

一种靶向 CXCR6 的抗体及其应用

相关申请的交叉引用

本专利申请要求于 2023 年 12 月 20 日提交的申请号为 CN202311766847.6 的中国发明专利申请的优先权权益，在此将其全部内容引入作为参考。

技术领域

本发明属于抗体药物领域，具体而言，本发明涉及抗 CXCR6 抗体及其用于制备药物的用途。

背景技术

CXC 家族趋化因子受体 6 (CXC chemokine ligand 6, CXCR6) 又名 Bonzo、STRL33、TYMSTR。CXCR6 表达于活化的 T 细胞上，包括 CD4+ T (Th1、Th17 细胞)、CD8+ T 细胞等。这些活化的 T 细胞是多种炎症或免疫失调疾病的重要驱动因子，包括自身免疫疾病、移植物抗宿主病 (GvHD)、神经退行性疾病等。例如，在多种自身免疫疾病 (如银屑病，白癜风，I 型糖尿病，多发性硬化症，类风湿性关节炎，克罗恩氏病，溃疡性结肠炎等) 或移植物抗宿主病中，已发现异常活化的 T 细胞是重要的致病细胞。

当前炎症或免疫失调疾病的治疗药物主要是广谱性的抗炎药物，如糖皮质激素、非甾体抗炎药；炎症因子抑制剂，如 TNF α 抑制剂或 IL23-IL17 通路抑制剂；JAK 抑制剂，如乌帕替尼 (Upadacitinib, JAK1 抑制剂)、鲁索替尼 (Ruxolitinib, JAK1/2 抑制剂)；免疫细胞迁徙阻断剂，如那他珠单抗 (natalizumab, $\alpha 4$ 阻断剂)；S1PR 抑制剂，如芬戈莫德 (fingolimod)；等等。但是，这些治疗药物均不能从根源上清除致病的 T 细胞，需要持续用药才能控制疾病发展。因此直接清除致病 T 细胞 (异常活化的 T 细胞) 的治疗方式有望成为治疗炎症或免疫失调疾病的新的突破性方向。CXCR6 作为异常活化 T 细胞的细胞表面标志物，靶向 CXCR6 的清除型抗体非常有潜力应用于上述疾病的治疗。

CXCR6 属于 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 家族，该家族的蛋白胞外段均较短且分割，靶向该家族成员的抗体往往对空细胞有一定程度的非特异结合，导致较差的药代属性。CXCR6 为七次跨膜蛋白，更需要提供一种对表达 CXCR6 的活化 T 细胞具有高特异性的抗体。此外，考虑到抗体药物开发

中、尤其是在临床前毒理评估中对具有人猴种属交叉活性的抗体分子的需求，本领域还希望提供具有人猴种属交叉活性的抗 CXCR6 抗体。

发明内容

5 本发明要解决的技术问题是，提供一种对 CXCR6 表达细胞具有高亲和力、高选择性且同时具有高生物活性的抗 CXCR6 抗体；其不具有或具有极低的非特异的结合活性；同时提供的抗体是人源化的，可更有利地应用于临床治疗；并且，期望该抗 CXCR6 抗体具有人猴种属交叉活性，便于在临床前毒理评估中应用。

10 相应地，本发明提供如下技术方案。

一方面，本发明提供一种抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段能够以高亲和力结合 CXC 家族趋化因子受体 6 (CXCR6)，特别是人 CXCR6。

在本发明的上下文中，除非另有说明，术语“CXCR6”涵盖 CXCR6 的任何形式，例如活性和非活性形式或者膜结合和可溶形式；并且涵盖 CXCR6 的任何结构区域，例如胞外区 (ECD) 及其包含的结构域。

具体而言，本发明提供的抗体或其抗原结合片段包含重链的互补决定区 (CDRs)，即重链 CDR1 (H-CDR1)、重链 CDR2 (H-CDR2)、重链 CDR3 (H-CDR3)，和轻链的互补决定区 (CDRs)，即轻链 CDR1 (L-CDR1)、轻链 CDR2 (L-CDR2)、轻链 CDR3 (L-CDR3)。根据本发明的具体实施方式，所述抗体或其抗原结合片段包含的重链 CDRs 源自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:3 中任一个所示的氨基酸序列；和/或，所述抗体或其抗原结合片段包含的轻链 CDRs 源自 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:6 中任一个所示的氨基酸序列。

25 如上提供的任一个氨基酸序列是本申请“具体实施方案”部分提供的示例性抗体的重链可变区 (VH) 或轻链可变区 (VL) 的氨基酸序列，所述示例性抗体包括了鼠抗、嵌合抗体与人源化抗体。采用本领域公知的抗体重链或轻链互补决定区的定义工具 (例如 Chothia、Kabat、IMGT、Contact、CCG 等)，本领域技术人员可以容易地确定各自所包含的重链 CDRs 和轻链 CDRs。

30 优选地，本发明提供的抗体或其抗原结合片段包含来自以下氨基酸序列配对所示的重链可变区和轻链可变区的重链 CDRs 以及轻链 CDRs：

(1) SEQ ID NO:1+ SEQ ID NO:4;

(2) SEQ ID NO:2+ SEQ ID NO:5; 或

(3) SEQ ID NO:3+ SEQ ID NO:6。

如上文所述, 例如可以采用 CCG 编号系统划分上述氨基酸序列配对中的 CDRs, 参见本发明的实施例中所示。

5 相应地, 在本发明提供的抗体或其抗原结合片段中, 所述重链 CDRs 和轻链 CDRs 如下所示:

(1) 依次包含 SEQ ID NO:7、8、9 所示氨基酸序列的 H-CDR1、H-CDR2H-CDR3; 和, 依次包含 SEQ ID NO:11、12、13 所示氨基酸序列的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3;

10 (2) 依次包含 SEQ ID NO:7、10、9 所示氨基酸序列的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3; 和, 依次包含 SEQ ID NO:11、12、14 所示氨基酸序列的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3; 或

(3) 依次包含 SEQ ID NO:7、8、9 所示氨基酸序列的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3; 和, 依次包含 SEQ ID NO:15、16、14 所示氨基酸序列的 L-CDR1、
15 L-CDR2、L-CDR3。

优选地, 本发明提供的抗体或其抗原结合片段特异性地靶向 CXCR6, 优选人 CXCR6。可选地, 本发明提供的抗体或其抗原结合片段具有或不具有人(human)、猴(cyno)、鼠(mouse) CXCR6 的种属交叉结合活性。优选地, 本发明提供的抗体或其抗原结合片段具有人与猴 CXCR6 的种属交叉结合活
20 性。

优选地, 本发明提供的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 二者均包括上述 CDRs 以及其间的框架区 (framework region, FR), 各个区的排列方式从 N 端至 C 端为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

进一步优选地, 在本发明提供的抗体或其抗原结合片段中, 所述重链可变区可以包含 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:3 中任一个所示的氨基酸序列, 或者包含与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列; 和/或, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:4 至 SEQ ID NO:6 中任一个所示的氨基酸序列, 或者包含与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列。在本发明的上下文中, 术语“至少 75%同一性”导致的氨基酸序列的至多 25%差异
25 可存在于重链可变区或轻链可变区中的任意框架区中, 或者存在于本发明的抗体或其抗原结合片段中重链可变区和轻链可变区以外的任意结构域或序列中。所述差异可以由任何位置的氨基酸缺失、添加或置换产生, 其中置换
30

可以是保守置换或非保守置换。所述“至少 75%同一性”涵盖至少 75%同一性至 100%同一性之间任何百分比的同一性，例如 75%、80%、85%、90%，甚至 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、甚至 100%同一性。

5 根据本发明的具体实施方式，本发明提供的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区包含选自以下氨基酸序列组合的一种：

(1) SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列，或与所述氨基酸
10 序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；

(2) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；或

(3) SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列；和，SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列，或与所述氨基酸
15 序列具有至少 75%同一性的氨基酸序列。

优选地，本发明提供的抗体可以为鼠抗、兔抗、人抗，也可以是为鼠源抗体、嵌合抗体或者完全或部分人源化抗体。所述抗体还可以称为衍生化抗体，例如在初始的鼠源单克隆抗体的基础上进行 CDRs 移植、亲和力成熟、
20 点突变改造、化学修饰等获得的抗体，其中所述化学修饰包括糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、蛋白酶切割、与细胞配体或效应分子等连接、活性反应基团保护和/或封闭等。优选地，所述抗体的抗原结合片段可以为抗体的 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv 等任意形式的片段。

25 除了重链和/轻链可变区之外，本发明提供的所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区（CH）和/或轻链恒定区（CL），优选地包含人或鼠的重链恒定区和/或轻链恒定区。优选地，所述抗体或其片段包含 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

根据本发明的具体实施方式，所述抗体为单克隆抗体，优选为鼠、嵌合
30 或人源化的单克隆抗体。根据本发明的具体实施方式，所述单克隆抗体包含 IgG1 的重链恒定区序列；和/或包含 kappa 轻链恒定区。

根据本发明的具体实施方式，本发明的抗体为单克隆抗体。优选地，本

发明提供的抗 CXCR6 抗体为免疫球蛋白，例如，所述免疫球蛋白的类型为人 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM。进一步优选地，所述抗体为人 IgG1 或 IgG4 亚型。根据本发明的具体实施方式，本发明的抗体包含人 IgG1 重链恒定区和人 kappa 轻链恒定区，具体序列示于实施例部分。

5 进一步地，本发明提供的抗 CXCR6 抗体或其抗原结合片段表现出抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）。优选地，本发明提供的抗 CXCR6 抗体或其抗原结合片段具有增强的 ADCC 活性。例如，所述抗 CXCR6 抗体是去岩藻糖基化的，例如是经去除 N 糖基化位点上的岩藻糖修饰的单克隆抗体。或者，本发明提供的抗 CXCR6 抗体是人 IgG1 抗体，并且在其重链 Fc
10 区具有一个或多个选自 S298A、E333A、K334A、S239D、I332E、S239D、A330L、I332E 的氨基酸残基突变，该氨基酸残基编号根据 Kabat EU 索引编号。根据本发明的具体实施方式，本发明提供的抗 CXCR6 抗体具有 S298A/E333A/K334A 三重突变、S239D/I332E 双重突变或 S239D/A330L/I332E 三重突变。

15 另一方面，本发明还提供一种核酸分子，其包含编码本发明所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列。

所述“编码本发明所述的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列”是指编码抗体或其抗原结合片段中包含的重链 CDRs、轻链 CDRs、轻链可变区、重链可变区、重链和/或轻链的核苷酸序列。例如，本发明提供的核酸分子包含：
20 含：编码上述抗体或其抗原结合片段中包含的各个重链 CDRs 和轻链 CDRs 的核苷酸序列；编码上述抗体或其抗原结合片段中包含的重链可变区和轻链可变区的核苷酸序列；或者，编码上述抗体或其抗原结合片段中包含的重链和轻链的核苷酸序列。

本发明的核酸分子可以被克隆到载体中，进而转化或转染宿主细胞。因此又一方面，本发明还提供一种载体，所述载体包含本发明的核酸分子。所述载体可以为真核表达载体、原核表达载体、人工染色体及噬菌体载体等。本发明的载体或核酸分子可以用于转化或转染宿主细胞，用于保存或抗体表达等目的。因此，还一方面，本发明提供一种宿主细胞，所述宿主细胞包含
25 本发明的核酸分子和/或载体，或者所述宿主细胞被本发明的核酸分子和/或载体转化或转染。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞，例如细菌或昆虫、真菌或动物细胞。

30 本发明提供的抗体或其抗原结合片段可以利用本领域已知的任何方法

获得。例如，在允许本发明提供的宿主细胞表达所述抗体的重链和轻链的情况下，培养所述宿主细胞。任选地，所述方法还包括回收产生的抗体的步骤。

另一方面，本发明提供的抗体或其抗原结合片段还可与其他部分直接或间接连接，所述其他部分例如是其他抗体的重链 CDRs、轻链 CDRs、重链可变区、轻链可变区、重链、轻链；或者，所述其他部分例如是小分子化合物，例如用作抗体偶联药物中的细胞毒性化合物；或者，所述其他部分例如是细胞表面受体、糖类、聚合物等对所述抗体或其抗原结合片段进行修饰的部分。因此，相应地，本发明提供一种缀合物，例如抗体偶联药物，其包含本发明提供的抗体或其抗原结合片段。本发明还提供一种双特异性或多特异性抗体，其包含本发明提供的抗体或其抗原结合片段。本发明还提供一种融合蛋白，其包含本发明提供的抗体或其抗原结合片段。

本发明提供的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体或者融合蛋白可以被包含在组合物中，更特别地被包含在药物组合物、例如药物制剂中，从而根据实际需要用于各种目的。

因此，在又一方面，本发明还提供一种组合物，所述组合物包含本发明提供的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体或者融合蛋白，以及可选的药学上可接受的辅料。本发明提供的组合物可以制成医学或药学领域已知的各种剂型，经适用方式施用。

再一方面，本发明还提供所述抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体或者融合蛋白在制备用于预防、治疗和/或改善疾病或病症的药物中的用途，所述疾病或病症与 CXCR6 表达（包括过表达）相关。特别是，本发明提供的抗体或其抗原结合片段可以通过结合 CXCR6 发挥 ADCC 作用，但不限于此。例如，本发明提供的抗体可以为靶向 CXCR6 的清除型抗体。进一步地，所述疾病或病症可以是急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病、自身免疫性肝炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、类风湿性关节炎、白癜风，银屑病、银屑病关节炎、青少年类风湿性关节炎、多发性硬化、非酒精性脂肪性肝炎、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、I 型糖尿病、强制性脊柱炎、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白相关疾病、格雷夫斯病、干燥综合症等等。

相应地，本发明还提供一种预防、治疗和/或改善疾病或病症的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用本发明的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体或者融合蛋白，所述疾

病或病症与 CXCR6 表达（包括过表达）相关。进一步地，所述疾病或病症可以是急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病、自身免疫性肝炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、类风湿性关节炎、白癜风、银屑病、银屑病关节炎、青少年类风湿性关节炎、多发性硬化、非酒精性脂肪性肝炎、

5 系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、I 型糖尿病、强制性脊柱炎、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白相关疾病、格雷夫斯病、干燥综合症等等。所述受试者可以为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

本发明提供的上述预防、治疗和/或改善疾病或病症的方法在应用时取决于多种因素，包括所施用的药物组合物的具体活性成分，患者的年龄、体重、

10 性别或身体和医疗状况，待处理病情的严重程度，给药途径等。

再一方面，本发明还提供所述本发明的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体在制备用于诊断疾病或病症的试剂中的用途，所述疾病或病症与 CXCR6 表达（包括过表达）相关。

进一步地，所述疾病或病症可以是急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病、自身免疫性肝炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、类风湿性关节炎、白癜风、银屑病、银屑病关节炎、青少年类风湿性关节炎、多发性硬化、非酒精性脂肪性肝炎、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、I 型糖尿病、强制性脊柱炎、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白相关疾病、格雷夫斯病、干燥综合症等等。

15

还一方面，本发明还提供一种诊断疾病或病症的方法，所述方法包括使本发明的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体或者融合蛋白与来自受试者的生物学样本相接触，所述疾病或病症与 CXCR6 表达（包括过表达）相关。进一步地，所述疾病或病症可以是急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病、自身免疫性肝炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、类风湿性关节炎、白癜风、银屑病、银屑病关节炎、青少年类风湿性关节炎、多发性硬化、非酒精性脂肪性肝炎、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、I 型糖尿病、强制性脊柱炎、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白相关疾病、格雷夫斯病、干燥综合症等等。所述受试者可以为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

20

25

又一方面，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括本发明的抗体或其抗原结合片段、核酸分子、载体、宿主细胞、缀合物、双或多特异性抗体。所述试剂盒可以用于上述预防、治疗和/或改善，或者上述诊断中，或者用于

30

所述 CXCR6 的任何检测中。取决于预期的应用方式，所述试剂盒还包含用于预防、治疗和/或改善、诊断或者检测的其他试剂。例如，所述试剂盒为用于采用 ELISA 来检测任何生物学样本中 CXCR6 表达（包括过表达）的试剂盒。

- 5 与现有技术相比，本发明提供一系列抗 CXCR6 鼠抗、嵌合抗体以及相应的人源化序列、人源化抗体分子。实验证明，本发明提供的抗体能够通过结合 CXCR6 的不同区域与位点而以高亲和力、高特异性结合 CXCR6；并且本发明提供的抗体还具有人、猴 CXCR6 的种属交叉结合活性。在作用机制方面，不受限于任何理论，本发明提供的抗 CXCR6 抗体能够通过 ADCC 发
- 10 挥作用，为靶向 CXCR6 的清除型抗体，因此非常有潜力用于治疗炎症或免疫失调疾病，而且已经在多种炎症性疾病模型中呈现出显著的治疗效应。此外，与已有 CXCR6 抗体相比，本发明提供的抗 CXCR6 抗体的细胞非特异性结合显著更低，由此具有更低的脱靶毒性和更佳安全性。特别重要的是，本发明提供抗 CXCR6 的人源化抗体及其 ADCC 增强型，可更利于临床应用。
- 15 因此，本发明提供的抗 CXCR6 抗体在炎症或免疫失调疾病治疗等方面具有重要的应用潜力。

附图说明

以下，结合附图来详细说明本发明的实施方案，其中：

- 20 图 1 示出了人 CXCR6 过表达细胞免疫小鼠得到的小鼠血清对人 CXCR6 和猴 CXCR6 的滴度反应。

图 2 示出了人 CXCR6 与猴 CXCR6 的 N 端区域以及胞外环区的氨基酸比对结果，*表示相同氨基酸。

- 25 图 3 示出了去除了第 2~13 位氨基酸的人 CXCR6 过表达细胞免疫小鼠得到的小鼠血清对人 CXCR6 和猴 CXCR6 的滴度反应。

图 4 示出了根据本发明的嵌合抗体对不同 CXCR6 过表达细胞或空白细胞的结合活性，其中 4A：HEK293-huCXCR6 细胞；4B：CHOS-huCXCR6-1T48 细胞；4C：HEK293-cynoCXCR6 细胞；4D：CHOS-mCXCR6 细胞。

- 30 图 5 示出了根据本发明的嵌合抗体对不同 CXCR6 过表达细胞或空白细胞的 ADCC 活性，其中 5A：HEK293-huCXCR6 细胞；5B：CHOS-huCXCR6-1T48 细胞；5C：HEK293-cynoCXCR6 细胞。

图 6 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H3L3 对不同 CXCR6 过表达细胞或空白细胞的结合活性，其中 6A: CHOS-huCXCR6-1T48 细胞；6B: HEK293-cynoCXCR6 细胞。

图 7 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H3L3 对不同空白细胞和 ssDNA 的非特异结合活性，其中 7A: CHOS-Blank 细胞；7B: HEK293-Blank 细胞；7C: ssDNA。

图 8 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 对不同细胞或 ssDNA 的结合活性，其中 8A: HEK293-huCXCR6 细胞；8B: HEK293-cynoCXCR6 细胞；8C: HEK293-Blank 细胞；8D: ssDNA。

图 9 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 对不同 CXCR6 过表达细胞或空白细胞的 ADCC 活性，其中 9A: HEK293-huCXCR6 细胞；9B: HEK293-cynoCXCR6 细胞；9C: HEK293-Blank 细胞。

图 10 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 不同 ADCC 活性增强版本的活性，其中 10A: 对 CHOS-huCXCR6-1T48 细胞的结合活性；10B: 在 CHOS-huCXCR6-1T48 细胞中的 ADCC 活性。

图 11 示出了根据本发明的克隆 22C6 的表位分析结果，其中 11A: 人源化抗体 hz22C6-H3L3 对 huCXCR6 及其不同区域人鼠嵌合形式的相对结合强度；11B: 人源化抗体 hz22C6-H3L3 对 huCXCR6 及其 ECL2、ECL3 不同点突变形式的相对结合强度。

图 12 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H3L3 和 hz22C6-H23L30 在小鼠中的血药浓度走势。

图 13 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 在食蟹猴中的血药浓度走势。

图 14 至图 16 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H3L3 和 hz22C6-H23L30 在小鼠 EAE 模型中的药效。

图 17 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 在小鼠 CIA 模型中的药效，其中 17A: CIA 临床评分；17B: 小鼠体重走势图；17C: CIA 病理评分；17D: 典型 CIA HE 染色病理图。

图 18 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 在小鼠 GvHD 模型中的药效。

图 19 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 (Fuc-) 在小鼠 IBD 模型中的药效，其中 19A: IBD 疾病活动临床评分；19B: 大肠重量

与长度比值统计图；19C：实验终点大肠拍照；19D：典型大肠 HE 染色病理图；19E：流式检测结果图。

图 20 示出了根据本发明的人源化抗体 hz22C6-H23L30 在小鼠白癜风模型中的药效，其中 20A：白癜风评分；20B：典型小鼠照片。

5 图 21 示出了抗 muCXCR6 抗体在小鼠 T1D 模型中的药效，其中 21A：T1D 发病率；21B：血糖浓度走势图。

实施发明的最佳方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解，这些
10 实施例仅用于说明本发明，其不以任何方式限制本发明的范围。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

实施例中：

人 CXCR6 (huCXCR6 或 hCXCR6)：参见 UniProtKB-O00574

15 猴 CXCR6 (cynoCXCR6)：参见 UniProtKB-Q9BDS6

鼠 CXCR6 (muCXCR6 或 mCXCR6)：参见 UniProtKB-Q9EQ16

对照抗体 Beacon2-G5：来自专利公布文件 WO2022251853A1，可变区序列如下，用人 IgG1 重链恒定区和人 kappa 轻链恒定区构建得到：

重链可变区 【SEQ ID NO:17】：

20 EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLE
WVATISSRGSYTYYPDSVKGRLTISRENAKNTLSLQMSSLKSEDTAMYCY
ARRVFPYWFFDVWGAGTTVTVSS

轻链可变区 【SEQ ID NO:18】：

25 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKSGQSPKLL
IYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPYTF
GGGTKLEIK

人 IgG1 重链恒定区 【SEQ ID NO:19】：

30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL

TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

人 kappa 轻链恒定区 【SEQ ID NO:20】:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
5 QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

实施例 1: 鼠抗筛选

1.1 采用人 CXCR6 的小鼠免疫

10 采用 CHO-S 细胞构建过表达人 CXCR6 的细胞株, 简称
“CHOS-huCXCR6-1T19”细胞(北京科诺信诚科技有限公司构建, 克隆号
1T19)。用该细胞免疫 Balb/c 小鼠(雌性, 6~8 周龄, 购自上海必凯科翼生
物科技有限公司)。免疫三次(间隔 2 周免疫一次, 每次免疫腹腔注射 100uL
含 1E7 细胞的 PBS 悬液)后采小鼠眼眶血。

15 采用 HEK293 细胞构建分别表达人 CXCR6、猴 CXCR6 的细胞株, 简称
“HEK293-huCXCR6”和“HEK293-cynoCXCR6”细胞。用
HEK293-huCXCR6、HEK293-cynoCXCR6 和 HEK293-Blank 细胞进行血清滴
度测试。具体地, 制备三种细胞的密度为 4E6/mL 的 PBS 悬液, 以 50ul/孔
铺 96 孔板; 小鼠血清用 PBS 稀释, 稀释倍数 1:50, 然后以 50ul/孔加入该
20 96 孔板中; 将该 96 孔板 4℃孵育 1h。之后, 离心弃去上清, 然后用 PBS 清
洗 2 次。向该 96 孔板中加入 1:1000 稀释的二抗(APC Goat Anti-Mouse IgG
(H+L), jacksonimmuno, 115-136-146), 孵育 30min 后, 离心弃上清, PBS
清洗 2 次。然后, 每孔加入 30ul PBS 充分混匀, 使用 IQue Screener PLUS
(Saorius)流式细胞仪检测血清滴度。

25 结果示于图 1(数据呈现方式为“过表达株的 FACS 信号值/Blank 细胞
株的 FACS 信号值”, 用于表明靶点特异性的滴度反应)。结果表明, 4 只小
鼠的血清均对 huCXCR6 有较强的特异性滴度反应, 而对 cynoCXCR6 的特
异性滴度反应则相对较弱。

1.2 采用去除了第 2~13 位氨基酸的人 CXCR6 的小鼠免疫

30 临床前的毒理评估为药物开发非常重要的一环, 具有人猴种属交叉活性
的分子能为毒理评估带来极大便利。鉴于 CHOS-huCXCR6-1T19 免疫后的小
鼠血清对 cynoCXCR6 的滴度较弱, 因此对免疫用细胞株进行重新设计, 以

开发对人、猴 CXCR6 均具有较强结合能力的抗体。

通过对 huCXCR6 和 cynoCXCR6 胞外区进行保守性分析,发现 huCXCR6 和 cynoCXCR6 主要在 N 端区域 (N-Terminal domain, NTD) 差异较大,而在胞外环区 (Extracellular loop, ECL) 1~3 保守性较高。比对结果示于图 2。

5 采用 NIH/3T3 细胞构建过表达去除了第 2~13 位氨基酸 (参见图 2 中灰色部分的氨基酸) 的人 CXCR6 的细胞株,简称 “NIH/3T3-huCXCR6 (Δ 2-13AA)” 细胞。使用 NIH/3T3 细胞是为了进一步降低细胞其余无关抗原的免疫反应。采用与上文相同的实验过程,使用 NIH/3T3-huCXCR6(Δ 2-13AA) 细胞对 Balb/c 小鼠进行免疫和滴度检测。

10 结果示于图 3。结果表明, NIH/3T3-huCXCR6 (Δ 2-13AA) 细胞免疫的小鼠血清对 huCXCR6 和 cynoCXCR6 均具有较强的特异性滴度反应。

1.3 杂交瘤克隆的筛选

在小鼠用对应过表达细胞株加强免疫后的第三天处死小鼠,取小鼠脾脏和淋巴结,研磨后将获得的细胞经预处理后与小鼠骨髓瘤细胞进行电融合,15 经 HAT 培养基培养 10 天后进行杂交瘤上清的流式细胞术筛选,使用的细胞为 HEK293-huCXCR6、HEK293-cynoCXCR6 和 HEK293-Blank 细胞株,实验过程与上文相同。

最终获得了大于 100 个具有 huCXCR6 和 cynoCXCR6 交叉结合活性的杂交瘤克隆。

20

实施例 2: 人鼠嵌合抗体的制备与活性表征

2.1 载体构建与抗体生产

使用小鼠轻重链简并引物对杂交瘤克隆的抗体基因序列进行扩增,获得的轻重链扩增产物片段直接连接到包含人 kappa 轻链恒定区【SEQ ID NO:20】和人 IgG1 重链恒定区【SEQ ID NO:19】的 PTT5 表达载体上,连接25 产物转化进感受态细胞 DH5α 中 (Yestern, 货号 E607-80VL) 并涂板、挑取单克隆与测序。

分析得到正确的抗体轻重链基因序列后,用悬浮驯化的 HEK293 细胞进行配对瞬转表达。将轻重链质粒以 2:3 的比例用 PEI 试剂 (Polysciences, 货号 24885) (1μg 质粒: 4μg PEI) 转染至密度为 2E6/ml 的 HEK293 细胞中,30 将转染的细胞在 37℃、5% CO₂ 中培养 5-7 天。收集上清液用 rProtein A 琼脂糖填料的纯化柱 (GE Healthcare Bio-sciences, 货号 127903) 进行纯化,纯

化后的样品用 0.22um 滤器过滤除菌，并用 Nanodrop One（Thermo fisher Scientific）测定纯化抗体的浓度。

2.2 嵌合抗体的结合活性分析

对一系列人鼠嵌合抗体进行初筛鉴定，挑选出三个活性较佳的抗体分子，分别命名为“ch28N24”、“ch22C6”和“ch30N18”；对应的克隆分别命名为“28N24”、“22C6”和“30N18”。

使用 huCXCR6、cynoCXCR6 和 muCXCR6 的多种过表达细胞株对这些抗体分子进行了 FACS 结合活性鉴定，同时用空白细胞株进行了非特异性结合测试，实验中使用 Beacon2-G5 作为对照抗体分子。具体地，制备各细胞的密度为 4E6/mL 的 PBS 悬液，以 50ul/孔铺 96 孔板；各抗体用 PBS 稀释到 2 倍指定梯度浓度，然后以 50ul/孔加入该 96 孔板中；将该 96 孔板 4℃ 孵育 1h。之后，离心弃去上清，然后用 PBS 清洗 2 次。向该 96 孔板中加入 1:1000 稀释的二抗(APC Goat Anti-human IgG Fcy, jacksonimmuno, 109-135-098)，孵育 30min 后，离心弃上清，PBS 清洗 2 次。然后，每孔加入 30ul PBS 充分混匀，使用 IQue Screener PLUS（Saorius）流式细胞仪进行检测。FACS 结合曲线示于图 4，结合 EC50 值示于表 1。

结果表明，三个抗体分子均具有非常好的 huCXCR6 和 cynoCXCR6 结合活性，EC50 值在 0.7~2.6ug/mL 之间（图 4A-C；表 1），同时三个抗体分子均不与 muCXCR6 结合（图 4D）。因此，实验证明，本发明提供的几个嵌合抗体均具有良好的人猴交叉结合活性。

表 1. 嵌合抗体对靶点蛋白表达细胞的结合活性

抗体名	FACS 结合活性 EC50 (ug/mL)		
	HEK293-huCXCR6 细胞	HEK293-cynoCXCR6 细胞	CHOS-huCXCR6-1T48 细胞
ch28N24	1.48	1.79	2.38
ch22C6	0.93	0.79	0.89
ch30N18	1.65	1.25	2.61
Beacon2-G5	1.03	0.82	0.76

2.3 嵌合抗体的 ADCC 活性分析

抗体依赖细胞介导的细胞毒活性（Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）是 anti-CXCR6 清除型抗体治疗炎症性疾病的主要作用

机理，因此用 ADCC 报告基因细胞对本发明提供的嵌合抗体分子进行了 ADCC 活性分析。具体地，用过表达细胞株或对照细胞株为靶细胞，以 2E4/孔铺 96 孔板，待测抗体初始工作浓度为 20 μg/mL，8 倍稀释，共 10 个梯度。稀释后的抗体加入细胞中混匀，37℃，5%CO₂ 培养箱中培养 1h，将效应细胞 jurkat-CD16A/NF（购自吉满生物）按照效靶比 7.5:1 的比例，每孔加入 1.5E5 个效应细胞，轻柔混匀，使效、靶细胞充分接触，37℃，5%CO₂ 培养箱中培养 5 个小时，加入 Bio-LiteTM 检测试剂（Vazyme，cat: DD1201）检测孔板荧光信号。ADCC 活性示于图 5。

结果表明，三个抗体分子对 huCXCR6 和 cynoCXCR6 过表达细胞株均具有非常强的 ADCC 活性。

实施例 3 来自克隆 22C6 的鼠抗的人源化改造

3.1 人源化

利用 CDR 区嫁接的方式对来自克隆 22C6 的鼠抗 22C6 进行了人源化改造，其中 CDR 定义参考 CCG 编号系统。所选人源化模板示于表 2；不同版本轻重链人源化序列示于表 3。

表 2. 鼠抗 22C6 进行人源化采用的轻重链人源化模板

母版重链	V 区模板	J 区模版	母版轻链	V 区模板	J 区模版
22C6_VH	IGHV3-23*01	IGHJ6-1	22C6_VK	IGKV1-12*01	IGKJ4-1

表 3. 鼠抗 22C6 及其不同人源化版本的序列（粗体并加下划线的部分为 CDR）

序列名	序列
>22C6_VH 【鼠抗 22C6 的 VH； SEQ ID NO:1】	EVKLEESGGDLVKPGGSLKLSAAS <u>GFTFSSYGMS</u> WVRQTPDKRLEWVA <u>TISSGGSYTYYPDSVKGRFI</u> ISRDNAKNTLYLQVSSLKSEDTAMYYCSR <u>LYGNYPFFTMDY</u> WGQGTSTVTVSS H-CDR1: GFTFSSYGMS 【SEQ ID NO:7】 H-CDR2: TISSGGSYTYYPDSVKG 【SEQ ID NO:8】 H-CDR3: LYGNYPFFTMDY 【SEQ ID NO:9】
>22C6_VH_hz3 【人源化序列；SEQ ID NO:2】	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS <u>CAASGFTFSSYGMS</u> WVRQAPGKLEWVA <u>TISSGGSYTYYPDTVKGRFT</u> ISRDN <u>SKNTLYLQMN</u> SLRAEDTAVYYCSR <u>LYGNYPFFTMDY</u> WGQGT <u>TVTVSS</u> H-CDR1: GFTFSSYGMS 【SEQ ID NO:7】

	H-CDR2: TISSGGSYTYYPDTVKG 【SEQ ID NO:10】 H-CDR3: LYGNYPFFTMDY 【SEQ ID NO:9】
>22C6_VH_hz23 【人源化序列; SEQ ID NO:3】	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYGMS</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>TISSGGSYTYYPDSVKGRFT</u> ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRL <u>LYGNYPFFTMDY</u> WGQGTTTVTVSS H-CDR1: GFTFSSYGMS 【SEQ ID NO:7】 H-CDR2: TISSGGSYTYYPDSVKG 【SEQ ID NO:8】 H-CDR3: LYGNYPFFTMDY 【SEQ ID NO:9】
>22C6_VK 【鼠抗 22C6 的 VL; SEQ ID NO:4】	DVVTQSQKFMSTSVGDRVSVTC <u>KASQNVRTNVA</u> WYQQKPGQSPKALIH <u>SASyrNT</u> GVPDRFTGSGSGT DFTLTINNVSQEDLAIEYFC <u>QQYNSYPYT</u> FGGGTKLEIK L-CDR1: KASQNVRTNVA 【SEQ ID NO:11】 L-CDR2: SASyrNT 【SEQ ID NO:12】 L-CDR3: QQYNSYPYT 【SEQ ID NO:13】
>22C6_VK_hz3 【人源化序列; SEQ ID NO:5】	DIQMTQSPSSVSASVGRVITTC <u>KASQNVRTNVA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SASyrNT</u> GVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYNTYPYT</u> FGGGTKVEIK L-CDR1: KASQNVRTNVA 【SEQ ID NO:11】 L-CDR2: SASyrNT 【SEQ ID NO:12】 L-CDR3: QQYNTYPYT 【SEQ ID NO:14】
>22C6_VK_hz30 【人源化序列; SEQ ID NO:6】	DIQMTQSPSSVSASVGRVITTC <u>KASQNVRSWLA</u> WYQQKPGKAPKLLIY <u>SASSRQS</u> GVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYNTYPYT</u> FGGGTKVEIK L-CDR1: KASQNVRSWLA 【SEQ ID NO:15】 L-CDR2: SASSRQS 【SEQ ID NO:16】 L-CDR3: QQYNTYPYT 【SEQ ID NO:14】

3.2 人源化抗体 hz22C6-H3L3 (VH: 22C6_VH_hz3; VL: 22C6_VK_hz3)
结合活性分析

按照实施例 2 所述, 获得 hz22C6-H3L3 人源化抗体分子, 并通过 FACS 检测结合活性。FACS 结合曲线示于图 6, 结果表明 hz22C6-H3L3 具有非常强的 huCXCR6 和 cynoCXCR6 结合活性。

由于 CXCR6 属于 GPCR 家族七次跨膜蛋白, 该家族蛋白胞外段均较短且分割, 靶向该家族的抗体往往对空细胞和生物大分子(蛋白质、脂质、DNA 等)有一定程度的非特异结合。使用不表达 CXCR6 的空细胞株 (HEK293-Blank 和 CHOS-Blank) 测试了 hz22C6-H3L3 的结合活性, 结果表明 hz22C6-H3L3 对空细胞无非特异结合, 而对照分子 Beacon2-G5 在高浓

度下具有较强的非特异结合（图 7A、7B）。同时使用 ELISA 方法检测了 hz22C6-H3L3 对 ssDNA 的非特异结合活性。具体地，包被物为 ssDNA(Sigma, 货号 D8899)，二抗使用 Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific (jacksonimmuno, 109-135-098)。结果表明，在最高浓度 30 μ g/mL 下，
5 hz22C6-H3L3 存在低程度的非特异结合，而对照分子 Beacon2-G5 在 7.5 μ g/mL 浓度下就非常显著（图 7C）。

3.3 人源化抗体 hz22C6-H23L30（ VH： 22C6_VH_hz23； VL： 22C6_VK_hz30）结合活性分析

进一步地，为了提升 hz22C6-H3L3 的人源化程度，同时消除其对 ssDNA
10 的结合，对 hz22C6-H3L3 的轻重链做了进一步的突变设计，得到了分子 hz22C6-H23L30。hz22C6-H23L30 轻重链人源化程度均得到了提升（表 4）。

表 4. 人源化抗体人源化程度

轻链名	人源化程度（%）	重链名	人源化程度（%）
>IGKV1-12*01+>IGKJ4-1	--	>IGHV3-23*01+>IGHJ6-1	--
>22C6_VK_hz3	85	>22C6_VH_hz3	89
>22C6_VK_hz30	91	>22C6_VH_hz23	91

对 hz22C6-H23L30 进行了 FACS 结合活性分析。结果表明， hz22C6-H23L30 具有非常强的 huCXCR6 和 cynoCXCR6 结合活性（图 8A、
15 8B），同时对空细胞 HEK293-blank 不具有非特异结合（图 8C）。使用 ELISA 测试 hz22C6-H23L30 对 ssDNA 的非特异结合，结果表明 hz22C6-H23L30 在高浓度下（30 μ g/mL）对 ssDNA 亦无非特异结合。

3.4 hz22C6-H23L30 的 ADCC 活性分析

按照实施例 2 所述，对 hz22C6-H23L30 进行了 ADCC 活性分析。ADCC 活
20 性示于图 9A、9B。结果表明，hz22C6-H23L30 对 huCXCR6 和 cynoCXCR6 过表达细胞株均具有非常强的 ADCC 活性；并且 hz22C6-H23L30 对空细胞无 ADCC 活性(图 9C)，而对照分子 Beacon2-G5 在高浓度下有 ADCC 信号，这表明其在体内可能会存在脱靶杀伤活性。

25 **实施例 4** ADCC 活性增强分子的活性检测

据公开信息，抗体 ADCC 活性受 Fc 受体糖型和 Fc 特殊位点氨基酸突变

的影响。为了获得 ADCC 活性更强的抗体分子，发明人对 hz22C6-H23L30 做了 ADCC 活性增强的设计和抗体分子制备。共获得四个不同版本的 ADCC 活性增强分子，其中 hz22C6-H23L30 (Fuc-) 为 Fc 区 N 糖修饰中无岩藻糖的分子，hz22C6-H23L30 (AAA) 为重链引入 S298A/E333A/K334A 三重突变的分子，hz22C6-H23L30 (DE) 为重链引入 S239D/I332E 双重突变的分子，hz22C6-H23L30 (DLE) 为重链引入 S239D/A330L/I332E 三重突变的分子(其中氨基酸残基编号根据 Kabat EU 索引编号)。

FACS 和 ADCC 活性检测结果表明四个 ADCC 增强版本的分子对 huCXCR6 结合活性与 hz22C6-H23L30 一致(图 10A)，同时它们的 ADCC 活性相较 hz22C6-H23L30 大幅提升(图 10B)，这提示它们在体内对 CXCR6 阳性的细胞具有更好的清除能力。

实施例 5 克隆 22C6 的表位分析

使用 hz22C6-H3L3 对克隆 22C6 进行了表位分析。

5.1 结合区域分析

考虑到克隆 22C6 不与 muCXCR6 结合，因此首先用 muCXCR6 的 N 端、胞外 loop 段 1~3 逐一对 huCXCR6 进行替换，构建了人鼠嵌合 CXCR6 基因的 pCDNA3.1 瞬转表达载体，同时在 huCXCR6 和各嵌合基因的 N 端添加了 6*his 标签用于后续实验数据的标准化。将所有载体在 HEK293 细胞中瞬转表达，转染 48h 后，用 his 标签抗体(Biolegend, 货号 362605)和 hz22C6-H3L3 进行流式分析，方法同上。

通过将 his 标签的信号值相对于 huCXCR6 的信号值进行均一化，均一化后的结果示于图 11A。结果表明克隆 22C6 的结合表位主要在 ECL2, ECL1 和 ECL3 对其结合有次要影响。

5.2 结合位点分析

进一步对 ECL2 和 ECL3 上的人鼠差异氨基酸进行了突变分析，以明确克隆 22C6 的关键表位。共构建了 F173Q、D176A、Y182A、H183A、D184A、E185A、R254A、S255A、I256A、W258A、E259A、Y260A、Y261A、H267K 14 个带有 his 标签的点突变瞬转表达载体，并进行了 HEK293 瞬转表达和流式分析。结果示于图 11B。结果表明，克隆 22C6 的关键表位有 Y182、H183、D184、E185、Y260、Y261。

实施例 6 人源化抗体的药代动力学分析

6.1 在小鼠中的药代动力学分析

对基于克隆 22C6 的不同人源化抗体分子进行了小鼠 PK 分析。

采用 balb/c 小鼠，雌性，周龄大于六周（购自上海必凯科翼生物科技有限公司）。给药剂量为单次静脉注射，200ug/只小鼠，每组 4 只小鼠。然后在给药后 1h、4h、8h、24h、48h、96h、120h、144h、192h、240h、288h、336h 各采血约 50ul，分离血清，-80℃保存。

采用 ELISA 法检测各抗体分子各时间点的血药浓度，包被物为 anti-huIgG Fab 单克隆抗体（Sigma，货号 I5260-1ML），二抗使用 Anti-Human IgG, Fc γ fragment specific（jacksonimmuno，109-135-098）。最后检测得到的各抗体的血药浓度走势示于图 12，PK 分析结果示于表 5。其中，hz22C6-H23L30 的 t1/2 为 178.06 小时，具有良好的小鼠 PK 代谢属性。

表 5. 人源化抗体在小鼠中的药代动力学分析结果

PK 参数(单位)	hz22C6-H3L3	hz22C6-H23L30
t1/2(小时)	153.37	178.06
Cmax(μ g/ml)	256.48	255.53
AUC-192(μ g/ml*小时)	23435.82	24936.78

6.2 在食蟹猴中的药代动力学分析

对 hz22C6-H23L30 进行了食蟹猴 PK 分析。

使用一雌一雄两只食蟹猴，给药剂量为 20mg/kg，30min 内静脉输注，输注完毕后即刻以及输注完后 1h、2h、4h、8h、24h、48h、72h、第 5 天、第 7 天、第 10 天、第 14 天、第 21 天、第 35 天、第 49 天、第 63 天各采集约 500ul 血液样品，分离血清，-80℃保存。

采用 ELISA 法检测各时间点血药浓度，包被物为 Goat Anti-Human IgG(H+L)，minX Monkey（BERHYL，货号 A80-319A），二抗使用 Goat Anti-Human IgG, Monkey ads-HRP（southernbiotech，2049-05）。最后检测得到的抗体的血药浓度走势示于图 13，PK 分析结果示于表 6。

表 6. 人源化抗体在食蟹猴中的药代动力学分析结果

PK 参数(单位)	hz22C6-H23L30（雄猴）	hz22C6-H23L30（雌猴）
t1/2(天)	12.37	13.65

Cmax(μg/ml)	1212.00	1082.00
AUC-D63(μg/ml*天)	8521.56	7725.94

hz22C6-H23L30 的 t1/2 约为 13 天，具有良好的食蟹猴 PK 代谢属性。

实施例 7 人源化抗体的药效

7.1 在实验性动物脑炎模型（EAE 模型）中的药效

5 由于筛选到的抗体分子不与 muCXCR6 结合，因此造模小鼠为 huCXCR6-knock in-C57BL/6J 小鼠（上海南方模式生物科技股份有限公司）。造模过程简要如下：小鼠用 1 - 4%异氟烷和氧的混合气体（流速 1-2L/min）吸入麻醉后，背部皮下注射 100ul 乳剂（乳剂成分：2mg/mL 的 MOG 35-55，含 4mg/mL 的结核分枝杆菌的完全弗氏佐剂，等体积高速匀浆混匀）免疫，
10 同时小鼠腹腔注射百日咳毒素（1ug/mL，200uL），48 小时后再次腹腔注射等剂量百日咳毒素。

造模后每日进行小鼠称重和 EAE 临床打分，评分标准为：

- 0 分：正常，无明显疾病表现；
- 1 分：尾巴无力或后肢虚弱无力；
- 15 2 分：尾巴无力同时后肢虚弱无力；
- 3 分：部分后肢瘫痪；
- 4 分：后肢完全瘫痪；
- 5 分，濒死状态或 EAE 致死。

在每个小鼠 EAE 平均得分达到约 1 分时进行分组并腹腔给药，药物采
20 用本发明的抗 CXCR6 抗体 hz22C6-H3L3 和对照 hIgG1（无关抗体），hz22C6-H3L3 设置了多剂量组（15mg/kg、5mg/kg、2mg/kg、0.5mg/kg）和不同给药次数的测试，每组 8 只小鼠。结果表明，所有 hz22C6-H3L3 组相较于对照组均观察到了 EAE 小鼠症状的显著改善，即实现了显著的治疗效果；同时，多次给药（图 14A）的治疗效果略优于单次给药（图 14B），不同剂
25 量下的多次给药治疗效果相当。通过造模后第 24 天采血进行流式细胞术分析发现，对照组小鼠外周血中有较高比例的 CXCR6 阳性 T 细胞（CXCR6+ T 细胞），而各治疗组的外周血中 CXCR6+ T 细胞比例均显著降低（图 15A、15B），这表明本发明的抗 CXCR6 抗体 hz22C6-H3L3 能有效清除小鼠体内 CXCR6 阳性 T 细胞（不局限于任何理论，推测是通过 ADCC 等作用），改
30 善小鼠的临床症状，实现治疗作用。

进一步地,采用本发明的抗 CXCR6 抗体 hz22C6-H23L30 进行了对 EAE 模型的预防发病与治疗的效果验证,每组 8 只小鼠。结果示于图 16。结果表明,5mg/kg 剂量下,3 次预防给药(造模后第 4、7、10 天)可以显著延缓 EAE 小鼠发病,同时降低 EAE 发病的持续时间与严重程度(图 16A);4 次治疗给药(造模后第 14、18、22、26 天)几乎可以实现小鼠 EAE 症状的完全缓解,具有良好的治疗效果(图 16B)。

以上证据提示抗 CXCR6 抗体在中枢神经系统炎症性疾病(如多发性硬化症,MOG 抗体相关疾病等)中的治疗潜力。

7.2 在类风湿性关节炎模型(CIA 模型)中的药效

小鼠 CIA 模型是常用的类风湿性关节炎模型。造模小鼠同样为 huCXCR6-knock in-C57BL / 6J 小鼠,造模过程简要如下:在第 0 天和第 21 天分别从小鼠尾根部皮下注射 100ul CII 乳剂(乳剂成分为 4mg/mL 鸡 II 型胶原(溶解于 50mM 醋酸溶液)与含 4mg/mL 结核分枝杆菌的弗氏完全佐剂等体积充分混合乳化)。

- 15
- CIA 临床评分标准为: 每只足单独评分;
- 0 分: 正常;
- 1 分: 任一关节(踝关节,跗跖关节,趾关节,下同)红肿;
- 2 分: 任二关节红肿;
- 3 分: 三类关节均有红肿;
- 20
- 4 分: 整只足完全红肿。

CIA 病理评分标准见表 7:

表 7. CIA 模型病理评分标准

关节病变	病变程度	分值
滑膜增生, 软骨处炎性细胞浸润	轻度	1.0
	重度	2.0
血管翳	轻度	3.0
	重度	4.0
关节周围腔隙消失, 骨组织与周围结缔组织黏连, 部分骨组织结构破坏	轻度	5.0
	重度	6.0
关节腔部分消失, 部分骨组织破坏、融合	轻度	7.0
	重度	8.0

踝关节纤维化	9.0
炎症累及指骨关节	+1.0*
炎症累及骨髓	+1.0*

*: +1.0 表示在已有分数上额外再加 1.0 分。

在第 21 天开始对小鼠进行 CIA 临床评分, 将出现 CIA 临床症状的小鼠按评分均分为两组进行腹腔给药 (hz22C6-H23L30 和对照 hIgG1, n=12), 剂量为 10mg/kg, 每三天一次, 给药 7 次。

5 结果示于图 17。结果表明, 本发明的抗 CXCR6 抗体 hz22C6-H23L30 给药后, 小鼠 CIA 临床症状评分得到了显著改善 (图 17A), hz22C6-H23L30 组小鼠体重显著高于对照 hIgG1 组 (图 17B)。同时, hz22C6-H23L30 组的病理评分低于对照 hIgG1 组 (图 17C、17D, 示出了第 1 只小鼠的结果)。这些结果表明抗 CXCR6 抗体在类风湿性关节炎中具有治疗潜力。

10 **7.3** 在小鼠移植物抗宿主病模型 (GvHD 模型) 中的药效

造模过程为将筛选过的人 PBMC (上海儒百生物科技有限公司, 货号: PBMNC100C) 通过尾静脉接种于 NCG 小鼠 (6~8 周龄, 雌鼠), 接种剂量为 $1 \times 10^7/200\mu\text{l}$ 。接种 14 天后, 根据小鼠体重随机分为两组进行腹腔给药 (hz22C6-H23L30 和对照 hIgG1), 剂量为 10mg/kg, 每三天一次, 给药 8 次。

15 结果示于图 18。结果表明, 本发明的抗 CXCR6 抗体 hz22C6-H23L30 给药后, GvHD 模型小鼠的生存率得到了改善, 表明抗 CXCR6 抗体在 GvHD 中具有治疗潜力。

7.4 在炎症性肠炎模型 (IBD 模型) 中的药效

使用 CD4+CD25- T 细胞移植 IBD 模型评估本发明的抗 CXCR6 抗体的
20 药效。造模过程简要如下: 供体鼠为 huCXCR6-knock in-C57BL / 6J 转基因小鼠和受体鼠为 B6-RAG-/-小鼠 (江苏集萃药康生物科技股份有限公司), 将供体鼠的脾脏细胞用 CD4+CD25-磁珠进行分选, 分选后按 5E6/只尾静脉注射到受体鼠中。注射后定期对小鼠进行疾病活动评分 (分组前一周两次, 分组以后每天一次), 从体重、大便性状和大便隐血三个维度进行评分, 评分
25 标准如表 8:

表 8. IBD 疾病活动评分表

评分	体重下降 (%)	大便性状	大便隐血
0	-	正常	阴性 (-)

1	1-5	松散但不黏肛周	阳性 (±)
2	5-10	松散黏肛周	阳性 (+)
3	10-15	腹泻	阳性 (++)
4	>15	带血稀便	肉眼血便 (>++)

小鼠的疾病活动得分=(体重下降评分+大便性状评分+大便隐血评分) / 3。

在全部小鼠的疾病活动得分的平均分约为 0.3 时，进行分组给药 (n=4，分组当天记为 D0)，分别给与 hz22C6-H23L30 (Fuc-) 和对照 hIgG1 抗体，
5 剂量为 5mg/kg，每周两次，腹腔注射。结果示于图 19。结果表明，本发明的抗 CXCR6 抗体给药后，小鼠 IBD 临床症状得到了显著改善，疾病活动评分显著降低并且在 D16 后完全缓解 (图 19A)。试验终点 D20 取材，大肠重量/长度比值 (该比值越高说明 IBD 疾病程度越重)，hz22C6-H23L30 (Fuc-) 组与未造模 B6 RAG-/-小鼠相当，显著低于对照 hIgG1 组 (图 19B，19C)。
10 HE 病理结果表明对照 hIgG1 组小鼠大肠存在大量纤维组织增生，中性粒细胞、淋巴细胞浸润，黏膜层坏死和溃疡灶，上述病理表现在 hz22C6-H23L30 (Fuc-) 组只轻微存在或完全没有 (图 19D)。同时，在 D15 取外周血以及试验终点取肠系淋巴结进行流式检测分析，结果表明对照 hIgG1 组中外周血和肠系淋巴结存在较高比例 CXCR6+CD4+ T 细胞，hz22C6-H23L30 (Fuc-) 组中这群细胞被显著清除 (图 19E)。这些结果一起表明，CXCR6 在 IBD 模型致病过程中的重要作用，提示抗 CXCR6 的抗体在炎症性肠炎中具有治疗
15 潜力。

7.5 在白癜风模型中的药效

使用小鼠白癜风模型评估本发明的抗 CXCR6 抗体的药效。造模过程简
20 要如下：D0 在 huCXCR6-knock in-C57BL / 6J 转基因小鼠背部皮下接种 2E5 B16F10 黑色素瘤细胞，D4 和 D10 两次注射 200 μg 抗小鼠 CD4 抗体 (BioXcell，货号 BE0003-3-50MG)，D21 左右移除小鼠皮下肿瘤并随机分组，每组小鼠 (n=7) 分别给与 hz22C6-H23L30 和对照 hIgG1 抗体，剂量为 10mg/kg，每周两次，腹腔注射。持续观察小鼠白癜风进展情况。根据小鼠
25 白色毛发的面积打分 0~7 分。结果表明，本发明的抗 CXCR6 抗体给药后，小鼠白癜风进展得到了改善 (图 20A、20B)，提示靶向 CXCR6 的抗体在白癜风中具有治疗潜力。

实施例 8 抗 CXCR6 抗体在一型糖尿病 (T1D) 中的药效

NOD 雌性小鼠会自发产生 T1D, 但发病时间较晚。因此采用了加速 NOD 鼠 T1D 模型评估靶向 CXCR6 抗体的药效。造模过程简要如下: D0 和 D14 5 两次给 NOD 小鼠 (江苏集萃药康生物科技股份有限公司) 注射 200 μ g 抗鼠 PD1 抗体诱导 T1D 发病, 同时从 D0 开始每组小鼠 (n=7 或 8) 分别给与自制的去岩藻糖的抗鼠 CXCR6 抗体和对照 mIgG 抗体, 剂量为 5mg/kg, 每周两次, 腹腔注射。D0 开始持续监测小鼠血糖变化 (一周测量两次), 观察小鼠 T1D 发病情况。T1D 发病标准: 小鼠禁食血糖浓度 ≥ 13.9 mmol/L 定义为 10 T1D 发病。结果示于图 21。结果表明, 抗鼠 CXCR6 抗体可以完全抑制 T1D 的发病 (图 21A), 维持小鼠正常的血糖水平 (图 21B)。本实施例提示靶向 CXCR6 的抗体在 T1D 中具有治疗潜力。

以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明, 本领域技术人员可 15 以根据本发明作出各种改变或变形, 只要不脱离本发明的精神, 均应属于本发明所附权利要求的范围。

权 利 要 求

1. 一种抗 CXCR6 的抗体或其抗原结合片段, 所述抗体或其抗原结合片段包含重链 CDRs 即重链 CDR1 (H-CDR1)、重链 CDR2 (H-CDR2)、重链 CDR3 (H-CDR3), 和轻链 CDRs 即轻链 CDR1 (L-CDR1)、轻链 CDR2 (L-CDR2)、轻链 CDR3 (L-CDR3), 其中, 所述重链 CDRs 和轻链 CDRs 如下所示:

(1) 依次包含 SEQ ID NO:7、8、9 所示氨基酸序列的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3; 和, 依次包含 SEQ ID NO:11、12、13 所示氨基酸序列的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3;

(2) 依次包含 SEQ ID NO:7、10、9 所示氨基酸序列的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3; 和, 依次包含 SEQ ID NO:11、12、14 所示氨基酸序列的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3; 或

(3) 依次包含 SEQ ID NO:7、8、9 所示氨基酸序列的 H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3; 和, 依次包含 SEQ ID NO:15、16、14 所示氨基酸序列的 L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段特异性地靶向 CXCR6, 优选人 CXCR6;

可选地, 所述抗体或其抗原结合片段具有人与猴 CXCR6 的种属交叉结合活性。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区和轻链可变区包含选自以下氨基酸序列组合的一种:

(1) SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列;

(2) SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 或

(3) SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列; 和, SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 75% 同一性的氨基酸序列。

5 4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体为鼠抗、兔抗、人抗, 或者是鼠源抗体、嵌合抗体、完全或部分人源化抗体, 或者为衍生化抗体;

 或者, 所述抗体的抗原结合片段为抗体的 scFv、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或 Fv 等任意形式的片段;

10 可选地, 所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 (CH) 和/或轻链恒定区 (CL), 优选地包含人或鼠的重链恒定区和/或轻链恒定区; 优选地, 所述抗体或其片段包含 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的重链恒定区和/或 κ 或 λ 型轻链恒定区。

15 5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其特征在于, 所述抗体为单克隆抗体; 优选地, 所述抗体为免疫球蛋白, 例如, 所述免疫球蛋白的类型为人 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM; 优选地, 所述抗体为人 IgG1 或 IgG4 亚型;

 优选地, 所述抗体或其抗原结合片段表现出抗体依赖性细胞介导的细胞
20 毒性 (ADCC), 优选具有增强的 ADCC 活性。

 6. 一种核酸分子, 其包含编码权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

25 7. 一种载体, 其包含权利要求 6 所述的核酸分子。

 8. 一种宿主细胞, 其包含权利要求 6 所述的核酸分子或权利要求 7 所述的载体。

30 9. 一种组合物, 其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体或权利要求 8 所述的宿主细胞, 以及可选的药学上可接受的辅料。

10. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善疾病或病症的药物中的用途。

11. 一种预防、治疗和/或改善疾病或病症的方法，所述方法包括给有此需要的受试者施用权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的组合物。

12. 权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的组合物在制备用于诊断疾病或病症的试剂中的用途。

13. 一种诊断疾病或病症的方法，所述方法包括使权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的组合物与来自受试者的生物学样本相接触。

14. 根据权利要求 10 至 13 中任一项所述的用途或方法，其特征在于，所述疾病或病症与 CXCR6 表达（包括过表达）相关；

优选地，所述疾病或病症是急性移植物抗宿主病、慢性移植物抗宿主病、自身免疫性肝炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、接触性皮炎、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎、青少年类风湿性关节炎、多发性硬化、非酒精性脂肪性肝炎、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎、I 型糖尿病、强制性脊柱炎、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白相关疾病、格雷夫斯病、干燥综合症；

优选地，所述受试者为哺乳类动物；更优选地，所述受试者为人。

15. 一种试剂盒，其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 6 所述的核酸分子、权利要求 7 所述的载体、权利要求 8 所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的组合物。