



(21)申請案號：104119331

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 16 日

(51)Int. Cl. : C07K16/42 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/06/17 美國

62/013,196

(71)申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)

臺北市南港區研究院路二段 128 號

(72)發明人：陳君柏 CHEN, JIUN-BO (TW)；熊御宇 SHIUNG, YU-YU (TW)；張子文 CHANG, TSE-WEN (TW)

(74)代理人：何美瑩

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：17 共 50 頁

(54)名稱

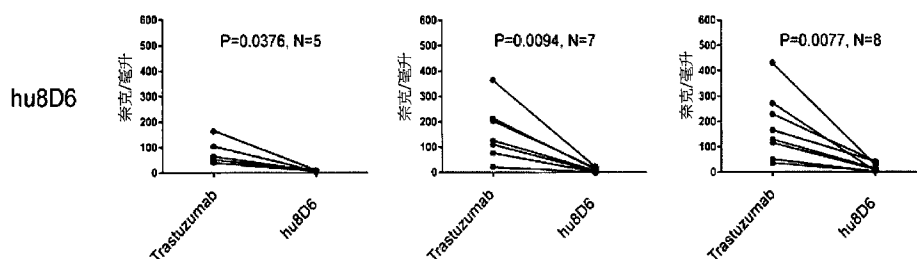
交聯 B 淋巴球之 CD23 但不致敏肥大細胞的人源化抗-IgE 抗體

HUMANIZED ANTI-IGE ANTIBODIES THAT CROSSLINK CD23 ON B LYMPHOCYTES BUT DO NOT SENSITIZE MAST CELLS

(57)摘要

揭露一種新的人源化抗-IgE 抗體。此抗體可結合至游離的 IgE、位於 B 淋巴球上與膜結合的 IgE、或與 CD23 結合的 IgE，而非位於肥大細胞上與高親和力 IgE.Fc 受體結合的 IgE。本發明關於藉由投予本發明抗-IgE 抗體對 IgE 介導疾病的治療，IgE 介導疾病包括過敏性氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、食物過敏、慢性自發性(特發性)蕁麻疹、慢性鼻竇炎、系統性肥大細胞增生症、皮膚肥大細胞增生症、過敏性支氣管肺麩菌病、復發性特發性血管性水腫，以及和嗜酸性球有關的腸胃疾病。

A novel humanized anti-IgE antibody is disclosed. The antibody is capable of binding to free IgE, membrane-bound IgE on B lymphocytes, IgE bound by CD23, but not to IgE bound by high-affinity IgE.Fc receptor on mast cells. The present invention relates to the treatment of IgE-mediated diseases, including allergic asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food allergy, chronic spontaneous (idiopathic) urticaria, chronic rhinosinusitis, systemic mastocytosis, cutaneous mastocytosis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, recurrent idiopathic angioedema, and eosinophil-associated gastrointestinal disorder by administering the anti-IgE antibody of the present invention.



第17b圖

發明摘要

C7K16/42 (2006.01)
C07K16/46 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
A61P37/00 (2006.01)

※ 申請案號：104119331

※ 申請日：104. 6. 16

※IPC 分類：

【發明名稱】 交聯B淋巴球之CD23但不致敏肥大細胞的人源化抗-IgE抗體/
HUMANIZED ANTI-IgE ANTIBODIES THAT CROSSLINK CD23 ON B
LYMPHOCYTES BUT DO NOT SENSITIZE MAST CELLS

【中文】

揭露一種新的人源化抗-IgE抗體。此抗體可結合至游離的IgE、位於B淋巴球上與膜結合的IgE、或與CD23結合的IgE，而非位於肥大細胞上與高親和力IgE.Fc受體結合的IgE。本發明關於藉由投予本發明抗-IgE抗體對IgE介導疾病的治療，IgE介導疾病包括過敏性氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、食物過敏、慢性自發性(特發性)蕁麻疹、慢性鼻竇炎、系統性肥大細胞增生症、皮膚肥大細胞增生症、過敏性支氣管肺麴菌病、復發性特發性血管性水腫，以及和嗜酸性球有關的腸胃疾病。

【英文】

A novel humanized anti-IgE antibody is disclosed. The antibody is capable of binding to free IgE, membrane-bound IgE on B lymphocytes, IgE bound by CD23, but not to IgE bound by high-affinity IgE.Fc receptor on mast cells. The present invention relates to the treatment of IgE-mediated diseases, including allergic asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food allergy, chronic spontaneous (idiopathic) urticaria, chronic rhinosinusitis, systemic mastocytosis, cutaneous mastocytosis, allergic bronchopulmonary aspergillosis, recurrent idiopathic angioedema, and eosinophil-associated gastrointestinal disorder by administering the anti-IgE antibody of the present invention.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(17b)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無。

發明專利說明書

【發明名稱】 交聯B淋巴球之CD23但不致敏肥大細胞的人源化抗-IgE抗體
/ HUMANIZED ANTI-IgE ANTIBODIES THAT CROSSLINK CD23 ON B
LYMPHOCYTES BUT DO NOT SENSITIZE MAST CELLS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於製備人源化抗體，其可結合至游離的IgE、位於B淋巴球上與膜結合的IgE、或是CD23結合的IgE，而非位於肥大細胞上與高親和力IgE.Fc受體結合的IgE。本發明也關於此種抗體於治療IgE介導疾病上的治療應用，所述IgE介導疾病包括，過敏性氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、食物過敏、慢性自發性(特發性)蕁麻疹、慢性鼻竇炎、系統性肥大細胞增生症、皮膚肥大細胞增生症、過敏性支氣管肺麴菌病、復發性特發性血管性水腫，以及和嗜酸性球有關的腸胃疾病。

【先前技術】

【0002】 過敏是一種對外來、無害的抗原之過度免疫反應所引起的超敏狀態。立即的超敏反應(hypersensitivity)是在抗原存在下發生，透過免疫球蛋白E (immunoglobulin E, IgE)和呈現在肥大細胞和嗜鹼性球表面之高親和力IgE.Fc受體(FcεRI)的交互作用產生，此抗原可和與FcεRI結合的IgE反應，造成發炎細胞所執行的和新合成的介質被釋出。大多數過敏性疾病是IgE介導的。眾所周知，一些非過敏性疾病，其不涉及對外來抗原的免疫反應，特別是發炎性皮膚疾病，也是IgE介導的。

【0003】 IgE有兩種主要的受體， $Fc\epsilon RI$ 和低親和力IgE.Fc受體 $Fc\epsilon RII$ (也稱為CD23)。 $Fc\epsilon RI$ 於人類主要表現在肥大細胞和嗜鹼性球的表面，在此，它是一個四聚體複合物，其包含一個 α 鏈、一個 β 鏈，和兩個以雙硫鍵結合的 γ 鏈。由過敏原所引起位在肥大細胞和嗜鹼性球上之 $Fc\epsilon RI$ 的活化，會導致去顆粒作用(degranulation)，而樹突狀細胞上之 $Fc\epsilon RI$ 活化，則會導致IgE介導的過敏原被呈現。

【0004】 CD23是一種分子量約45kDa的第二型穿膜醣蛋白，包含一個C型類凝集素功能區塊(C-type lectin-like domain)，之後為一個莖部區域(其具有多個重複區可作為預測性之白胺酸拉鍊(putative leucine zipper)以形成捲曲螺旋三聚體(coiled-coil trimers))，一個膜跨越區域，以及一個短的氨基端細胞質功能區塊。實際上，單體CD23對IgE的親和力($KD=10^{-6}-10^{-7}$ M)比對 $Fc\epsilon RI$ ($KD=$ 約 10^{-10} M)低得多，但對其三聚體形式的親和力則高出許多($KD=10^{-8}-10^{-9}$ M)。編碼CD23多肽之 $Fc\epsilon RII$ 基因具有驅使兩種mRNA變異體合成的兩個替代的轉錄起始位點，兩種mRNA變異體導致產生兩種CD23同型異構物，其於氨基端細胞質尾端之前七(CD23a)和六(CD23b)個胺基酸不同。CD23a是被B細胞專門地和連續地表現，而CD23b是由位於單核球/巨噬細胞、B細胞、T細胞、嗜酸性球、樹突狀細胞和上皮細胞表面上的IL-4所誘導。位在B細胞上的CD23被認為有助於IgE生成和抗原呈現的調控，而位在巨噬細胞和樹突狀細胞上的CD23涉及吞噬作用/內噬作用、抗原-IgE複合物的清除和抗原呈現。位於上皮細胞上的CD23的附加功能包括IgE的運輸。抗原-IgE複合物可直接跨越上皮細胞穿透至內腔的空間，且反之亦然。CD23也可以是37、33、25和16 kDa之游離的可溶性CD23 (sCD23)蛋白形式，由

細胞表面釋出。在體內負責CD23脫落(CD23 shedding)的主要金屬蛋白酶是ADAM10基因，其以三聚體形式產生37 kDa或35kDa的sCD23。另一種自然產生的sCD23是derCD23，其乃藉由於塵蟎(*dermatophagoides pteronyssinus*)糞便發現的Der p1蛋白酶作用所產生。利用Der p1裂解CD23產生16 kDa單體的derCD23。其顯示可觀察到三聚體sCD23片段作為促進自發性IgE合成的關鍵分子，而較小的單體sCD23似乎可向下調節(down-regulate) IL-4 刺激的IgE合成。

【0005】 IgE以分泌的形式和與膜結合的形式存在，其似乎是因剪接所產生的變異體(splicing variants)。分泌形式IgE之 ϵ 鏈的恆定區域存在C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}-C_{H4}功能區塊，然而於人體中發現具有與膜結合的IgE (mIgE)之與膜結合形式IgE的 ϵ 鏈有兩種同型異構物，其為選擇性剪接的結果。人類mIgE之兩種同型異構物的 ϵ 鏈包含一個m ϵ is- ϵ 胜肽和一個膜錨定胜肽(membrane-anchoring peptide)。一個同型異構物在C_{H4}功能區塊和膜錨定胜肽間只包含m ϵ is- ϵ 胜肽(長度為15個胺基酸)(稱為“短型”)，然而第二個同型異構物在C_{H4}功能區塊和m ϵ is- ϵ 胜肽間還包含一個額外長度為52個胺基酸的功能區塊(稱為C ϵ mX功能區塊) (稱為“長型”)。

【0006】 因為IgE在介導大多數過敏性疾病中扮演重要的角色，目前已有多種策略以控制體內的IgE濃度或調控IgE合成，例如抗-IgE、抗-IL-4/IL-13和抗-CD23。Omalizumab (Xolair®)是一種重組人源化單株抗-IgE抗體，其可以和血清中循環的游離IgE以及位於B細胞上與膜結合的IgE結合，而非位於細胞表面上與Fc ϵ RI結合以及與CD23結合的IgE。Omalizumab可顯著地降低(高達99%)過敏患者中的血清游離IgE，抑制IgE結合至Fc ϵ RI，

以及後續向下調節嗜鹼性球和肥大細胞上之FcεRI的量。在許多IgE介導疾病(例如：過敏性氣喘、慢性蕁麻疹、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎等)中的大量臨床試驗已經顯示，Omalizumab於這些疾病的治療上是有效且安全的。Omalizumab在許多國家已被批准用於治療重度過敏性氣喘和慢性特發性蕁麻疹。此外，Lumiliximab，其為一種抗-CD23單株抗體，包含靈長類動物(食蟹猴)的變異區域和人類的恆定區域。Lumiliximab可結合至C型凝集素功能區塊，以避免IgE與CD23結合，因此可使表面CD23穩定並減少CD23之蛋白酶切割。已有文獻報導Lumiliximab可抑制生殖細胞系ε轉錄本，降低培養的人類周邊血液單核球細胞(PBMCs)中的IgE生成，並減少過敏患者血液的IgE濃度。

【0007】 在1990年的專利(美國專利第4,940,782號)揭露，對大鼠IgE具有專一性的小鼠IgG單株抗體44.7b，其可結合至與CD23結合的IgE，而非與FcεRI結合的IgE。這種抗體44.7b從未用來作為治療IgE介導疾病的治療性候選藥物。發表於2012年的一篇論文(Shiung et al., *Immunobiology*, 2012, 217:676-683)指出，小鼠抗-人IgE單株抗體(即，8D6)，能夠結合至與CD23結合的IgE，而非與FcεRI結合的IgE。作者認為此抗體不只具有Omalizumab的主要藥理學特性以中和IgE而未使肥大細胞和嗜鹼性球致敏化，還具有Lumiliximab的特性以交聯與CD23結合的IgE。然而，鼠源抗體可能具有免疫原性且不能應用於治療IgE介導的疾病。已發現鼠源抗體於人類之治療應用受限於患者對鼠源抗體產生的免疫反應。因此，鼠源抗體的人源化是必需的，可減少其在人類接受者的免疫原性。

【發明內容】

【0008】 本發明係關於人源化抗體，其結合至(1)分泌游離形式的人類IgE，(2)位於B淋巴球上與膜結合的IgE，(3)位於B細胞上與CD23結合的IgE，或與溶液中游離之CD23結合的IgE。此種抗-IgE抗體不結合至位於肥大細胞和嗜鹼性球上與FcεRI結合的IgE，因此不會活化這些發炎細胞。本發明也關於在IgE生合成中那些人源化抗-IgE抗體的生物學特性、IgE對各種細胞和分子組成物的結合，以及可能的清除過敏原之效應。它還涉及這種抗體於IgE介導的過敏性和非過敏性疾病治療中的應用。

【0009】 我們已經確認MEMP1972A (一種抗-M1'抗體)之第Ib和IIa期試驗的最新結果(Gauvreau et al., *Science Translation Medicine*, 2014, Vol. 6: 243ra85)，其指出藉由抑制新的IgE合成可減少IgE介導的症狀。我們推論，因為hu8D6:IgE複合物可結合至CD23，且因為CD23可表現在許多種類的細胞上(Acharya et al. *Clin. Exp. Immunol.*, 2010, 162:12-23)，hu8D6:IgE複合物吸附到細胞表面的CD23，可降低體內循環的總IgE濃度(游離的和與hu8D6結合的IgE)。此外，沿著黏膜內襯的上皮細胞能夠透過CD23依賴性胞吞轉運(CD23-dependent transcytosis)清除與細胞結合的物質(Tu et al. *Gastroenterology*, 2005, 129:928-940)，當hu8D6:IgE複合物運送至胃腸道和支氣管管道管內腔時，hu8D6可能可協助處理並移除進入的過敏原和內源性之IgE結合的自體抗原(IgE-binding autoantigens)。Hu8D6結合至與CD23結合的IgE可有效地交聯位於B淋巴球上的CD23，以造成藉由B細胞之抗原專一性IgE生成的抑制，其乃發生於藉由特定抗原活化之時。Hu8D6的上述性質可支持hu8D6和具有相同IgE結合特性的其他人源化抗體的潛在用途，能於具

有IgE介導疾病的患者身上抑制抗原專一性的IgE生成，因此能改善這些疾病病況。利用小鼠8D6抗體作為一個例子，我們已製備此抗體的人源化形式。此人源化抗體具有以上所討論的所有結合特性和生物學特性。

【0010】 參考文獻

(1) Bonita J. Rup, Larry E. Kahn, “Monoclonal antibodies against IgE-associated determinants, hybrid cell lines producing these antibodies, and use therefore” US Patent 4,940,782 (1990).

(2) Yu-Yu Shiung, Chen-Yi Chiang, Jiun-Bo Chen, Pheidias C. Wu, Alfur Fu-Hsin Hung, Donic Chien-Sheng Lu, Rong-Long Pan, Tse Wen Chang. “An anti-IgE monoclonal antibody that binds to IgE on CD23 but not on high-affinity IgE.Fc receptors, FcRn”, *Immunobiology.*, 217:676-683-9 (2012)

(3) Gail M. Gauvreau, Jeffrey M. Harris, Louis-Philippe Boulet, Heleen Scheerens, J. Mark Fitzgerald, Wendy S. Putnam, Donald W. Cockcroft, Beth E. Davis, Richard Leigh, Yanan Zheng, Barbro Dahlén, Yehong Wang, Romeo Maciucă, Irvin Mayers, X. Charlene Liao, Lawren C. Wu, John G. Matthews, Paul M. O’Byrne¹, “Targeting membrane-expressed IgE B cell receptor with an antibody to the M1 prime epitope reduces IgE production”, *Science Translation Medicine.*, Vol. 6: 243ra85 (2014)

(4) M Acharya, G Borland, A L Edkins, L M MacLellan, J Matheson, B W Ozanne, and W Cushley, “CD23/FcεRII: molecular multi-tasking”, *Clin. Exp. Immunol.*, 162(1): 12-23 (2010)

(5) Yahong Tu, Saad Salim, Jackie Bourgeois, Vincenza Di Leo, E. Jan Irvine, John K. Marshall, Mary H. Perdue, “CD23-Mediated IgE Transport

Across Human Intestinal Epithelium: Inhibition by Blocking Sites of Translation or Binding”, *Gasgastroenterology*, 129(3): p928-940(2005)

(6) Jiun-Bo Chen, Pheidias C. Wu, Alfur Fu-Hsin Hung, Chia-Yu Chu, Tsen-Fang Tsai, Hui-Ming Yu, Hwan-You Chang, and Tse Wen Chang, “Unique epitopes on C ϵ mX in IgE–B cell receptors are potentially applicable for targeting IgE-committed B cells”, *J. Immunol.*, 184: 1748-1756 (2010)

(7) Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D., “High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I”, *J. Immunol.*, 157: p221–230 (1996)

(8) Pathan NI, Chu P, Hariharan K, Cheney C, Molina A, Byrd J., “Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines”, *Blood*, 111(3):p1594-1602 (2008)

(9) Wan T, Beavil RL, Fabiane SM, Beavil AJ, Sohi MK, Keown M, Young RJ, Henry AJ, Owens RJ, Gould HJ, Sutton BJ., “The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation”, *Nature Immunol.*, 3(7):681-6 (2002)

【圖式簡單說明】

【0011】 依據附圖從以下詳細說明可對於本發明有更佳理解，在此：

第1圖顯示可變重鏈之胺基酸序列的比對，可變重鏈包含人類生殖細胞系 V_H1 - 69 和 JH4 序列 (V_H1 - 69/JH4)、小鼠抗-IgE 抗體 8D6

(mu8D6)，以及8D6-接枝人源化8D6 (hu8D6)，圖中以底線表示互補決定區(CDR)，以星號標示保留在hu8D6之鼠源V_H框架的胺基酸；

第2圖顯示可變輕鏈之胺基酸序列的比對，可變輕鏈包含人類生殖細胞系 V_κ1 - 39 和 J_κ1 序列 (V_κ1 - 39/J_κ1)、小鼠抗-IgE 抗體 8D6 (mu8D6)，以及8D6-接枝人源化8D6 (hu8D6)，圖中以底線表示互補決定區(CDR)，以星號標示保留在hu8D6之鼠源V_κ框架的胺基酸；

第3圖係利用ELISA測定之hu8D6 (實線)和親本c8D6抗體(虛線)結合至人類IgE的滴定曲線；

第4圖係利用ELISA測定之hu8D6 (實線)和嵌合8D6 (c8D6, 虛線)去與HRP結合的c8D6競爭以結合人類IgE的抑制曲線；

第5圖係利用表面電漿共振式生物分子感測器(BIAcore)分析 hu8D6 Fab對人類IgE之表面電漿共振(SPR)曲線。RU：共振單位；

第6a圖和第6b圖係利用流式細胞儀分析hu8D6和c8D6對mIgE.Fc-表現Ramos細胞株的結合，圖中mIgE.Fc_L Ramos：表現長型人類與膜結合的IgE.Fc的Ramos細胞(第6a圖)，以及mIgE.Fc_S Ramos：表現短型人類與膜結合的IgE.Fc的Ramos細胞(第6b圖)；

第7圖顯示hu8D6對IgE-飽和重組人類FcεRIα鏈的結合；

第8a圖至第8e圖顯示hu8D6對人類FcεRI-表現RBL SX-38細胞(將人類IgE預先給予人類FcεRI-表現RBL SX-38細胞)的結合；

第9圖係利用ELISA測定之hu8D6和Omalizumab與重組FcεRIα-Fc蛋白競爭以結合人類IgE的抑制曲線；

第10圖係利用流式細胞儀分析hu8D6和Omalizumab去與位於

RBL SX-38細胞上之天然FcεRI受體競爭人類IgE結合的抑制曲線；

第11圖顯示hu8D6無法活化和引發IgE-致敏化RBL SX-38細胞的去顆粒作用；

第12圖顯示hu8D6對IgE-飽和重組三聚體人類CD23的結合；

第13a圖至第13d圖顯示hu8D6對人類CD23-表現SKW6.4細胞的結合；

第14a圖至第14e圖顯示hu8D6:IgE免疫複合物無法結合至人類FcεRI-表現RBL SX-38細胞；

第15圖顯示hu8D6:IgE免疫複合物無法活化和引發IgE-致敏化RBL SX-38細胞的去顆粒作用；

第16a圖至第16d圖顯示hu8D6:IgE免疫複合物對人類CD23-表現SKW6.4細胞的結合；以及

第17a圖和第17b圖顯示Omalizumab (第17a圖)或hu8D6 (第17b圖)在體外對IgE從頭合成(*de novo* IgE synthesis)的抑制效果。

【實施方式】

【0012】 本發明係關於人源化抗體，其結合至(1)分泌游離形式的人類IgE，(2)位於B淋巴球上與膜結合的IgE，(3)位於B細胞上與CD23結合的IgE，或是(4)與溶液中游離之CD23結合的IgE。此種抗-IgE抗體不結合至位於肥大細胞和嗜鹼性球上與FcεRI結合的IgE，因此不會活化這些發炎細胞。在廣泛的定義中，人源化抗體其中重鏈和輕鏈的恆定區域以及V_H和V_L功能區塊的框架區域均為人類來源。

【0013】 利用噬菌體、酵母菌或核糖體表達單鏈抗體庫(單鏈抗體庫包含人類B淋巴球的V_H和V_L部分)的各種方法已成功地用於篩選針對人類細胞表面抗原或細胞因子的抗體。這種方法也可用來篩選具有本發明獨特IgE結合特性的人類抗體。或者，本發明抗體可以於具有人類免疫球蛋白V_H和V_L基因庫的基因轉殖小鼠中獲得。

【0014】 在一實施例中，本發明提供製備具有上述結合特性之人源化型式小鼠抗-IgE單株抗體(8D6)的詳細說明。本發明提供一種人源化抗-人類IgE抗體，hu8D6，其包含一個重鏈變異區域(SEQ ID NO: 2)和一個輕鏈變異區域(SEQ ID NO: 4)。確認hu8D6的高度變異區域的胺基酸序列如下：CDR - H1 包含 GYTFNGYWMMH (SEQ ID NO: 5)；CDR - H2 包含 YINPTTGHTTEYNQKFKD (SEQ ID NO: 6)；CDR-H3包含ARQEYRHSWFAY (SEQ ID NO: 7)；CDR-L1包含QSVDYDGDY (SEQ ID NO: 8)；CDR-L2 包含AASNLD (SEQ ID NO: 9)；CDR-L3包含QQTNEPWT (SEQ ID NO: 10)。

【0015】 本發明提供一種人源化抗-人類IgE抗體（即，hu8D6），其中此抗體於其二價型式對人類IgE的結合活性為EC₅₀≈10⁻¹⁰ M。抗體於其一價Fab型式對人類IgE的親和力為KD≈10⁻¹¹ M。

【0016】 在以下實施例中，本發明提供一種人源化抗-IgE抗體，hu8D6，其可結合至游離人類IgE (未被其兩個受體結合)、位於B淋巴球上與膜結合的IgE (長型和短型)，或是與CD23結合的IgE上，但無法結合至與FcεRI結合的IgE和引發由肥大細胞或嗜鹼性球釋放β-氨基己糖苷酶(β-hexosaminidase)。此外，hu8D6可有效地抑制IgE結合至FcεRI。Hu8D6和

人類IgE的免疫複合物可結合至CD23，但無法結合至FcεRI和引發由肥大細胞或嗜鹼性球釋放β-氨基己糖苷酶。再者，hu8D6可結合與膜結合的IgE和位於B細胞上與交聯CD23結合的IgE，且因此可於體外培養系統抑制來自人類周邊血液單核球細胞之IgE生成的從頭合成(*de novo synthesis*)。

【0017】 在本發明一範疇，人源化抗-IgE抗體（即，hu8D6），可以是全長抗體(例如，IgG分子)、抗原結合片段(例如，Fab或F(ab')₂)，或單鏈Fv。

【0018】 在本發明另一範疇，本發明人源化抗-IgE抗體，hu8D6，展現治療特性，且可提供用以治療IgE介導疾病的方法，包含投予有需要之患者有效劑量的此人源化抗-IgE抗體，在此所述之人源化抗-IgE抗體為抗體或抗原結合片段。IgE介導疾病包含過敏性氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、食物過敏、慢性自發性(特發性)蕁麻疹、慢性鼻竇炎、系統性肥大細胞增生症、皮膚肥大細胞增生症、過敏性支氣管肺麩菌病、復發性特發性血管性水腫，以及和嗜酸性球有關的腸胃疾病。值得注意的是，其中的一些疾病(例如慢性自發性蕁麻疹、系統性肥大細胞增生症，以及復發性特發性血管性水腫)並非過敏性疾病，且不涉及外部過敏原。

【0019】 【實施例】

【0020】 實施例1 人源化抗-IgE抗體的產生

【0021】 1.1 CDR接枝

【0022】 將來自8D6之V_H (SEQ ID NO: 1)和V_K (SEQ ID NO: 3)功能區塊的胺基酸序列與人類生殖細胞系V_H1-69/JH4 (SEQ ID NO: 11)和V_K1-39/Jκ1 (SEQ ID NO: 12)對偶基因做比對。為製造CDR接枝，使用接受體V_H

框架，其於四個位置M48I、R66K、V67A和S76N有別於人類生殖細胞系V_H1-69對偶基因。將互補決定區(CDRs)(其為8D6的位置第26-35個胺基酸(CDR-H1，SEQ ID NO: 5)、第50-65個胺基酸(CDR-H2，SEQ ID NO: 6)以及第93-104個胺基酸(CDR-H3，SEQ ID NO: 7))利用基因工程置入接受體V_H框架，以產生如第1圖所示8D6 V_H的直接CDR-接枝。在V_κ功能區塊，將位置為第27-34個胺基酸(CDR-L1，SEQ ID NO: 8)、第50-56個胺基酸(CDR-L2，SEQ ID NO: 9)以及第89-97個胺基酸(CDR-L3，SEQ ID NO: 10)的CDRs接枝至接受體V_κ框架，其於位置M4L有別於人類生殖細胞系V_κ1-39對偶基因(第2圖)。將8D6 V_L的直接CDR-接枝稱為hu8D6 V_L (SEQ ID NO: 4)。

【0023】 1.2 IgG製造

【0024】 為了獲得人源化8D6 (hu8D6)和嵌合8D6 (c8D6)抗體，利用Expi293™表現系統(Invitrogen)暫時表現。利用ExpiFectamine™ 293試劑(Invitrogen)於125 毫升細胞培養瓶內在30 毫升培養物中進行轉染。在轉染的前一天，以Expi293™表現培養基(Invitrogen)稀釋Expi293F™細胞至密度為 2×10^6 細胞/毫升。在轉染的當天，對培養物進行細胞計數，並利用離心將其濃縮至 2.5×10^6 細胞/毫升，移除舊的培養基，並加入新鮮的培養基。藉由將80 微升的ExpiFectamine 293於1.5 毫升的OPTI-MEM (Invitrogen)中稀釋以形成轉染複合物，並在5分鐘後加入稀釋的ExpiFectamine 293™溶液到30 微克的質體DNA中。之後將3 毫升的DNA-轉染試劑複合物溶液於室溫下培養20分鐘，並緩慢將其加入懸浮液中培養，同時緩慢地旋動細胞培養瓶。將轉染的細胞置於37°C 培養箱之迴轉式振盪器的搖床上，並培養16 小時。培養後，將150 微升的ExpiFectamine 293™轉染增強劑1和1.5 毫升

的ExpiFectamine 293™轉染增強劑2加到培養物中。在轉染後第7天終止培養並進行收集以供抗體純化。利用rProtein-A瓊脂糖凝膠™親和層析(GE Healthcare)由懸浮液純化抗體。如同利用尺寸排阻快速蛋白質液相層析(size exclusion fast protein liquid chromatography)所測定，最終產物為尺寸均一的，其具有>99%的蛋白質是以相對分子量(M_r)約150,000的單一波峰沖提出來。

【0025】 1.3 結合分析(EC_{50})

【0026】 將人類IgE的Fc區域(ϵ .Fc 2-4)(根據先前由Wan等人(*Nature Immunol.*, 2002, 3:681-686)所述的編碼系統，其起始於Ser²²⁶至Gly⁵⁹⁹，且包含兩個突變N265Q和N371Q)表現於Expi293F™細胞，並藉由利用Omalizumab偶聯之NHS-活化的瓊脂糖凝膠™樹脂(GE Healthcare)的抗-IgE免疫親和性層析加以純化。對於hu8D6的 EC_{50} 測定，將 ϵ .Fc 2-4蛋白配製於塗覆液(15 mM碳酸鈉，35 mM碳酸氫鈉，pH 9.6)中以50 奈克/孔洞的量固定於96孔盤上，並於4°C下隔夜培養。以200 微升/孔洞的測定稀釋劑(含0.5%牛血清白蛋白，0.05% Tween-20，0.01%硫柳汞的磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS))於室溫下反應1小時以封阻塗覆的孔洞。以200 微升/孔洞的洗滌緩衝液(含0.05% Tween-20的PBS)清洗微量盤三次。將100 微升的抗體稀釋液(於1:3步驟從0.1 毫克/毫升連續稀釋)加入塗覆的孔洞中。於室溫下培養2小時。吸乾所有孔洞，並以200 微升/孔洞的洗滌緩衝液清洗所有孔洞6次。將微量盤與1:10,000比例稀釋之辣根過氧化酶(HRP)結合的山羊抗-小鼠IgG-Fc抗體(Jason ImmunoResearch)培養1小時(100 微升/孔洞)。之後，以200 微升/孔洞的洗滌緩衝液清洗所有孔洞6次。最後，利用50 微升/孔洞的NeA-Blue

TMB受質(Clinical Science Products)進行呈色，且藉由加入50 微升/孔洞的1N氫氯酸終止反應。在ELISA分析儀測定於OD₄₅₀之吸光值。利用Prism軟體(GraphPad)計算EC₅₀。如第3圖所示，hu8D6和c8D6的EC₅₀為 1.48×10^{-10} 和 1.16×10^{-10} M。結果指出在CDR接枝的過程後幾乎完全地保留了hu8D6的結合活性。

【0027】 1.4 競爭分析(IC₅₀)

【0028】 執行競爭性ELISA試驗以比較hu8D6和c8D6與HRP結合的c8D6競爭對人類IgE之結合的效率，以測定hu8D6的結合特性。以隔夜培養的方式於4°C下利用配製於塗覆液之50 奈克的ε.Fc 2-4蛋白塗覆ELISA微量盤的孔洞，並將塗覆的孔洞與測定稀釋劑培養以進行封阻。另外，以1:1000之比例將HRP-c8D6的原液稀釋於測定稀釋劑中，且於1:3步驟中將溶液與從0.1 毫克/毫升連續稀釋之未結合的c8D6或hu8D6混合。將這兩個系列的混合物加至ELISA的孔洞中，並在室溫下培養1小時。然後利用PBST洗滌孔洞，將孔洞與TMB培養，並測定其OD₄₅₀。利用Prism軟體計算IC₅₀。如第4圖所示，未結合的hu8D6和c8D6的IC₅₀為 1.79×10^{-9} 和 2.28×10^{-9} M。結果指出hu8D6和8D6結合至相同的抗原表位。

【0029】 1.5 利用表面電漿共振(SPR)分析測定KD

【0030】 為了產生hu8D6 Fab，將hu8D6抗體V_H和V_K之DNA片段的cDNAs分別地連接至Fab表現載體之人類Cγ1-CH1功能區塊和人類Cκ區域，此Fab表現載體是來自pIgG1(κ)載體，利用Cγ1-CH1功能區塊取代整個Cγ1恆定區域修飾而成(Chen et al. *J Immunol.* 184:1748-1756)。利用Expi293™表現系統(Invitrogen)供暫時表現。利用KappaSelect瓊脂糖凝膠™

親和層析(GE Healthcare)由懸浮液純化Hu8D6 Fabs。如同利用尺寸排阻快速蛋白質液相層析所測定，最終產物為尺寸均一的，其具有>99%的蛋白質是以相對分子量(M_r)約50,000的單一波峰沖提出來。

【0031】 對hu8D6的KD測定而言，SPR測定是利用Biacore X儀器(GE Healthcare)進行。利用氨基偶聯試劑盒(GE Healthcare)將Hu8D6 Fab固定於CM5晶片(GE Healthcare)上。偶聯密度限制於<500共振單位。於流速為30 微升/分鐘下，將配製於HBS-P緩衝液(GE Healthcare)中濃度為25、12.5、6.25 和 3.125 nM之 ϵ .Fc 2-4蛋白注射到感測晶片上。將所有樣品注射至流路(flow cell)中達120秒，其於25 °C下具有720秒的解離時間。利用10 mM glycine-HCl (pH 2.5)之兩次為時30秒的注入執行感測器表面的再生。 ϵ .Fc 2-4於不同濃度下結合至固定的hu8D6 Fab的聲譜圖(sonograms)如第5圖所示。利用BIAevaluation軟體(GE Healthcare)計算親和力和速率常數，顯示hu8D6 Fab對 ϵ .Fc 2-4之結合速率(k_{on})和解離速率(k_{off})為 $1.23 \pm 0.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 $5.79 \pm 0.03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ，導致hu8D6的KD為 $4.8 \pm 0.7 \times 10^{-11} \text{ M}$ 。

【0032】 1.6 流式細胞儀(FACS)分析

【0033】 以編碼mIgE.Fc_L (細胞膜 ϵ 鏈之長型的C_H2-細胞質尾端)或mIgE.Fc_S (細胞膜 ϵ 鏈之短型的C_H2-細胞質尾端)之重組DNA轉染的Ramos細胞株是由Chen等人產生(Chen et al. *J Immunol.* 184:1748-1756)，並用以測定hu8D6的結合活性。以細胞密度為 2×10^6 細胞/毫升，將表現mIgE.Fc_L或mIgE.Fc_S的Ramos細胞再懸浮於流式細胞緩衝液(FACS buffer)(含1%胎牛血清和0.1%疊氮化鈉的1x PBS)。將於 100 微升流式細胞緩衝液中的 2×10^5 細胞與10、1、0.1、0.01和0.001 微克/毫升的hu8D6和c8D6於冰上培養30分鐘，

之後以流式細胞緩衝液洗滌。利用對人類IgG-Fc具有專一性之FITC標誌的山羊IgG (Caltag Laboratories)偵測結合的抗體。以FACSCanto II流式細胞儀 (BD Biosciences)分析染色的細胞。利用FCSExpress軟體(DeNono software)分析抗體對Ramos細胞株結合之螢光強度的幾何平均。利用Prism軟體計算EC₅₀。如第6a圖和第6b圖所示，hu8D6和c8D6對mIgE.Fc_L-表現Ramos細胞結合之EC₅₀為 2.21×10^{-10} 和 2.0×10^{-10} ，且hu8D6和c8D6對mIgE.Fc_S-表現Ramos細胞之EC₅₀為 3.86×10^{-10} 和 3.0×10^{-10} 。結果指出hu8D6和c8D6對兩個mIgE同型異構物的結合活性大致相等。

【0034】 實施例2 Hu8D6無法結合至與人類FcεRI結合的IgE

【0035】 2.1 Hu8D6無法結合至IgE-飽和的重組人類FcεRI的α鏈

【0036】 利用ELISA測定hu8D6對固相重組FcεRIα融合蛋白(huFcεRIα-huFcγ1，稱為FcεRIα-Fc)的結合，其由人類FcεRIα的細胞外區域(從Val²⁶至Leu²⁰⁴)和人類γ1的絞鏈-C_{H2}-C_{H3}部分構成(Shiung et al., *Immunobiology*, 2012, 217:676-683)。利用FreeStyl™ 293F系統(Invitrogen)表現FcεRIα-Fc蛋白質，並以蛋白質A層析加以純化。利用於4°C下隔夜培養的方式，以2 微克/毫升的FcεRIα-Fc塗覆ELISA微量盤的孔洞，並利用測定稀釋劑(含0.5%牛血清白蛋白，0.05% Tween-20，0.01%硫柳汞的PBS)於室溫下處理1小時。之後以1 微克/毫升IgE (IgE是利用抗-IgE層析由U266細胞的培養基中純化出來)使塗覆的FcεRIα-Fc蛋白飽和。在以洗滌緩衝液洗滌孔洞6次後，將捕獲的IgE與10、1、0.1以及0.01 微克/毫升的人類IgE (Sigma)、hu8D6、c8D6、Omalizumab和小鼠抗-人類IgE單株抗體5H2 (AbD Serotec)

進行培養。利用HRP結合的山羊抗-人類kappa輕鏈(GeneTex)和HRP結合的山羊抗-小鼠IgG.Fc (Jackson ImmunoResearch)偵測結合的人類IgE和小鼠IgG。人源化8D6、c8D6和Omalizumab不結合至IgE-飽和的重組FcεRIα融合蛋白，然而5H2於所有濃度下並非如此(如第7圖所示)。

【0037】 2.2 Hu8D6無法結合至位於嗜鹼性球上的IgE

【0038】 使用RBL SX-38細胞，其為轉置編碼人類FcεRI之α、β和γ鏈基因的大鼠嗜鹼性白血病細胞(Wiegand et al., *J. Immunol.*, 1996, 157:221-230)，以作為細胞表面FcεRI的儲庫。將配製於1 毫升流式細胞緩衝液之 2×10^6 RBL SX-38細胞與3 微克/毫升之IgE於冰上培養30分鐘。利用流式細胞緩衝液洗滌細胞以移除未結合的IgE，且之後將配製於100 微升流式細胞緩衝液之 2×10^5 細胞與10 微克/毫升之hu8D6、c8D6、Omalizumab和5H2抗體於冰上培養30分鐘，之後利用流式細胞緩衝液洗滌。利用對人類IgG-Fc或FITC標誌的F(ab)₂兔抗-小鼠IgG具有專一性之FITC標誌的山羊IgG (AbD Serotec)偵測結合的抗體。以FACSCanto II流式細胞儀分析染色的細胞。如第8a圖至第8e圖所示，人源化8D6、c8D6和Omalizumab無法結合至IgE-飽和的RBL SX-38細胞，且5H2可結合至RBL SX-38細胞。

【0039】 2.3 對FcεRIα-Fc蛋白的競爭分析

【0040】 執行競爭性ELISA試驗以比較hu8D6和Omalizumab與HRP結合的IgE競爭對FcεRIα-Fc蛋白之結合的效率(Shiung et al)。以隔夜培養的方式於4°C下利用配製於塗覆液之100 奈克的U266 IgE蛋白塗覆ELISA微量盤的孔洞，並將塗覆的孔洞與測定稀釋劑(含0.5%牛血清白蛋白，0.05% Tween-20，0.01%硫柳汞的PBS)培養以進行封阻。另外，以1:6000之比例將

HRP-IgE的原液稀釋於測定稀釋劑中，且於1:3步驟中將溶液與從0.1 毫克/毫升連續稀釋之未結合的hu8D6或Omalizumab混合。將這兩個系列的混合物加至ELISA的孔洞中，並在室溫下培養1小時。然後利用PBST洗滌孔洞，將孔洞與TMB培養，並測定其OD₄₅₀。利用Prism軟體計算IC₅₀。以目標為人類HER2蛋白之Trastuzumab (Herceptin™)作為陰性對照組，其並不會抑制IgE對FcεRIα-Fc之結合。如第9圖所示，hu8D6和Omalizumab用以抑制IgE結合至FcεRIα-Fc的IC₅₀為9.4和25.9 x 10⁻¹⁰ M，其指出hu8D6於抑制IgE結合至其受體之能力上優於Omalizumab。

【0041】 2.4 對細胞表面FcεRI的競爭性分析

【0042】 將配製於0.1 毫升流式細胞緩衝液之2 x 10⁵ RBL SX-38細胞與不同濃度(濃度為45、30、13.3、8.9、5.93、3.95、2.63、1.76、1.17、0.78、0.52和0.35 微克/毫升)之hu8D6、Omalizumab或Trastuzumab，以及FITC-標誌的IgE (濃度為4.5 微克/毫升)，於冰上培養30分鐘。利用流式細胞緩衝液洗滌細胞以移除未結合的IgE。以FACSCanto II流式細胞儀分析染色的細胞。利用Prism軟體計算IC₅₀。Trastuzumab並不會影響IgE對SX-38細胞之結合。如第10圖所示，hu8D6和Omalizumab用以抑制IgE結合至SX-38細胞的IC₅₀為18.8 x 10⁻⁹和24.7 x 10⁻⁹ M，其指出hu8D6於抑制IgE結合至FcεRI-表現細胞之能力上優於Omalizumab。

【0043】 實施例3 Hu8D6無法使RBL SX-38細胞致敏化

【0044】 利用測定β-氨基己糖苷酶(一種儲存於顆粒的溶解體酵素)釋放進入培養基中的量，以評估去顆粒作用的程度。以隔夜培養之方式於

37 °C下，以於0.5 毫升培養基內含有 3×10^5 細胞/孔洞的量將RBL SX-38細胞接種培養於24孔盤。在第二天，移除培養基，並加入內含1 微克/毫升人類IgE之0.25 毫升預熱的培養基至每一孔洞中。在於37 °C培養箱培養2小時後，每個孔洞利用0.5 毫升的Tyrode's緩衝液(含135 mM氯化鈉，5 mM氯化鉀，5.6 mM葡萄糖，1.8 mM氯化鈣，1 mM氯化鎂，20 mM HEPES以及0.5 毫克/毫升牛血清白蛋白，pH 7.3)清洗兩次，且之後加入含10、1、0.1或0.01 微克/毫升抗體或1% Triton X-100之0.25 毫升預熱的Tyrode's緩衝液。在於37 °C培養箱培養30分鐘後，收集上清液並於室溫下以300xg離心5分鐘，且從每個孔洞中將50 微升清澈的上清液移至新的96 孔黑色Optiplate™ (Perkin-Elmer)的孔洞中。將50 微升的受質溶液(80 μ M的4-MUG ((4-甲基繖形酮-N-乙酰-d -氨基葡萄糖苷)，Sigma)配製於0.1 M檸檬酸緩衝液(pH 4.5)中)加入每一孔洞中，並將微量盤置於37°C培養1小時。可藉由加入100 微升甘胺酸緩衝液(0.2 M甘胺酸，0.2 M氯化鈉，pH 10.7)終止反應。利用Victor™ 3螢光讀取器(Perkin-Elmer)於每一孔洞上方測定所得螢光(以波長355 奈米激發；紀錄發散波長460 奈米之螢光強度)。以相對於100%釋放之數值(利用1% Triton X-100溶解細胞以提供此數值)的百分比表示測量值。人源化8D6、c8D6和Omalizumab並不會引發IgE-致敏化的RBL SX-38細胞的去顆粒作用，但5H2會引發所述作用(第11圖)。

【0045】 實施例4 Hu8D6可結合與人類CD23結合的IgE

【0046】 4.1 Hu8D6可結合IgE-飽和的重組三聚體人類CD23

【0047】 利用ELISA測定hu8D6對固相重組人類CD23融合蛋白(ILZ-

CD23)的結合，重組人類CD23融合蛋白包含人類CD23之氨基端異白胺酸拉鍊(isoleucine zipper (ILZ))和細胞外區域(從Asp⁴⁸至Ser³²¹)，並透過ILZ模組(ILZ motif)形成非共價三聚體(Shiung et al., *Immunobiology*, 2012, 217:676-683)。利用FreeStyle™ 293F系統表現多聚組胺酸標籤(polyhistidine-tagged)的ILZ-CD23，並以鎳瓊脂糖凝膠™層析(GE Healthcare)由轉染培養基加以純化，且之後保存於具有2 mM氯化鈣之1x HBSS緩衝液中。將5 微克/毫升的純化ILZ-CD23塗覆於ELISA微量盤並封阻，且以配製於Ca²⁺/Mg²⁺測定稀釋劑(含1 mM氯化鈣，0.5 mM氯化鎂，0.5%牛血清白蛋白，0.05% Tween-20和0.01%硫柳汞的PBS)中濃度為3 微克/毫升的純化人類IgE使塗覆的ILZ-CD23飽和。在以洗滌緩衝液洗滌孔洞6次後，於Ca²⁺/Mg²⁺測定稀釋劑中，將捕獲的IgE與10、1、0.1以及0.01 微克/毫升的hu8D6、c8D6、Omalizumab和5H2進行培養。利用HRP結合的山羊抗-人類IgG.Fc和HRP結合的山羊抗-小鼠IgG.Fc偵測結合的人類IgG和小鼠IgG。如第12圖所示，相較於同型對照組人類IgG抗體，人源化8D6、c8D6和5H2抗體可結合至塗覆於固相表面之人類IgE-飽和的重組CD23，然而Omalizumab並無結合活性。

【0048】 4.2 Hu8D6可結合至IgE-沖擊致敏的(IgE-pulsed) SKW6.4 B 細胞

【0049】 將CD23高表現量的人類B細胞株(Pathan et al., *Blood*, 2008, 111:1594-1602)與IgE一起培養，以沖擊致敏(pulse) CD23。將配製於1 毫升之Ca²⁺/Mg²⁺流式細胞緩衝液(含1mM氯化鈣，0.5 mM氯化鎂，1%胎牛血清和0.1%疊氮化鈉的1X PBS)中的2 x 10⁶ SKW6.4細胞與3 微克/毫升之IgE於冰上培養30分鐘。將以Ca²⁺/Mg²⁺流式細胞緩衝液洗滌的細胞與10 微克/毫

升的 hu8D6 、 c8D6 、 Omalizumab 和 抗 -CD23 抗體 (Clone: EBVCS2, eBioscience) 於冰上培養30分鐘，之後以 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 流式細胞緩衝液洗滌細胞。利用對人類IgG-Fc或FITC標誌的F(ab)₂兔抗-小鼠IgG具有專一性之FITC標誌的山羊IgG偵測結合的抗體。以FACSCanto II流式細胞儀分析染色的細胞。發現抗-CD23可良好地結合至SKW6.4 B細胞上以作為陽性對照組。如第13a圖至第13d圖所示，Omalizumab對與CD23結合之IgE的結合受到妨礙，然而hu8D6和c8D6可有效地結合至位於SKW6.4細胞上的IgE。

【0050】 實施例5 Hu8D6和IgE的免疫複合物無法結合至人類FcεRI

【0051】 5.1 Hu8D6和IgE的免疫複合物的製備

【0052】 將純化的人類IgE (分子量約190 kDa)、hu8D6、c8D6、Omalizumab和5H2 (分子量約150 kDa)以1X PBS稀釋至濃度為1 毫克/毫升。藉由混合95 微升之1 毫克/毫升的人類IgE和75 微升之1 毫克/毫升的抗-IgE單株抗體，以製備包含抗-IgE:IgE免疫複合物之混合物。於室溫下培養此混合物2小時並供進一步的使用。

【0053】 5.2 Hu8D6和IgE的免疫複合物無法結合至RBL SX-38細胞

【0054】 將配製於100 微升流式細胞緩衝液中之 2×10^5 RBL SX-38 細胞與10 微克/毫升之hu8D6:IgE、c8D6:IgE、Omalizumab:IgE和5H2:IgE免疫複合物於冰上培養30分鐘，之後以流式細胞緩衝液洗滌細胞。利用對人類IgG-Fc或FITC標誌的F(ab)₂兔抗-小鼠IgG具有專一性之FITC標誌的山羊IgG偵測結合的抗體。以FACSCanto II流式細胞儀分析染色的細胞。如第14a圖至第14e圖所示，hu8D6:IgE、c8D6:IgE和Omalizumab:IgE免疫複合物無法

結合至RBL SX-38細胞，但是抗-FcεRI和5H2:IgE可結合至RBL SX-38細胞。

【0055】 5.3 Hu8D6和IgE的免疫複合物無法活化RBL SX-38細胞

【0056】 以隔夜培養方式於37 °C培養箱內，以於0.5 毫升培養基內含 3×10^5 RBL SX-38細胞的量接種培養於24孔盤。在第二天，利用0.5 毫升的Tyrode's緩衝液清洗每個孔洞兩次，且之後加入內含10 微克/毫升抗-IgE:IgE免疫複合物或1% Triton X-100之0.25 毫升預熱的Tyrode's緩衝液。在37°C下培養30分鐘後，收集上清液並於室溫下以300xg離心5分鐘，且從每個孔洞中將50 微升清澈的上清液移至新的96 孔黑色Optiplate™ (Perkin-Elmer)的孔洞中。將50 微升的4-MUG受質溶液加入每一孔洞中，並將微量盤置於37°C培養1小時。可藉由加入100 微升甘胺酸緩衝液終止反應。如第15圖所示，hu8D6:IgE、c8D6:IgE和Omalizumab:IgE免疫複合物不會引發RBL SX-38細胞的去顆粒作用，但是5H2:IgE會引發所述作用。

【0057】 實施例6 Hu8D6和IgE的免疫複合物能夠結合至人類CD23

【0058】 將配製於100 微升之 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 流式細胞緩衝液中的 2×10^5 SKW6.4細胞與10 微克/毫升之hu8D6:IgE、c8D6:IgE、Omalizumab:IgE免疫複合物和抗-CD23於冰上培養30分鐘，之後以 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 流式細胞緩衝液洗滌細胞。利用對人類IgG-Fc或FITC標誌的F(ab)'₂兔抗-小鼠IgG具有專一性之FITC標誌的山羊IgG偵測結合的抗-IgE:IgE免疫複合物。以FACSCanto II流式細胞儀分析染色的細胞。如第16a圖至第16d圖所示，Omalizumab:IgE免疫複合物無法結合至表面CD23，然而hu8D6:IgE、c8D6:IgE免疫複合物和抗-CD23可有效地結合至SKW6.4細胞。

【0059】 實施例7 Hu8D6能夠抑制PBMCs的IgE生成

【0060】 利用離心透過Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare)密度梯度純化健康的供血者或特異反應性患者之血液樣本中的周邊血液單核球細胞(PBMCs)。將分離的PBMCs以 10^6 細胞/毫升量懸浮於含100 奈克/毫升人類IL-4 (R&D systems)和100 奈克/毫升小鼠抗-CD40單株抗體(BioLegend, clone: G28-5)的完全IMDM培養基(Invitrogen)中。將10 微克/毫升之人源化8D6、Omalizumab和Trastuzumab加入培養基中。分別於第7、11和14天培養後，收集無細胞上清液(cell-free supernatants)並儲存於-20°C。藉由利用捕獲抗體(抗-人類IgE、HP6061 (Abcam))和偵測抗體(生物素標誌的抗-人類IgE、HP6029 (Abcam))的ELISA測定釋放進入上清液中的IgE。簡而言之，將HP6061以配製於塗覆液(15 mM碳酸鈉，35 mM碳酸氫鈉，pH 9.6)中100 奈克/孔洞的量固定於96孔盤上，並於4°C下隔夜培養。以200 微升/孔洞的測定稀釋劑(含0.5%牛血清白蛋白，0.05% Tween-20，0.02%液體生物防腐劑ProClin 300的PBS)於室溫下反應1小時以封阻塗覆的孔洞。以200 微升/孔洞的洗滌緩衝液(含0.05% Tween-20的PBS)清洗微量盤三次。利用純化的U266 IgE以產生標準曲線(兩倍連續稀釋範圍由800至3.125 奈克/毫升)。為改善IgE定量的準確性，於完全IMDM培養基中製備IgE標準品，並摻有10 微克/毫升的hu8D6、Omalizumab或Trastuzumab。將100 微升清澈的上清液和標準品加入塗覆的孔洞中。於室溫下培養1小時。吸乾所有孔洞，並以200 微升/孔洞的洗滌緩衝液清洗所有孔洞6次。將捕獲的IgE與100 微升的偵測抗體溶液(含50 奈克/毫升之生物素標誌的HP6029的測定稀釋劑)於室溫下培

養1小時。之後，為時1小時，利用鏈抗生物素蛋白(streptavidin) poly-HRP (1:10,000稀釋，Thermo Pierce) (100 微升/孔洞)偵測結合的生物素-HP6029。吸乾所有孔洞，並以200 微升/孔洞的洗滌緩衝液清洗所有孔洞6次。最後，利用100 微升/孔洞的NeA-Blue TMB受質(Clinical Science Products)進行呈色，且藉由加入100 微升/孔洞的1M硫酸終止反應。藉由利用SoftMax Pro軟體(Molecular Devices)以產生的4-參數羅吉特曲線擬合(four parameter logistic curve-fit)而產出標準曲線，並用其計算在所有試驗樣本中的IgE濃度。藉由Prism軟體使用司徒頓t檢驗(Student t tests)比較數據。如第17a圖和第17b圖所示，分別於7、11和14天培養中，培養開始之濃度為10 毫克/毫升的hu8D6可使培養物IgE濃度減少了88.1%、93.4 %和88.6%，然而Omalizumab可使IgE濃度減少了21.3%、26.4%和30%。於抑制IgE從頭合成上，此結果指出hu8D6結合與膜結合的IgE和位於B細胞上與CD23結合的IgE的能力優於Omalizumab (Omalizumab不會結合已被CD23結合的IgE)。

【0061】 所有說明書中所揭示之發明技術特點可以任意方式組合。說明書中揭示之每一技術特點可以提供相同、等同或相似目的之其他方式替換。因此，除非另有特別說明，文中所有揭示之特點均只是等同或相似特點之一般系列之實例。

【0062】 由上述可知，熟習此技藝者能輕易地了解本發明之必要特徵，在不脫離其精神與範圍之下能就本發明做許多改變與調整以應用於不同用途與條件。

【符號說明】 無。

【序列表】

序列表

<110> 中央研究院

<120> 交聯B淋巴球之CD23但不致敏肥大細胞的人源化抗-IgE抗體

<130> P2880-TW

<150> US62013196

<151> 2014-06-17

<160> 12

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 鼠屬(Mus sp.)

<220>

<223> 衍生自8D6融合瘤之重鏈的變異區域

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Met	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Gly	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Asp	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Thr	Thr	Gly	His	Thr	Glu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Ile	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gln	Glu	Tyr	Arg	His	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
		115													

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人源化的重鏈變異區域

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Glu Tyr Arg His Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> 鼠屬(Mus sp.)

<220>

<223> 衍生自8D6融合瘤之輕鏈的變異區域

<400> 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Met Asn Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 4

<211> 111

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化的輕鏈變異區域

<400> 4
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30
Gly Asp Thr Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn
85 90 95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 鼠屬(Mus sp.)

<220>
<223> 衍生自mu8D6抗體重鏈的互補決定區1

<400> 5
Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 鼠屬(Mus sp.)

<220>
<223> 衍生自mu8D6抗體重鏈的互補決定區2

<400> 6
Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

1

5

<210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <223> 人類免疫球蛋白基因的生殖細胞系VH1-69/JH4序列

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <223> 人類免疫球蛋白基因的生殖細胞系Vk1-39/Jk1序列

<400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Trp Thr
85
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

申請專利範圍

1. 一種人源化抗體，其結合至游離的 IgE、位於 B 淋巴球上與膜結合的 IgE、或是與 CD23 結合的 IgE，而非與 FcεRI 結合的 IgE。
2. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其可交聯位於 B 淋巴球上之與 IgE 結合的 CD23。
3. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體可減少藉由 B 淋巴球所生成的總 IgE 量。
4. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體可減少藉由抗原活化的 B 淋巴球所生成之抗原專一性的 IgE。
5. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體可減少以該人源化抗體治療之患者生成 IgE。
6. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體為一抗原結合片段。
7. 如請求項 6 所述之人源化抗體，其中該抗原結合片段為 Fab、F(ab')₂ 或單鏈 Fv。
8. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體之 V_H 和 V_L 衍生自人類 B 淋巴球。
9. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體具有小鼠 8D6 抗體之 IgE 結合特性。
10. 如請求項 1 所述之人源化抗體，其中該抗體包含一重鏈變異區域(V_H)，其包含與 SEQ ID NO:2 相同的一胺基酸序列，或 SEQ ID NO:2 之一或多個框架區域之一或多個突變所構成之與 SEQ ID NO:2 具有至少 90%相似性的一胺基酸序列；以及一輕鏈變異區域(V_L)，其包含與 SEQ ID NO:4

相同的一胺基酸序列，或 SEQ ID NO:4 之一或多個框架區域之一或多個突變所構成之與 SEQ ID NO:4 具有至少 90%相似性的一胺基酸序列。

11. 如請求項 10 所述之人源化抗體，其中該 V_H 的高度變異區域位於第 26-35 個胺基酸(CDR-H1; SEQ ID NO: 5)、第 50-65 個胺基酸(CDR-H2; SEQ ID NO: 6)，以及第 93-104 個胺基酸(CDR-H3; SEQ ID NO: 7)。

12. 如請求項 10 所述之人源化抗體，其中 V_L 的高度變異區域位於第 27-34 個胺基酸(CDR-L1; SEQ ID NO: 8)、第 50-56 個胺基酸(CDR-L2; SEQ ID NO: 9)，以及第 89-97 個胺基酸(CDR-L3; SEQ ID NO: 10)。

13. 一種醫藥組成物，包含如請求項 1 所述之人源化抗體以及其之一藥物學上可接受的載體。

14. 一種以如請求項 1 所述之人源化抗體，來製備用以治療一 IgE 介導疾病之藥學組成物之用途。

15. 如請求項 14 所述之用途，其中該 IgE 介導疾病為過敏性氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎、食物過敏、慢性自發性(特發性)蕁麻疹、慢性鼻竇炎、系統性肥大細胞增生症、皮膚肥大細胞增生症、過敏性支氣管肺麴菌病、復發性特發性血管性水腫，以及和嗜酸性球有關的腸胃疾病。

16. 如請求項 14 所述之用途，其中該抗體可結合至 IgE、與膜結合的 IgE，或是與 CD23 結合的 IgE；但無法結合至與 FcεRI 結合的 IgE 與引發肥大細胞和嗜鹼性球的去顆粒作用。

17. 如請求項 14 所述之用途，其中該抗體與 IgE 的免疫複合物可結合至 CD23 並交聯 CD23；但無法結合至 FcεRI 與引發肥大細胞和嗜鹼性球的去顆粒作用。

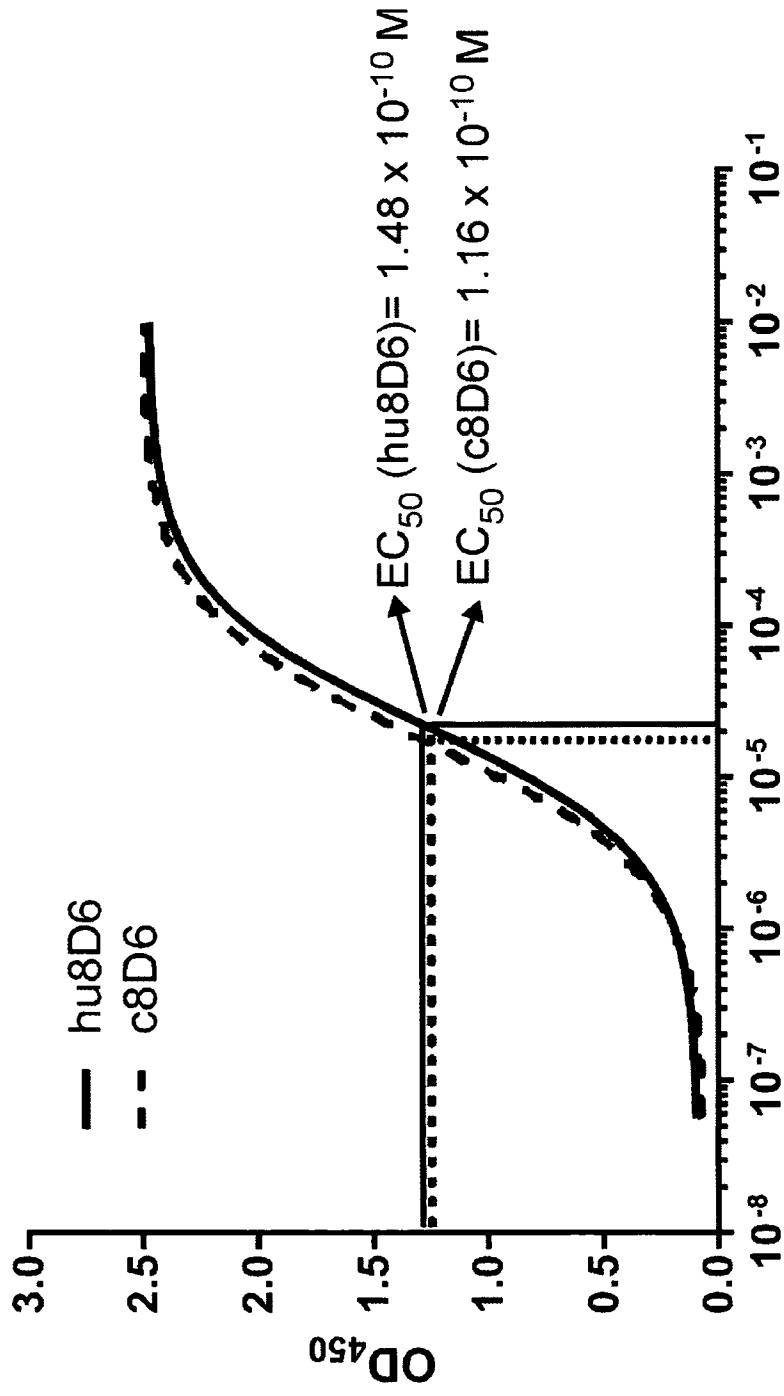
	1	10	20	30	40	50
V_H1-69/J_H4	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVVRQAPGGQGLEWMGG					
$\mu_8D6 V_H$	QVQLQQSGAE LAKPGASV MLSCKASGYTFNGYWMHWVKQRPQDLEWIGY					
$hu8D6 V_H$	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYTFNGYWMHWVRQAPGGQGLEWIGY					*
	51a	60	70	80	abc	90
V_H1-69/J_H4	IIPIFGTANYAQQKFKDGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR--					
$\mu_8D6 V_H$	INPTTGHTTEYNQKFKDKATLTADESSNTAYIELSSLTSDDSAVYYCARQE					
$hu8D6 V_H$	INPTTGHTTEYNQKFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQE					
		**	*	*		
	100	110				
V_H1-69/J_H4	----	YFDYWGQGLVTVSS	(SEQ ID NO: 11)			
$\mu_8D6 V_H$	YRHSWFAYWGQGLVTVSA	(SEQ ID NO: 1)				
$hu8D6 V_H$	YRHSWFAYWGQGLVTVSS	(SEQ ID NO: 2)				

圖式

第1圖

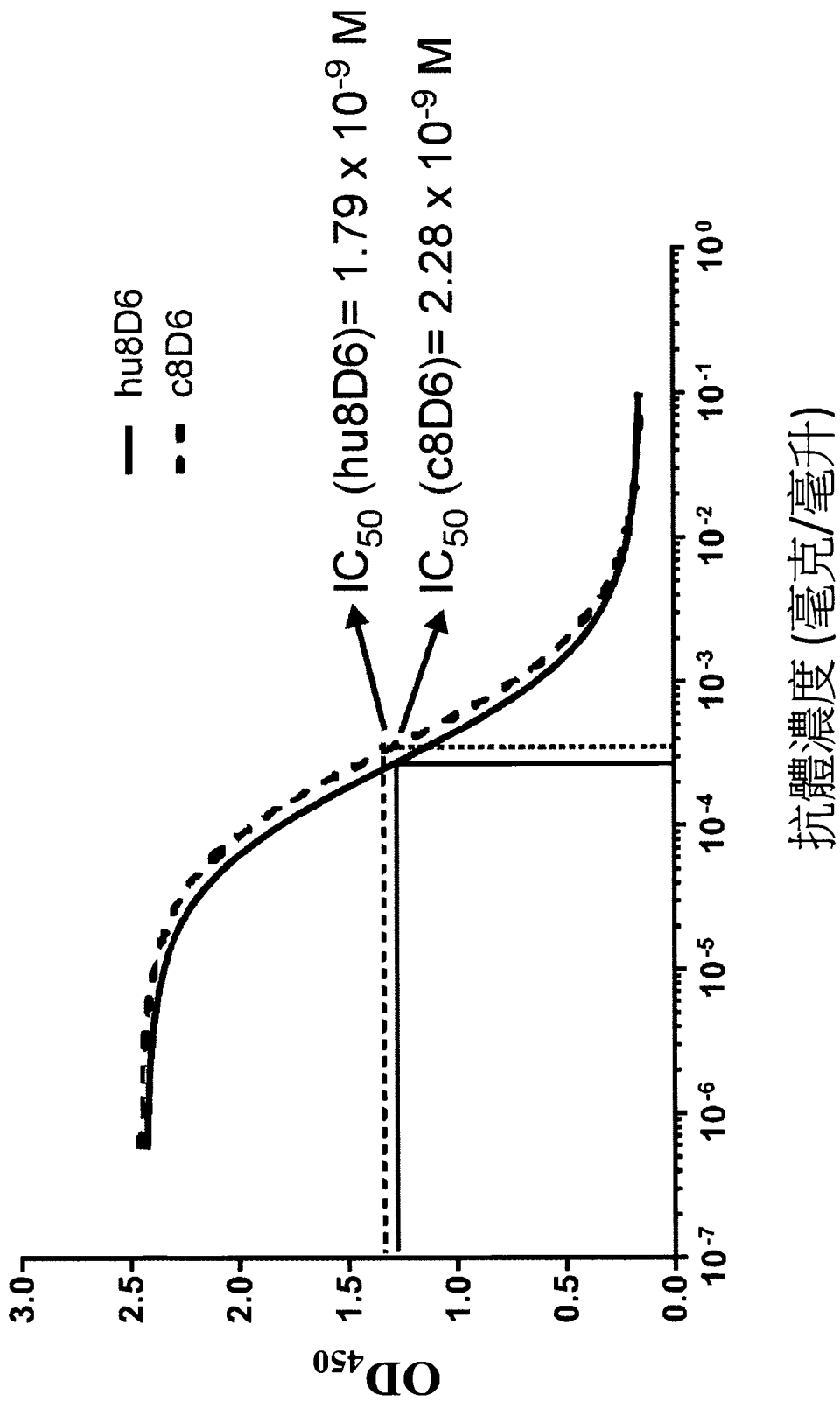
	1	10	20	abcd	30	40
V_k1-39/J_k1	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVTTTCRASQ	ISIS---	<u>SYLNWYQQKPGKAPKL</u>		
mu8D6 V_k	DIVLTQSPASLAVSLGQR	ATISCKASQ	SVDYDGD	<u>TYMWNWYHQKPGQPPKL</u>		
hu8D6 V_k	DIQLTQSPSSLSASVGD	RVTTTCRASQ	SVDYDGD	<u>TYMWNWYQQKPGKAPKL</u>		
				*		
	50	60	70	80	90	
V_k1-39/J_k1	LIYAASSLQSGVPSRF	SGSGGTDF	TLTISSLQ	PEDFATY	<u>CQQS-YSTW</u>	
mu8D6 V_k	LIYAASNLD	SGIPARFSG	SGGTDF	TLNIHPV	<u>EEEDAATY</u>	<u>CQQTNE</u>
hu8D6 V_k	LIYAASNLD	SGVPSRF	SGSGGTDF	TLTISSLQ	PEDFATY	<u>CQQTNE</u>
	100	107				
V_k1-39/J_k1	TFGQG	TKVEIKR	(SEQ	ID NO:	12)	
mu8D6 V_k	TFGGG	TKLEIKR	(SEQ	ID NO:	3)	
hu8D6 V_k	TFGQ	TKVEIKR	(SEQ	ID NO:	4)	

第2圖

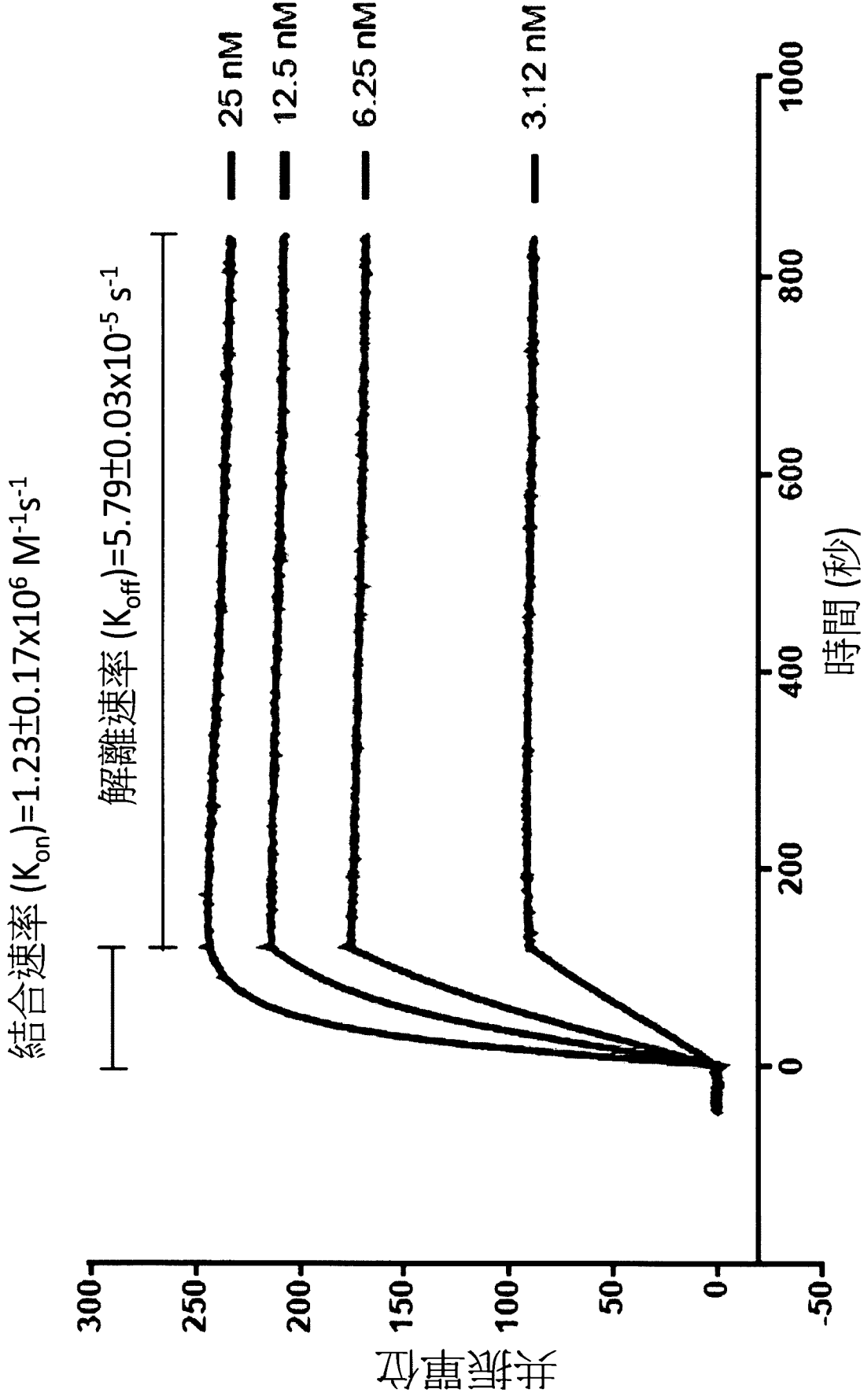


抗體濃度 (毫克/毫升)

第3圖

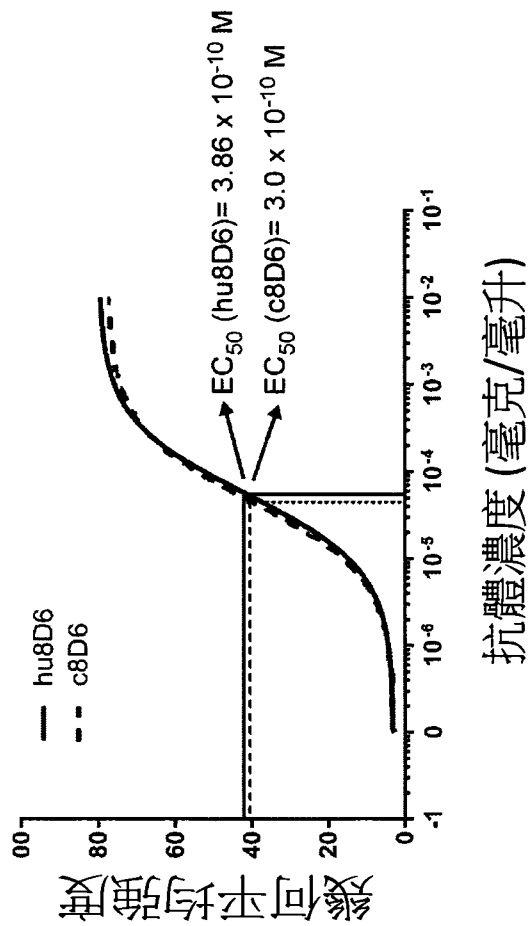


第4圖



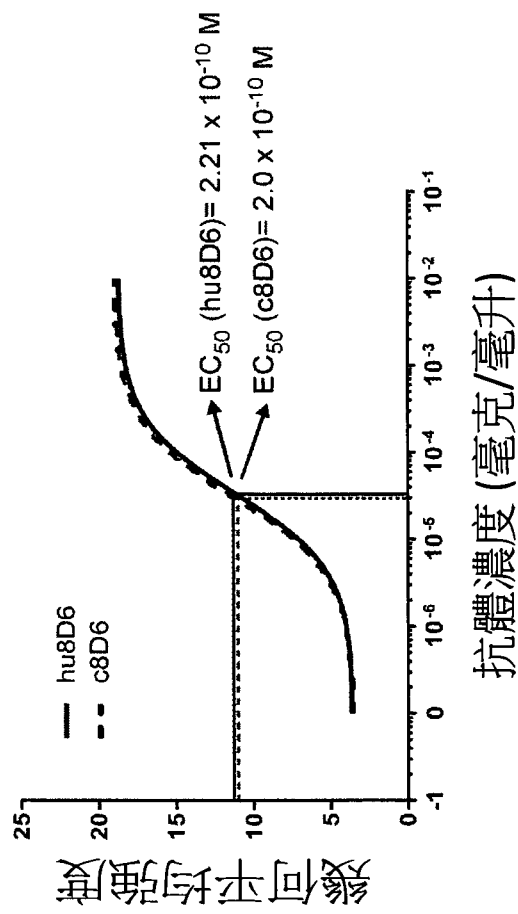
第5圖

mlgE.Fc_s Ramos細胞

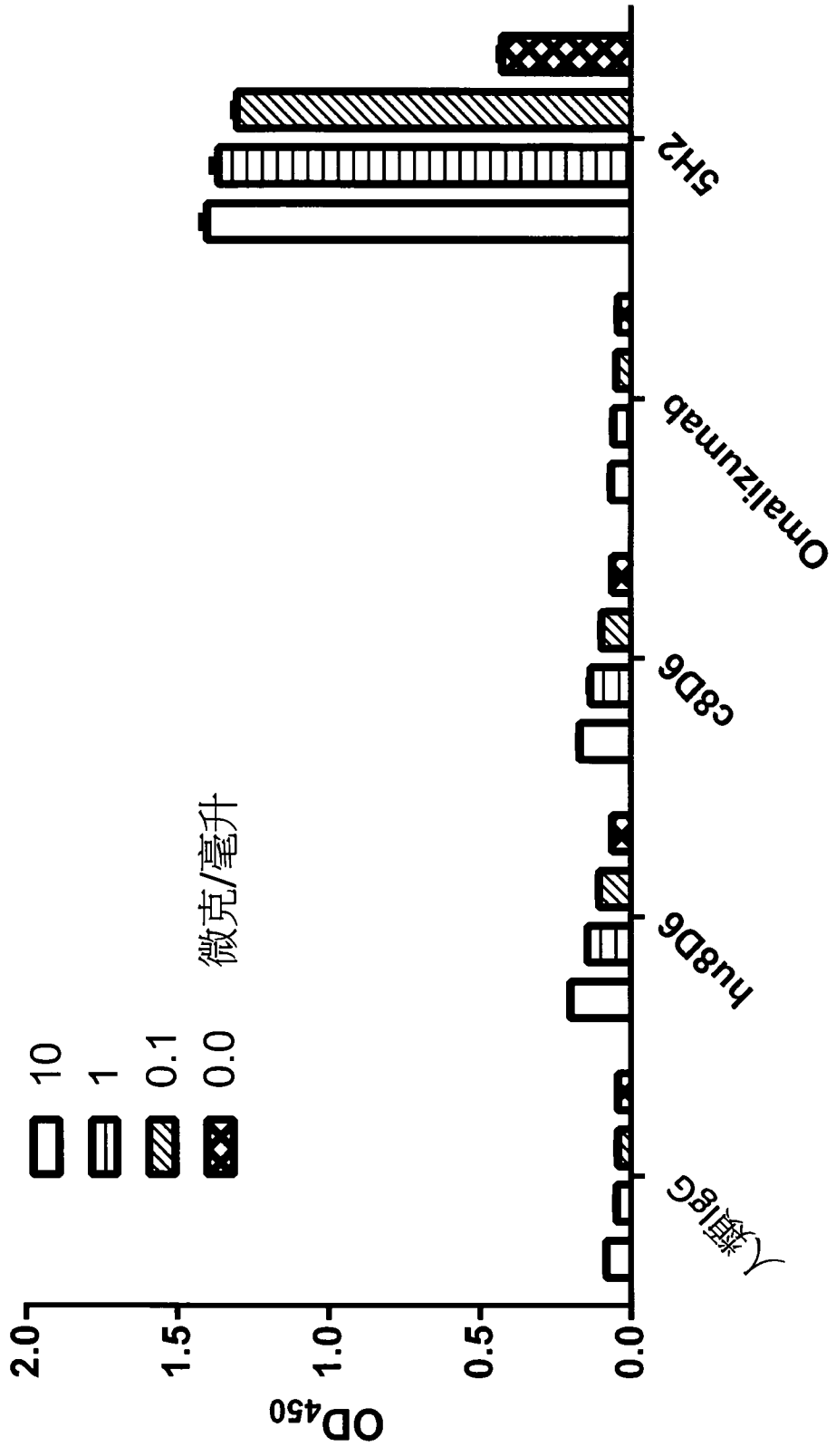


第6b圖

mlgE.Fc_L Ramos細胞

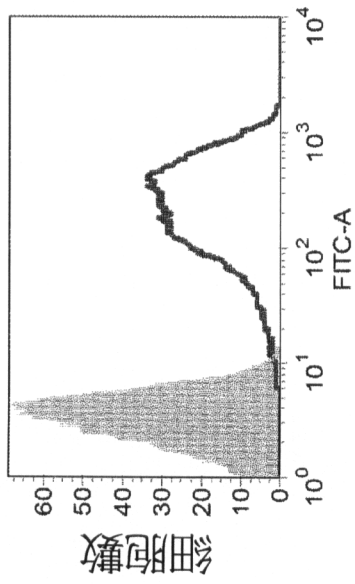


第6a圖



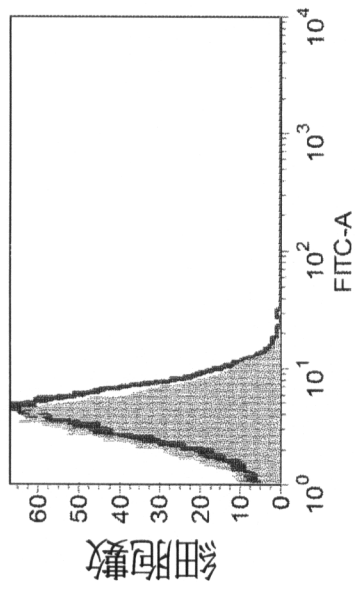
第7圖

抗-FcεR1α



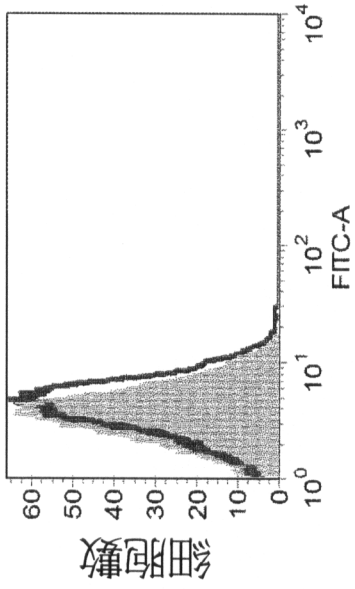
第8a圖

c8D6



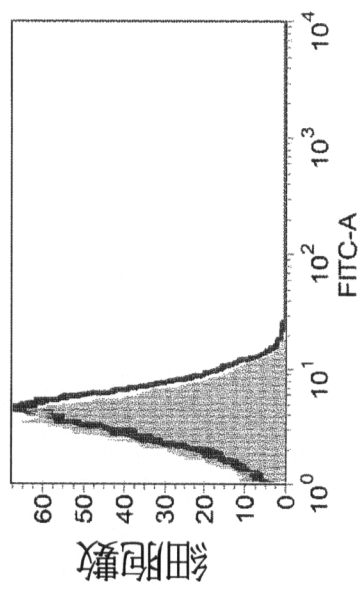
第8b圖

hu8D6



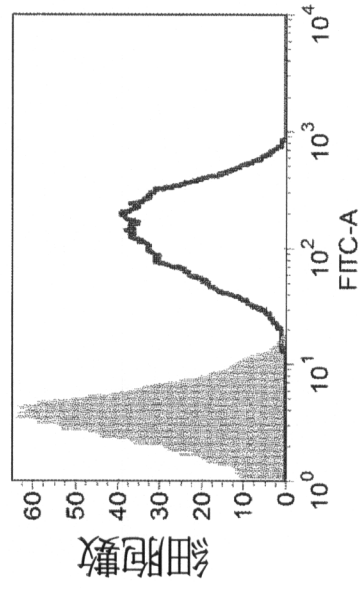
第8c圖

Omalizumab



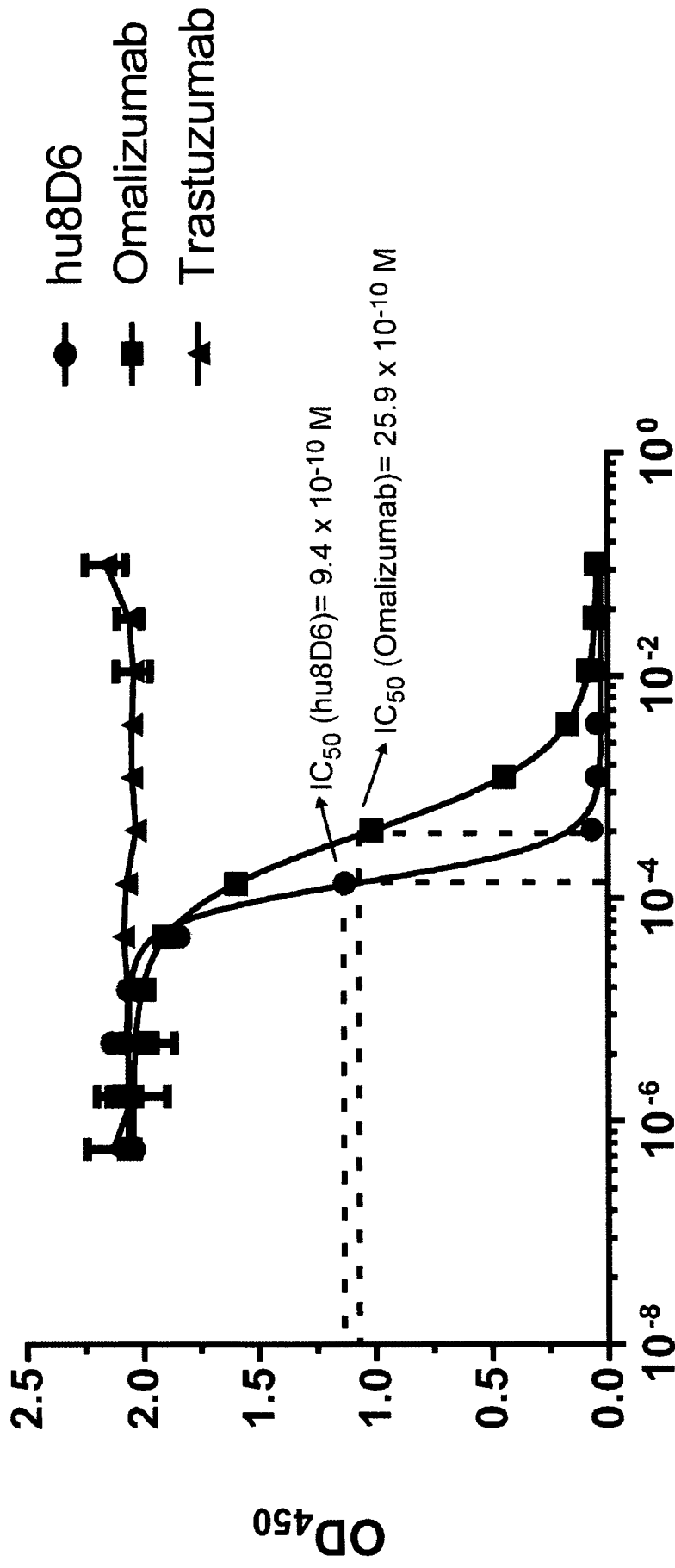
第8d圖

5H2



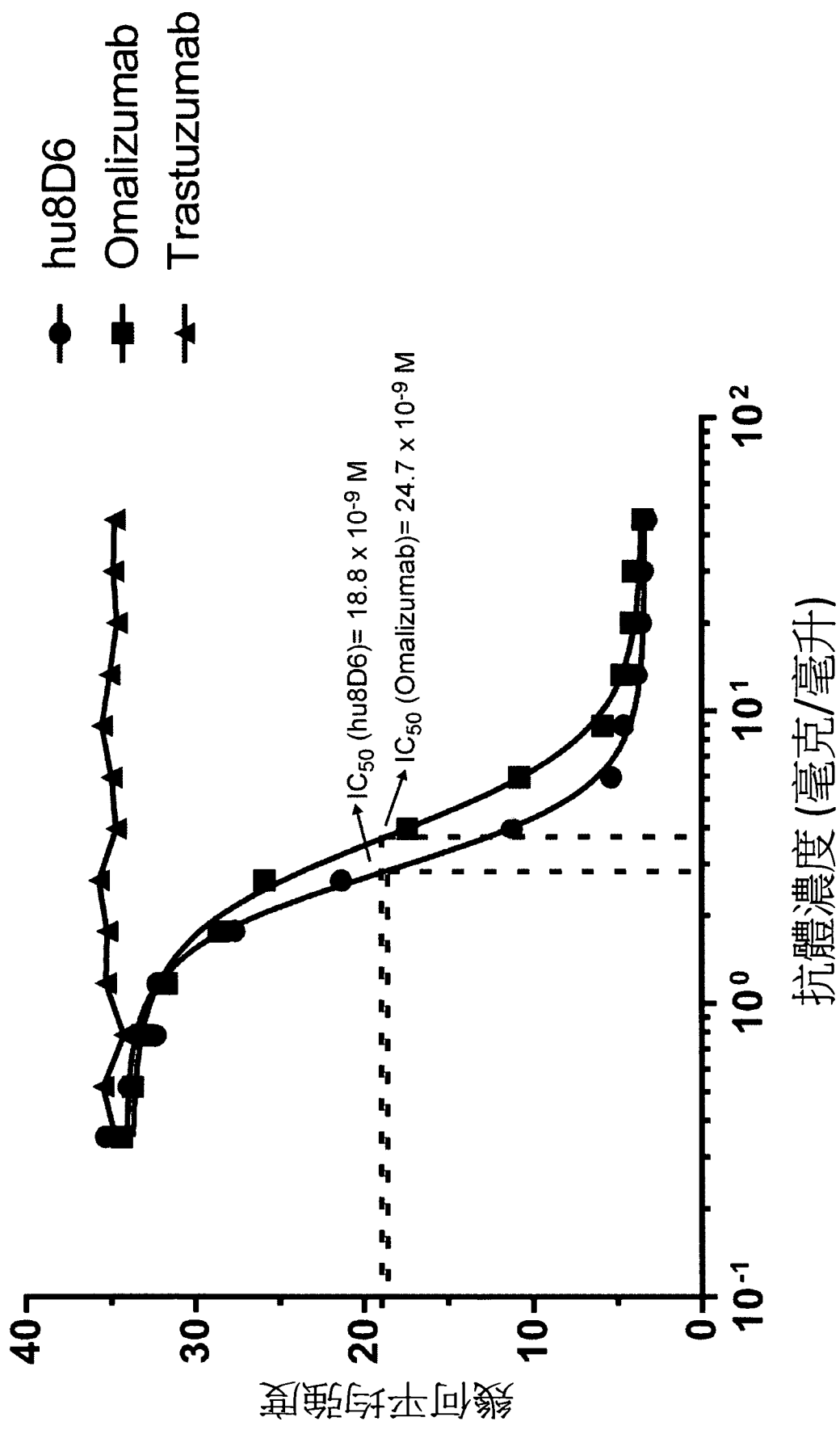
第8e圖

第8圖

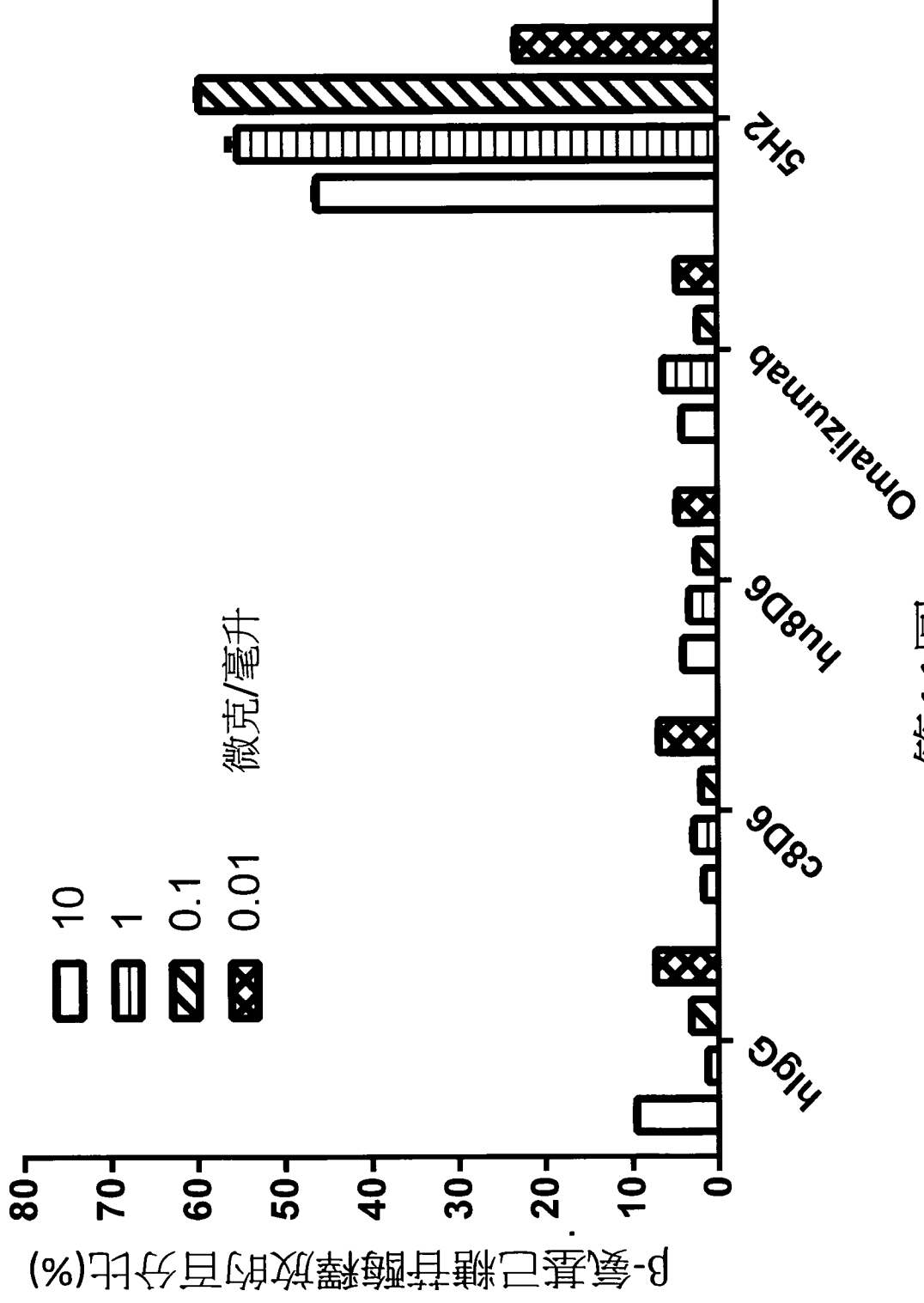


抗體濃度 (毫克/毫升)

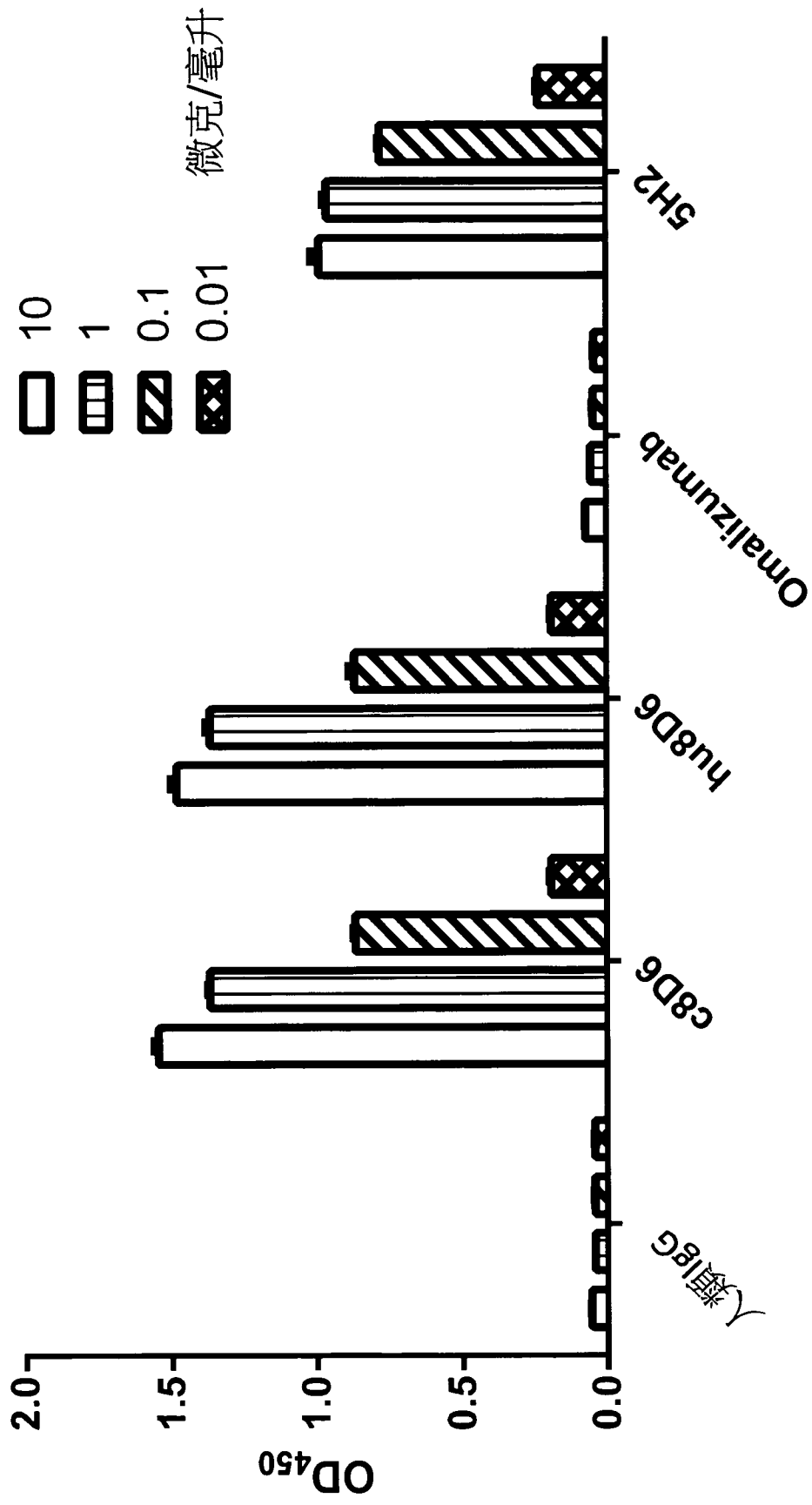
第9圖



第10圖

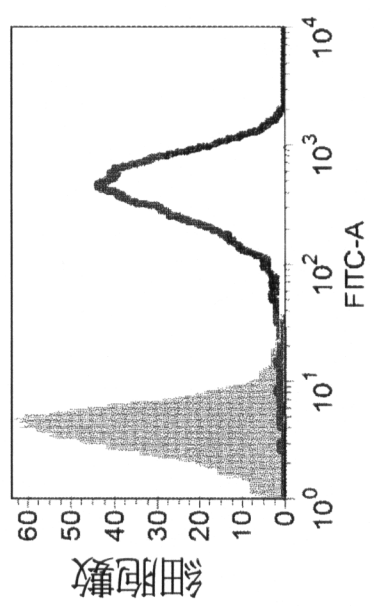


第11圖



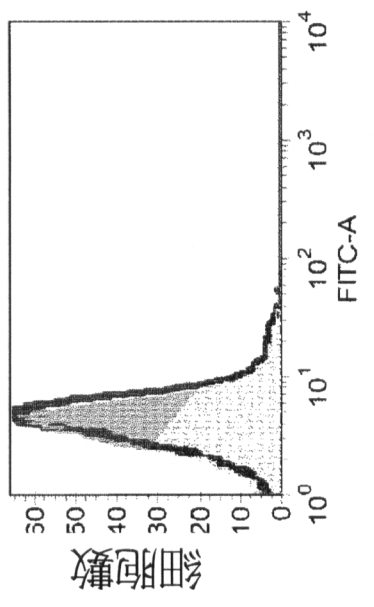
第12圖

抗-CD23



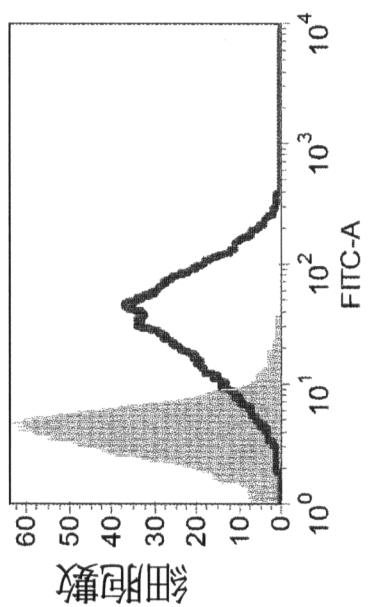
第13a圖

Omalizumab



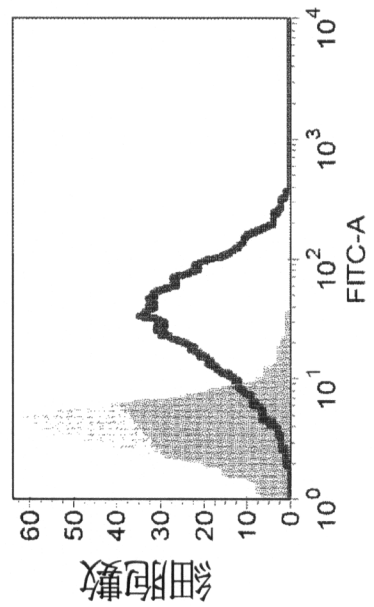
第13b圖

c8D6



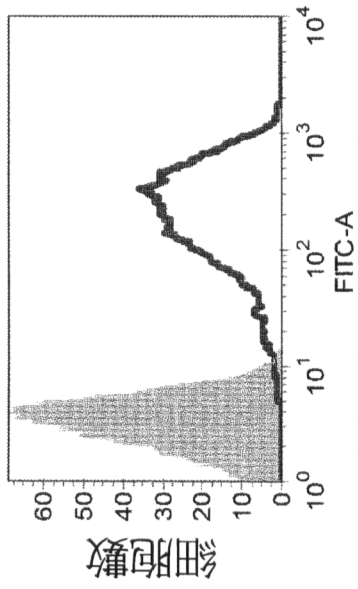
第13c圖

hu8D6



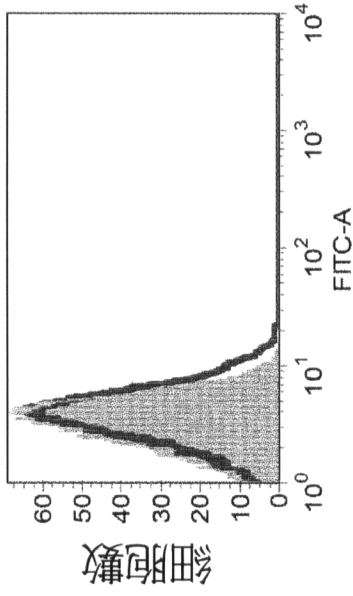
第13d圖

抗-FcεR1α



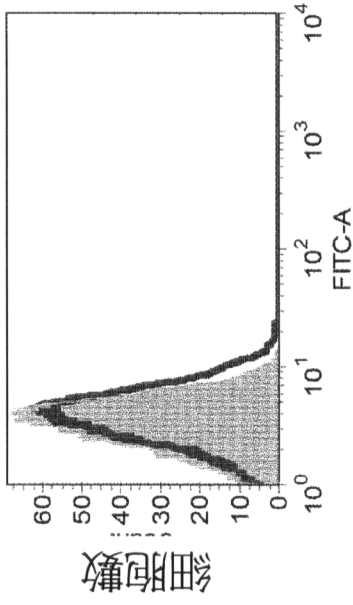
第14a圖

c8D6:IgE IC



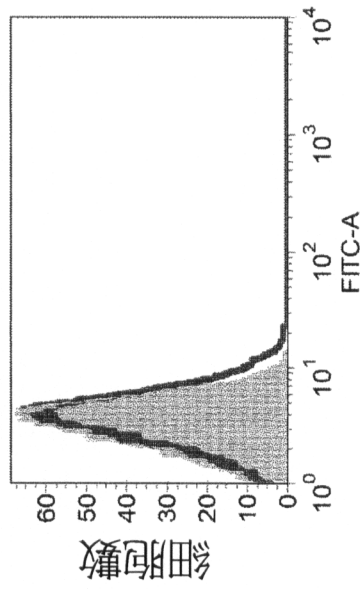
第14b圖

hu8D6:IgE IC



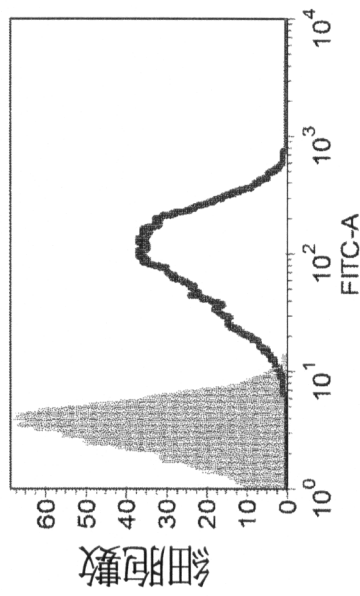
第14c圖

Omalizumab:IgE IC

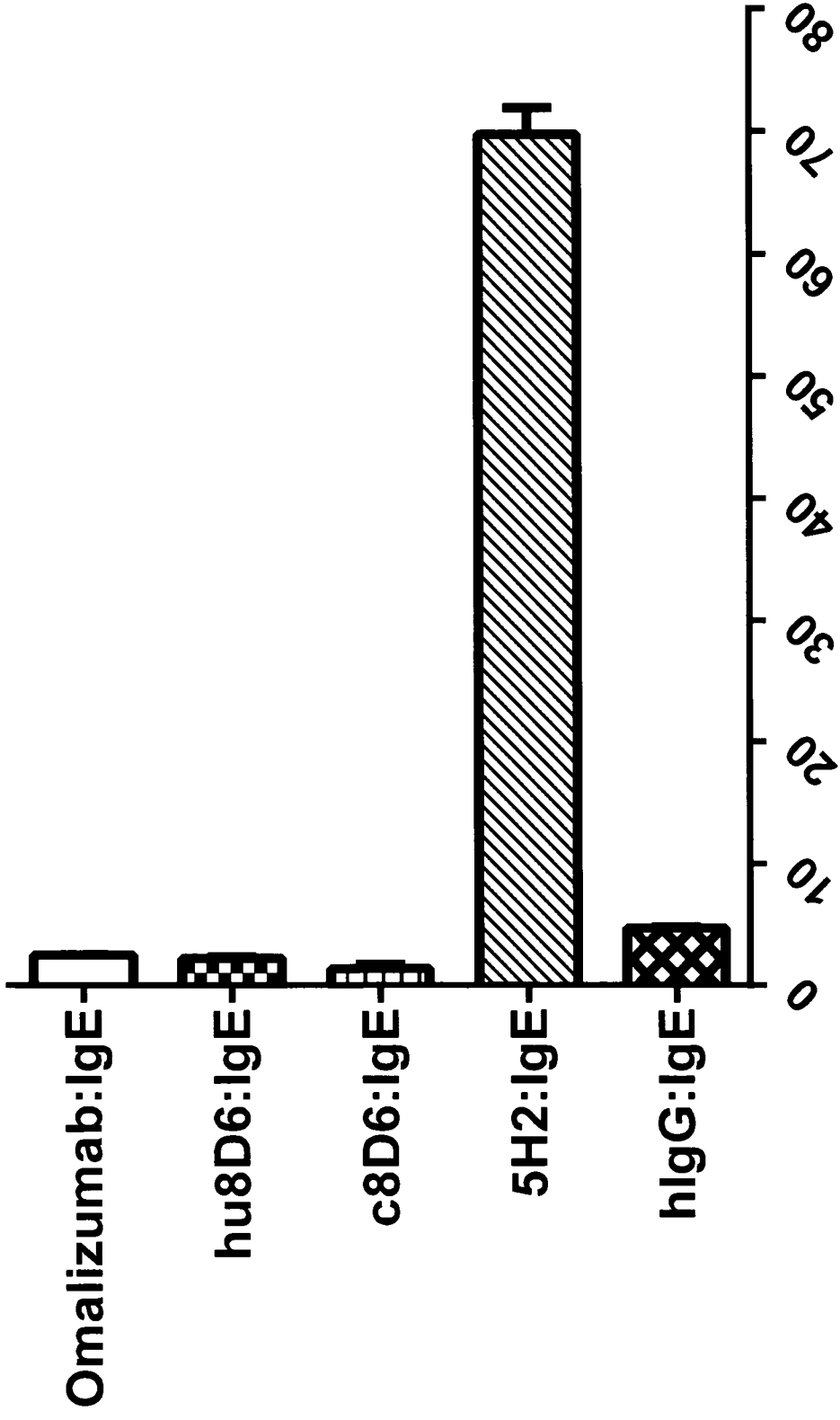


第14d圖

5H2:IgE IC



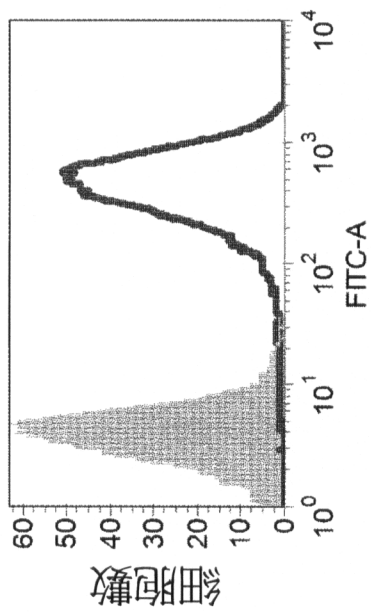
第14e圖



β -氨基己糖苷酶釋放的百分比(%)

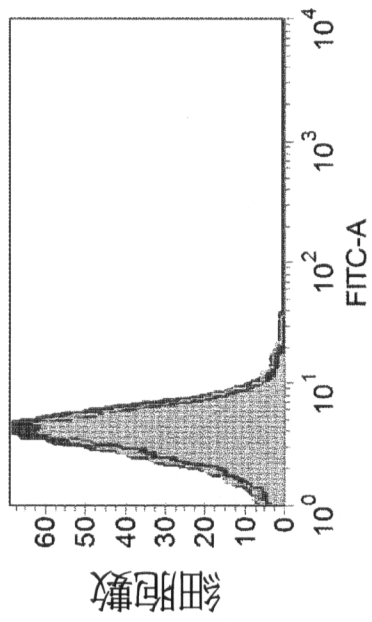
第15圖

抗-CD23



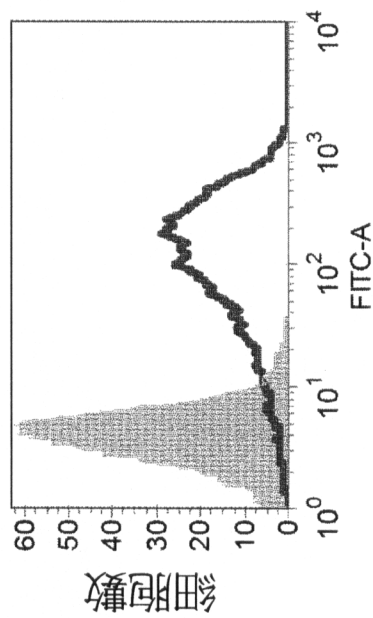
第16a圖

Omalizumab:IgE IC



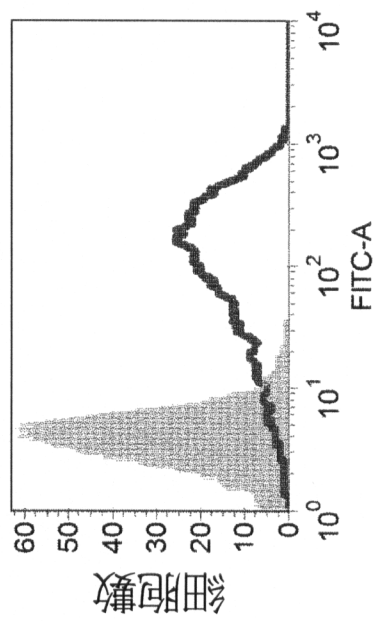
第16b圖

c8D6:IgE IC



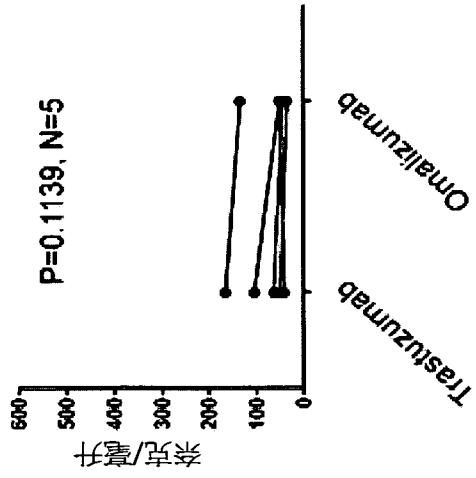
第16c圖

hu8D6:IgE IC

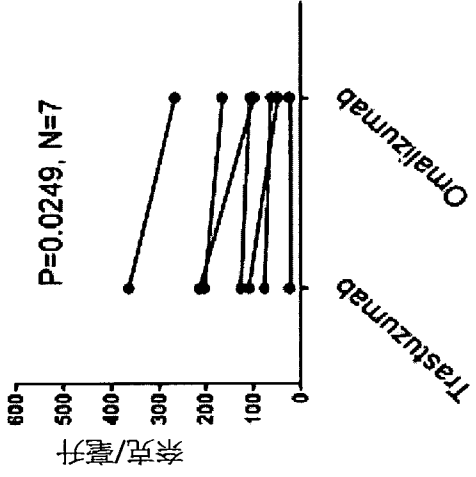


第16d圖

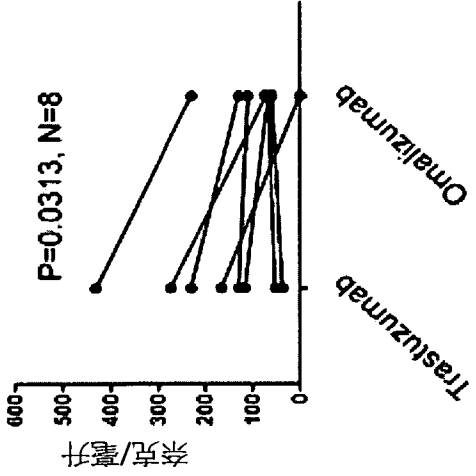
第7天



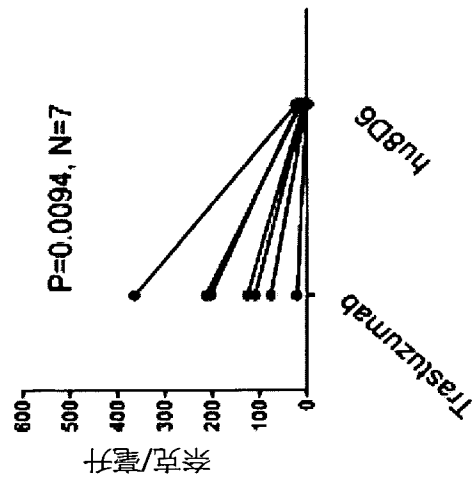
第11天



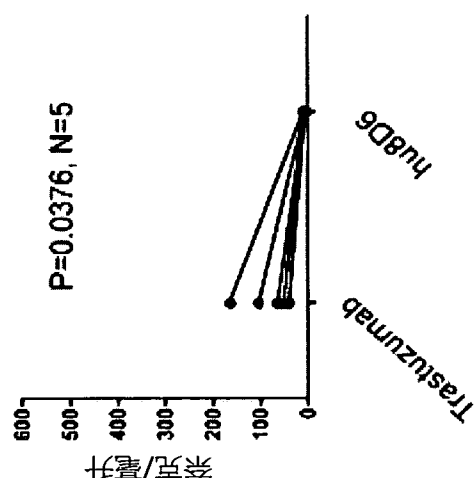
第14天



第17a圖



第17b圖



hu8D6

Omalizumab