
7. Wu G, Wang D, Xiong F, Wang Q, Liu W, Chen J, Chen Y. The emerging roles of CEACAM6 in human cancer (Review). *Int J Oncol* 2024;64.
8. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, Tsurutani J, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2022;387:9-20.
9. Cortés J, Kim S-B, Chung W-P, Im S-A, Park YH, Hegg R, Kim MH, et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2022;386:1143-1154.
10. Gogia P, Ashraf H, Bhasin S, Xu Y. Antibody-Drug Conjugates: A Review of Approved Drugs and Their Clinical Level of Evidence. *Cancers (Basel)* 2023;15.
11. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 2013;82:775-797.
12. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol* 2017;8:1603.
13. Mustafa MI, Mohammed A. Nanobodies: A Game-Changer in Cell-Mediated

Immunotherapy for Cancer. *SLAS Discovery* 2023;28:358-364.