(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
2022 年 1 月 13 日 (13.01.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/007965 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/00 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/105620

(22) 国际申请日: 2021 年 7 月 9 日 (09.07.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010663029.3 2020年7月10日 (10.07.2020) CN
202110750959.7 2021年7月1日 (01.07.2021) CN

(71) 申请人: 上海济煜医药科技有限公司(SHANGHAI JEMINCARE PHARM CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 江西济民可信集团有限公司(JIANGXI JEMINCARE GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江西省南昌市艾溪湖北路688号中兴软件园14栋, Jiangxi 330096 (CN)。

(72) 发明人: 邓俗俊(DENG, Sujun); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 顾春银(GU, Chunyin); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 刘小五(LIU, Xiaowu); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 曹晓丹(CAO, Xiaodan); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 刘培培(LIU, Peipei); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 张建建(ZHANG, Jianjian); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 潘忠宗(PAN, Zhongzong); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 肖政(XIAO, Zheng); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 王学萍(WANG, Xueping); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。 郭海兵(GUO, Haibing); 中国上海市浦东新区自由贸易试验区哈雷路1118号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海巅石知识产权代理事务所(普通合伙) (SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号楼103室/张琤, 蒋舫玮, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

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

(54) **Title:** ANTI-IGE ENGINEERED ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗IgE的工程化抗体及其应用

(57) **Abstract:** An antigen binding protein. Compared with the light and heavy chain variable region sequences of omalizumab, the antigen binding protein comprises an amino acid mutant. The antigen binding protein is an anti-IgE engineered antibody. Further involved are a pharmaceutical composition comprising the antigen binding protein, and a method thereof for relieving or treating a disease related to an abnormal IgE level.

(57) 摘要: 一种抗原结合蛋白，其与奥马珠单抗的轻重链可变区序列相比，包含氨基酸突变，该抗原结合蛋白为抗IgE的工程化抗体。还涉及包含所述抗原结合蛋白的药物组合物，以及其用于缓解或治疗与异常IgE水平相关的疾病的方法。

WO 2022/007965 A1

一种抗 IgE 的工程化抗体及其应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种抗 IgE 的工程化抗体，以及其在 IgE 水平异常疾病中的应用。

背景技术

免疫球蛋白 E（immunoglobulin E，IgE）是一种分子量为 180KD 的蛋白质，尽管 IgE 仅占血清总 Ig 的 0.002%，但其与过敏性疾病的病变过程具有十分紧密的关系。在不同的组织和器官中，IgE 升高均会引起炎症免疫反应，最常见的有过敏性哮喘、过敏性鼻炎和鼻窦炎、过敏性结膜炎、系统性过敏、皮肤过敏和荨麻疹等疾病。

近年来，生物制剂如抗 IgE 单克隆抗体治疗 IgE 水平异常有关疾病成为研究热点。2003 年抗 IgE 抗体奥马珠单抗（Omalizumab）最先由 FDA 批准上市治疗哮喘。2014 年，美国食品药品管理局（FDA）批准了奥马珠单抗用于治疗慢性特发性荨麻疹。奥马珠单抗的应用存在以下问题：（1）其在药学相关剂量下靶向游离 IgE 但不靶向（或不能有效靶向）IgE/FcεRI（IgE Fc 受体）复合物的致病性种类；（2）其给药浓度、周期与患者体重及游离的 IgE 浓度直接相关，在患者体重和游离的 IgE 浓度超出一定范围后，其给药浓度和频率都要有所增加，给患者的病情控制管理增加了复杂性和不便性；（3）其对 IgE 的亲和力并不是特别好。

因此，亟需提高的疗效和依从性的工程优化的 IgE 新抗体。

发明内容

本申请提供了一种抗原结合蛋白，其对奥马珠单抗的抗体轻重链序列进行了工程优化改造，可包含一下至少一个特点：（1）在奥马珠单抗的基础上提高了人源化程度，降低抗药抗体产生的概率，减少潜在药效的损失；（2）突变了翻译后修饰位点，提高了化学稳定性，例如，提高了在高温或 pH 环境下的稳定性；（3）通过酵母展示法提高了与人 IgE 的亲和力，提高药效，有望将所述抗原结合蛋白应用于体重更高或游离的 IgE 浓度更高的患者中；（4）以高亲和力结合猴的 IgE，有助于临床前动物模型的药效研究；（5）有效阻断 IgE 与 IgE Fc 受体（FcεRI）结合；（6）延长了血清半衰期，可以减少其注射频次，便于患者的病情控制。

一方面，本申请提供了一种抗原结合蛋白，所述抗原结合蛋白包含抗体轻链可变区（VL），

其中与 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列相比，所述 VL 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：E55 和 V104。

在某些实施方式中，所述 VL 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：D30b、V29、D30、Y30a 和 G30c。

在某些实施方式中，所述 VL 包含下组位置处的氨基酸突变：D30b、E55 和 V104。

在某些实施方式中，所述 VL 包含选自以下任意一组位置处的氨基酸突变：（1）D30b、E55、V104、V29、D30 和 Y30a；（2） D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；（3） D30b、E55、V104 和 Y30a；（4） D30b、E55、V104、Y30a 和 G30c；（5）D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；和（6） D30b、E55、V104、D30 和 Y30a。

在某些实施方式中，所述 E55 位置处的氨基酸突变包括 E55Q。

在某些实施方式中，所述 V104 位置处的氨基酸突变包括 V104L。

在某些实施方式中，所述 D30b 位置处的氨基酸突变包括 D30bE。

在某些实施方式中，所述 V29 位置处的氨基酸突变包括 V29L。

在某些实施方式中，所述 Y30a 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：Y30A、Y30aS 和 Y30aD。

在某些实施方式中，所述 D30 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：D30Y、D30A、D30E、D30F、D30G 和 D30N。

在某些实施方式中，所述 G30c 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：G30cA、G30cY 和 G30cW。

在某些实施方式中，所述 VL 包含下组的氨基酸突变：D30bE、E55Q 和 V104L。

在某些实施方式中，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 23-34 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的抗原结合蛋白包括抗体重链可变区（VH），其中与 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列相比，所述 VH 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：I37、A49、S50 和 D54。

在某些实施方式中，所述 VH 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、T30、S31、S96 和 H97。

在某些实施方式中，所述 VH 包含下组位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

在某些实施方式中，所述 I37 位置处的氨基酸突变包括 I37V。

在某些实施方式中，所述 A49 位置处的氨基酸突变包括 A49S。

在某些实施方式中，所述 S50 位置处的氨基酸突变包括 S50V。

在某些实施方式中，所述 D54 位置处的氨基酸突变包括 D54A。

在某些实施方式中，所述 N60 位置处的氨基酸突变包括 N60A。

在某些实施方式中，所述 P61 位置处的氨基酸突变包括 P61D。

在某些实施方式中，所述 I67 位置处的氨基酸突变包括 I67F。

在某些实施方式中，所述 T30 位置处的氨基酸突变包括 T30R。

在某些实施方式中，所述 S31 位置处的氨基酸突变包括 S31Q。

在某些实施方式中，所述 S96 位置处的氨基酸突变包括 S96T。

在某些实施方式中，所述 H97 位置处的氨基酸突变包括 H97N。

在某些实施方式中，所述 VH 包含下组的氨基酸突变：N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V 和 D54A。

在某些实施方式中，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 58 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VH 包含 SEQ ID NO:51-56 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55 和 V104；且 VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

在某些实施方式中，所述 VL 和所述 VH 包括选自以下任意一组位置处的氨基酸突变：（1） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、V29、D30 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54、S96 和 H97；（2） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 T30；（3） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96；（4） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54；（5） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54；（6） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97；（7） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54；（8） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30 和

Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97；（9） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96；和（10） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S31。

在某些实施方式中，所述的抗原结合蛋白包括抗体重链恒定区。

在某些实施方式中，所述的抗原结合蛋白的所述抗体重链恒定区源自人 IgG 恒定区。

在某些实施方式中，所述人 IgG 恒定区包括人 IgG1 恒定区。

在某些实施方式中，所述人 IgG1 恒定区包括选自下组的一种或多种氨基酸突变：M252Y、S254T 和 T256E。

在某些实施方式中，所述人 IgG1 恒定区包含 SEQ ID NO: 60-61 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的抗原结合蛋白包括抗体轻链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供了分离的一种或多种核酸分子，所述核酸分子编码本申请所述的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请提供了载体，所述载体包含本申请所述的核酸分子。

另一方面，本申请提供了细胞，所述细胞包含本申请所述的核酸分子或所述的载体。

另一方面，本申请提供了制备本申请所述的抗原结合蛋白的方法，所述方法包括在使得所述的抗原结合蛋白表达的条件下，培养所述的细胞。

另一方面，本申请提供了组合物，所述组合物包含所述的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

另一方面，本申请提供了所述的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的组合物在制备药物中的用途，所述药物用于缓解或治疗与异常 IgE 水平相关的疾病。

另一方面，本申请提供了缓解或治疗与异常 IgE 水平相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用所述的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的组合物。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本

申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是奥马珠单抗、AB1904AM10 和 AB1904AM15 对食蟹猴血清中游离 IgE 的抑制率-时间变化图。

图 2 显示的是 IgE 抗体阻断人全长 IgE 和 FcεRIα 受体蛋白的结合。

图 3 显示的是 IgE 抗体阻断人全长 IgE 和细胞表面 CD23 受体蛋白的结合。

图 4A 和图 4B 显示的是 IgE 抗体抑制人全长 IgE 诱导 FcεRI/RBL-2H3 的组胺释放。

图 5 显示的是人全血组胺释放。

图 6 显示的是 IgE 抗体在 hFcRn 小鼠血清中的药物-时间曲线图。

图 7 显示的是 IgE 抗体在食蟹猴血清中的药物-时间曲线图。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“IgE”通常是指哺乳动物体内的抗体。IgE 是介导过敏反应诸如哮喘、食物过敏、1 型超敏反应和基于众多原因的常见鼻窦炎的免疫球蛋白质家族的成员。IgE 由 B 细胞分泌并在 B 细胞的表面上表达。B 细胞合成的 IgE 通过经短膜结合区连接至成熟 IgE 序列的跨膜结构域锚定于 B 细胞膜中。IgE 还可以通过其 Fc 区连接至低亲和力 IgE 受体（FcεRII）而结合至 B 细胞（以及单核细胞、嗜酸性细胞和血小板）。在哺乳动物暴露于过敏原后，B 细胞无性扩增，其合成结合该过敏原的 IgE。该 IgE 进而由 B 细胞释放至循环中，在循环中其被 B 细胞结合(经由 FcεRII)且通过在肥大细胞和嗜碱性细胞表面上发现的所谓高亲和力受体

（FcεRI）而被肥大细胞和嗜碱性细胞所结合。由此，此类肥大细胞和嗜碱性细胞针对过敏原敏化。接下来暴露于过敏原将交联这些细胞上的 FcεRI 且因此活化其组胺和负责临床超敏反应和过敏反应的其他因子的释放。

在本申请中，术语“抗原结合蛋白”通常是指保留特异性结合抗原(例如 IgE)的能力的抗体的一个或多个片段或部分，或保留与抗原的所需结合能力的抗体片段的合成变体。已展示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段或某些部分或其变体进行。实例包括可特异性结合两种或更多种不同抗原或抗原的几个表位或不连续表位区域的双特异性、双重特异性及多特异性形式。抗原结合蛋白的实例可包括单链抗体（即全长重链和轻链）；Fab、修饰的 Fab、Fab’、修饰的 ab’、$F(ab')_2$、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、单结构域抗体（例如 VH 或 VL 或 VHH）（例如如 WO 2001090190 中所述）、scFv、二价、三价或四价抗体、双-scFv、双功能抗体、tribody、triabody、四功能抗体及以上任一个的表位-抗原结合剂（参见例如 Holliger 及 Hudson, 2005, Nature Biotech.23(9):1126-1136; Adair 及 Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217）。用于产生和制造这些抗体片段的方法为本领域中所众所周知（参见例如 Verma 等人，1998，Journal of Immunological Methods, 216, 165-181）。

在本申请中，术语“抗体”泛指由四条多肽链（两条重链（H）链及两条轻（L）链）构成的任何免疫球蛋白（Ig）分子或保留 Ig 分子的表位结合特征的至少一部分以允许特异性结合 IgE 的其任何功能片段、突变体、变体或衍生物。在全长抗体中，每一重链由重链可变区（本文中缩写为 VH)和重链恒定区（CH）构成。重链恒定区由四个结构域——CH1、铰链、CH2 和 CH3（重链 γ、α 和 δ）或 CH1、CH2、CH3 及 CH4（重链 μ 和 ε）构成。每个轻链由轻链可变区（本文中缩写为 VL）和轻链恒定区（CL）构成。轻链恒定区由一个结构域 CL 构成。VH 和 VL 区可进一步再分成高变区，称为互补决定区（CDR），穿插有称为构架区（FR）的更保守区。每个 VH 及 VL 由自氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个 CDR 及四个 FR 构成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可具有任何同种型/类别（例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY）、类别（例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2）或子类。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常是指相比于含有不同抗体的混合物的“多株”抗体制剂，共享通用重链及通用轻链氨基酸序列的抗体分子制剂，或至少保留 Ig 分子的轻链表位结合特征的其任何功能片段、突变体、变体或衍生物。单克隆抗体可通过几种已知技术产生，所述技术如噬菌体、细菌、酵母或核糖体展示以及经典方法，例如杂交瘤来源的抗体，例如通过杂交瘤技术，诸如标准 Kohler 及 Milstein 杂交瘤方法（(1975)Nature 256:495-497）

制备的杂交瘤所分泌的抗体。

在本申请中，术语“奥马珠单抗（Omalizumab）”通常是指一种选择性结合人类免疫球蛋白 E（IgE）的重组 DNA 衍生的人源化 IgG1κ 单克隆抗体，商品名为 Xolair®。奥马珠单抗具有约 149kD 的分子量。由中国仓鼠卵巢细胞悬浮液培养物在含有抗生素庆大霉素（gentamicin）的培养基中产生（参见 EP602126（和基于其的 SPC/GB06/005）；WO93/04173；US6267958（和基于该专利的 PTE）；WO97/04807；WO97/04801；Presta 等人(1993) *J .Immunol* .151:2623-2632）。在本申请中，提及奥马珠单抗，是指包含如 SEQ ID NO: 22 所示的轻链可变区和如 SEQ ID NO: 50 所示的重链可变区的 IgG 全长抗体。奥马珠单抗目前适用于治疗皮肤测试呈阳性或在体外对长期气源性致敏原具有反应性且具有吸入性皮质类固醇不充分控制的症状的患者中的中度至重度持久性哮喘。

在本申请中，在描述 VH 或 VL 序列的常见免疫球蛋白部分（CDR-互补决定区，或 FR-构架区）时，其以标准顺序连接（VH＝HFR1.HCDR1.HFR2.HCDR2.HFR3.HCDR3.HFR4；VL＝LFR1.LCDR1.LFR2.LCDR2.LFR3.LCDR3.LFR4）。

本申请的抗体或抗原结合蛋白的氨基酸编号可以将来自抗体或抗原结合蛋白的连续氨基酸序列按照 Chothia 编码规则进行编号。在本申请中，术语“Chothia 编码”、“Chothia 编号”或“Chothia 定义”可互换地使用，通常是指一种氨基酸残基的编号系统（Chothia 等人，(1987)J.Mol.Biol., 196,901-917(1987)）。按照 Chothia 编码规则，对于奥马珠单抗，VL（SEQ ID NO: 22）各部分的定义如下：LFR1（L1-L23），LCDR1（L24-L34），LFR2（L35-L49），LCDR2（L50-L56），LFR3（L57-L88），LCDR3（L89-L97）和 LFR4（L98-L107），VH（SEQ ID NO: 50）各部分的定义如下：HFR1（H1-H25），HCDR1（H26-H32），HFR2（H33-H51），HCDR2（H52-H56），HFR5（H57-H94），HCDR3（H95-H102）和 HFR4（H103-H113），VH（SEQ ID NO: 50），其中，“Lx”或“Hx”（x 为阿拉伯数字）表示轻链（L）可变区或重链（H）可变区的编号为 x 的氨基酸，对于 VL，L24 表示 VL 按照 Chothia 编码规则的第 24 位氨基酸。当在 VL 或 VH 内部时，位置 Lx 或 Hx 也可以使用第 x 位的氨基酸的字母加上数字表示，如对于奥马珠单抗的 VL，位置 L24 上为精氨酸（R），故也可以以 R24 表示 VL 的第 24 位氨基酸。在本文中，上述两种表示位置的称呼（例如，L24 和 R24）可互换的使用。奥马珠单抗的互补决定区根据 Chothia 编码规则的氨基酸位置如下表 1-表 6 所示。

表 1 奥马珠单抗 LCDR1 的氨基酸编号（Chothia）

编号	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L30A	L30B	L30C	L30D	L31	L32	L33	L34

氨基酸	R	A	S	Q	S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	M	N

表 2 奥马珠单抗 LCDR2 的氨基酸编号（Chothia）

编号	L50	L51	L52	L53	L54	L55	L56
氨基酸	A	A	S	Y	L	E	S

表 3 奥马珠单抗 LCDR3 的氨基酸编号（Chothia）

编号	L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L96	L97
氨基酸	Q	Q	S	H	E	D	P	Y	T

表 4 奥马珠单抗 HCDR1 的氨基酸编号（Chothia）

编号	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H31A	H32
氨基酸	G	Y	S	I	T	S	G	Y

表 5 奥马珠单抗 HCDR2 的氨基酸编号（Chothia）

编号	H52	H53	H54	H55	H56
氨基酸	T	Y	A	G	S

表 6 奥马珠单抗 HCDR3 的氨基酸编号（Chothia）

编号	H95	H96	H97	H98	H99	H100	H100A	H100B	H100C	H100D	H101	H102
氨基酸	G	S	H	Y	F	G	H	W	H	F	A	V

对于氨基酸突变，本申请采用“突变前氨基酸+位置+突变后氨基酸”的表示方式，例如，VL 的氨基酸突变“E55Q”表示 VL 的第 55 位氨基酸由谷氨酸（E）突变为谷氨酰胺（Q）。

在本申请中，术语“Kd”、“KD”或“K_D”可互换地使用，通常是指如本领域中已知的特

定抗体-抗原相互作用的解离常数。免疫结合相互作用的强度或亲和力可根据相互作用的解离常数（kD 或 kd）表示，其中 K_D 越小，代表亲和力越大或越高。所选多肽的免疫结合特性可使用本领域中众所周知的方法定量。一种此类方法包括测量抗原结合位点/抗原复合物形成及解离的速率，其中这些速率视复合配偶体的浓度、相互作用的亲和力及同等影响两个方向上速率的几何结构参数而定。因此，“缔合速率常数”（“Kon”）及“解离速率常数”（“Koff”）可通过计算浓度及缔合与解离的实际速率来确定。Koff/Kon 的比率能够抵消不与亲和力相关的所有参数，且等于解离常数 Kd。

本申请的抗体或抗原结合蛋白的亲和力以及他们抑制结合的程度可通过本领域普通技术人员，使用常规技术，例如 Scatchard 等人描述的技术（Ann.KY.Acad.Sci.51:660-672(1949)）、生物膜层光学干涉（BLI）技术，使用 ForteBio Octet®，或通过表面等离子共振（SPR），使用诸如 Biacore 的系统测定。对于生物膜层光学干涉，内部的生物传感器底端由生物膜层覆盖，生物膜层可结合并固定生物分子。当具有一定带宽的可见光垂直入射生物膜层时，光在生物膜层的两个界面反射后形成一定波长的干涉波。当固定分子与溶液中分子发生相互作用时，生物膜层厚度增加，干涉光谱曲线向波长增加的方向移动，光波相位移动由工作站实时探测，对光波的相位移动进行分析便可定量得出传感器表面分子数量变化及相关浓度与动力学数据。对于表面等离子共振，标靶分子被固定于固相上和在沿流槽流动的移动相中暴露于配体。如果发生配体结合固定标靶，则局部折射率改变，导致 SPR 角变化，其可通过检测反射光强度的变化而进行实时监测。可分析 SPR 信号的变化速率以针对结合反应的缔合和解离相产生表观速率常数。这些值的比率产生表观平衡常数（亲和力）。

应了解本申请提供的抗原结合蛋白的亲和力可使用本领域中已知的任何合适方法改变。因此，本申请还设计本申请的抗原结合蛋白的变体，其具有改善的对 IgE 的亲和力。此类变体可通过许多亲和力成熟方案获得，包括使 CDR 突变（Yang 等人，J.Mol.Biol.,254，392-403，1995）、链置换（Marks 等人，Bio/Technology，10,779-783，1992）、使用大肠杆菌的增变基因菌株（Low 等人，J .Mol .Biol .，250，359-368，1996）、DNA 改组（Patten 等人，Curr.Opin.Biotechnol.，8,724-733，1997）、噬菌体展示（Thompson 等人，J.Mol.Biol.， 256,77-88,1996）和性 PCR（Crameri 等人，Nature，391，288-291，1998）。

在本申请中，术语“分离的核酸分子”通常包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，例如，可以是双链 DNA。这些核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中，或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过包括碱/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳在内的标准技术和本领域公知的其他方法与其他细胞成分或其他掺杂物（例如其他

细胞核酸或蛋白质）分离纯化时，核酸是“分离的”或“基本上纯的”。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够运输其已连接的另一种核酸的核酸分子。术语“载体”涵盖（但不限于）质粒、病毒、粘粒和人工染色体。一种载体类型为“质粒”，其是指其中可连接其他 DNA 区段的环形双链 DNA 环。另一类型的载体为病毒载体，其中其他 DNA 片段可连接至病毒基因组。一般而言，工程改造的载体可包含复制起点、多克隆位点和可选择标记。载体本身通常为核苷酸序列，一般为 DNA 序列，其包含插入序列（转基因）和充当载体的“主链”或“骨架”的较大序列。现代载体可涵盖除转基因插入序列和主链以外的额外特征：启动子、遗传标记、抗生素抗性、报告基因、靶向序列、蛋白质纯化标签。

在本申请中，术语“细胞”通常是指能够或可以向其中引入例如编码异源多肽或构成 shRNA 的核酸的细胞。宿主细胞可包括原核细胞，其可用于繁殖载体/质粒，和真核细胞，其可用于表达核酸。例如，真核细胞可以是哺乳动物细胞。又例如，所述哺乳动物宿主细胞可以选自如下的哺乳动物细胞：CHO 细胞（例如 CHO K1 或 CHO DG44）、BHK 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HEK 293 细胞、HEK 293EBNA 细胞、PER.C6 细胞和 COS 细胞。在某些情形中中，所述哺乳动物细胞可选自杂交瘤、骨髓瘤和啮齿动物细胞。骨髓瘤细胞可包含大鼠骨髓瘤细胞（例如 YB2），和小鼠骨髓瘤细胞（例如 NS0、SP2/0）。用于药学应用的多肽或蛋白质可以在哺乳动物细胞如 CHO 细胞、NS0 细胞、SP2/0 细胞、COS 细胞、HEK 细胞、BHK 细胞、细胞等中产生。

在本申请中，术语“药学上可接受的载体”通常是指不干扰活性成分的生物活性的有效性的一种或多种非毒性材料。这类制剂常规地可以含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体、以及任选地其他治疗剂。这类药学上可接受的载体还可以含有适合于给予人的相容的固体或液体填料、稀释剂或包封物质。可以用于在此所描述的配制品中的其他设想的载体、赋形剂、和/或添加剂包括：例如，调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、脂质、蛋白质赋形剂（如血清白蛋白、明胶、酪蛋白）、成盐平衡离子（如钠）等等。适合用于在此所描述的配制品中的这些和另外已知的药物载体、赋形剂和/或添加剂是本领域中已知的，例如，如“雷明顿药物科学与实践（Remington:The Science and Practice of Pharmacy）”，第 22 版，药学出版公司（Pharmaceutical Press）（2012）以及“医师案头参考(Physician’s Desk Reference)”，第 66 版，医药经济出版社（Medical Economics）（2012）中所列出。可以常规地选择对于所希望或所要求的给予方式、溶解度和/或稳定性来说合适的药学上可接受的载体。

在本申请中，术语“与异常 IgE 水平相关的疾病”通常是指由血清 IgE 水平异常（例如，升高）相关的任何疾患或病症。示例性的与异常 IgE 水平相关的疾病可包括但不限于支气管

哮喘、过敏性鼻炎、过敏性皮炎、荨麻疹、过敏反应或特应性皮炎。

在本申请中，术语“多肽”、“肽”、“蛋白”和“蛋白质”可互换地使用，通常是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。该聚合物可以是直链或支链的，它可以包含修饰的氨基酸，并且可以被非氨基酸中断。这些术语还涵盖已经被修饰的氨基酸聚合物。这些修饰可以包含：二硫键形成、糖基化、脂化（lipidation）、乙酰化、磷酸化、或任何其他操纵（如与标记组分结合）。术语“氨基酸”包括天然的和/或非天然的或者合成的氨基酸，包括甘氨酸以及 D 和 L 旋光异构体、以及氨基酸类似物和肽模拟物。

在本申请中，术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换地使用，通常是指具有任何长度的核苷酸的聚合形式，如脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构，并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段的编码区或非编码区、根据连接分析定义的多个座位（一个座位）、外显子、内含子、信使 RNA（mRNA）、转运 RNA、核糖体 RNA、短干扰 RNA（siRNA）、短发夹 RNA（shRNA）、micro-RNA（miRNA）、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的 DNA、任何序列的分离的 RNA、核酸探针、和引物。多核苷酸可以包含一个或多个经修饰的核苷酸，如甲基化的核苷酸和核苷酸类似物。如果存在，可以在聚合物组装之前或之后进行核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后，如通过与标记的组分缀合来进一步修饰。

除了本文提到的特定蛋白质和核苷酸之外，本申请还可包括其功能性变体、衍生物、类似物、同源物及其片段。

术语“功能性变体”指与天然存在序列具有基本上同一的氨基酸序列或由基本上 同一的核苷酸序列编码并能够具有天然存在序列的一种或多种活性的多肽。在本申请的上下文中，任何给定序列的变体是指其中残基的特定序列（无论是氨基酸或核苷酸残基）已经经过修饰而使得所述多肽或多核苷酸基本上保留至少一种内源功能的序列。可以通过天然存在的蛋白质和/或多核苷酸中存在的至少一个氨基酸残基和/或核苷酸残基的添加、缺失、取代、修饰、替换和/或变异来获得变体序列，只要保持原来的功能活性即可。

在本申请中，术语“衍生物”通常是指本申请的多肽或多核苷酸而言包括自/对序列的一个（或多个）氨基酸残基的任何取代、变异、修饰、替换、缺失和/或添加，只要所得的多肽或多核苷酸基本上保留其至少一种内源功能。

在本申请中，术语“类似物”通常对多肽或多核苷酸而言，包括多肽或多核苷酸的任何模拟物，即拥有该模拟物模拟的多肽或多核苷酸的至少一种内源功能的化学化合物。

通常，可以进行氨基酸取代，例如至少 1 个（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 20 个以上）氨基酸取代，只要经修饰的序列基本上保持需要的活性或能力。氨基酸取代可包括使用非天然存在的类似物。

用于本申请的蛋白质或多肽也可以具有氨基酸残基的缺失、插入或取代，所述氨基酸残基产生沉默的变化并导致功能上等同的蛋白质。可以根据残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两性性质的相似性进行有意的氨基酸取代，只要保留内源性功能即可。例如，带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸；带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸；并且含具有相似亲水性值的不带电极性头基的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。

在本申请中，术语“同源物”通常是指与野生型氨基酸序列和野生型核苷酸序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列可以包括可以与主题序列是至少 80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%相同的氨基酸序列。通常，同源物将包含与主题氨基酸序列相同的活性位点等。同源性可以根据相似性（即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基）来考虑，也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中，提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。

为了确定序列同一性，可进行序列比对，其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行，例如，使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign（DNASTAR）软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数，包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

在本申请中，术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

在本申请中，术语“包含”通常是指包括明确指定的特征，但不排除其他要素。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10%的范围内变动。

发明详述

一方面，本申请提供一种抗原结合蛋白，所述抗原结合蛋白可包含抗体轻链可变区（VL），其中与奥马珠单抗的轻链可变区，即 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列相比，本申请所述的抗原结合蛋白的所述 VL 可包含选自下组的一个或两个位置处的氨基酸突变：E55 和 V104。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的所述 VL 可包含选自下组的一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个）位置处的氨基酸突变：D30b、V29、D30、Y30a 和 G30c。

例如，所述抗原结合蛋白的所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变：D30b、E55 和 V104。

例如，所述 VL 可包含 D30b、E55、V104、V29、D30 和 Y30a 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VL 可包含 D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VL 可包含 D30b、E55、V104 和 Y30a 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VL 可包含 D30b、E55、V104、Y30a 和 G30c 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VL 可包含 D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VL 可包含 D30b、E55、V104、D30 和 Y30a 位置处的氨基酸突变。

在本申请中，所述 E55 位置处的氨基酸突变可包括 E55Q。

在本申请中，所述 V104 位置处的氨基酸突变可包括 V104L。

在本申请中，所述 D30b 位置处的氨基酸突变可包括 D30bE。

在本申请中，所述 V29 位置处的氨基酸突变可包括 V29L。

在本申请中，所述 Y30a 位置处的氨基酸突变可包括选自下组的任意一种：Y30A、Y30aS 和 Y30aD。

在本申请中，所述 D30 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：D30Y、D30A、D30E、D30F、D30G 和 D30N。

在本申请中，所述 G30c 位置处的氨基酸突变可包括选自下组的任意一种：G30cA、G30cY 和 G30cW。

在本申请中，所述 VL 可包含下组的氨基酸突变：D30bE、E55Q 和 V104L。

在本申请中，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 57 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 VL 可包含 SEQ ID NO: 23-34 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白的所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、V29L、D30Y 和 Y30aD。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、D30A、Y30aD 和 G30cW。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 30bE、E55Q、V104L 和 Y30aA。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L 和 Y30aD。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L 和 Y30aS。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、Y30aD 和 G30cY。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、D30E、Y30aD 和 G30cW。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、D30G、Y30aD 和 G30cA。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、D30N、Y30aD 和 G30cA。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、D30N、Y30aD 和 G30cW。

例如，所述 VL 可包含氨基酸突变 D30bE、E55Q、V104L、D30F 和 Y30aD。

在本申请中，所述抗原结合蛋白还可包含轻链恒定区。例如，所述轻链恒定区可以来自人 kappa 轻链。例如，所述轻链恒定区可包含如 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白还可包括抗体轻链。所述抗体轻链可包括所述抗体轻链可变区和所述抗体轻链恒定区。例如，本申请所述抗原结合蛋白的所述抗体轻链可包括 SEQ ID NO: 23-34 中任一项所示的氨基酸序列。

本申请所述抗原结合蛋白可包含抗体重链可变区（VH），其中与奥马珠单抗的重链可变区，即 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列相比，本申请所述的抗原结合蛋白的所述 VH 可包含选自下组的一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个）位置处的氨基酸突变：I37、A49、S50 和 D54。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的所述 VH 还可包含选自下组的一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个或 7 个）位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、T30、S31、S96 和 H97。

例如，所述抗原结合蛋白的所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

例如，所述 VH 可包含 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54、S96 和 H97 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VH 可包含 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 T30 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VH 可包含 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VH 可包含 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S31 位置处的氨基酸突变。

例如，所述 VH 可包含 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97 位置处的氨基酸突变。

在本申请中，所述 I37 位置处的氨基酸突变可包括 I37V。

在本申请中，所述 A49 位置处的氨基酸突变可包括 A49S。

在本申请中，所述 S50 位置处的氨基酸突变可包括 S50V。

在本申请中，所述 D54 位置处的氨基酸突变可包括 D54A。

在本申请中，所述 N60 位置处的氨基酸突变可包括 N60A。

在本申请中，所述 P61 位置处的氨基酸突变可包括 P61D。

在本申请中，所述 I67 位置处的氨基酸突变可包括 I67F。

在本申请中，所述 T30 位置处的氨基酸突变可包括 T30R。

在本申请中，所述 S31 位置处的氨基酸突变可包括 S31Q。

在本申请中，所述 S96 位置处的氨基酸突变可包括 S96T。

在本申请中，所述 H97 位置处的氨基酸突变可包括 H97N。

在本申请中，所述 VH 可包含下组的氨基酸突变：N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V 和 D54A。

在本申请中，所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 58 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的 VH 可包含 SEQ ID NO: 51-56 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白的所述 VH 可包含氨基酸突变 N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V、D54A、S96T 和 H97N。

例如，所述 VH 可包含氨基酸突变 N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V、D54A 和 T30R。

例如，所述 VH 可包含氨基酸突变 N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V、D54A 和 S96T。

例如，所述 VH 可包含氨基酸突变 N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V、D54A 和 S31Q。

例如，所述 VH 可包含氨基酸突变 N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V、D54A 和 H97N。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 62 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 63 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 36-37 中任一项所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基

酸序列，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 45-48 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 64 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 3-14 中任一项所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 62、42、63、64、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 36-37 中任一项所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 42 所示的氨基酸序列，所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 45-48 中任一项所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 3-14 中任一项所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、45、3、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、46、4、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 37、42、45、5、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、47、6、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO:

36、42、45、7、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、45、8、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、48、9、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、45、10、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、48、11、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、45、12、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、47、12、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 36、42、47、13、17 和 19 所示的氨基酸序列。

例如，所述抗原结合蛋白可包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别依次包含 SEQ ID NO: 38、42、45、14、17 和 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可包含框架区 HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4，所述 HFR1、HFR2、HFR3、HFR4、LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4 可分别包含 SEQ ID NO: 35、40、44、49、1、15、18 和 21 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白还可包含抗体重链恒定区。在某些情形中，所述抗体重链恒定区可源自人 IgG 恒定区。例如，所述人 IgG 恒定区可包括人 IgG1 恒定区。在某些情形

中，所述人 IgG1 恒定区可包含选自下组的一种或多种氨基酸突变：M252Y、S254T 和 T256E（Chothia 编码规则）。例如，所述人 IgG1 恒定区可包含下组的氨基酸突变：M252Y、S254T 和 T256E（Chothia 编码规则）。在某些情形中，本申请所述抗原结合蛋白的抗体重链恒定区可包含 SEQ ID NO: 60-61 中任一项所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白还可包括抗体重链。所述抗体重链可包括所述抗体重链可变区和所述抗体重链恒定区。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可包含抗体轻链可变区（VL）和抗体重链恒定区（VH），其中，与 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列相比，所述 VL 可包含选自下组的一个或两个位置处的氨基酸突变：E55 和 V104，且与 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列相比，所述可 VH 包含选自下组的一个或多个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个）位置处的氨基酸突变：I37、A49、S50 和 D54。

在某些情形中，所述抗原结合蛋白的所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变：D30b、E55 和 V104，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

例如，所述抗原结合蛋白的所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、V29、D30 和 Y30a，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54、S96 和 H97。

例如，本申请的抗原结合蛋白的所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 T30。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104 和 Y30a，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104 和 Y30a，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、Y30a 和 G30c，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104 和 Y30a，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、D30 和 Y30a，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96。

例如，所述 VL 可包含下组位置处的氨基酸突变 D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c，且所述 VH 可包含下组位置处的氨基酸突变 N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S31。

在本申请中，所述各位置处的氨基酸突变的种类可以是上文提到的那些。

在本申请中，所述抗原结合蛋白的所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 23-34 中任一项所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 51-56 中任一项所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 52 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 53 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 55 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 51 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ

ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 54 所示的氨基酸序列。

例如，所述 VL 可包含如 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，且所述 VH 可包含如 SEQ ID NO: 56 所示的氨基酸序列。

本申请所述的抗原结合蛋白具有化学稳定性高。例如，在高温、低 pH 和/或反复冻融环境下能够稳定存在。例如，在 40℃下放置 0 至 28 天，或在 pH5.0 和 40℃下放置 0-28 天，本申请的抗原结合蛋白生成聚体的量比奥马珠单抗低至少 5%（例如，至少 10%、15%、20%、25%、30%或更高）（例如，通过尺寸排阻高效液相色谱 SEC-HPLC 检测），例如，在 40℃下放置 0 至 28 天，或在 pH5.0 和 40℃下放置 0-28 天，本申请所述的抗原结合蛋白的主峰含量比奥马珠单抗高至少 5%（例如，至少 10%、15%、20%或更高）（例如，通过全柱成像毛细管等电聚焦电泳 iCIEF 检测的）。

本申请所述的抗原结合蛋白与人 IgE 或其片段具有高结合亲和力。例如，以低于 5×10^{-10}M（如，低于 4×10^{-10}M、3×10^{-10}M、2×10^{-10}M、2.8×10^{-10}M、2.6×10^{-10}M、2.4×10^{-10}M、2.2×10^{-10}M、2.0×10^{-10}M、1.8×10^{-10}M、1.6×10^{-10}M、1.4×10^{-10}M、1.2×10^{-10}M、1.0×10^{-10}M 或更低）的 K_D 值结合人 IgE CH3-CH4（例如通过 Octet Red 检测的），又例如，以低于 2×10^{-9}M（如，低于 1.5×10^{-9}M、1.2×10^{-9}M、1×10^{-9}M 或更低）的 K_D 值结合人全长 IgE（例如通过 Octet Red 检测的），又例如，以低于 5×10^{-9}M（如，低于 4.8×10^{-9}M、4.6×10^{-9}M、4.4×10^{-9}M、4.2×10^{-9}M、4.0×10^{-9}M、3.8×10^{-9}M 或更低）的 K_D 值结合人全长 IgE（例如通过 Biacore 检测）。

本申请所述的抗原结和蛋白能以高亲和力结合猴的 IgE，有助于临床前动物模型的药效研究，例如，以低于 3.0×10^{-10}M（如，低于 2.5×10^{-10}M、2.4×10^{-10}M、2.3×10^{-10}M、2.2×10^{-10}M、2.1×10^{-10}M、2.0×10^{-10}M、1.9×10^{-10}M、1.8×10^{-10}M 或更低）的 K_D 值结合食蟹猴的 IgE CH3-CH4（例如通过 Octet Red 检测的），又例如，以低于 4.0×10^{-9}M（如，低于 3.9×10^{-9}M、3.8×10^{-9}M、3.7×10^{-9}M、3.6×10^{-9}M、3.5×10^{-9}M 或更低）的 K_D 值结合猴的 IgE CH3-CH4（例如通过 Biacore 检测）。

本申请所述的抗原结合蛋白能有效阻断 IgE 与 IgE Fc 受体（FcεRI）结合，例如，以低于 1.5 nM（如，低于 1.4 nM、1.3 nM、1.2 nM、1.1 nM、1.0 nM、0.9 nM 或更低）的 EC_{50} 值阻断人全长 IgE 与 FcεRI 的结合（例如通过 ELISA 检测），又例如，以低于 4.0nM（如，低于 3.9nM、3.8nM、3.7nM、3.6nM、3.5nM、3.4nM、3.3nM、3.2nM、3.1nM、3.0nM 或更低）的

IC_{50}值阻断 IgE 刺激表达 FcεRI 的细胞释放组胺。

本申请的抗原结合蛋白在血液中具有较长的半衰期，可以减少其注射频次，便于患者的病情控制。例如，本申请所述的抗原结合蛋白的半衰期比奥马珠单抗增加 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更高，如使用 ELISA 检测，通过非房室模型分析或游离 IgE 浓度所计算得到的。

核酸分子、载体和细胞

本申请还提供了一种分离的核酸分子，其编码本申请的抗原结合蛋白的重链和/或轻链。合适地，所述核酸分子编码本申请的抗原结合蛋白的重链或轻链。本申请的核酸分子可包含合成 DNA，例如通过化学加工、cDNA、基因组 DNA 或其任何组合产生。

编码本申请的抗原结合蛋白的核酸分子可通过本领域技术人员众所周知的方法获得。例如，编码抗体重链和轻链部分或所有的核酸分子可按需要从测定的核酸分子或基于对应氨基酸序列合成。可使用分子生物学的标准技术制备编码本申请的抗原结合蛋白的核酸分子。所需核酸分子可使用寡核苷酸合成技术完全或部分合成。适当时可使用定点突变诱发及聚合酶链反应（PCR）技术。

本申请还涉及一种克隆或表达载体，其包含本申请的一个或多个核酸分子。因此，提供了一种克隆或表达载体，其包含编码本申请的抗原结合蛋白的一个或多个核酸分子。或者，克隆或表达载体可以包含分别编码本申请的抗原结合蛋白的轻链及重链的两个核酸分子，及合适的信号序列。

本申请还提供了一种宿主细胞，其包含一种或多种克隆或表达载体，所述克隆或表达载体包含编码本申请的抗原结合蛋白的一种或多种核酸分子。任何合适的宿主细胞/载体系统可用于表达编码本申请的抗原结合蛋白的核酸分子。可使用细菌，例如大肠杆菌及其他微生物系统，或还可使用真核，例如哺乳动物、宿主细胞表达系统。合适哺乳动物宿主细胞包括 CHO、骨髓瘤或杂交瘤细胞。

制备方法

本申请还提供了一种用于产生本申请所述的抗原结合蛋白的方法，其包括在使得所述的抗原结合蛋白表达的条件下，培养所述的细胞。所述抗原结合蛋白可仅仅包含重链或轻链多肽，在此情况下可以仅将重链或轻链的编码序列转染宿主细胞。为产生包含重链和轻链的产物，细胞系可用两种载体转染，第一载体编码轻链多肽，且第二载体编码重链多肽。或者，可使用单一载体，该载体包括编码轻链和重链多肽的序列。

本申请提供了一种培养宿主细胞和表达、分离、纯化所述抗原结合蛋白或其片段的方法。

在一个实施方案中，提供了一种用于纯化抗原结合蛋白的方法，其包括以下步骤：以非结合模式进行阴离子交换层析法，使得杂质保留在柱上和洗脱抗体。

例如，所述纯化可以采用蛋白质 A 柱上的亲和力捕获，然后滴定。例如，所述纯化可以采用蛋白质 G 柱上的亲和力捕获，然后 HPLC 滴定。例如，所述纯化可以采用 IgE 柱上的亲和力捕获，然后滴定。纯化方法还可包括一个或多个过滤步骤，诸如透滤步骤或 HPLC 过滤步骤。

药物组合物、方法和用途

因为本申请的抗原结合蛋白适用于治疗和/或预防病理性病况，所以本申请还提供了一种药物组合物或诊断组合物，其包含本申请的抗原结合蛋白，以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体组合。因此，本申请还提供了本申请的抗原结合蛋白在制备药物组合物中的用途。

本申请还提供了一种用于制备药物或诊断组合物的方法，其包括添加和混合本申请的抗体或抗原结合剂连同一种或多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。所述抗原结合蛋白可作为药物或诊断组合物中的唯一活性成分，也可伴随有其他活性成分，包括其他抗体成分或非抗体成分，诸如类固醇或其他药物分子尤其半衰期与 IgE 结合无关的药物分子。

所述组合物可以个别施用于患者或可与其他药剂、药物或激素组合施用（例如同时、连续或分开）。

另一方面，本申请提供了所述的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的组合物在制备药物中的用途，所述药物用于缓解或治疗与异常 IgE 水平相关的疾病。

另一方面，本申请提供了缓解或治疗与异常 IgE 水平相关的疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用所述的抗原结合蛋白、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的组合物。

药物组合物可以包含治疗有效量的本申请的抗体或抗原结合蛋白。在本申请中，术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防靶向疾病或病况或展现可检测的治疗或预防效果所需要的治疗剂的量。对于任何公开的抗体或抗原结合蛋白，可最初在细胞培养测定中或在动物模型中，通常在啮齿动物、兔、狗、猪或灵长类动物中估计治疗有效量。动物模型还可用于确定施用的适当浓度范围及途径。所述信息可随后用于确定适用于施用人的剂量及途径。人受试者的精确治疗有效量将视疾病病况的严重程度、受试者的整体健康、受试者的年龄、重量及性别、饮食、施用的时间及频率、药物组合、反应敏感性及对疗法的耐受性/反应而定。

本申请的药物组合物可通过多种途径施用，包括但不限于经口、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、鞘内、室内、透皮、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、经肠、局部、舌下、阴道内或直肠途径。还可使用无针注射器施用本发明的药物组合物。通常，治疗组合物可制备成作为液体溶液或悬浮液的可注射剂。还可制备适合于在注射前溶解或悬浮于液体媒介物中的固体形式。

包含本申请的抗原结合蛋白的治疗剂量的药物组合物不显示体内明显毒理学作用。并且，通过施用连续剂量的本申请的抗原结合蛋白，受试者体内 IgE 活性的水平可维持在适当正常（例如，减少）的水平。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的融合蛋白、制备方法和用途等，而不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 设计并表达奥马珠单抗工程优化抗体

以奥马珠单抗的轻重链可变区为基础（轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 22 所示，重链可变区序列如 SEQ ID NO: 50 所示），进行优化设计，对轻重链进行人源化突变和翻译后修饰（PTM）位点去除，得到新的轻重链可变区。

然后将全长重组抗体轻重链蛋白质序列的分别进行密码子优化，基因合成密码子优化后 DNA 片段（Genscript），克隆合成后基因片段以 IgG1 形式装入表达载体 pcDNA3.4（Life Technologies）。表达质粒扩增和质粒抽提后双质粒共转 ExpiCHO 细胞（ThermoFisher Scientific，A29133），根据供应商 ExpiCHO 表达系统方法进行抗体瞬转表达，过程如下：在培养总体积 25ml 培养基中，36.5℃，8%二氧化碳浓度下培养 Expi CHO 细胞到密度 6×10^6/mL，使用 ExpiFectamine 转染试剂化转各 10μg 抗体轻重链表达质粒到细胞；转染一天后，各取 150μL 和 4mL ExpiCHO 增强剂和 ExpiCHO 辅料添加到培养细胞中，继续培养至 9 天，4 度，3500 转离心取上清。混合 AmMagTM Protein A 磁珠（Genscript，L00695）和抗体表达上清，室温孵育 2 小时，PBS 洗涤两次弃上清，加入适量洗脱缓冲液 Protein G or A SefinoseTM Elution buffer（Sangon,C600481），充分混匀后置于试管架上静止孵育 5 分钟，孵育期间重悬磁珠 2-3 次，重复洗脱 2 次，洗脱后，立即加入适量中和液 1M Tris-HCl，pH7.5（Sangon, B548124）中和备用，得到纯化的抗体见表 7，AB1904HzL0H0 即奥马珠单抗。

表 7 人源化和 PTM 突变去除后的抗体

抗体编号	轻链可变区突变	重链可变区突变

AB1904HzL0H0	无	无
AB1904L1p1H3p2	D30bE，E55Q，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,P61D,I67F
AB1904L13p1H3p3	D30bE,E55Q,D94Y,V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,P61D,I67F
AB1904L2p1H4p2	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,P61D,I67F,D73N,F78L
AB1904L2p1H4p3	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,P61D,I67F,D73N,F78L
AB1904L1p1H5p2	D30bE，E55Q，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L
AB1904L2p1H5p2	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L
AB1904L12p1H5p2	D30bE,E55Q,E93N,V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L
AB1904L13p1H5p2	D30bE,E55Q,D94Y,V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L
AB1904L1p1H5p3	D30bE，E55Q，V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L
AB1904L2p1H5p3	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L
AB1904L12p1H5p3	D30bE,E55Q,E93N,V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L
AB1904L13p1H5p3	D30bE,E55Q,D94Y,V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L

实施例 2 人 IgE 亲和力检测

首先检测抗体与生物素化的人 IgE CH3-CH4（生物素-hIgE CH3-CH4，Sino Biological，货号：29702-H08H，内部进行生物素标记）的亲和力，利用解离速率进行排序，实验方法如下：

（1）抗原及抗体稀释：抗原及抗体均用 1xKinetic Buffer （Kinetic Buffer，Fortébio, 18-1105）稀释，抗原使用浓度为 1 μg/ml，抗体使用浓度为 100 nM。

（2）样品上机检测（Octet Data Acquisition 11.1.0.11）：首先，按照下表将样品加入 96 孔板（Greiner bio-one，655209），体系为 200 μL/well。然后设置软件参数，板温设定为 30℃，收集标准动力学信号的频率为 5.0 HZ。接着，用 1xPBST 预湿 CH1 sensor（Fortébio, 18-0039）10 分钟，然后上机检测。每个循环包含以下步骤：1）浸入缓冲液 60 s；2）检测抗原是否与传感器有非特异性结合；3）10 mM pH1.7 的甘氨酸溶液再生；4）浸入缓冲液 60s；5）抗体固化在传感器上，时间为 30s；6）传感器浸入缓冲液 180s；7）抗原与抗体结合，时间 180 s；8）抗原抗体的解离，时间 10 分钟；9）传感器再生。

（3）数据分析：采用 Fortebio 的 Data Analysis 11.1 软件，对抗原-抗体以 1:1 的结合方式，测定结合速率（K_a）和解离速率（K_d），以此计算抗体的平衡解离常数（K_D），结果如表 2 所示。

实施例 3 抗体物理化学性质检测

3.1 SEC-HPLC 纯度分析

（1）将样品稀释至 1mg/mL，混匀，12000rpm 离心 5min，取上清转至样品瓶，放入 HPLC 样品盘。设置色谱条件如下：

色谱条件	参数
色谱柱	TSK G3000SWxl
检测波长	280nm
柱温	25℃
样品盘温度	5°C
流速	0.5ml/min
进样量	10μg

（2）色谱柱用流动相（200mM 磷酸盐缓冲液，pH6.8）平衡后，进样分析，用色谱软件进行数据分析，峰面积归一化法计算各个峰的峰面积百分比。

3.2 HIC-HPLC 分析

（1）将样品稀释至 1mg/ml，混匀，12000rpm 离心 5 分钟，取上清转移至样品瓶内，放入 HPLC 样品盘。设置色谱条件如下：

色谱条件	参数
色谱柱	MAbPacHIC-10
检测波长	214nm
柱温	25°C
样品盘温度	5 °C
流速	0.8ml/min
进样量	10μg

（3）用流动相 A（50mM 磷酸盐缓冲液/1M 硫酸铵，pH 7.0）和流动相 B(50mM 磷酸盐缓冲液，pH 7.0)进行梯度洗脱分析，色谱软件进行数据分析，根据出峰保留时间，计算各样品亲水系数。

3.3 熔解温度（Tm）值分析

将供试品用样品缓冲液稀释至 1mg/mL，然后按照 Protein Thermal Shift™ Starter Kit（货号 4461146）说明书，取供试品溶液 13μL 加入至 PCR 管内，加入 5μL Protein Thermal shift TM Buffer，加入 2μL10×染色液，使反应体积为 20μL，混匀后，12000rpm 离心 5min 以去除气泡。将检测样品置于 PCR 仪内，进行样品分析，记录样品的 Tm 值。

3.4 ICIEF 分析

取样品溶液加入到已经充分混匀的以下体系中：1%的甲基纤维素（货号：101876））70μl，尿素（货号：U6504）4M，两性电解质 Pharmalyte pH 3-10（货号 17-0456-01） 8μl，pI marker 5.5（货号：A58325）和 9.5（货号：A358357）各 2μl。补加适当体积超纯水至 200μl，混匀。所有样品 6000rpm 离心 3min 除气泡，然后转移上清到样品瓶中，置于样品盘上，记录样品位置。开机运行，分析结束后，将结果文件导入 Chrom Perfect 软件进行图谱积分处理并计算各峰的等电点以及各峰百分比。抗体理化检测结果见表 8。

表 8 人源化和 PTM 突变后抗体的理化特性检测结果

抗体名称	轻链突变	重链突变	得率 (mg/L)	亲和力 KD	热稳定性 Tm	亲水性 HIC	单体率 SEC
AB1904HzL0H0	无	无	132	3.86E-10	88.6	1.0	
AB1904L1p1H3p2	D30bE，E55Q，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,P61D,I67F	280	4.86E-10	82.5	0.94	99.92%
AB1904L13p1H3p3	D30bE,E55Q,D94Y,V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,P61D,I67F	282	3.96E-10	85.1	0.99	99.56%
AB1904L2p1H4p2	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,P61D,I67F,D73N,F78L	126	1.46E-09	78.1	-	99.73%
AB1904L2p1H4p3	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,P61D,I67F,D73N,F78L	313	1.67E-09	77.3	-	99.80%
AB1904L1p1H5p2	D30bE，E55Q，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L	225	1.75E-09	82.2	-	99.78%
AB1904L2p1H5p2	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L	207	2.41E-09	81.3	-	99.86%
AB1904L12p1H5p2	D30bE,E55Q,E93N,V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L	196	3.37E-09	81.7	-	99.87%

AB1904L13p1H5p2	D30bE,E55Q,D94Y,V104L	I37V,A49S,S50V,D54A,N60A,I67F,F78L	228	2.08E-09	85.5	-	99.79%
AB1904L1p1H5p3	D30bE，E55Q，V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L	250	3.61E-09	82.1	-	99.85%
AB1904L2p1H5p3	D30bE，E93N，V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L	220	2.04E-09	80.7	-	99.87%
AB1904L12p1H5p3	D30bE,E55Q,E93N,V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L	231	3.79E-09	81.3	-	99.89%
AB1904L13p1H5p3	D30bE,E55Q,D94Y,V104L	I37V,A49S,S50V,D54G,N60A,I67F,F78L	233	1.86E-09	85.6	-	99.75%

结果显示，AB1904L1p1H3p2（轻链可变区 SEQ ID NO: 23，重链可变区 SEQ ID NO: 51）亲和力较高，同时，也去除了潜在翻译后修饰位点，进一步提高了化学稳定性。

实施例 4 酵母亲和力成熟得到新的抗体

选择 AB1904L1P1H3P2 进行酵母亲和力成熟，得到表 9 的抗体 AB1904Am1 至 AB1904Am15，其中，在 Fc 片段进行 YTE（M252Y/S254T/T256E）工程突变，分别命名为 AB1904Am13、AB1904Am14、AB1904Am15。

表 9 亲和力成熟和 YTE 工程突变后的抗体

抗体编号	轻链可变区（SEQ ID NO）	重链可变区（SEQ ID NO）
AB1904Am1	24	52
AB1904Am2	25	53
AB1904Am3	26	54
AB1904Am4	27	51
AB1904Am5	28	51
AB1904Am6	29	55
AB1904Am7	30	51
AB1904Am8	31	55
AB1904Am9	32	51
AB1904Am10	32	54
AB1904Am11	33	54

AB1904Am12	34	56
AB1904Am13	26	54
AB1904Am14	29	55
AB1904Am15	32	54

使用实施例 3 的方法检测表 9 中的抗体的物理化学特性，结果见表 10 所示。

表 10 亲和力成熟和 YTE 工程突变后的抗体的理化特性检测结果

抗体编号	产量(mg/L)	单体纯度%	亲水系数	pI	酸性峰（%）	主峰（%）	碱性峰（%）	Fab Tm（℃）
奥马珠单抗	NA	99.6	1	7.5	12	80.5	7.5	89.1
AB1904Am2	158	99.8	0.88	8.3	56.2	35.9	8	84.8
AB1904Am3	339	99.7	0.98	7.8	6.2	81.4	12.4	82.5
AB1904Am5	251	99.8	0.91	7.5	69	21	10	84.3
AB1904Am10	271	99.8	0.97	8	6.6	81	12.5	84.3
AB1904Am11	278	99.7	0.97	7.8	6.9	80.8	12.3	83.2
AB1904Am12	224	99.8	0.87	8	7.2	82.4	10.4	84.5
AB1904Am13	224	99.7	0.97	7.4	7.5	80.9	11.7	82.4
AB1904Am14	199	99.5	0.98	7.5	8.4	79.9	11.7	84
AB1904Am15	244	99.6	0.96	7.6	7.4	80.8	11.8	84

实施例 5 所述抗体与人 IgE CH3-CH4、人全长 IgE 及食蟹猴 IgE CH3-CH4 结合（Octet Red 检测）

5.1 本申请所述抗体能够结合人 IgE CH3-CH4

采用 Octet RED96e（Fortebio）测定抗体 AB1904Am1- AB1904Am12 与人 IgE CH3-CH4（hIgE CH3-CH4, Sino Biological，货号：29702-H08H）的亲和力，抗原及抗体均用 1xPBST（1xPBS：生工，B548117-0500；0.02%吐温 20：sigma-alorich，P1379）稀释，抗原使用浓度为 50 nM，抗体使用浓度为 33.3 nM。按照实施例 2 的方法进行上机检测。结果如表 11 所示，所述抗体与人 IgE CH3-CH4 亲和力高，K_D 值与奥马珠单抗接近或更低。

表 11 抗体与人 IgE CH3-CH4 的结合亲和力结果

抗体	K_D (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
AB1904Am1	3.117E-10	6.47E+05	2.02E-04
AB1904Am2	3.39E-11	3.99E+05	1.35E-05
AB1904Am3	7.695E-11	9.10E+05	7.00E-05
AB1904Am4	1.536E-10	7.73E+05	1.19E-04
AB1904Am5	1.328E-10	5.60E+05	7.44E-05
Omalizumab	2.12E-10	8.64E+05	1.83E-04

AB1904Am6	2.396E-10	8.72E+05	2.09E-04
AB1904Am7	2.615E-10	4.98E+05	1.30E-04
AB1904Am8	2.126E-10	5.82E+05	1.24E-04
AB1904Am9	1.935E-10	8.19E+05	1.59E-04
AB1904Am10	1.16E-10	8.54E+05	9.91E-05
AB1904Am11	1.073E-10	8.51E+05	9.13E-05
AB1904Am12	1.601E-10	4.69E+05	7.51E-05

5.2 本申请所述抗体能够结合人全长 IgE

按照实施例 2 的方法测定所述抗体与人全长 IgE（FL hIgE, ABBIOTEC，货号：250205）的亲和力。结果如表 12 所示。所述抗体均能与人全长 IgE 以高亲和力结合。

表 12 抗体与人全长 IgE 的结合亲和力结果

抗体	K_D (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
AB1904Am2	7.917E-10	4.04E+05	3.20E-04
AB1904Am10	5.839E-10	8.25E+05	4.82E-04
AB1904Am15	5.905E-10	8.53E+05	5.04E-04
AB1904Am5	8.082E-10	5.70E+05	4.61E-04
AB1904Am6	9.058E-10	9.27E+05	8.39E-04
AB1904Am14	9.888E-10	9.42E+05	9.32E-04
AB1904Am3	4.168E-10	9.49E+05	3.96E-04
AB1904Am13	4.828E-10	9.52E+05	4.60E-04

5.3 本申请所述抗体能够结合食蟹猴 IgE CH3-CH4

按照实施例 2 的方法检测所述抗体与生物素化的食蟹猴 IgE CH3-CH4（Biotin-cyno IgE CH3-CH4，恺佧生物）的亲和力，结果如表 13 所示。所述抗体均能与生物素化的食蟹猴 IgE CH3-CH4 以高亲和力结合。

表 13 抗体与生物素化的食蟹猴 IgE CH3-CH4 的结合亲和力结果

抗体	K_D (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
AB1904 Am2	1.1E-10	2.06E+06	2.22E-04
AB1904 Am3	1.6E-10	1.70E+06	2.72E-04
AB1904 Am5	1.5E-10	1.77E+06	2.67E-04
AB1904 Am10	1.7E-10	1.52E+06	2.54E-04
AB1904 Am11	1.7E-10	1.50E+06	2.48E-04
AB1904 Am6	1.8E-10	1.74E+06	3.08E-04
AB1904Am15	1.005E-10	2.10E+06	2.11E-04

实施例 6 所述抗体与人全长 IgE 及食蟹猴 IgE CH3-CH4 结合（Biacore 检测）

首先以 2 μL/min 的流速，将 Biotin CAPture reagent 捕获到 CAP 芯片（GE Healthcare, 货

号：28-9202-34）上，捕获时间 300 s。使用 HBS-EP+作为实验缓冲液。每个进样循环测定一种浓度的抗体与被捕获抗原间的结合，每个循环包括捕获抗原、不同浓度抗体的进样及再生。以 10 μL/min 的流速，将 2 μg/ml 的生物素化的人全长 IgE （Biotin-FL hIgE，Abbiotec，货号：250205，自己生物素标记）或者 0.25 μg/ml 的生物素化的食蟹猴 IgE CH3-CH4（Biotin-cyno IgE，恺佧生物定制）捕获在 2 通道上，捕获时间 60 s, 1 通道作为空白参考通道。以 30 μL/min 的流速，将逐级稀释的抗体（100 nM，50 nM，25 nM，12.5 nM，6.25 nM，3.125 nM，1.5625 nM，0 nM）依次进样于 1，2 通道，测定结合及解离。以 10 μL/min 的流速，用再生缓冲液（6 M 盐酸胍，0.25 M 氢氧化钠）进行芯片再生以去除被捕获的抗原及抗体。使用 Biacore 8K 分析软件对数据进行分析。软件分析所用的模型为 1:1 binding。

结果如表 14 所示，本申请所述抗体均能与生物素化的人全长 IgE 和食蟹猴 IgE CH3-CH4 结合，K_D 值与奥马珠单抗没有显著差别或更低。

表 14 抗体与生物素化的人全长 IgE 和食蟹猴 IgE CH3-CH4 的结合亲和力结果

抗原	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
生物素-人全长 IgE	AB1904Am10	2.10E+05	7.79E-04	3.71E-09
	AB1904Am15	2.54E+05	7.99E-04	3.15E-09
	Omalizumab	3.48E+05	2.16E-03	6.20E-09
生物素-猴 IgE CH3-CH4	AB1904Am10	4.29E+05	1.42E-03	3.32E-09
	AB1904Am15	4.27E+05	1.46E-03	3.41E-09
	Omalizumab	6.48E+05	2.49E-03	3.85E-09

实施例 7 所述抗体与人及食蟹猴 FcRn 结合（Octet Red 检测）

按照实施例 2 的方法采用 Octet RED96e（Fortebio）分别测定所述抗体与人 FcRn（Acro，FCN-H52W7）和食蟹猴 FcRn（Acro, FCM-C52W9）的亲和力。其中，使用 1xPBS（10 mM Na2HPO4.12H2O，2 mM KH2PO4，137 mM NaCl，2.7 mM KCl，pH6.0）分别稀释人 FcRn 和食蟹猴 FcRn 到 5 μg/mL，稀释生物素偶联的 THETM His 标签的小鼠单克隆抗体到 2 μg/mL；使用 1x PBST（1xPBS，0.02%吐温 20，PH6.0）分别稀释待测抗体，抗体稀释浓度范围均为 1000 nM-31.3 nM。结果如表 15 所示。所述抗体均能与食蟹猴及人 FcRn 结合。

表 15 抗体与食蟹猴及人 FcRn 的亲和力结果

抗体	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	FcRn
AB1904Am10	9.139E-08	1.16E+06	1.06E-01	食蟹猴 FcRn
AB1904Am15	3.154E-08	9.22E+05	2.91E-02	
AB1904Am10	9.866E-08	1.22E+06	1.21E-01	人 FcRn
AB1904Am15	3.283E-08	8.75E+05	2.87E-02	

实施例 8 抗体阻断生物素化的人全长 IgE 与 FcεRI 的结合

用 PBS 将 FcεRIα（R&D，6678-Fc）稀释到 0.5 μg/ml 的包被酶标板，100 μl/孔，贴封板膜，置于 37°C孵育 1 小时，然后用洗涤液 (PBS + 0.05% TWEEN-20）洗板 3 次。继而用洗涤液配制封闭液（PBS + 0.05% TWEEN-20+2%BSA），每孔加入 300 μl 封闭液，37°C封闭 1 小时。用封闭液配制生物素化的人全长 IgE（Biotin-FL hIgE，Abbiotec，货号：250205，自己进行生物素化标记），浓度为 160 ng/ml；随后用封闭液配制 anti-IgE 抗体，抗体的起始浓度为 4 μg/ml，3 倍梯度稀释（稀释 7 个浓度点+1 个 0 浓度点）；然后将 60 μL 的 anti-IgE 抗体加入 60 μL Biotin-FL hIgE 中，37°C共孵育 2 小时。继而取出封闭好的酶标板，用洗涤液洗板 3 次，以 100μl/孔 加入 37 度预先孵育的 anti-IgE 抗体和生物素化的人全长蛋白复合物溶液，37°C孵育 1 小时。用洗涤液洗板 3 次，封闭液 1/5000 稀释 SA-HRP（sigma，S2438-250UG），以 100μl/孔加至酶标板内，37°C孵育 1 小时；用洗涤液洗板 3 次，以 100μl/孔加入 TMB 显色液（Biopanda，货号：TMB-S-003），室温避光反应 10 分钟，然后以 50μl/孔加入终止液（Solarbio，货号：C1058）终止反应，在 450nm 波长处测定吸光值。结果如图 2 所示，结果显示，本申请所述抗体能够阻断生物素化的 IgE 与 FcεRI 的结合，且 EC_{50} 值低于奥马珠单抗。

实施例 9 抗体阻断生物素化的人全长 IgE 与 IM-9 细胞表面 CD23 的结合

使用 RPMI1640+10%FBS（RPMI1640、FBS，Thermo Fisher）于 37°C、5%二氧化碳条件下培养 IM-9 细胞。收集 IM-9 细胞，继而用 FACS 缓冲液 (PBS+2%FBS) 洗涤 1 次，重悬于 FACS 缓冲液中，细胞密度为 2.5*106 个/ml。使用 U 型底 96 孔细胞培养板，加入细胞悬液（每孔 100 μl），然后置于 4 度冰箱预冷 30min。用 FACS 缓冲液配制生物素化的人全长 IgE（hIgE，ABBIOTEC，货号：250205，内部生物素标记），浓度为 20 μg/ml；随后用 FACS buffer 配制 anti-IgE 抗体，起始浓度为 60 μg/ml，3 倍梯度稀释（稀释 7 个浓度点+1 个 0 浓度点），然后将 60 μL 的 anti-IgE 抗体加入 60 μL 生物素-FL hIgE 中，4 °C孵育 1 小时。同时在每孔细胞中加入 2.5 μL 的 Fc Block（BD Pharmingen，货号：564220），4 °C孵育 1 小时；将 96 孔细胞培养板从 4 °C冰箱取出，2000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，然后以 100μl/孔加入预先孵育的 anti-IgE 抗体和生物素化的人全长 IgE 蛋白复合物溶液，4°C孵育 1 小时后，2000 rpm 离心 5 min ，弃上清，用 FACS 缓冲液洗 3 次。将 FITC 偶联的链亲和素（Invitrogen，货号：SA1001）1：500 稀释后，每孔加入 100μL，4 度孵育 1 小时后，2000 rpm 离心 5 min ，弃上清，用 FACS 缓冲液洗 3 次；随后细胞用 FACS 缓冲液 1：2 稀释后，用 Guava easyCyte 6-2L

Benchtop Flow Cytometer 上机检测。结果如图 3 所示，本申请所述抗体能够阻断生物素化的人全长 IgE 与 IM-9 细胞表面 CD23 的结合。

实施例 10 抗体阻断生物素化的人全长 IgE 刺激 FcεRI/RBL-2H3 释放组胺

使用 FcεRI/RBL-2H3 培养基（MEM+15%FBS+1mM 丙酮酸钠+1μg/ml Puromycin）于 37℃、5%二氧化碳条件下培养 FcεRI/RBL-2H3 细胞（吉凯基因构建）。使用细胞培养基配制人全长 IgE 蛋白（ABBIOTEC，货号：250205）浓度为 2.4 μg/ml；随后用细胞培养基配制 anti-IgE 抗体，浓度起始为 15 μg/ml，2 倍梯度稀释（9 个浓度点+1 个 0 浓度）。先将 50μL 人全长 IgE 蛋白加入 96 孔平底细胞培养板中，再加入 50μL 配制好 anti-IgE 抗体。同时，收集 FcεRI/RBL-2H3 细胞，重悬于培养基中，细胞浓度为 $2*10^6$ 个/ml，以 50 μl/孔加入相应 96 孔平底细胞培养板中，将细胞培养板置于 37℃、5%二氧化碳细胞培养箱孵育过夜。第二天，吸弃上清，细胞用 Assay Buffer（Tyrode's buffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 nM HEPES, 1.4 mM CaCl2, 1 mM MgCl2.6H2O, 5.6 mM Glucose, 0.1%BSA)，pH7.4）洗 2 次，然后每孔加入 200 μl 1 μg/ml 的多克隆 anti-IgE 抗体（R&D，货号：G-107-C），37℃、5%二氧化碳细胞培养箱孵育 30 分钟；最后吸取上清，用 Histamine Dynamic 试剂盒（CISBIO，货号：62HTMDPEG）进行检测，检测方法按照试剂盒说明书进行。结果如图 4A 和图 4B 所示，结果显示，所述抗体能够抑制 FL hIgE 诱导 FcεRI/RBL-2H3 的组胺释放，且 IC_{50} 值低于奥马珠单抗，说明抑制效果比奥马珠单抗好。

实施例 11 人全血组胺释放实验

志愿者在捐献血液的 24 小时前不应服用引起过敏的药物、抗组胺药、口服糖皮质激素以及任何阻断 H2 受体的物质。全血采用肝素作为抗凝剂。

组胺释放根据试剂盒（Sigma，货号：IB89145）的操作步骤进行，具体如下：待测抗体用 PBS 稀释成 6000、600、60 及 6 nM，试剂盒中的阳性对照抗 IgE 血清用组胺释放缓冲液稀释 1000 倍后使用。组胺释放过程按照下表 16 进行加样并操作。

表 16 组胺释放加样说明

	抗体样品	阳性对照	自发释放	总的组胺释放
组胺释放缓冲液	-	-	100μL	180μL
抗体	100μL	-	-	-
抗 IgE 血清	-	100μL	-	-
肝素抗凝的人全血	100μL	100μL	100μL	20μL

混匀后，37 度孵育 60 分钟	混匀后，90 度孵育 10 分钟
冰浴 10 分钟后，700 g 离心 10 分钟（制动关闭），取 50 μl 上清用于乙酰化。	

组胺 ELISA 根据试剂盒（Sigma，货号：IB89128）的操作步骤进行，具体如下：取 50 μl 上清或用去离子水稀释 1 倍的标准品及对照品，分别加到对应的孔中。然后每孔加入 25 μl 的乙酰化缓冲液和 25 μl 乙酰化溶液，600 rpm 摇床室温下振荡 45 分钟。最后再加入 100 μl 去离子水，600 rpm 摇床室温下振荡 15 分钟。样品乙酰化好之后，取 25 μl 加入已经包被好组胺的孔板中，再加入 100 μl 的抗组胺血清并用封板膜封好，600 rpm 摇床室温下振荡 3 个小时。孵育好之后，弃掉孔板中的液体，每孔加入 300 μl 清洗液清洗 4 遍，每孔再加入 100 μl 酶联二抗，600 rpm 摇床室温下振荡 30 分钟。弃掉孔板中的液体，每孔加入 300 μl 清洗液清洗 4 遍，每孔加入 100 μl 底物，600 rpm 摇床室温下振荡 30 分钟。最后再加入 100 μl 的终止液终止反应，Envision 酶标仪（PerkinElmer）10 分钟内读取 450 nm 和 570 nm 下的吸光值。

结果如图 5 所示，结果显示，Anti-IgE 血清会交联或者激活已经与 Fc ε RI 结合的 IgE，诱导组胺释放，而奥马珠单抗、AB1904Am10 及 AB1904Am15 则不会。

实施例 12 抗体稳定性研究

通过高温、低 pH、反复冻融稳定性实验条件综合评价候选抗体稳定性，稳定性研究的重点测试项目主要针对产品关键纯度指征，包括 SEC-HPLC、iCIEF、非还原性 CE-SDS。

11.1 高温稳定性试验

本研究重点考察候选抗体在高温条件下的稳定性，将样品置于 40±2 ℃实验条件下，分别在第 0、3、7、14、21、28 天取样检测 SEC-HPLC 纯度、电荷异构体纯度、nrCE-SDS 纯度，实验结果如下：

表 17 高温下的抗体稳定性结果

高温 40℃		奥马珠单抗						AB1904Am10						AB1904Am15					
检测项目		0 天	3 天	7 天	14 天	21 天	28 天	0	3 天	7 天	14 天	21 天	28 天	0 天	3 天	7 天	14 天	21 天	28 天
SEC-HPLC	聚体%	0.78	0.88	0.93	0.95	1.01	1.08	0.72	0.56	0.55	0.63	0.66	0.80	0.64	0.47	0.48	0.47	0.53	0.67
	单体%	98.86	98.21	97.64	96.70	95.80	94.88	98.78	98.39	97.87	96.78	95.79	94.71	99.36	98.47	97.88	96.99	96.01	94.99

	片段%	0.36	0.91	1.43	2.35	3.20	4.04	0.5	1.05	1.58	2.59	3.55	4.49	0	1.05	1.64	2.54	3.45	4.34
NRCE-SDS	主峰%	97.7	94.9	93.8	92.1	90.4	87.3	97.0	93.1	91.7	91.1	90.0	86.1	96.6	94.3	93.7	92.4	91.7	89.1
	片段%	2.3	5.1	6.2	7.9	9.7	12.5	3.1	6.9	8.2	9.0	10.0	13.9	3.5	5.6	6.4	7.6	8.3	10.9
iCIEF	酸性峰%	9.0	10.8	13.4	20.5	26.0	31.7	7.6	12.3	15.8	21.2	26.3	31.5	8.8	11.3	17.9	24.8	30.9	35.6
	主峰%	80.6	69.6	62.8	55.0	49.8	45.6	84.3	77.4	72.8	66.8	61.5	55.0	82.6	78.2	70.6	63.1	57.6	52.8
	碱性峰%	10.4	19.6	23.8	24.6	24.2	22.7	8.1	10.3	11.4	12.0	12.2	13.5	8.7	10.5	11.4	12.1	11.6	11.7

11.2 低 pH 值稳定性试验

重点考察候选抗体在低 pH 条件下的稳定性，用盐酸调节样品 pH 值至 5.0, 将样品置于 40±2 ℃条件下，分别于第 0h、6h、24h、48h、72h 取样检测 SEC-HPLC 纯度、电荷异构体纯度、NRCE-SDS 纯度，实验结果如下：

表 18 低 pH 值下的抗体稳定性结果

低 pH 5.0，40℃		奥马珠单抗					AB1904Am10					AB1904Am15				
检测项目		0小时	6小时	24小时	48小时	72小时	0小时	6小时	24小时	48小时	72小时	0小时	6小时	24小时	48小时	72小时
SEC-HPLC	单体%	98.86	98.39	98.56	98.26	98.12	98.78	98.71	98.55	98.59	98.53	99.36	98.96	98.83	98.72	98.71
	聚体%	0.78	1.11	0.91	1.00	0.99	0.72	0.67	0.73	0.63	0.56	0.64	0.53	0.53	0.58	0.48
	片段%	0.36	0.50	0.52	0.73	0.89	0.5	0.62	0.72	0.78	0.91	0	0.51	1.10	0.71	0.80
NRCE-SDS	主峰%	97.7	97.5	97.0	96.8	96.6	97.0	97.2	96.7	96.6	96.5	96.6	97.1	96.8	96.1	96.0
	片段%	2.3	2.5	3	3.2	3.4	3.1	2.9	3.3	3.3	3.5	3.5	3	3.3	3.9	4
iCIEF	酸性峰%	9.0	9.7	8.7	8.7	9.2	7.6	8.1	8.7	9.8	10.6	8.8	9.0	9.7	10.7	11.9
	主峰%	80.6	78.2	72.8	66.4	60.6	84.3	82.6	81.1	79.1	78.0	82.6	81.6	80.1	78.6	76.7

	碱性峰%	10.4	12.1	18.5	24.8	30.2	8.1	9.3	10.2	11.1	11.4	8.7	9.4	10.2	10.7	11.4

11.3 反复冻融稳定性试验

重点考察候选抗体在反复冻融条件下的稳定性，将样品置于-70±10 ℃冻结至室温融解为一个循环，分别于第三个循环和第 6 个循环，取样检测，实验结果如下：

表 19 反复冻融下的抗体稳定性结果

反复冻融		奥马珠单抗			AB1904Am10			AB1904Am15		
检测项目		0 次	3 次	6 次	0 次	3 次	6 次	0 次	3 次	6 次
SEC-HPLC	单体%	98.86	98.71	98.54	98.78	98.80	98.83	99.36	98.92	98.76
	聚体%	0.78	0.86	1.01	0.72	0.64	0.60	0.64	0.48	0.54
	片段%	0.36	0.44	0.46	0.5	0.57	0.57	0	0.60	0.70
NRCE-SDS	主峰%	97.7	96.4	96.4	97.0	96.0	96.0	96.6	95.5	95.2
	片段%	2.3	3.1	3.3	3.1	4.0	4.0	3.5	4.6	4.8
iCIEF	酸性峰%	9.0	9.9	10.1	7.6	8.4	8.0	8.8	8.7	8.3
	主峰%	80.6	79.2	79.2	84.3	82.4	83.0	82.6	82.4	82.6
	碱性峰%	10.4	10.9	10.8	8.1	9.2	9.1	8.7	9.0	9.1

通过对 AB1904Am10、AB1904Am15、奥马珠单抗进行高温稳定性、低 pH 稳定性、反复冻融稳定性研究，高温和低 pH 稳定性研究结果表明：在高温和低 pH 条件下，候选抗体 AB1904Am10 和 AB1904Am15 稳定性优于奥马珠单抗，特别是在 SEC-HPLC 检测中聚体生成量减少，在 iCIEF 检测中主峰下降减少，说明候选抗体 AB1904Am10 和 AB1904Am15 对于温度和低 pH 更耐受，稳定性更好，对于生产、贮存和使用过程中更好的稳定性。反复冻融稳定性研究结果表明：AB1904Am10 和 AB1904Am15 反复冻融 6 次后，所有关键纯度质量指标稳定性良好。

实施例 13 在人源化 FcRn 小鼠模型中药代动力学（PK）研究

以人源化 FcRn 小鼠为受试动物，分别研究三个待试药物奥马珠单抗、AB1904Am10 和 AB1904Am15 单次皮下给药后的药代动力学指标。所有动物实验方案获得了 IACUC 审阅和批准。hFcRn 小鼠采购自北京百奥赛图，雄性，6-8 周龄，体重 23-26g，饲养于 SPF 级动物房，标准颗粒饲料喂养，自由进食及饮水，室温 18～24 ℃，相对湿度 40%～50%，每日 12 h 昼夜交替。实验动物共 12 只，随机分为三组，每组四只动物，皮下单次给药，给药剂量为 10 mg/kg，给药体积为 10 mL/kg。采血时间点为给药前，给药后 2h，6h，24 h（第 1 天），第 2 天，第 3 天，第 4 天，第 7 天，第 10 天，第 14 天，第 21 天，第 28 天，第 35 天和第 42

天。通过脸颊穿刺采集全血 60 μL/只至 EP 管中，室温静置 30min，然后离心（2000 g，4 ℃，5 min）分离血清，每个样品分装为 2 份（检测管和备份管），10 μL/管，置于-80 ℃ 保存。

利用 Elisa 间接法检测，分析三种药下不同时间点药代动力学。包被抗原为抗人 IgG1 抗体（Fc specific）（Abcam，货号：ab1927），2μg/ml，100ul/孔，37℃，2h。洗板后用 200ul/孔封闭液 4℃过夜。血清样本加样，50μl/孔，37℃，1h。检测抗体为鼠抗人 Fab HRP（1：10000）（Abcam，货号：ab87422），100μl/孔，37℃，0.5h。TMB 显色液（KPL，货号：52-00-03）显色，酶标仪（Molecular Devices，SpectraMax M3）读值 OD450。根据标曲获得药物浓度，PK Solver 非房室进行数据处理获得 PK 参数。

结果如图 6 所示。给药奥马珠单抗后，半衰期（t1/2）=10.9 天，最高浓度（Cmax）为 53214.1ng/ml；AUC 为 900661 ng/ml*d；给药 AB1904AM10 后，半衰期（t1/2）=13.5 天，最高浓度（Cmax）为 60441.4ng/ml；AUC 为 1220787 ng/ml*d；给药 AB1904AM15 后半衰期（t1/2）=26.6 天，最高浓度（Cmax）为 57355.7ng/ml。AUC 1284785 ng/ml*d。

实施例 14 在食蟹猴模型中药代动力学-药效动力学（PK/PD）研究

以食蟹猴（Cynomolgus monkey）为受试动物，分别研究三个待试药物奥马珠单抗、AB1904Am10 和 AB1904Am15 单次皮下给药后的药代动力学和药效指标。

所有动物实验方案获得了 IACUC 审阅和批准。SPF 级雄性 Cynomolgus monkey，实验用 9 只，4 周岁龄以上，体重 4.1～5.7kg，饲养于 SPF 级动物房，自由进食及饮水等。给药剂量：10 mg/kg；给药途径与给药体积：皮下注射给药；给药体积：根据具体药物浓度计算。分组：3 个 TA，每个 TA 3 只食蟹猴；给药：根据体重计算给药体积，单次皮下注射药物，并记录给药时间；采点：于给药前，给药后 2h，6h，24 h（第 1 天），第 2 天，第 3 天，第 4 天，第 7 天，第 10 天，第 14 天，第 21 天，第 28 天，第 35 天，第 42 天和第 56 天，头静脉和隐静脉采集全血 300 μL/只至 EP 管中，并记录采血时间；处理样品：全血室温静置 1 h，离心：6,000 g，25℃，10 min，分离血清，每个样品分装 5 份（1 份检测管和 4 份备份管），30 μL/管。置于-80℃保存。

利用 Elisa 间接法检测，分析三种药下不同时间点药代动力学。包被抗原为抗人 IgG1 抗体(Fc specific)（Abcam，货号：ab1927），2μg/ml，100ul/孔，37℃，2h。洗板后用 200ul/孔封闭液 4℃过夜。血清样本加样，50ul/孔，37℃，1h。检测试剂为人 IgE-Biotin（Abbiotec，货号：250205，自己进行生物素化标记）+SA-HRP（sigma，货号：S2438-250UG）。100ul/孔，37℃，0.5h。TMB 显色液（KPL，货号：52-00-03）显色，酶标仪（Molecular Devices，SpectraMax M3）读值 OD450。根据标准曲线获得药物浓度，PK Solver 非房室进行数据处理获得 PK 参

数。

结果如图 7 所示，给药奥马珠单抗后，半衰期（t1/2）=6.35 天，最高浓度（Cmax）为 112493 ng/ml，AUC 为 1704601 ng/ml*d；给药 AB1904AM10 后，半衰期（t1/2）=11.15 天，最高浓度（Cmax）为 83940 ng/ml，AUC 为 1324493 ng/ml*d；给药 AB1904AM15 后，半衰期（t1/2）=12.2 天，最高浓度（Cmax）为 142880 ng/ml, AUC 为 3061056 ng/ml*d。

然后利用 Elisa 间接法检测，检测血清中游离 IgE。包被抗原为 AB1904Am15，0.5μg/ml，100ul/孔，4℃过夜。洗板后用 200ul/孔封闭液 37℃ ，1h。血清样本加样，50ul/孔，37℃，1.5h。加入生物素标记的奥马珠抗体 500ng/ml，每孔 100uL，1h； 然后加入 SA-HRP（1：10000, sigma，货号：S2438-250UG），100ul/孔，37℃，1h。TMB 显色液（KPL，货号：52-00-03）显色，酶标仪（Molecular Devices，SpectraMax M3）读值 OD450。根据标准曲线得游离 IgE 浓度。

结果如图 1 所示，给药奥马珠单抗后，游离 IgE 恢复到起始浓度的时间在 21 天左右；给药 AB1904Am10 后，游离 IgE 恢复到起始浓度的时间在 28 天左右；给药 AB1904Am15 后，游离 IgE 恢复到起始浓度的时间在 42～56 天左右。

权 利 要 求 书

1. 抗原结合蛋白，其包含抗体轻链可变区（VL），其中与 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列相比，所述 VL 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：E55 和 V104。
2. 根据权利要求 1 所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：D30b、V29、D30、Y30a 和 G30c。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含下组位置处的氨基酸突变：D30b、E55 和 V104。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含选自以下任意一组位置处的氨基酸突变：

   （1） D30b、E55、V104、V29、D30 和 Y30a；

   （2） D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；

   （3） D30b、E55、V104 和 Y30a；

   （4） D30b、E55、V104、Y30a 和 G30c；

   （5） D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；和

   （6） D30b、E55、V104、D30 和 Y30a。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 E55 位置处的氨基酸突变包括 E55Q。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 V104 位置处的氨基酸突变包括 V104L。
7. 根据权利要求 2-6 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 D30b 位置处的氨基酸突变包括 D30bE。
8. 根据权利要求 2-7 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 V29 位置处的氨基酸突变包括 V29L。
9. 根据权利要求 2-8 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 Y30a 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：Y30A、Y30aS 和 Y30aD。
10. 根据权利要求 2-9 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 D30 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：D30Y、D30A、D30E、D30F、D30G 和 D30N。
11. 根据权利要求 2-10 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 G30c 位置处的氨基酸突变包括选自下组的任意一种：G30cA、G30cY 和 G30cW。
12. 根据权利要求 2-11 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含下组的氨基酸突变：D30bE、E55Q 和 V104L。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 SEQ ID NO: 57 所

示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 包含 SEQ ID NO: 23-34 中任一项所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 1-14 所述的抗原结合蛋白，其包括抗体重链可变区（VH），其中与 SEQ ID NO: 50 所示的氨基酸序列相比，所述 VH 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：I37、A49、S50 和 D54。

16. 根据权利要求 15 所述的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含选自下组的一个或多个位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、T30、S31、S96 和 H97。

17. 根据权利要求 15-16 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含下组位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54。

18. 根据权利要求 15-17 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含选自以下任意一组位置处的氨基酸突变：

（1） N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54、S96 和 H97；

（2） N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 T30；

（3） N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96；

（4） N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S31；和

（5） N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97。

19. 根据权利要求 15-18 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 I37 位置处的氨基酸突变包括 I37V。

20. 根据权利要求 15-19 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 A49 位置处的氨基酸突变包括 A49S。

21. 根据权利要求 15-20 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 S50 位置处的氨基酸突变包括 S50V。

22. 根据权利要求 15-21 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 D54 位置处的氨基酸突变包括 D54A。

23. 根据权利要求 16-22 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 N60 位置处的氨基酸突变包括 N60A。

24. 根据权利要求 16-23 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 P61 位置处的氨基酸突变包括 P61D。

25. 根据权利要求 16-24 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 I67 位置处的氨基酸突变包括 I67F。

26. 根据权利要求 16-25 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 T30 位置处的氨基酸突变包括 T30R。
27. 根据权利要求 16-26 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 S31 位置处的氨基酸突变包括 S31Q。
28. 根据权利要求 16-27 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 S96 位置处的氨基酸突变包括 S96T。
29. 根据权利要求 16-28 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 H97 位置处的氨基酸突变包括 H97N。
30. 根据权利要求 15-29 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含下组的氨基酸突变：N60A、P61D、I67F、I37V、A49S、S50V 和 D54A。
31. 根据权利要求 15-20 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 15-31 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VH 包含 SEQ ID NO: 51-56 中任一项所示的氨基酸序列。
33. 根据权利要求 15-32 中任一项所述的抗原结合蛋白，其中所述 VL 和所述 VH 包括选自以下任意一组位置处的氨基酸突变：
    （1） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、V29、D30 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54、S96 和 H97；
    （2） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 T30；
    （3） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96；
    （4） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54；
    （5） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54；
    （6） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97；
    （7） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；

VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50 和 D54；

（8） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30 和 Y30a；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 H97；

（9） VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S96；和

（10）VL 包括以下位置处的氨基酸突变：D30b、E55、V104、D30、Y30a 和 G30c；VH 包括以下位置处的氨基酸突变：N60、P61、I67、I37、A49、S50、D54 和 S31。

34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包括抗体重链恒定区。

35. 根据权利要求 34 所述的抗原结合蛋白，其中所述抗体重链恒定区源自人 IgG 恒定区。

36. 根据权利要求 35 所述的抗原结合蛋白，其中所述人 IgG 恒定区包括人 IgG1 恒定区。

37. 根据权利要求 36 所述的抗原结合蛋白，其中所述人 IgG1 恒定区包括选自下组的一种或多种氨基酸突变：M252Y、S254T 和 T256E。

38. 根据权利要求 37 所述的抗原结合蛋白，其中所述人 IgG1 恒定区包含 SEQ ID NO: 60-61 中任一项所示的氨基酸序列。

39. 根据权利要求 1-38 中任一项所述的抗原结合蛋白，其包括抗体轻链恒定区。

40. 根据权利要求 39 所述的抗原结合蛋白，其中所述抗体轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 59 所示的氨基酸序列。

41. 分离的一种或多种核酸分子，其编码权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白。

42. 载体，其包含根据权利要求 41 所述的核酸分子。

43. 细胞，其包含根据权利要求 41 所述的核酸分子或根据权利要求 42 所述的载体。

44. 制备权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白的方法，所述方法包括在使得权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白表达的条件下，培养根据权利要求 43 所述的细胞。

45. 药物组合物，其包含权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白、权利要求 41 所述的核酸分子、权利要求 42 所述的载体和/或权利要求 43 所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载体。

46. 权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白、权利要求 41 所述的核酸分子、权利要求 42 所述的载体、权利要求 43 所述的细胞和/或权利要求 45 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于缓解或治疗与异常 IgE 水平相关的疾病。

47. 缓解或治疗与异常 IgE 水平相关的疾病的方法，其包括向有需要的受试者施用权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白、权利要求 41 所述的核酸分子、权利要求 42 所述的载体、权利要求 43 所述的细胞和/或权利要求 45 所述的药物组合物。
48. 多肽，其包含权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白。
49. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白。
50. 试剂盒，权利要求 1-40 中任一项所述的抗原结合蛋白、权利要求 41 所述的核酸分子、权利要求 42 所述的载体、权利要求 43 所述的细胞和/或权利要求 45 所述的药物组合物。

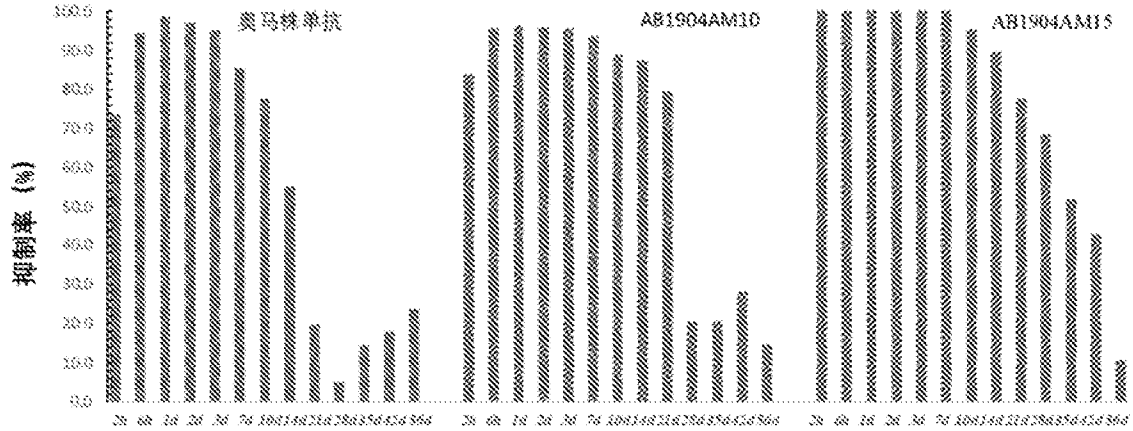
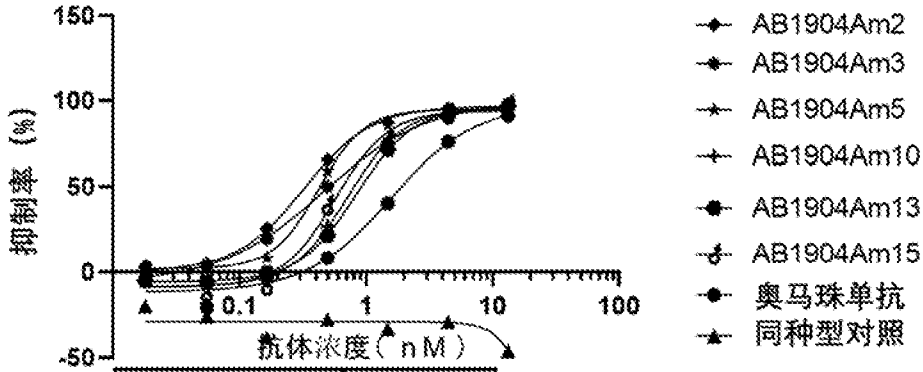
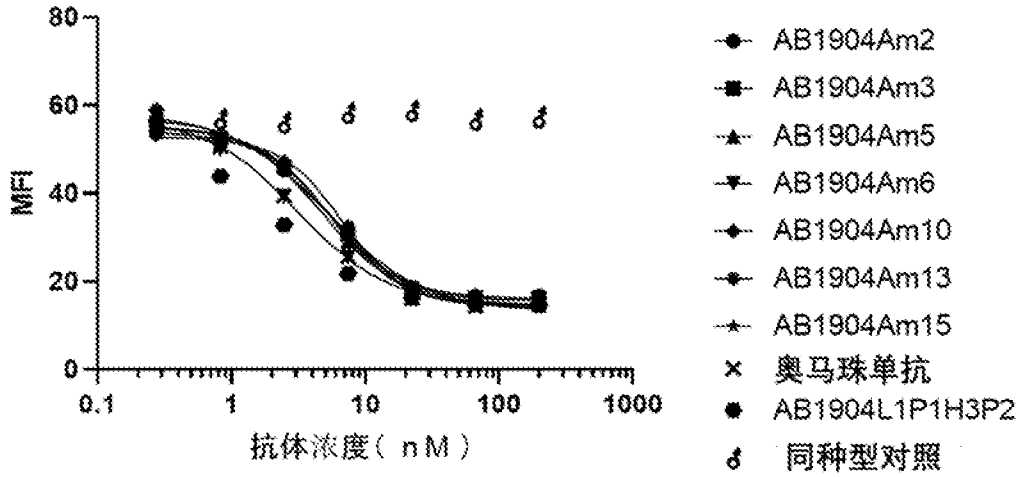


图 1



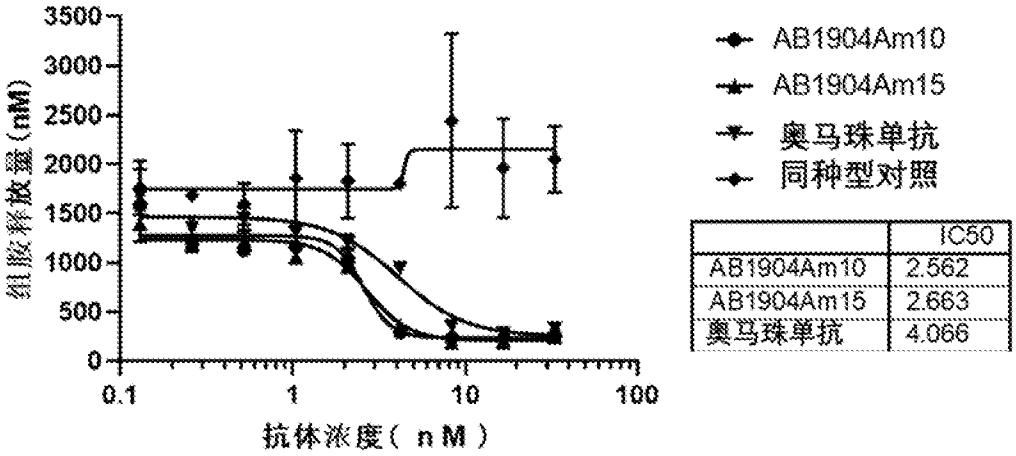
	EC50
AB1904Am2	0.3204
AB1904Am3	0.4567
AB1904Am5	0.4198
AB1904Am10	0.7066
AB1904Am13	0.8328
AB1904Am15	0.5670
奥马珠单抗	1.557

图 2



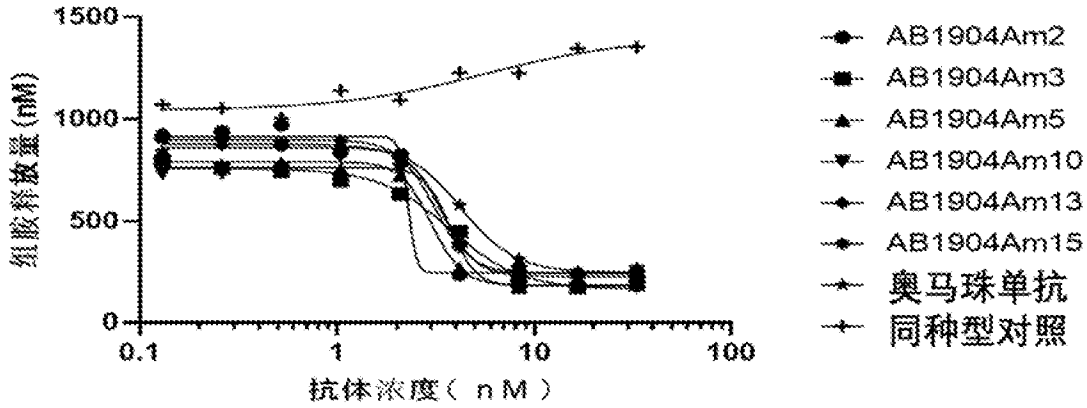
	IC50
AB1904Am2	5.498
AB1904Am3	5.324
AB1904Am5	4.670
AB1904Am6	3.139
AB1904Am10	6.724
AB1904Am13	5.107
AB1904Am15	5.497
奥马珠单抗	2.945
AB1904L1P1H3P2	1.148

图 3



	IC50
AB1904Am10	2.562
AB1904Am15	2.663
奥马珠单抗	4.066

图 4A



	IC50
AB1904Am2	~ 2.285
AB1904Am3	3.719
AB1904Am5	3.004
AB1904Am10	3.734
AB1904Am13	3.396
AB1904Am15	3.113
奥马珠单抗	4.268

图 4B

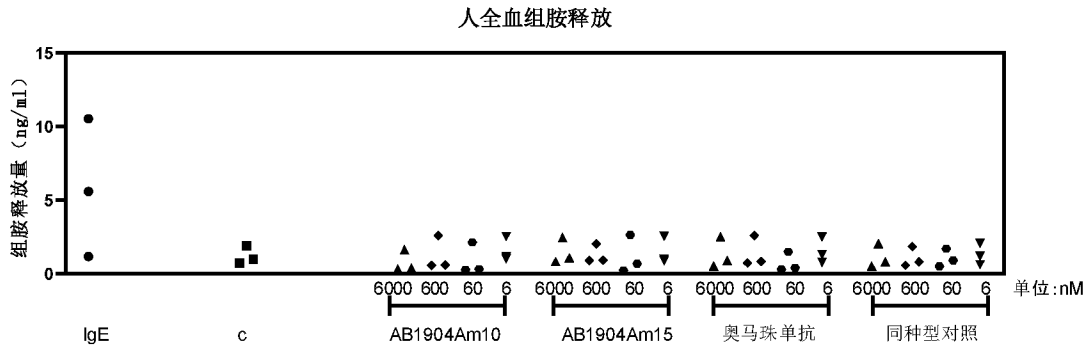


图 5

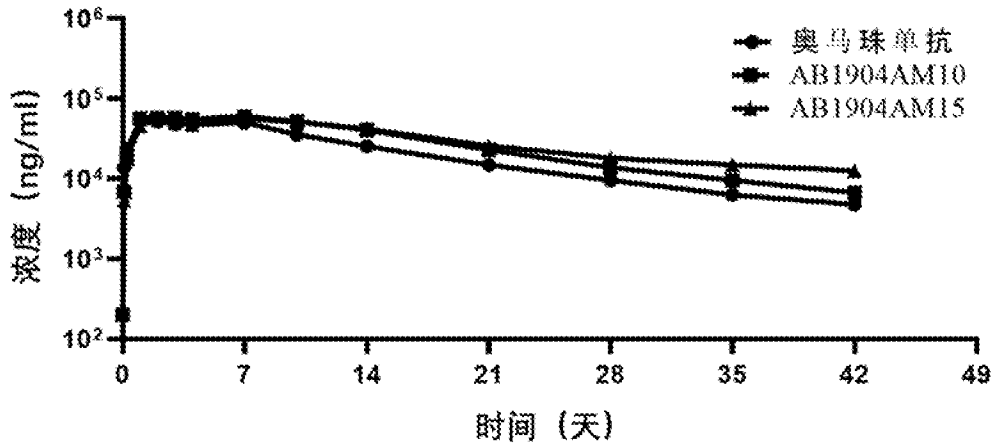


图 6

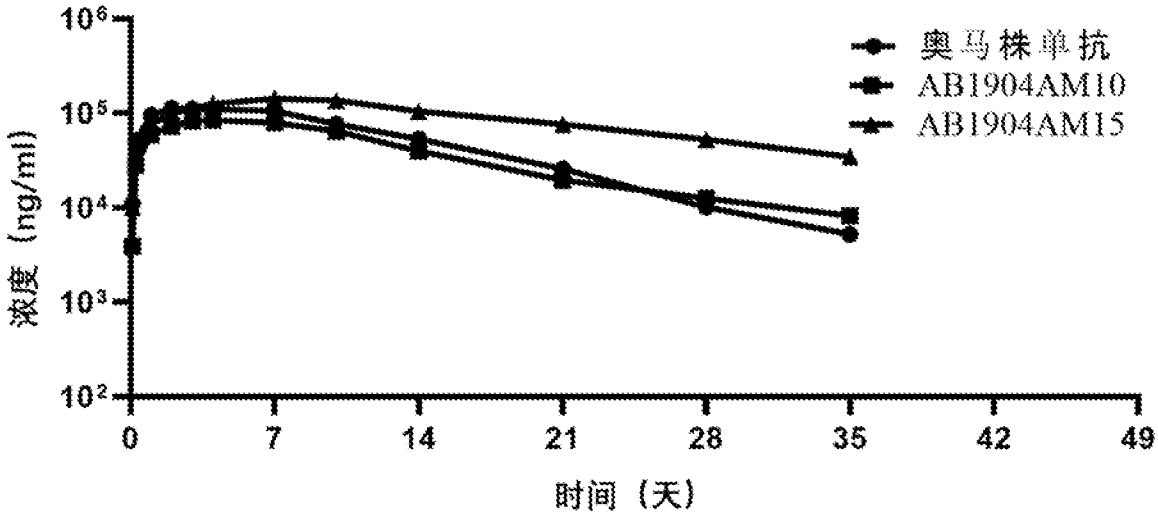

奥马株单抗
AB1904AM10
AB1904AM15
浓度（ng/ml）
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
7
14
21
28
35
42
49
时间（天）

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/105620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(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,A61K,C12N

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)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge: IgE, 免疫球蛋白E, immunoglobulin E, 抗体, 奥马珠单抗, 抗CD20, Omalizumab, XOLAIR, 改造, 修饰, 突变, mutation, mutant, SEQ ID NO: 22-24, 51-61

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1268176 A (GENENTECH INC.) 27 September 2000 (2000-09-27) claim 1, table 3, table 5, figure 1	1-50
A	WO 2019213468 A1 (ALLAKOS INC.) 07 November 2019 (2019-11-07) entire document	1-50
A	CN 102232113 A (GENENTECH, INC. et al.) 02 November 2011 (2011-11-02) entire document	1-50
A	WO 2019157358 A1 (GENENTECH, INC. et al.) 15 August 2019 (2019-08-15) entire document	1-50
A	PENNINGTON, L.F. et al. "Structural basis of omalizumab therapy and omalizumab-mediated IgE exchange" *Nat Commun.*, Vol. 7, 19 May 2016 (2016-05-19), article no. 11610, entire document	1-50
A	WARD, D.E. et al. "Chimeric Antigen Receptors Based on Low Affinity Mutants of FcεRI Re-direct T Cell Specificity to Cells Expressing Membrane IgE" *Front Immunol*, Vol. 9, 10 October 2018 (2018-10-10), article no. 2231, entire document	1-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 September 2021	**09 October 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China**	Authorized officer
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/105620

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/105620

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **47**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 47 relates to a method for treatment of the human or animal body, and thus to a subject matter which the International Search Authority is not required to search under PCT Rule 39.1(iv). A search is carried out in this report based on "the use in the preparation of a pharmaceutical composition".

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/105620

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 1268176 A	27 September 2000	DE 69819332 T2	15 July 2004
		NO 996551 D0	29 December 1999
		US 6290957 B1	18 September 2001
		WO 9901556 A2	14 January 1999
		ES 2210778 T3	01 July 2004
		PT 996728 E	31 March 2004
		KR 20010014422 A	26 February 2001
		BR 9810654 A	04 October 2005
		WO 9901556 A3	22 April 1999
		AR 013169 A1	13 December 2000
		US 5994511 A	30 November 1999
		SK 284395 B6	04 March 2005
		JP 2002510211 A	02 April 2002
		KR 100547538 B1	31 January 2006
		PL 194562 B1	29 June 2007
		AU 8270198 A	25 January 1999
		HU 0002474 A3	28 March 2003
		US 2002054878 A1	09 May 2002
		CZ 9904735 A3	14 June 2000
		EP 0996728 B1	29 October 2003
		TW I233946 B	11 June 2005
		US 6761889 B2	13 July 2004
		HU 0002474 A2	28 October 2000
		DE 69819332 D1	04 December 2003
		HK 1027833 A1	23 January 2001
		JP 2009055902 A	19 March 2009
		TW 570976 B	11 January 2004
		ZA 9805500 A	24 December 1999
		JP 4286327 B2	24 June 2009
		BR 9810654 B1	08 January 2013
		IL 133973 A	10 December 2006
		CZ 473599 A3	14 June 2000
		IS 5321 A	23 December 1999
		PL 338030 A1	25 September 2000
		CA 2295540 A1	14 January 1999
		HU 228845 B1	28 June 2013
		US 6682735 B2	27 January 2004
		AT 253116 T	15 November 2003
		IL 133973 D0	30 April 2001
		NO 324992 B1	14 January 2008
		ZA 985500 B	24 December 1999
		CA 2295540 C	25 January 2011
		NO 996551 L	01 March 2000
		CN 1260357 C	21 June 2006
		IS 2039 B	15 August 2005
		AR 060038 A2	21 May 2008
		JP 4371248 B2	25 November 2009
		CZ 300724 B6	29 July 2009
		NO 996551 A	01 March 2000
WO 2019213468 A1	07 November 2019	SG 11202010911 W A	30 December 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/105620

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				CN	112384535	A	19 February 2021
				AU	2019262167	A1	10 December 2020
				BR	112020022236	A2	02 February 2021
				EP	3788078	A1	10 March 2021
				CA	3099338	A1	07 November 2019
				KR	20210005245	A	13 January 2021
CN	102232113	A	02 November 2011	KR	102070761	B1	29 January 2020
				IL	208366	D0	30 December 2010
				NZ	588853	A	26 July 2013
				CN	112481367	A	12 March 2021
				JP	6161233	B2	12 July 2017
				AU	2009231733	B2	24 December 2015
				BR	PI0906261	A2	07 July 2015
				CA	2718120	A1	08 October 2009
				EP	2271770	A1	12 January 2011
				MX	2010010746	A	15 October 2010
				WO	2009124090	A1	08 October 2009
				RU	2607569	C2	10 January 2017
				SG	2014014138	A	30 July 2014
				JP	6037515	B2	07 December 2016
				RU	2014110413	A	27 September 2015
				JP	2015166738	A	24 September 2015
				MX	348362	B	07 June 2017
				KR	20100131003	A	14 December 2010
				JP	2011523350	A	11 August 2011
				KR	20170063996	A	08 June 2017
				NZ	601815	A	31 October 2014
				US	2011123530	A1	26 May 2011
				EP	2631302	A2	28 August 2013
				EP	2631302	A3	08 January 2014
				JP	2014204725	A	30 October 2014
				PH	12018500045	A1	28 October 2019
				EP	2271770	B1	22 August 2018
				AU	2009231733	A1	08 October 2009
				RU	2010144502	A	10 May 2012
WO	2019157358	A1	15 August 2019	AU	2019218128	A1	17 September 2020
				BR	112020016172	A2	15 December 2020
				KR	20200118474	A	15 October 2020
				JP	2021512856	A	20 May 2021
				EP	3749362	A1	16 December 2020
				CR	20200394	A	05 November 2020
				CN	111787947	A	16 October 2020
				CL	2020002047	A1	23 October 2020
				IL	276050	D0	31 August 2020
				CA	3088557	A1	15 August 2019
				SG	11202007564V	A	29 September 2020
				US	2020377953	A1	03 December 2020
				TW	202003033	A	16 January 2020
				WO	2019157358	A8	10 October 2019

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/105620

A. 主题的分类

C07K 16/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(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, A61K, C12N

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））

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, JPTXT, USTXT, EPTXT, 万方, CNKI, PubMed, GenBank, ISI web of knowledge:IgE, 免疫球蛋白E, immunoglobulin E, 抗体, 奥马珠单抗, 抗CD20, Omalizumab, XOLAIR, 改造, 修饰, 突变, mutation, mutant, SEQ ID NO:22-24、51-61

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
X	CN 1268176 A (基因技术股份有限公司) 2000年 9月 27日 (2000-09-27) 权利要求1、表3、表5、图1	1-50
A	WO 2019213468 A1 (ALLAKOS INC.) 2019年 11月 7日 (2019-11-07) 全文	1-50
A	CN 102232113 A (健泰科生物技术公司等) 2011年 11月 2日 (2011-11-02) 全文	1-50
A	WO 2019157358 A1 (GENENTECH, INC.等) 2019年 8月 15日 (2019-08-15) 全文	1-50
A	PENNINGTON, L.F.等. "Structural basis of omalizumab therapy and omalizumab-mediated IgE exchange" Nat Commun., 第7卷, 2016年 5月 19日 (2016-05-19), 第11610篇 全文	1-50
A	WARD, D.E.等. "Chimeric Antigen Receptors Based on Low Affinity Mutants of FcεRI Re-direct T Cell Specificity to Cells Expressing Membrane IgE" Front Immunol, 第9卷, 2018年 10月 10日 (2018-10-10), 第2231篇 全文	1-50

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 9月 17日	2021年 10月 9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 刘新蕾 电话号码 86-(10)-53962097

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/105620

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：
   ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/105620

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 47
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求47涉及对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1（Ⅳ）中所列的无需进行国际检索的情形。本报告基于“制备药物组合物中的用途”进行检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/105620

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	1268176	A	2000年 9月 27日	DE	69819332	T2	2004年 7月 15日
				NO	996551	D0	1999年 12月 29日
				US	6290957	B1	2001年 9月 18日
				WO	9901556	A2	1999年 1月 14日
				ES	2210778	T3	2004年 7月 1日
				PT	996728	E	2004年 3月 31日
				KR	20010014422	A	2001年 2月 26日
				BR	9810654	A	2005年 10月 4日
				WO	9901556	A3	1999年 4月 22日
				AR	013169	A1	2000年 12月 13日
				US	5994511	A	1999年 11月 30日
				SK	284395	B6	2005年 3月 4日
				JP	2002510211	A	2002年 4月 2日
				KR	100547538	B1	2006年 1月 31日
				PL	194562	B1	2007年 6月 29日
				AU	8270198	A	1999年 1月 25日
				HU	0002474	A3	2003年 3月 28日
				US	2002054878	A1	2002年 5月 9日
				CZ	9904735	A3	2000年 6月 14日
				EP	0996728	B1	2003年 10月 29日
				TW	I233946	B	2005年 6月 11日
				US	6761889	B2	2004年 7月 13日
				HU	0002474	A2	2000年 10月 28日
				DE	69819332	D1	2003年 12月 4日
				HK	1027833	A1	2001年 1月 23日
				JP	2009055902	A	2009年 3月 19日
				TW	570976	B	2004年 1月 11日
				ZA	9805500	A	1999年 12月 24日
				JP	4286327	B2	2009年 6月 24日
				BR	9810654	B1	2013年 1月 8日
				IL	133973	A	2006年 12月 10日
				CZ	473599	A3	2000年 6月 14日
				IS	5321	A	1999年 12月 23日
				PL	338030	A1	2000年 9月 25日
				CA	2295540	A1	1999年 1月 14日
				HU	228845	B1	2013年 6月 28日
				US	6682735	B2	2004年 1月 27日
				AT	253116	T	2003年 11月 15日
				IL	133973	D0	2001年 4月 30日
				NO	324992	B1	2008年 1月 14日
				ZA	985500	B	1999年 12月 24日
				CA	2295540	C	2011年 1月 25日
				NO	996551	L	2000年 3月 1日
				CN	1260357	C	2006年 6月 21日
				IS	2039	B	2005年 8月 15日
				AR	060038	A2	2008年 5月 21日
				JP	4371248	B2	2009年 11月 25日
				CZ	300724	B6	2009年 7月 29日
				NO	996551	A	2000年 3月 1日
WO	2019213468	A1	2019年 11月 7日	SG	11202010911W	A	2020年 12月 30日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/105620

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	112384535	A	2021年 2月 19日
				AU	2019262167	A1	2020年 12月 10日
				BR	112020022236	A2	2021年 2月 2日
				EP	3788078	A1	2021年 3月 10日
				CA	3099338	A1	2019年 11月 7日
				KR	20210005245	A	2021年 1月 13日
CN	102232113	A	2011年 11月 2日	KR	102070761	B1	2020年 1月 29日
				IL	208366	D0	2010年 12月 30日
				NZ	588853	A	2013年 7月 26日
				CN	112481367	A	2021年 3月 12日
				JP	6161233	B2	2017年 7月 12日
				AU	2009231733	B2	2015年 12月 24日
				BR	PI0906261	A2	2015年 7月 7日
				CA	2718120	A1	2009年 10月 8日
				EP	2271770	A1	2011年 1月 12日
				MX	2010010746	A	2010年 10月 15日
				WO	2009124090	A1	2009年 10月 8日
				RU	2607569	C2	2017年 1月 10日
				SG	2014014138	A	2014年 7月 30日
				JP	6037515	B2	2016年 12月 7日
				RU	2014110413	A	2015年 9月 27日
				JP	2015166738	A	2015年 9月 24日
				MX	348362	B	2017年 6月 7日
				KR	20100131003	A	2010年 12月 14日
				JP	2011523350	A	2011年 8月 11日
				KR	20170063996	A	2017年 6月 8日
				NZ	601815	A	2014年 10月 31日
				US	2011123530	A1	2011年 5月 26日
				EP	2631302	A2	2013年 8月 28日
				EP	2631302	A3	2014年 1月 8日
				JP	2014204725	A	2014年 10月 30日
				PH	12018500045	A1	2019年 10月 28日
				EP	2271770	B1	2018年 8月 22日
				AU	2009231733	A1	2009年 10月 8日
				RU	2010144502	A	2012年 5月 10日
WO	2019157358	A1	2019年 8月 15日	AU	2019218128	A1	2020年 9月 17日
				BR	112020016172	A2	2020年 12月 15日
				KR	20200118474	A	2020年 10月 15日
				JP	2021512856	A	2021年 5月 20日
				EP	3749362	A1	2020年 12月 16日
				CR	20200394	A	2020年 11月 5日
				CN	111787947	A	2020年 10月 16日
				CL	2020002047	A1	2020年 10月 23日
				IL	276050	D0	2020年 8月 31日
				CA	3088557	A1	2019年 8月 15日
				SG	11202007564V	A	2020年 9月 29日
				US	2020377953	A1	2020年 12月 3日
				TW	202003033	A	2020年 1月 16日
				WO	2019157358	A8	2019年 10月 10日