



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113365697 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 201980077120.2

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22) 申请日 2019.09.19

代理人 王健

(30) 优先权数据

62/736,208 2018.09.25 US

(51) Int.Cl.

A61P 29/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 37/06 (2006.01)

2021.05.24

C07K 16/28 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 39/395 (2006.01)

PCT/US2019/051976 2019.09.19

G01N 33/53 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/068557 EN 2020.04.02

(71) 申请人 百进生物科技公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 N·V·阿库夫 A·A·迪夫卡尔

种田贵德

权利要求书10页 说明书81页 附图8页

(54) 发明名称

抗TLR9药剂和组合物及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

描述了用于制备和使用抗TLR9药剂(例如,单克隆抗体,与TLR9结合的抗体片段和衍生物)的组合物和方法,以及试剂盒、编码此类分子的核酸、诊断试剂和包括抗TLR9药剂的试剂盒,以及制备和使用其的方法。

全长人TLR9前体的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 72)

1 mgfcrsalhp lsllvqaiml amrlalgtlp afipcelgph glvncnwflf ksvphfsmaa
61 prgnvtslsl ssnrhhhd edfahlpelr hinkwncpp vglspmhfc hmtiepstfl
121 avptleelnl synnimtvp lpkslslsl shtnilmids aslaglhalr flfmdgncyy
181 knpcrqalev apgallgign lthlslkynn ltvvprnlps sleylllsyn rivklapedl
241 anltaIrvld vggncrrcdh apncmecpr hfgqlhpdtf shlsrleglv lkdeslswln
301 aswfrlglnl rvidisenfl ykcitktkaf qgltrklrn lsfnyqkrvs fahlslapsf
361 gslvalkeld mhgiffrsld ettlrplarl pmqltrlqm nfinqaqlgi frafpqlryv
421 dlsdnrlsqa seltatmgea dggekvwlgp gdlapavdt pssedfrpnc stlnftldis
481 rnnlvtvqpe mfaqlshlqc lrshncisq avngsqflpl tglqvldish nkldiyhehs
541 ftelprleal dlsynsqpfg mggvghnfsf vahlrtrhl slehnnihsq vsqqlcstsl
601 raldfagnal ghswaegdly lhffqglegl iwldlqnrhl htllpqtlnr lpkelqvrlr
661 rdnylaaffkw wshflpkle vldlagnqk aitngalpag trlrldvsc nsisfvapgf
721 fskakelrel nlsanalktv dhawfgplas aqildvsn plhcaqgaaf mdfllevqaa
781 vpglpsrvkc gspgqlqglc ifaqdlrlcl dealswdcfa lsllavalgl gvpmhhlcg
841 wdlwycfhlc lawlpwrgrq sgrdedalpy dafvvfdktq savadvvnye lrgqleecrg
901 rwalrlcleo rdwlpgkltf enlwasvygs rktlflvlat drvsqllras flaqqrllle
961 drkdvvvlvi lspdgrrrry vrlrqlrcrg svllwphqps qgrsfwaqlg maltrdnhhf
1021 ynrrfcaqgpt ae

1. 一种抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与To11样受体9 (TLR9) 结合,其中所述药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和/或至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:

a) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR), 其中

所述第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列 $NX_1X_2MX_3$ (SEQ ID NO:76) 至少80%相同的多肽, 其中:

X_1 为Y或F,

X_2 为G或E, 以及

X_3 为N、H或T;

所述第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列 $SISSX_1X_2SYIX_3YX_4X_5X_6VKG$ (SEQ ID NO:77) 至少80%相同的多肽, 其中:

X_1 为S或T,

X_2 为S或R,

X_3 为Y或S,

X_4 为A或V,

X_5 为D或E, 以及

X_6 为T或S; 并且

所述第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的多肽, 其中:

X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R,

X_2 为T、D、P、W、G或S,

X_3 为L、I、M、V或T,

X_4 为G、T、A、D或Y,

X_5 为I、T、G或V,

X_6 为T、A、P、Y、G或D,

X_7 为无氨基酸、A、G或P,

X_8 为I、P、F或L,

X_9 为D、H、E或A, 以及

X_{10} 为Y或H; 和/或

b) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR, 其中

所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 $X_1ASEDIYNX_2LA$ (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的多肽, 其中:

X_1 为L或R; 以及

X_2 为N或G;

所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4LX_5X_6$ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的多肽, 其中:

X_1 为Y、N或H,

X₂为A或T,
 X₃为S或N,
 X₄为T、S、N或R,
 X₅为Q或H,以及
 X₆为D、Y、T或I;并且

所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列X₁QX₂X₃X₄X₅X₆X₇T (SEQ ID NO:81) 至少80% 相同的多肽,其中:

X₁为L或Q,
 X₂为D、Y或E,
 X₃为S或Y,
 X₄为E或D,
 X₅为Y或F,
 X₆为P或L,以及
 X₇为F、Y、N、W、L或P。

2. 权利要求1的抗TLR9药剂,其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少85%相同、至少90%相同、至少95%相同或至少100%相同的多肽。

3. 权利要求1或2的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少85%相同,至少90%相同,至少95%相同或至少100%相同的多肽。

4. 权利要求1至3中任一项的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少85%相同,至少90%相同,至少95%相同或至少100%相同的多肽。

5. 权利要求1至4中任一项的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少85%相同,至少90%相同,至少95%相同或至少100%相同的多肽。

6. 权利要求1至5中任一项的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少85%相同,至少90%相同,至少95%相同或至少100%相同的多肽。

7. 权利要求1至6中任一项的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少85%相同,至少90%相同,至少95%相同或至少100%相同的多肽。

8. 权利要求1至7中任一项的抗TLR9药剂,其中

i) 所述CDRH1包含选自NYGMN (SEQ ID NO:1)、NFGMN (SEQ ID NO:2)、NFGMH (SEQ ID NO:73)、NYEMN (SEQ ID NO:74) 和NYGMT (SEQ ID NO:75) 的氨基酸序列;

ii) 所述CDRH2包含选自SISSSSSYIYYADTVKG (SEQ ID NO:3)、SISSTSSYIYYADTVKG (SEQ ID NO:4)、SISSTSSYISYADTVKG (SEQ ID NO:5)、SISSTSSYIYYVDTVKG (SEQ ID NO:6)、SISSTSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:7) 和SISSTRSYIYYAETVKG (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列;

iii) 所述CDRH3包含选自YTLGIT-IDY (SEQ ID NO:9)、ADITIAAPHY (SEQ ID NO:10)、QDITTP-FDY (SEQ ID NO:11)、FTLGIT-LDY (SEQ ID NO:12)、SPMGITGFEY (SEQ ID NO:13)、HWVGGY-FDY (SEQ ID NO:14)、HTIGIT-FDY (SEQ ID NO:15)、YTLGIT-LDY (SEQ ID NO:16)、RGLAVGPFY (SEQ ID NO:17)、QSITVP-FDY (SEQ ID NO:18)、QSTYGD-FDY (SEQ ID NO:19)、HTVDTP-FAH (SEQ ID NO:20) 和_xTIGIT-FDY (SEQ ID NO:21) 的氨基酸序列;

iv) 所述CDRL1包含选自LASEDIYNNLA (SEQ ID NO:22) 和RASEDIYNGLA (SEQ ID NO:23) 的氨基酸序列;

v) 所述CDRL2包含选自YASTLQD (SEQ ID NO:24)、YASSLQD (SEQ ID NO:25)、YASTLQY (SEQ ID NO:26)、NANSLHT (SEQ ID NO:27)、YTSNLQD (SEQ ID NO:28)、NANTLHI (SEQ ID NO:29)和HASRLQD (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列;以及

vi) 所述CDRL3包含选自LQDSEYPFT (SEQ ID NO:31)、LQDSEFPYT (SEQ ID NO:32)、LQDSEFPNT (SEQ ID NO:33)、LQDSEYPWT (SEQ ID NO:34)、LQDSEYPYT (SEQ ID NO:35)、QQYYDYLP (SEQ ID NO:36)、LQSEYPWT (SEQ ID NO:37)、LQDSEYPLT (SEQ ID NO:38)和QQYSDYPWT (SEQ ID NO:39)的氨基酸序列。

9. 权利要求1至8中任一项的抗TLR9药剂,其包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中所述两个免疫球蛋白重链可变结构域各自包含一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且所述两个免疫球蛋白轻链可变结构域各自包含一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

10. 权利要求1至9中任一项的抗TLR9药剂,其中每个免疫球蛋白重链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
1	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)
2	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYAD TVKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGM	SISSSSYIYYAD	HWVGGY-FD	RASEDIYNGL	NANSLH	QQYYDYLP

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
	N (1)	TVKG (3)	Y (14)	A (23)	T (27)	T (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-LDY (16)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQSEYPW T (37)
11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPFY Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGM T (1)	SISSTSSYIYYVD TVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPFT (31)
13	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD SVKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNGL A (23)	NANTLHI (29)	QQYSDYPW T (39)
14	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPFY Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
15	NYGM N (1)	SISSTRSYIYYAE TVKG (8)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNNL A (22)	HASRLQ D (30)	LQDSEYPW T (34)
16	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

11. 权利要求10的抗TLR9药剂,其中所有CDR序列来自同一组。

12. 权利要求1至11中任一项的抗TLR9药剂,其中所述药剂是以下中的一种或多种:

- i) 分离的;
- ii) 非天然存在的;
- iii) 抗体或其抗原结合片段;
- iv) 抗体或其衍生物;
- v) 人源化抗体或其抗原结合片段;以及
- vi) 与TLR9结合的人源化抗体的衍生物。

13. 权利要求1至12中任一项的抗TLR9药剂,其中所述药剂包含可检测的标记或标签或与可检测的标记或标签缀合。

14. 权利要求1至13中任一项的抗TLR9药剂,其中所述药剂非扩散地固定在固体支持物上。

15. 一种诊断试剂,其包含权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂。
16. 一种试剂盒,其包含权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂或权利要求15的诊断试剂。
17. 一种诊断试剂盒,其配置为检测生物样品中的Toll样受体9 (TLR9),其中所述试剂盒包含权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂或权利要求15的诊断试剂。
18. 一种分离的核酸分子,其包含编码权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列。
19. 一种分离的核酸分子,其包含编码权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。
20. 一种重组表达载体,其包含第一表达盒和第二表达盒,其中所述第一表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列,并且所述第二表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。
21. 一种用权利要求20的重组表达载体转染的重组宿主细胞。
22. 一种检测TLR9的方法,其包含使已知或疑似含有TLR9的样品与权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂接触,并且如果所述样品含有TLR9,则检测TLR9:抗TLR9复合物。
23. 一种第一抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与Toll样受体9 (TLR9)结合,其中所述第一药剂与第二抗TLR9药剂竞争性结合或能够与第二抗TLR9药剂竞争性结合,所述第二药剂为权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂。
24. 一种第一抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与Toll样受体9 (TLR9)结合,其中所述第一药剂与第二抗TLR9药剂结合相同的表位或能够与第二抗TLR9药剂结合相同的表位,所述第二药剂为权利要求1至14中任一项的抗TLR9药剂。
25. 一种用于检测免疫细胞的异质群体中的TLR9的抗TLR9药剂,其中在所述群体中的浆细胞样树突细胞和/或B细胞中以显著水平检测到TLR9,而在所述群体中的其他免疫细胞中没有显著检测到TLR9。
26. 权利要求25的抗TLR9药剂,其中所述抗TLR9药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:
所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区(CDR);并且
所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR。
27. 权利要求26的抗TLR9药剂,其中
- a) 所述第一重链CDR(CDRH1)包含与氨基酸序列NX₁X₂MX₃(SEQ ID NO:76)至少80%相同的多肽,其中:
X₁为Y或F,
X₂为G或E,以及
X₃为N、H或T;
- b) 所述第二重链CDR(CDRH2)包含与氨基酸序列SISSX₁X₂SYIX₃YX₄X₅X₆VKG(SEQ ID NO:77)至少80%相同的多肽,其中:

X₁为S或T,
 X₂为S或R,
 X₃为Y或S,
 X₄为A或V,
 X₅为D或E,以及
 X₆为T或S;

c) 所述第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的多肽,其中:

X₁为Y、A、Q、F、S、H或R,
 X₂为T、D、P、W、G或S,
 X₃为L、I、M、V或T,
 X₄为G、T、A、D或Y,
 X₅为I、T、G或V,
 X₆为T、A、P、Y、G或D,
 X₇为无氨基酸、A、G或P,
 X₈为I、P、F或L,
 X₉为D、H、E或A,以及
 X₁₀为Y或H;

d) 所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列X₁ASEDIYNX₂LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的多肽,其中:

X₁为L或R;以及
 X₂为N或G;

e) 所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列X₁X₂X₃X₄LX₅X₆ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的多肽,其中:

X₁为Y、N或H;
 X₂为A或T;
 X₃为S或N;
 X₄为T、S、N或R;
 X₅为Q或H;以及
 X₆为D、Y、T或I;和/或

f) 所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列X₁QX₂X₃X₄X₅X₆X₇T (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的多肽,其中:

X₁为L或Q,
 X₂为D、Y或E,
 X₃为S或Y,
 X₄为E或D,
 X₅为Y或F,
 X₆为P或L,以及
 X₇为F、Y、N、W、L或P。

28. 权利要求26或27的抗TLR9药剂,其中

i) 所述CDRH1包含选自NYGMN (SEQ ID NO:1)、NFGMN (SEQ ID NO:2)、NFGMH (SEQ ID NO:73)、NYEMN (SEQ ID NO:74)和NYGMT (SEQ ID NO:75)的氨基酸序列;

ii) 所述CDRH2包含选自SISSSSSYIYYADTVKG (SEQ ID NO:3)、SISSTSSYIYYADTVKG (SEQ ID NO:4)、SISSTSSYISYADTVKG (SEQ ID NO:5)、SISSTSSYIYYVDTVKG (SEQ ID NO:6)、SISSTSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:7)和SISSTRSYIYYAETVKG (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列;

iii) 所述CDRH3包含选自YTLGIT-IDY (SEQ ID NO:9)、ADITIAAPHY (SEQ ID NO:10)、QDITTP-FDY (SEQ ID NO:11)、FTLGIT-LDY (SEQ ID NO:12)、SPMGITGFEY (SEQ ID NO:13)、HWVGGY-FDY (SEQ ID NO:14)、HTIGIT-FDY (SEQ ID NO:15)、YTLGIT-LDY (SEQ ID NO:16)、RGLAVGPFDY (SEQ ID NO:17)、QSITVP-FDY (SEQ ID NO:18)、QSTYGD-FDY (SEQ ID NO:19)、HTVDTP-FAH (SEQ ID NO:20)和_xTIGIT-FDY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列;

iv) 所述CDRL1包含选自LASEDIYNNLA (SEQ ID NO:22)和RASEDIYNGLA (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列;

v) 所述CDRL2包含选自YASTLQD (SEQ ID NO:24)、YASSLQD (SEQ ID NO:25)、YASTLQY (SEQ ID NO:26)、NANSLHT (SEQ ID NO:27)、YTSNLQD (SEQ ID NO:28)、NANTLHI (SEQ ID NO:29)和HASRLQD (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列;和/或,

vi) 所述CDRL3包含选自LQDSEYPFT (SEQ ID NO:31)、LQDSEFPYT (SEQ ID NO:32)、LQDSEFPNT (SEQ ID NO:33)、LQDSEYPWT (SEQ ID NO:34)、LQDSEYPYT (SEQ ID NO:35)、QQYYDYLPPT (SEQ ID NO:36)、LQSEYPWT (SEQ ID NO:37)、LQDSEYPLT (SEQ ID NO:38)和QQYSDYPWT (SEQ ID NO:39)的氨基酸序列。

29. 权利要求26至28中任一项的抗TLR9药剂,其中每个免疫球蛋白重链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:

组	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
1	NYG MN (1)	SISSSSSYIYYA DTVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNN LA (22)	YASTLQ D (24)	LQDSEYPF T (31)
2	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	ADITIAAPH Y (10)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEFPY T (32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	ADITIAAPH Y (10)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEFPY T (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYA DTVKG (5)	QDITTP-FD Y (11)	LASEDIYNN LA (22)	YASTLQ Y (26)	LQDSEFPN T (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	ADITIAAPH Y (10)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEFPY T (32)
6	NYG MN (1)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYG MN (1)	SISSSSSYIYYA DTVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYG MN (1)	SISSSSSYIYYA DTVKG (3)	HWVGGY-F DY (14)	RASEDIYNG LA (23)	NANSLH T (27)	QQYYDYL PT (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEYPW T (34)

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
10	NYG MN (1)	SISSSSSYIYYA DTVKG (3)	YTLGIT-LD Y (16)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQSEYPPW T (37)
11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	RGLAVGPF DY (17)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEYPL T (38)
12	NYG MT (1)	SISSTSSYIYYV DTVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNN LA (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPPF T (31)
13	NYG MN (1)	SISSTSSYIYYA DSVKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNG LA (23)	NANTLH I (29)	QQYSDYP WT (39)
14	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	RGLAVGPF DY (17)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEYPL T (38)
15	NYG MN (1)	SISSTRSYIYYA ETVKG (8)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNN LA (22)	HASRLQ D (30)	LQDSEYPPW T (34)
16	NYG MN (1)	SISSTSSYIYYA DTVKG (4)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNN LA (22)	YASSLQ D (25)	LQDSEYPPW T (34)

30. 权利要求29的抗TLR9药剂,其中所有CDR序列来自同一组。

31. 权利要求25至30中任一项的抗TLR9药剂,其中在浆细胞样树突细胞中以显著水平检测到TLR9。

32. 权利要求31的抗TLR9药剂,其中使用流式细胞术测定在浆细胞样树突细胞中检测TLR9。

33. 权利要求32的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9,其信噪比为约2或更大,或信噪比为约15或更大。

34. 权利要求32的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9,其信噪比为约15或更大,信噪比为约45或更大,或信噪比为约50或更大。

35. 权利要求25至30中任一项的抗TLR9药剂,其中在B细胞中以显著水平检测到TLR9。

36. 权利要求35的抗TLR9药剂,其中使用流式细胞术测定在B细胞中检测TLR9。

37. 权利要求36的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在B细胞中检测TLR9,其信噪比为约2或更大,或信噪比为约2.5或更大。

38. 权利要求36的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在B细胞中检测TLR9,其信噪比为约10或更大,或信噪比为约11或更大。

39. 权利要求25至38中任一项的抗TLR9药剂,其中在所述群体中的其他免疫细胞中没有显著检测到TLR9,其中所述其他免疫细胞包含CD3⁻CD19⁻淋巴细胞、CD3⁺CD19⁻T细胞和单核细胞中的一种或多种。

40. 一种用于检测免疫细胞的异质群体中的TLR9的方法,其包含使所述群体与权利要求25至39中任一项的抗TLR9药剂接触,并且如果所述群体包含表达TLR9的细胞,则检测TLR9:抗TLR9复合物。

抗TLR9药剂和组合物及其制备方法和使用方法

[0001] 相关专利申请

[0002] 本专利申请要求于2018年9月25日提交的名称为“ANTI-TLR9 AGENTS AND COMPOSITIONS AND METHODS FOR MAKING AND USING THE SAME”,提名Nicole Vivienne ACUFF等人作为发明人,且代理人案号指定为BLD-0105-PV的美国临时专利申请号62/736,208的权益。前述申请的全部内容(包括所有文本、表格和附图)通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 该技术部分涉及与Toll样受体9(即,TLR9)及其变体结合的药剂,特别是在生理和/或体外条件与TLR9特异性反应的单克隆抗体、抗体片段和抗体衍生物。此类试剂可用于实验室/研究目的(例如,流式细胞术),并可用于通过递送含有此类试剂的药物或其他组合物来治疗和/或预防各种疾病或病症。

背景技术

[0004] 以下描述包括可能有助于理解本技术的信息。并非承认本文提供的任何信息或本文明确或隐含引用的任何出版物为现有技术,或甚至与当前要求保护的技术特别相关。

[0005] 背景

[0006] Toll样受体(TLR)作为跨膜蛋白存在于免疫系统的许多细胞上和某些细胞内,并且通常通过识别源自各种细菌、真菌、寄生虫和病毒的病原体相关分子模式而参与先天免疫应答。先天免疫系统迅速响应微生物的入侵并作为第一道防线,而先天免疫细胞(诸如巨噬细胞或树突细胞(DC))在促炎细胞因子或一氧化氮的产生中起关键作用。TLR还参与通过直接检测来自微生物的分子而有效建立针对病原体的获得性免疫。适应性免疫系统通过从B细胞产生抗体或通过产生杀伤或辅助T淋巴细胞而对微生物发挥高度特异性应答,从而产生终生免疫记忆。该过程可能需要数周甚至数月来建立足够的免疫水平。一些TLR类型位于细胞表面上(例如,用于检测和启动对胞外病原体的应答),而其他TLR类型位于细胞内(例如,用于检测和启动对胞内病原体的应答)。

[0007] 模式识别受体(PRR)(其识别每种病原体特异性的病原体相关分子模式(PAMP))通常在先天免疫细胞上表达并且辨别自身或非自身结构。TLR家族的超过10个成员存在于哺乳动物中并作为PRR起作用,识别多种PAMP,诸如脂多糖、脂蛋白、核酸等。在人类中,已鉴定出10种不同的TLR类型,称为TLR1-10,而在小鼠中,已鉴定出13种TLR类型。TLR1-TLR10在人和小鼠之间是保守的,尽管由于逆转录病毒的插入,TLR10在小鼠中不起作用。TLR11-13不存在于人类中。

[0008] TLR是由三个主要结构域组成的I型跨膜蛋白:(1)富亮氨酸的结合结构域;(2)跨膜结构域和(3)细胞质TIR(即,Toll-IL-1R)结构域。TIR结构域是在IL-1R和各种TLR中发现的高度保守的胞内结构域。对于某些TLR(例如,TLR1,TLR2,TLR4,TLR5,TLR6,TLR10),TLR的配体识别由结合结构域介导,该结合结构域包含富亮氨酸重复序列(LRR),该LRR由19-25个“xLxxLxLxx”基序的串联拷贝组成。

[0009] TLR可以分为胞外和胞内种类 (varieties)。TLR1、TLR2、TLR4、TLR 5、TLR6和TLR11识别其在细胞表面上的配体。相反,TLR3、TLR7、TLR8和TLR9在细胞内位于静息细胞的内质网(ER)膜上,但在激活时,TLR9转运至高尔基体,然后转运至溶酶体区室。TLR9的细胞内定位可能受ER膜蛋白UNC93B的调控,后者直接与细胞内TLR种类相互作用。在UNC93B基因具有错义突变的小鼠在TLR3、TLR7和TLR9转运上有缺陷并且无法激活细胞信号传导。内溶酶体区室中组织蛋白酶对TLR9的胞外域的加工通常是区室特异性激活所必需的。

[0010] 配体结合通常引起胞质TIR结构域的二聚化,最终激活由含有TLR结构域的衔接蛋白介导的下游细胞内信号传导。与哺乳动物IL-1R信号传导相似,TLR信号传导也激活NF- κ B以及促分裂原激活蛋白激酶(MAPK),以刺激基因表达,包括促炎性细胞因子和共刺激分子。此外,尽管TLR9也促进IL-6、IL-8、TNF和IL-12的表达,然而哺乳动物TLR系统主要通过产生I型干扰素(IFN)来建立抗病毒免疫应答。

[0011] 来自细菌和病毒的基因组核酸或其类似物刺激促炎细胞因子和I型IFN的产生。其中,免疫刺激性细菌DNA最先在卡介苗(Calmette-Guerin bacilli)中鉴定出,其能够促进抗肿瘤活性并诱导人外周血白细胞中的I型IFN(IFN- α/β)和II型IFN(IFN- γ)。

[0012] TLR9(有时在文献中也称为CD289)是在免疫系统细胞中表达的受体,该免疫系统细胞包括树突细胞(即,浆细胞样树突细胞(pDC))和B细胞的亚群,并且在某些情况下,TLR9在上皮细胞(例如,角质形成细胞)上表达。浆细胞样树突细胞(pDC)是响应病毒感染而分泌I型干扰素(IFN)的免疫细胞。它们在血液中循环并且可在外周淋巴器官中发现。浆细胞样树突细胞(pDC)由骨髓造血干细胞发育而来,并构成外周血单个核细胞(PBMC)的一小部分。pDC传导抗病毒机制,并可连接先天性和适应性免疫系统。在某些情况下,pDC可以参与和/或加剧自身免疫性疾病(例如,狼疮)。B细胞,也称为B淋巴细胞,是淋巴细胞亚型的白细胞的一种。它们通常通过分泌抗体而在适应性免疫系统(即,体液免疫组分)中起作用。B细胞可以呈递抗原并分泌细胞因子。在哺乳动物中,B细胞在骨髓中成熟。B细胞通常在其细胞膜上表达B细胞受体(BCR)。BCR使B细胞与特定抗原结合并引发抗体应答。

[0013] TLR9优先结合细菌和病毒中存在的DNA,并触发导致促炎性细胞因子应答的信号级联反应。例如,癌症、感染和组织损伤可调节TLR9的表达和激活。TLR9也是自身免疫性疾病和相关炎症中的一个因素。

[0014] TLR9可识别细菌DNA和合成寡核苷酸中的未甲基化的CpG基序(参见,例如,Hemmi et al.,Nature(2000),vol.408:740-745)。含CpG的硫代磷酸酯寡核苷酸的其他修饰也可以影响其通过TLR9作为免疫应答调节剂的能力(参见,例如,Zhao et al.,Biochem.Pharmacol.(1996),vol.51:173-182)。TLR9还识别来自DNA病毒(诸如HSV-1、HSV-2、EBV、人乳头瘤病毒16型(HPV16)、CMV或MCMV)的基因组DNA。除了核酸之外,疟原虫色素(hemozoin)(一种疟疾衍生的不溶性晶体)是TLR9的配体,DNA:RNA杂合体(hybrids)也是如此。

[0015] 小鼠中TLR9配体的结合导致产生高水平的IFN α (主要由浆细胞样树突细胞(pDC)产生),这需要MyD88和IRF7(参见,例如,Akira et al.,Cell(2006),vol.124,no.4:783-801)。MyD88(髓样分化因子88)是增加NF- κ B表达的衔接分子。通过与TLR9相互作用,CD14对于促炎性细胞因子的诱导可能是必需的(Baumann et al.,J.Exp.Med.(2010),vol.207:2689-2701)。

[0016] 天然存在的TLR9激动剂可产生抗肿瘤活性(例如,肿瘤生长和血管生成),从而产生有效的抗癌应答(例如,抗白血病;Smith and Wickstrom, *J.Natl.Cancer Inst.* (1998), vol.90:1146-1154)。此外,TLR9激动剂可与其他已知的抗肿瘤化合物(例如,西妥昔单抗(cetuximab),伊立替康(irinotecan);Vincenzo et al., *Clin.Cancer Res.* (2006), vol.12(2):577-583)。

[0017] 本文描述了针对TLR9的特定单克隆抗体(与其他报道的抗TLR抗体相比,其提供优异的靶特异性、信噪比等)以及也与TLR9结合的此类抗体的抗原结合片段。

[0018] 定义

[0019] “受体人框架”是指包含衍生自如本文定义的人免疫球蛋白框架或人共有框架的重链可变结构域(VH)框架或轻链可变结构域(VL)框架的氨基酸序列的框架。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含其相同的氨基酸序列,或其可含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,框架氨基酸变化的数目为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或2个或更少。在一些实施方案中,VH和/或VL受体人框架在序列上与VH和/或VL人免疫球蛋白框架氨基酸序列或人共有框架氨基酸序列相同。

[0020] “框架”或“FR”是指除了高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由四个FR结构域组成:FR1;FR2;FR3;和FR4。因此,HVR和FR序列通常以下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0021] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常见的氨基酸残基的框架。通常,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组是如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), 第1-3卷中的亚组。在一些实施方案中,对于VL,亚组是如Kabat等人(同上)中的 κ I亚组。在一些实施方案中,对于VH,亚组是如Kabat等人(同上)中的III亚组。

[0022] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的每个区域,其在序列上高变和/或形成结构上限定的环(“高变环”)。通常,天然四链抗体包含六个HVR;3个在VH(H1、H2、H3)中,以及3个在VL(L1、L2、L3)中。HVR通常包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列可变性和/或参与抗原识别。某些高变环出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处。参见Chothia and Lesk, *J.Mol.Biol.* 196:901-917 (1987)。相反,如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 所描述, CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)通常出现在L1的氨基酸残基24-34、L2的氨基酸残基50-56、L3的氨基酸残基89-97、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-65、以及H3的氨基酸残基95-102。除VH中的CDR1外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,其为与特定抗原接触的残基。除非另外指明,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基)在本文中根据Kabat等人(同上)编号。

[0023] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL)通常具有相似的结构,每个结

构域包含四个保守框架区 (FR) 和三个高变区 (HVR)。参见例如 Kindt 等人, *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91页 (2007)。单个 VH 或 VL 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外, 可使用结合特定抗原的抗体的 VH 或 VL 结构域分别筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库来分离结合所述抗原的抗体。参见例如 Portolano 等人, *J. Immunol.* 150: 880-887 (1993); Clarkson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0024] “亲和力”是指分子 (例如抗体) 的单个结合位点与其结合配偶体 (例如抗原) 之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指明, 否则“结合亲和力”是指固有结合亲和力, 其反映结合对的成员 (例如抗体和抗原) 之间的 1:1 相互作用。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可由解离常数 (Kd) 表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量, 包括本文所述的那些。本文其他地方描述了用于测量结合亲和力的具体说明性和示范性实施方案。在一些情况下, 本文的抗体以高亲和力例如以不超过约 1×10^{-7} M 的 Kd 值、优选不超过约 1×10^{-8} M 的 Kd 值且优选不超过约 5×10^{-9} M 的 Kd 值结合靶 (例如 TLR9)。

[0025] “亲和力成熟的”抗体是指与不具有这种改变的亲本抗体相比, 在一个或多个高变区 (HVR) 中具有一个或多个改变的抗体。优选地, 这种改变导致抗体对其靶抗原的亲和力提高。

[0026] 术语“抗 TLR9 药剂”是指这样的分子, 其是或包含一种或多种抗 TLR9 抗体、TLR9 结合抗体片段或 TLR9 结合抗体衍生物。

[0027] 术语“抗 TLR9 抗体”和“结合 TLR9 的抗体”是指能够以足够的亲和力和/或特异性结合 TLR9 使得该抗体在靶向 TLR9 中用作研究工具, 诊断剂和/或治疗剂的抗体。在一些实施方案中, 例如如通过放射免疫测定法 (RIA) 或通过 Scatchard 分析或通过表面等离子共振 (诸如如 Biacore) 所测量的, 抗 TLR9 抗体 (或其抗原结合片段) 与不相关的、非 TLR9 蛋白的结合程度小于所述抗体与 TLR9 的结合的约 10%。在某些实施方案中, 与 TLR9 结合的抗体具有 0.1 μ M、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM 或 0.001nM (例如 10^{-7} M 或更小, 10^{-7} M 至 10^{-13} M) 的解离常数 (Kd)。在某些实施方案中, 抗 TLR9 抗体结合在来自不同物种的 TLR9 中保守的 TLR9 的表位。

[0028] 本文中的术语“抗体”以最广义使用, 并且涵盖各种抗体结构, 包括但不限于, 单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体) 和抗体片段, 只要它们表现出所需的抗原结合活性。

[0029] “抗体衍生物”是指除完整抗体之外的分子, 其包含衍生自完整抗体 (或其抗原结合片段) 的部分并且其结合完整抗体 (或其抗原结合片段) 所结合的抗原。抗体衍生物的实例包括但不限于单链可变片段 (scFv), 双抗体, 三抗体等, 包含多个抗原结合抗体片段、单链可变片段、双抗体、三抗体等的适配体、。

[0030] “抗体片段”或“抗原结合抗体片段”是指除完整抗体之外的分子, 其包含与完整抗体所结合的抗原结合的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂ 和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0031] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文中可互换使用, 是指具有基本上与天然抗体结构类似的结构或具有含有如本文定义的 Fc 区的重链的抗体。

[0032] 本文中的术语“Fc 区”用于定义含有恒定区的至少一部分的免疫球蛋白重链的 C 末端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在一个实施方案中, 人 IgG 重链 Fc 区从

Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可存在或不存在。除非在本文中另有说明,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号体系(也称为EU索引)进行的,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991中所述。

[0033] 与参考抗体(例如结合TLR9的抗体)“结合相同表位的抗体”是指在竞争试验中阻断参考抗体与其抗原的结合达50%或更多的抗体,并且反过来,在竞争试验中,参考抗体将所述抗体与其抗原的结合阻断达50%或更多。

[0034] 术语“嵌合”抗体是指其中重链和/或轻链的一部分衍生自特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分衍生自不同来源或物种的抗体。

[0035] “人抗体”是具有对应于由人或人细胞产生的或衍生自利用人抗体库集或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这一定义明确排除了包含非人抗原结合残基的“人源化”抗体。

[0036] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上至少一个、且通常两个可变结构域的所有,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的那些,并且所有或基本上所有FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选地可包含衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,当与受体框架区来源的抗体比对时,人源化抗体(或其抗原结合片段或衍生物)在所需位置包括一个或多个氨基酸取代(或缺失或插入)。在一些这样的实施方案中,在人(或其他)或其他FR中的特定位置处被取代(或插入或缺失)的氨基酸残基对应于亲本抗体(即CDR或HVR来源的非人抗体)中的相应位置处的氨基酸残基。抗体的“人源化形式”例如非人抗体是指已经过人源化的抗体。

[0037] 如本文所用,术语“抗体药物缀合物”(ADC)相当于术语“免疫缀合物”,并且表示特别类别的药剂-药物缀合物。在此,“药剂-药物缀合物”是与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒性药剂)缀合的抗TLR9药剂(例如抗TLR9抗体或TLR9结合片段或其衍生物)。

[0038] 如本文所用,术语“细胞毒性药剂”是指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性药剂包括但不限于放射性同位素(例如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212和Lu的放射性同位素);化疗剂或药物(例如甲氨蝶呤、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、羟基柔毛霉素、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及以下公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0039] “诊断试剂”是指用于进行诊断测定的化合物,例如靶特异性抗体(或其抗原结合)。

[0040] “效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,其随着抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)下调;以及B细胞活化。

[0041] 药剂(例如药物制剂)的“有效量”是指在必要的剂量和时间段有效实现所需治疗

或预防结果的量。

[0042] 术语“表位”是指抗体结合的抗原分子上的特定位点。

[0043] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已经引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化细胞和从其衍生的后代,而与传代次数无关。后代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但可能含有突变。具有在原始转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变后代包括在本文中。

[0044] “兔抗体”具有氨基酸序列的抗体,该氨基酸序列相应于兔或兔细胞产生的或衍生自利用兔抗体库集或其他兔抗体编码序列的非兔来源的抗体的氨基酸序列。

[0045] “免疫缀合物”是与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒性药剂)缀合的抗体(或其抗原结合片段或衍生物)。免疫缀合物相当于术语“抗体药物缀合物”(ADC)。

[0046] “个体”或“患者”或“对象”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如牛、绵羊、猫、犬和马),灵长类(例如人和非人灵长类诸如猴)、兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或对象是人。

[0047] “分离的”分子(如核酸,抗体)是已经从其原始环境(例如天然环境,如果它是天然的;或宿主细胞,如果它是外源表达的)的组分中分离的分子,并且因此通过人为干预(例如,“由人之手”)从其原始环境中改变。在一些实施方案中,例如,通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱法(例如离子交换或反相HPLC)测定的,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。分离的核酸是指含在细胞中的核酸分子,该细胞通常含有该核酸分子,但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置。在一些实施方案中,可以给分离的核酸提供比来源样品中存在的组分的量更少的非核酸组分(例如蛋白质、脂质)。包含分离的核酸的组合物可以是约50%至大于99%不含非核酸组分。包含分离的核酸的组合物可为约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%不含非核酸组分。

[0048] “编码抗TLR9抗体的分离的核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子,包括在单个载体或单独载体中的这种核酸分子,并且这种核酸分子存在于重组宿主细胞中的一个或多个位置。

[0049] 如本文所用,术语“TLR9”是指由细胞中的TLR9前体蛋白的处理所产生的任何天然的、成熟的TLR9。除非另有说明,该术语包括来自任何脊椎动物来源的TLR9,该脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类(例如人和猕猴或恒河猴)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。该术语还包括天然的TLR9变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性全长人TLR9前体蛋白的氨基酸序列示于图1(SEQ ID NO:72;1032个氨基酸残基中,前25个为信号肽,而残基26-1032构成成熟的加工蛋白)。

[0050] 术语“TLR9阳性细胞”是指在其表面或在细胞膜或细胞器(例如,内体,ER,高尔基体,溶酶体等)上表达TLR9的任何细胞。一些细胞(包括被微生物感染或与一些癌症类型和肿瘤相关的那些细胞)表现出TLR9表达上调。

[0051] 术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即包含该群体的各个抗体是相同的(如在Ig重链和/或轻链氨基酸序列的水平上所评估的)和/或结合相同表位,除了可能的变体抗体外,例如含有天然产生的突变或在单克隆抗体制剂的生产中产生

的变体抗体(这种变体通常以微量存在)。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征为从基本上同质的抗体群体获得,且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本技术的待使用的单克隆抗体可通过多种技术制造,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法和用于制造单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行了描述。

[0052] 术语“包装插页”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其含有关于使用此类治疗产品的适应症、用法、剂量、施用、联合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0053] 相对于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列相同性”被定义为在比对序列和引入缺口(如果需要)以实现最大百分比序列相同性且不考虑任何保守取代作为序列相同性的一部分之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定百分比氨基酸序列相同性目的的比对可以通过各种方法实现,这在本领域技术人员能力范围内,例如使用公众可获取的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的全长序列上实现最大比对所需的任何算法。

[0054] 术语“药物组合物”是指这样的制剂,其为允许包含在其中的活性成分的生物活性为有效的形式,并且其不包含对施用该制剂的对象不可接受地毒性的其他组分。

[0055] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除了活性成分之外的对对象无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0056] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法上的变化形式例如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变所治疗个体的自然病程的临床干预,并且可以用于预防或在临床病理过程中进行。所需的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理结果、预防转移、降低疾病进展速率、改善或缓解疾病状态和缓和或改善预后。在一些实施方案中,本文抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0057] 术语“载体”是指能够增殖与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及整合至已导入该载体的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

发明内容

[0058] 在一些方面,本文提供了抗TLR9药剂,其与Toll样受体9(TLR9)结合,包括抗TLR9抗体、TLR9结合抗体片段、此类抗体和抗体片段的衍生物和变体(包括免疫缀合物、经标记的抗体和抗原结合抗体片段等),包含此类药剂的诊断试剂、包括本文提供的抗TLR9药剂的容器和试剂盒,及其制备方法和使用方法。

[0059] 在某些方面,本文提供了抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与TLR9结合,其中该药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中a)该抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区(CDR),其中第一重链CDR(CDRH1)包含与氨基酸序列NX₁X₂MX₃(SEQ ID NO:76)至少80%相

同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y或F, X_2 为G或E,以及 X_3 为N、H或T;第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列SIS X_1X_2 SYIX $_3YX_4X_5X_6$ VKG (SEQ ID NO:77) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为S或T, X_2 为S或R, X_3 为Y或S, X_4 为A或V, X_5 为D或E,以及 X_6 为T或S;第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R, X_2 为T、D、P、W、G或S, X_3 为L、I、M、V或T, X_4 为G、T、A、D或Y, X_5 为I、T、G或V, X_6 为T、A、P、Y、G或D, X_7 为无氨基酸、A、G或P, X_8 为I、P、F或L, X_9 为D、H、E或A,以及 X_{10} 为Y或H;以及b) 该抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR,其中第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 X_1 ASEDIYN X_2 LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为L或R;以及 X_2 为N或G;第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4$ L X_5X_6 (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y、N或H; X_2 为A或T; X_3 为S或N; X_4 为T、S、N或R; X_5 为Q或H;以及 X_6 为D、Y、T或I;以及第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 X_1 Q $X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ T (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为L或Q, X_2 为D、Y或E, X_3 为S或Y, X_4 为E或D, X_5 为Y或F, X_6 为P或L,以及 X_7 为F、Y、N、W、L或P。

[0060] 在某些方面中还提供了第一抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与TLR9结合,其中该第一药剂与第二抗TLR9药剂竞争性结合,该第二药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中a) 该第二药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR), 其中第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列 $NX_1X_2MX_3$ (SEQ ID NO:76) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y或F, X_2 为G或E,以及 X_3 为N、H或T;第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列SIS X_1X_2 SYIX $_3YX_4X_5X_6$ VKG (SEQ ID NO:77) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为S或T, X_2 为S或R, X_3 为Y或S, X_4 为A或V, X_5 为D或E,以及 X_6 为T或S;第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R, X_2 为T、D、P、W、G或S, X_3 为L、I、M、V或T, X_4 为G、T、A、D或Y, X_5 为I、T、G或V, X_6 为T、A、P、Y、G或D, X_7 为无氨基酸、A、G或P, X_8 为I、P、F或L, X_9 为D、H、E或A,以及 X_{10} 为Y或H;以及b) 该第二药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR,其中第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 X_1 ASEDIYN X_2 LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为L或R;以及 X_2 为N或G;第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4$ L X_5X_6 (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y、N或H; X_2 为A或T; X_3 为S或N; X_4 为T、S、N或R; X_5 为Q或H;以及 X_6 为D、Y、T或I;以及第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 X_1 Q $X_2X_3X_4X_5X_6X_7$ T (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为L或Q, X_2 为D、Y或E, X_3 为S或Y, X_4 为E或D, X_5 为Y或F, X_6 为P或L,以及 X_7 为F、Y、N、W、L或P。

[0061] 在某些方面还提供了第一抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与Toll样受体9 (TLR9) 结合,其中该第一药剂与第二抗TLR9药剂结合相同的表位,该第二药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中a) 第二药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR), 其中第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列 $NX_1X_2MX_3$ (SEQ ID NO:76) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y或F, X_2 为G或E,以及 X_3 为N、H或T;第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列SIS X_1X_2 SYIX $_3YX_4X_5X_6$ VKG (SEQ ID NO:77) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为S或T, X_2 为S或R, X_3 为Y或S, X_4 为A或V, X_5 为D或E,以及 X_6 为T或S;第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R, X_2 为T、D、P、W、G或S, X_3 为L、I、M、V或T, X_4 为G、T、A、D或Y, X_5 为I、T、G或V, X_6 为T、A、P、Y、G或D, X_7 为无氨基酸、A、G或P, X_8 为I、P、F或L, X_9 为D、H、E或A,以及 X_{10} 为Y或H;以及b) 该第二药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR,其中第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 X_1 ASEDIYN X_2 LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为L或R;以及 X_2 为N或G;第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4LX_5X_6$ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为Y、N或H; X_2 为A或T; X_3 为S或N; X_4 为T、S、N或R; X_5 为Q或H;以及 X_6 为D、Y、T或I;以及第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 $X_1QX_2X_3X_4X_5X_6X_7T$ (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列,其中 X_1 为L或Q, X_2 为D、Y或E, X_3 为S或Y, X_4 为E或D, X_5 为Y或F, X_6 为P或L,以及 X_7 为F、Y、N、W、L或P。

[0062] 在某些方面还提供抗TLR9药剂,其用于检测免疫细胞的异质群体 (heterogeneous population of immune cells) 中的TLR9,其中在该群体中的浆细胞样树突细胞 (pDC) 和/或B细胞中以显著水平检测到TLR9,且在该群体中的其他免疫细胞中没有显著检测到TLR9。

[0063] 在某些方面还提供了检测免疫细胞的异质群体中的TLR9的方法,其包含使该群体与本文提供的抗TLR9药剂接触,其中在该群体中的其他免疫细胞中未显著检测到TLR9。

[0064] 在一个方面,本文提供在生理条件与Toll样受体9 (TLR9) 结合的分离的非天然存在的抗TLR9药剂,特别是抗体或其抗原结合片段或衍生物。在抗TLR9抗体或抗原结合片段的上下文中,此类分子通常包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域。在此类分子中,每个免疫球蛋白重链和轻链可变结构域包含如下排列的第一、第二和第三链互补决定区 (CDR):FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0065] 在重链可变结构域部分中,第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列NYGMN或NFGMN (分别为SEQ ID NO:1、2) 具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列SISSSSSYIYYADTVKG、SISSTSSYIYYADTVKG、SISSTSSYISYADTVKG、SISSTSSYIYYVDTVKG、SISSTSSYIYYADSVKG或SISSTRSYIYYAETVKG (分别为SEQ ID NO:3-8) 具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,以及第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列YTLGIT-IDY、ADITIAAPHY、QDITTP-FDY、FTLGIT-LDY、SPMGITGFEY、HWVGGY-FDY、HTIGIT-FDY、YTLGIT-LDY、RGLAVGPFYD、QSITVP-FDY、QSTYGD-FDY、HTVDTP-FAH或 x TIGIT-FDY (分别为SEQ ID NO:9-21) 具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0066] 在轻链可变结构域部分中,第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列LASEDIYNLA或RASEDIYNGLA (分别为SEQ ID NO:22和23) 具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列YASTLQD、YASSLQD、YASTLQY、NANSLHT、YTSNLQD、NANTLHI或HASRLQD (分别为SEQ ID NO:24-30) 具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,以及第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列LQDSEYPFT、LQDSEFPYT、LQDSEFPNT、LQDSEYPWT、LQDSEYPYT、QQYYDYLPY、LQSEYPWT、LQDSEYPLT或QQYSDYPWT (分别为SEQ ID NO:31-39) 具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0067] 在一些实施方案中,该分离的非天然存在的抗TLR9抗体或其TLR9结合片段包括具有氨基酸序列DY YMT (SEQ ID NO:1) 的第一重链CDR,第二重链CDR具有氨基酸序列FIRNKANGYTTEYSASVKG (SEQ ID NO:2),第三重链CDR具有氨基酸序列YLQTGNFDY (SEQ ID NO:3),第一轻链CDR具有氨基酸序列RASQDISNFLN (SEQ ID NO:5),第二轻链CDR具有氨基酸序列FTSRLHS (SEQ ID NO:6),以及第三轻链CDR具有氨基酸序列QQGYTVPPT (SEQ ID NO:7)。

[0068] 在一些实施方案中,该分离的抗TLR9药剂包含非天然存在的抗TLR9抗体 (mAb),其包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域,该免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (分别为CDRH1-3),该免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链互补决定区 (分别为CDRL1-3),其中该抗体包含免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链可变结构域,该免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链可变结构域具有选自以下的CDRH1-3和CDRL1-3的组:

m Ab	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
[0069] 1	NYGMN (1)	SISSSSYIYYADT VKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)
2	NFGMN (2)	SISSTSSYIYYADT VKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)

[0070]

m Ab	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
3	NFGMN (2)	SISSTSSYIYYADT VKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGMH (2)	SISSTSSYISYADT VKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGMN (2)	SISSTSSYIYYADT VKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGMN (1)	SISSTSSYIYYADT VKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYGMN (1)	SISSTSSYIYYADT VKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGMN (1)	SISSTSSYIYYADT VKG (3)	HWVGGY-FD Y (14)	RASEDIYNGL A (23)	NANSLHT (27)	QQYYDYLP T (36)
9	NFGMN (2)	SISSTSSYIYYADT VKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGMN (1)	SISSTSSYIYYADT VKG (3)	YTLGIT-LDY (16)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQSEYPW T (37)
11	NYEMN (1)	SISSTSSYIYYADT VKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGMT (1)	SISSTSSYIYYVDT VKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQD (28)	LQDSEYPFT (31)
13	NYGMN (1)	SISSTSSYIYYADS VKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNGL A (23)	NANTLHI (29)	QQYSDYPW T (39)
14	NYEMN	SISSTSSYIYYADT	RGLAVGPF	LASEDIYNNL	YASSLQD	LQDSEYPLT

m Ab	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
[0071]	(1)	VKG (4)	Y (17)	A (22)	(25)	(38)
15	NYGMN (1)	SISSTRSYIYYAET (1)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNNL A (22)	HASRLQD (30)	LQDSEYPW T (34)
16	NYGMN (1)	SISSTSSYIYYADT (1)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

[0072] 在一些实施方案中,该分离的抗TLR9药剂包含非天然存在的抗TLR9抗体(mAb),其包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中该免疫球蛋白重链可变结构域具有选自SEQ ID NO:41-56的氨基酸序列或与任何此类重链可变结构域序列具有至少65%-95%或更高的序列同一性的氨基酸序列,并且免疫球蛋白轻链可变结构域选自SEQ ID NO:57-71或与任何此类轻链可变结构域序列具有至少65%-95%或更高的序列同一性的氨基酸序列。

[0073] 在一些实施方案中,其中抗TLR9药剂为抗体或其抗原结合抗体片段,该抗体(或其片段)为单克隆抗体,并且可为骆驼、人、人源化、小鼠、兔或其他哺乳动物抗体或抗原结合抗体片段。在一些实施方案中,该抗体(或抗原结合抗体片段)为IgG。在其他实施方案中,该IgG为IgG1、IgG2a或IgG2b,或IgG3或IgG4。

[0074] 在不是完全人抗体(即,从能够产生全部或部分人抗体库的哺乳动物产生或衍生的抗体)的抗TLR9抗体和抗原结合抗体片段的某些实施方案中,该分子为嵌合的或人源化的抗TLR9抗体和抗原结合抗体片段。

[0075] 在一些实施方案中,抗TLR9抗体、抗原结合抗体片段,或其衍生物或变体包括可检测标记。

[0076] 在一些实施方案中,抗TLR9药剂(例如抗TLR9抗体、抗原结合抗体片段或其衍生物或变体)为免疫缀合物的一部分,该免疫缀合物进一步包括细胞毒性剂(例如,核酸、肽、多肽、小分子或适体)。

[0077] 本文所述技术的相关方面涉及包括抗TLR9药剂的组合物,该抗TLR9药剂为根据本文所述技术的分离的非天然存在的抗TLR9抗体或抗原结合抗体片段。除了含有本文所述的抗TLR9抗体或抗原结合抗体片段之外,此类组合物通常还包括载剂,例如,药学上可接受的载剂。此类组合物可包装在容器中,在一些实施方案中,该容器进一步包装在试剂盒中,该试剂盒还包括使用说明书。在药物组合物的上下文中,这种试剂盒说明书为包装插页,其不仅含有使用说明书,而且含有关于药学活性成分(例如,抗TLR9抗体、抗原结合抗体片段,或其衍生物或变体)的信息。

[0078] 另一相关方面涉及经配置以检测生物样品(通常为取自对象的生物样品)中的TLR9的诊断(diagnostics)。这种试剂盒包括诊断试剂,该诊断试剂包括本文所述的抗TLR9药剂,例如,抗TLR9抗体、其抗原结合抗体片段,或衍生物或变体,其与可检测试剂(诸如荧光团或酶底物)缀合和/或固定在固体支持物上。

[0079] 本文提供的技术的其他方面涉及本文所述的抗TLR9药剂的制备。在抗TLR9抗体(或其抗原结合抗体片段或衍生物或变体)的上下文中,一个此类方面涉及编码本文提供的多肽的分离的核酸分子。在一些实施方案中,这种核酸编码免疫球蛋白重链可变结构域,该免疫球蛋白重链可变结构域具有第一重链CDR(CDRH1)、第二重链CDR(CDRH2)和第三重链CDR(CDRH3),第一重链CDR(CDRH1)包括与氨基酸序列NYGMN或NFGMN(分别为SEQ ID NO:1和2)具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,第二重链CDR(CDRH2)包括与氨基酸序列SISSSSSYIYYADTVKG、SISSTSSYIYYADTVKG、SISSTSSYISYADTVKG、SISSTSSYIYYVDTVKG、SISSTSSYIYYADSVKG或SISSTRSYIYYAETVKG(分别为SEQ ID NO:3-8)具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,以及第三重链CDR(CDRH3)包括与氨基酸序列YTLGIT-IDY、ADITIAAPHY、QDITTP-FDY、FTLGIT-LDY、SPMGITGFY、HWVGGY-FDY、HTIGIT-FDY、YTLGIT-LDY、RGLAVGPFY、QSITVP-FDY、QSTYGD-FDY、HTVDTP-FAH或xTIGIT-FDY(分别为SEQ ID NO:9-21)具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列。这种核酸还可编码免疫球蛋白轻链可变结构域,其中第一轻链CDR(CDRL1)包括与氨基酸序列LASEDIYNNLA或RASEDIYNGLA(分别为SEQ ID NO:22和23)具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列,第二轻链CDR(CDRL2)包括与氨基酸序列YASTLQD、YASSLQD、YASTLQY、NANSLHT、YTSNLQD、NANTLHI或HASRLQD(分别为SEQ ID NO:24-30)具有至少65%的序列同一性,任选地100%的序列同一性的氨基酸序列,以及第三轻链CDR(CDRL3)包括与氨基酸序列LQDSEYPFT、LQDSEFPYT、LQDSEFPNT、LQDSEYPWT、LQDSEYPYT、QQYYDYLPY、LQDSEYPWT、LQDSEYPLT或QQYSDYPWT(分别为SEQ ID NO:31-39)具有至少65%的序列同一性,任选地至少80%,至少90%,至少95%和100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0080] 在某些实施方案中,本文提供的核酸分子编码免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链可变结构域,该免疫球蛋白重链可变结构域具有选自SEQ ID NO:41-56的氨基酸序列或与任何此类重链可变结构域序列具有至少65%-95%或更高序列同一性的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链可变结构域具有选自SEQ ID NO:57-71的氨基酸序列或与任何此类轻链可变结构域序列具有至少65%-95%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0081] 相关方面涉及携带本文提供的核酸的质粒、表达盒和载体,以及用这种核酸分子转染的重组宿主细胞。

[0082] 本文提供的技术的其他方面涉及治疗或预防与TLR9的异常水平相关的疾病或病症(例如,癌症,感染,组织损伤,自身免疫性疾病,炎症等)的方法。此类方法包括向需要这种治疗的对象施用足以实现治疗的量的本文提供的抗TLR9药剂(例如,抗TLR9抗体或其抗原结合片段,衍生物或变体),从而治疗或预防该疾病或病症。可如此治疗的此类疾病和病症包括非病毒性癌症(例如,乳腺癌,神经胶质瘤,前列腺癌,非小细胞肺癌,卵巢癌等),病毒相关癌症,诸如与人乳头瘤病毒(HPV)感染相关的宫颈癌,与HBV感染相关的癌症(例如,肝细胞癌),与Epstein-Barr病毒(EBV)感染相关的癌症,与多瘤病毒感染相关的癌症,麻疹结节性红斑(ENL),自身免疫性疾病,自身免疫性炎症,与TLR9表达增加相关的自身免疫性甲状腺疾病,B细胞淋巴瘤,T细胞淋巴瘤,急性髓性白血病(acute myeloid leukemia),霍奇金病(Hodgkin's Disease),急性髓细胞性白血病(acute myelogenous leukemia),急性

骨髓单核细胞性白血病 (acute myelomonocytic leukemia), 急性成淋巴细胞性白血病 (acute lymphoblastic leukemia), 慢性髓细胞性白血病 (chronic myelogenous leukemia), 慢性淋巴细胞性白血病 (chronic lymphocytic leukemia), B细胞大细胞淋巴瘤, 恶性淋巴瘤, 急性白血病, 淋巴肉瘤细胞白血病, B细胞白血病, 骨髓增生异常综合征, 实体癌 (solid phase cancer), 疱疹病毒感染以及移植组织或器官的排斥等。在某些情况下, 本文提供的抗TLR9药剂 (例如, 抗TLR9抗体或其抗原结合片段, 衍生物或变体) 可用作佐剂或与佐剂联合使用 (例如, 用于疫苗)。

[0083] 本文提供的技术的其他方面涉及使用本文提供的抗TLR9药剂的诊断方法, 例如, 体外或体内诊断测定以检测TLR9的存在。

[0084] 根据以下详细描述、附图和权利要求书, 本文提供的技术的前述和其他方面将变得更加清楚。

[0085] 除非另外定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本技术所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管在本技术的实践或测试中可以使用与本文所述的那些类似或等同的方法和材料, 但是下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用整体并入本文。在发生冲突的情况下, 以本说明书 (包括定义) 为准。此外, 材料、方法和实施例仅仅是说明性的, 而不是限制性的。

[0086] 在以下描述、实施例、权利要求和附图中进一步描述了某些实施方案。

附图说明

[0087] 附图示出了本技术的某些实施方案, 并且不是限制性的。为了清楚和便于说明, 附图不是按比例绘制的, 并且在一些情况下, 可以夸大或放大地示出各个方面, 以便于对特定实施例的理解。

[0088] 下面提供了本说明书中描述的每个附图和表格的简要概述, 以及本文描述的各种核苷酸和氨基酸序列的列表。

[0089] 图1显示了代表性全长人TLR9前体的氨基酸序列 (SEQ ID NO:72)。在该序列中, 构成信号肽的氨基酸残基 (残基1-25) 用下划线标出。残基26-1032包括该蛋白质的成熟的加工形式。参见, 例如, NCBI参考序列: NP_059138.1。

[0090] 图2显示了本文提供的15种不同抗TLR9抗体 (AB 1-15) 的免疫球蛋白重链 (SEQ ID NO:41-55) 和轻链 (SEQ ID NO:57-70) 的可变结构域的氨基酸序列。重链和轻链各自的CDR区以粗体显示并加下划线。还针对每个重链和轻链可变结构域和CDR序列显示了基于比对 (alignment) 的共有序列 (“CON”; SEQ ID NO:56和71)。在每个比对中, 使用三个字符 (“*”、“:”和“.”): “*”表示具有单个完全保守残基的位置; “:”表示以下“强”残基组之一是完全保守的: STA; NEQK; NHQK; NDEQ; QHRK; MILV; MILF; HY以及FYW; 以及“.”表示以下“较弱”残基组之一是完全保守的: CSA; ATV; SAG; STNK; STPA; SGND; SNDEQK; NDEQHK; NEQHRK; FVLIM以及HFY。这些都是Gonnet Pam250 matrix中出现的阳性评分残基组。“强”和“弱”残基组分别定义为“强”得分>0.5和“弱”得分=<0.5。

[0091] 图3列出了在以下实施例中描述的实验中使用的抗TLR抗体的信息。

[0092] 图4, 图 (panel) A-D为散点图, 其示出了用于以下实施例3中描述的流式细胞术实验的门控策略 (gating strategy) 的结果。

[0093] 图5,图A-K显示了在以下实施例3中描述的实验的表面染色结果。图5,图A-J显示了在以下实施例3中描述的实验结果的直方图。图5,图K为示出这些结果中的一些的信噪比(S:N)的表格。

[0094] 图6,图A-K显示了在以下实施例3中描述的实验的细胞内染色结果。图6,图A-J显示了以下实施例3中描述的实验结果的直方图。图6,图K为示出这些结果中的一些的信噪比(S:N)的表格。

[0095] 图7,图A和B显示了在以下实施例4中描述的功能测定结果的图。简而言之,图A和B显示了在用CpG-B和本文提供的抗TLR9抗体处理后,2938XL-hTLR9A细胞的IL-8分泌。图7,图A为显示IL-8分泌的代表性图。虚线表示仅用CpG-B处理的细胞。图7,图B为显示相对于仅CpG-B处理,用抗TLR9抗体处理的IL-8分泌的倍数变化的图。数据代表2个或更多个独立实验。在图A和B的每一个中,“●”表示抗TLR9抗体1(AB1),而“○”表示抗TLR9抗体13AB13。

[0096] 图8显示了实施例6中描述的封闭测定的结果。上两行显示了CD19⁺B细胞的测定结果。下两行显示了CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC)的测定结果。根据用于每种测定的PE缀合的抗TLR9抗体(即,AB1,AB2,AB3,AB4,AB8,AB9,AB10,AB12,AB13,AB14,AB15),在左上(UL)对每个图进行编号。

具体实施方式

[0097] 抗体产生和表征

[0098] 下文的实施例描述了具有所需性能(包括对TLR9和/或其变体的亲和力和/或特异性)的抗TLR9药剂(特别是抗TLR9抗体)的产生。

[0099] 除了对TLR9具有强结合亲和力/和特异性的抗体之外,还期望从治疗角度选择具有其他有益特性的嵌合、人源化或变体抗体。例如,抗体可为改变肿瘤进展或降低自身免疫性疾病严重度的抗体。用于测定本文提供的抗TLR9抗体的活性的测定方法包括,例如基于细胞的ELISA(如以测量抗体对细胞上的靶的相对亲和力)、流式细胞术(如以测量抗体的细胞特异性)以及细胞毒性(如以测量介导直接或间接杀伤表达TLR9的靶细胞如淋巴瘤系或自身反应性B细胞的潜能)。优选地,在向人类患者施用治疗有效量的抗体后,人源化或变体抗体不能引起免疫原性反应。如果引发免疫原性反应,优选该反应将使得抗体仍然为用其治疗的患者提供治疗益处。

[0100] 在一些实施方案中,本文的抗TLR9药剂(例如抗TLR9抗体、人源化抗TLR9抗体)结合相同的表位。为了筛选与目的抗体结合的TLR9上的表位结合的抗体(例如阻断抗体与TLR9结合的那些),可以进行交叉阻断测定,如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)中所述。在某些情况下,可以进行表位作图以确定抗体是否结合目的表位,例如Champe等人, J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995), Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989)或Davidson和Doranz, Immunology 143:13-20(2014)中所述。

[0101] 本文的抗体通常具有重链可变结构域,其包含由下式表示的氨基酸序列:FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4,其中“FRH1-4”表示抗TLR9抗体可变重链结构域的四个重链框架区以及“CDRH1-3”表示抗TLR9抗体可变重链结构域的三个高变区。FRH1-4可衍生自共有序列(例如人免疫球蛋白重链或轻链的类、亚类或亚组的最常见氨基酸)或者可衍

生自个体人抗体框架区或者衍生自不同框架区序列的组合。例如Kabat等人(同上)中汇编了许多人抗体框架区序列。在一个实施方案中,如Kabat等人(同上)中汇编的人免疫球蛋白亚组的共有序列提供可变重链FR。

[0102] 人可变重链FR序列可具有在其中的取代,例如其中人FR残基由相应的非人残基置换(由“相应的非人残基”是指当将人和非人序列比对时具有与目的人残基相同的Kabat位置编号的非人残基),但是用非人残基置换不是必需的。例如,可通过噬菌体展示选择相应非人残基以外的置换FR残基。

[0103] 本文的抗体可具有轻链可变结构域,其包含由下式表示的氨基酸序列:FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4,其中“FRL1-4”表示抗TLR9抗体可变轻链结构域四个框架区以及“CDRL1-3”表示抗TLR9抗体可变轻链结构域的三个高变区。FRL1-4可衍生自共有序列(例如人免疫球蛋白重链或轻链的类、亚类或亚组的最常见氨基酸)或者可衍生自个体人抗体框架区或者衍生自不同框架区序列的组合。在一个实施方案中,如Kabat等人(同上)中汇编的人免疫球蛋白亚组的共有序列提供可变轻链FR。

[0104] 人可变轻链FR序列可具有在其中的取代,例如其中人FR残基被相应的小鼠残基置换,但是用非人残基置换不是必需的。例如,可以通过噬菌体展示来选择相应非人残基以外的置换残基。下文更详细地阐述用于产生本文的目的的人源化抗TLR9抗体的方法。

[0105] 抗TLR9药剂

[0106] 本文提供了与Toll样受体9(TLR9)结合的药剂。此类药剂可被称为抗TLR9药剂并且可以包括抗TLR9抗体、抗TLR9抗体片段(例如抗原结合片段)和抗TLR9抗体衍生物。在一些实施方案中,该药剂是分离的(例如与其天然环境的组分(例如动物、生物样品)分开)。在一些实施方案中,该药剂是非天然存在的(例如通过人干预产生的)。在一些实施方案中,该药剂为人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该药剂为结合TLR9的人源化抗体的衍生物。在一些实施方案中,该药剂在实验室条件下结合TLR9(例如在体外结合TLR9、在流式细胞术测定中结合TLR9、在ELISA中结合TLR9)。在一些实施方案中,该药剂在生理条件下结合TLR9(例如结合对象的细胞上的TLR9)。

[0107] 通常,本文提供的抗TLR9药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域。在一些实施方案中,本文的抗TLR9药剂包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域。通常,抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区(CDR;CDRH1、CDRH2、CDRH3),并且抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR(CDRL1、CDRL2、CDRL3)。

[0108] CDRH1

[0109] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的第一重链CDR(CDRH1)包含与氨基酸序列NX₁X₂MX₃(SEQ ID NO:76)至少80%相同的氨基酸序列,其中X₁为Y或F;X₂为G或E;以及X₃为N、H或T。在一些实施方案中,CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0110] SEQ ID NO:76的氨基酸X₁可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:

76的氨基酸X₁被保守氨基酸(例如,对于Y和/或F是保守的)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:76的氨基酸X₁被芳族氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:76的氨基酸X₁被中性氨基酸取代。

[0111] SEQ ID NO:76的氨基酸X₂可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:76的氨基酸X₂被保守氨基酸(例如,对于G和/或E是保守的)取代。

[0112] SEQ ID NO:76的氨基酸X₃可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:76的氨基酸X₃被保守氨基酸(例如,对N、H和/或T保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:76的氨基酸X₃被极性氨基酸取代。

[0113] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的CDRH1包含选自NYGMN (SEQ ID NO:1)、NFGMN (SEQ ID NO:2)、NFGMH (SEQ ID NO:73)、NYEMN (SEQ ID NO:74)和NYGMT (SEQ ID NO:75)的氨基酸序列。

[0114] CDRH2

[0115] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的第二重链CDR (CDRH2)包含与氨基酸序列SISX₁X₂SYIX₃YX₄X₅X₆VKG (SEQ ID NO:77)至少80%相同的氨基酸序列,其中X₁为S或T;X₂为S或R;X₃为Y或S;X₄为A或V;X₅为D或E;以及X₆为T或S。在一些实施方案中,CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0116] SEQ ID NO:77的氨基酸X₁可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₁被保守氨基酸(例如,对S和/或T保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₁被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₁被中性氨基酸取代。

[0117] SEQ ID NO:77的氨基酸X₂可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₂被保守氨基酸(例如,对S和/或R保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₂被极性氨基酸取代。

[0118] SEQ ID NO:77的氨基酸X₃可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₃被保守氨基酸(例如,对Y和/或S保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₃被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₃被中性氨基酸取代。

[0119] SEQ ID NO:77的氨基酸X₄可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₄被保守氨基酸(例如,对A和/或V保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₄被脂肪族氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₄被中性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₄被非极性氨基酸取代。

[0120] SEQ ID NO:77的氨基酸X₅可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₅被保守氨基酸(例如,对D和/或E保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₅被酸性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₅被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₅被带负电荷的氨基酸取代。

[0121] SEQ ID NO:77的氨基酸X₆可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₆被保守氨基酸(例如,对T和/或S保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:

77的氨基酸X₆被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:77的氨基酸X₆被中性氨基酸取代。

[0122] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的CDRH2包含选自SISSSSSYIYYADTVKG (SEQ ID NO:3)、SISSTSSYIYYADTVKG (SEQ ID NO:4)、SISSTSSYISYADTVKG (SEQ ID NO:5)、SISSTSSYIYYVDTVKG (SEQ ID NO:6)、SISSTSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:7)和SISSTRSYIYYAETVKG (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。

[0123] CDRH3

[0124] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的第三重链CDR (CDRH3)包含与氨基酸序列X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ (SEQ ID NO:78)至少80%相同的氨基酸序列,其中X₁为Y、A、Q、F、S、H或R;X₂为T、D、P、W、G或S;X₃为L、I、M、V或T;X₄为G、T、A、D或Y;X₅为I、T、G或V;X₆为T、A、P、Y、G或D;X₇为无氨基酸、A、G或P;X₈为I、P、F或L;X₉为D、H、E或A;以及X₁₀为Y或H。在一些实施方案中,CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0125] SEQ ID NO:78的氨基酸X₁可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₁被保守氨基酸(例如,对Y、A、Q、F、S、H和/或R保守)取代。

[0126] SEQ ID NO:78的氨基酸X₂可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₂被保守氨基酸(例如,对T、D、P、W、G和/或S保守)取代。

[0127] SEQ ID NO:78的氨基酸X₃可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₃被保守氨基酸(例如,对L、I、M、V和/或T保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₃被中性氨基酸取代。

[0128] SEQ ID NO:78的氨基酸X₄可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₄被保守氨基酸(例如,对G、T、A、D和/或Y保守)取代。

[0129] SEQ ID NO:78的氨基酸X₅可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₅被保守氨基酸(例如,对I、T、G和/或V保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₅被中性氨基酸取代。

[0130] SEQ ID NO:78的氨基酸X₆可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₆被保守氨基酸(例如,对T、A、P、Y、G和/或D保守)取代。

[0131] SEQ ID NO:78的氨基酸X₇可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₇被保守氨基酸(例如,对A、G和/或P保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₇被非极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₇被中性氨基酸取代。

[0132] SEQ ID NO:78的氨基酸X₈可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₈被保守氨基酸(例如,对I、P、F和/或L保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₈被非极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₈被中性氨基酸取代。

[0133] SEQ ID NO:78的氨基酸X₉可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₉被保守氨基酸(例如,对D、H、E和/或A保守)取代。

[0134] SEQ ID NO:78的氨基酸X₁₀可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:

78的氨基酸X₁₀被保守氨基酸(例如,对Y或H保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₁₀被芳族氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₁₀被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:78的氨基酸X₁₀被中性氨基酸取代。

[0135] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的CDRH3包含选自YTLGIT-IDY (SEQ ID NO:9)、ADITIAAPHY (SEQ ID NO:10)、QDITTP-FDY (SEQ ID NO:11)、FTLGIT-LDY (SEQ ID NO:12)、SPMGITGFEY (SEQ ID NO:13)、HWVGGY-FDY (SEQ ID NO:14)、HTIGIT-FDY (SEQ ID NO:15)、YTLGIT-LDY (SEQ ID NO:16)、RGLAVGPFY (SEQ ID NO:17)、QSITVP-FDY (SEQ ID NO:18)、QSTYGD-FDY (SEQ ID NO:19)、HTVDTP-FAH (SEQ ID NO:20)和xTIGIT-FDY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。

[0136] CDRL1

[0137] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列X₁ASEDIYNX₂LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中X₁为L或R;以及X₂为N或G。在一些实施方案中,CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0138] SEQ ID NO:79的氨基酸X₁可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:79的氨基酸X₁被保守氨基酸(例如,对L和/或R保守)取代。

[0139] SEQ ID NO:79的氨基酸X₂可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:79的氨基酸X₂被保守氨基酸(例如,对N和/或G保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:79的氨基酸X₂被中性氨基酸取代。

[0140] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的CDRL1包含选自LASEDIYNNLA (SEQ ID NO:22) 和RASEDIYNGLA (SEQ ID NO:23) 的氨基酸序列。

[0141] CDRL2

[0142] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列X₁X₂X₃X₄LX₅X₆ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中X₁为Y、N或H;X₂为A或T;X₃为S或N;X₄为T、S、N或R;X₅为Q或H;以及X₆为D、Y、T或I。在一些实施方案中,CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0143] SEQ ID NO:80的氨基酸X₁可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₁被保守氨基酸(例如,对Y、N和/或H保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₁被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₁被中性氨基酸取代。

[0144] SEQ ID NO:80的氨基酸X₂可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₂被保守氨基酸(例如,对A和/或T保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₂被中性氨基酸取代。

[0145] SEQ ID NO:80的氨基酸X₃可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₃被保守氨基酸(例如,对S和/或N保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:

80的氨基酸X₃被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₃被中性氨基酸取代。

[0146] SEQ ID NO:80的氨基酸X₄可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₄被保守氨基酸(例如,对T、S、N和/或R保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₄被极性氨基酸取代。

[0147] SEQ ID NO:80的氨基酸X₅可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₅被保守氨基酸(例如,对Q和/或H保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₅被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₅被中性氨基酸取代。

[0148] SEQ ID NO:80的氨基酸X₆可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:80的氨基酸X₆被保守氨基酸(例如,对D、Y、T或I保守)取代。

[0149] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的CDRL2包含选自Y YASTLQD(SEQ ID NO:24)、YASSLQD(SEQ ID NO:25)、YASTLQD(SEQ ID NO:26)、NANSLHT(SEQ ID NO:27)、YTSNLQD(SEQ ID NO:28)、NANTLHI(SEQ ID NO:29)和HASRLQD(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。

[0150] CDRL3

[0151] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的第三轻链CDR(CDRL3)包含与氨基酸序列X₁QX₂X₃X₄X₅X₆X₇T(SEQ ID NO:81)至少80%相同的氨基酸序列,其中X₁为L或Q;X₂为D、Y或E;X₃为S或Y;X₄为E或D;X₅为Y或F;X₆为P或L;以及X₇为F、Y、N、W、L或P。在一些实施方案中,CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0152] SEQ ID NO:81的氨基酸X₁可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₁被保守氨基酸(例如,对L和/或Q保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₁被中性氨基酸取代。

[0153] SEQ ID NO:81的氨基酸X₂可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₂被保守氨基酸(例如,对D、Y和/或E保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₂被极性氨基酸取代。

[0154] SEQ ID NO:81的氨基酸X₃可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₃被保守氨基酸(例如,对S和/或Y保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₃被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₃被中性氨基酸取代。

[0155] SEQ ID NO:81的氨基酸X₄可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₄被保守氨基酸(例如,对E和/或D保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₄被酸性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₄被极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₄被带负电荷的氨基酸取代。

[0156] SEQ ID NO:81的氨基酸X₅可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₅被保守氨基酸(例如,对Y和/或F保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₅被芳族氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₅被中性氨基

酸取代。

[0157] SEQ ID NO:81的氨基酸X₆可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₆被保守氨基酸(例如,对P和/或L保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₆被非极性氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₆被中性氨基酸取代。

[0158] SEQ ID NO:81的氨基酸X₇可被任何氨基酸取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₇被保守氨基酸(例如,对F、Y、N、W、L或P保守)取代。在一些实施方案中,SEQ ID NO:81的氨基酸X₇被中性氨基酸取代

[0159] 在一些实施方案中,本文提供的抗TLR9药剂的CDRL3包含选自LQDSEYPFT (SEQ ID NO:31)、LQDSEFPYT (SEQ ID NO:32)、LQDSEFPNT (SEQ ID NO:33)、LQDSEYPWT (SEQ ID NO:34)、LQDSEYPYT (SEQ ID NO:35)、QQYYDYLP (SEQ ID NO:36)、LQSEYPWT (SEQ ID NO:37)、LQDSEYPLT (SEQ ID NO:38)和QQYSDYPWT (SEQ ID NO:39)的氨基酸序列。

[0160] CDR组

[0161] 在一些实施方案中,抗TLR9药剂包含免疫球蛋白重链可变结构域以及免疫球蛋白轻链可变结构域,该免疫球蛋白重链可变结构域包含一组CDR(即CDRH1、CDRH2、CDRH3);该免疫球蛋白轻链可变结构域包含一组CDR(即CDRL1、CDRL2、CDRL3)。在一些实施方案中,本文中的抗TLR9药剂包含两个免疫球蛋白重链可变结构域以及两个免疫球蛋白轻链可变结构域,每个免疫球蛋白重链可变结构域包含一组CDR(即,CDRH1、CDRH2、CDRH3),每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含一组CDR(即,CDRL1、CDRL2、CDRL3)。CDR组可包含本文提供的CDR氨基酸序列(即,CDRH1、CDRH2、CDRH3;以及CDRL1、CDRL2、CDRL3)的任何组合。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链可变结构域包含一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且免疫球蛋白轻链可变结构域包含一组的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其选自下表中提供的组1-16。对于包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域的抗TLR9药剂,每个免疫球蛋白重链可变结构域可包含一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且每个免疫球蛋白轻链可变结构域可包含一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,其选自下表中提供的组1-16。

[0162]

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
1	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)
2	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYAD TVKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGM	SISSSSYIYYAD	HWVGGY-FD	RASEDIYNGL	NANSLH	QQYYDYLP

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
	N (1)	TVKG (3)	Y (14)	A (23)	T (27)	T (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-LDY (16)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQSEYPW T (37)
[0163] 11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGM T (1)	SISSTSSYIYYVD TVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPFT (31)
13	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD SVKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNNL A (23)	NANTLHI (29)	QQYSDYPW T (39)
14	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
15	NYGM N (1)	SISSTRSYIYYAE TVKG (8)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNNL A (22)	HASRLQ D (30)	LQDSEYPW T (34)
16	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

[0164] 在一些实施方案中,所有CDR来自同一组。例如,对于包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域的抗TLR9药剂,每个免疫球蛋白重链可变结构域可包含来自组1的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且每个免疫球蛋白轻链可变结构域可包含来自组1的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0165] 在一些实施方案中,CDR来自不同的组。例如,对于包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域的抗TLR9药剂,每个免疫球蛋白重链可变结构域可包含来自组1的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,而每个免疫球蛋白轻链可变结构域可包含来自组2的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。在另一个实例中,对于包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域的抗TLR9药剂,一个免疫球蛋白重链可变结构域可包含来自组1的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,而另一个免疫球蛋白重链可变结构域可包含来自组2的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列;并且一个免疫球蛋白轻链可变结构域可包含来自组1的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列,而另一个免疫球蛋白轻链可变结构域可包含来自组2的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序

列。

[0166] 与抗TLR9药剂竞争性结合的药剂

[0167] 本文提供了与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂竞争性结合或能够与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂竞争性结合的抗TLR9药剂。特别地,本文提供了与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂竞争性结合或能够与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂竞争性结合的此类药剂可称为竞争物药剂。在某些情况下,当竞争物与本文所述的抗TLR9药剂结合TLR9的相同通用区域(即,胞外区或富亮氨酸的结合结构域)结合时,可认为该药剂(即,竞争物药剂)竞争结合TLR9。在某些情况下,当竞争物与本文所述的抗TLR9药剂结合TLR9的完全相同区域(例如,完全相同的肽(线性表位))或完全相同的表面氨基酸(构象表位))时,可认为该药剂(即,竞争物药剂)竞争结合TLR9。在某些情况下,当在合适的测定条件竞争物与本文所述的抗TLR9药剂结合TLR9的相同通用区域(即,胞外区或富含的亮氨酸结合结构域)时,可认为该药剂(即,竞争物药剂)能够竞争结合TLR9。在某些情况下,当在合适的测定条件竞争物与本文所述的抗TLR9药剂结合TLR9的完全相同区域(例如,完全相同的肽(线性表位))或完全相同的表面氨基酸(构象表位))时,可认为该药剂(即,竞争物药剂)能够竞争结合TLR9。

[0168] 在某些情况下,当竞争物阻断本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合时,可认为药剂(即竞争物药剂)竞争结合TLR9。在某些情况下,当在合适的测定条件下竞争物阻断本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合时,可认为药剂(即竞争物药剂)能够竞争结合TLR9。竞争物是否阻断本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合可使用合适的竞争试验或阻断测定(诸如如本文实施例5中所述的阻断测定)来确定。竞争物药剂可在竞争或阻断测定中将本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合阻断50%或更多,并且反过来,本文所述的一种或多种抗TLR9药剂可在竞争或阻断测定中将竞争物药剂与TLR9的结合阻断约50%或更多。例如,药剂(即竞争物药剂)可在竞争或阻断测定中将本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合阻断约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%,并且反过来,本文所述的一种或多种抗TLR9药剂可在竞争或阻断测定中将竞争物药剂与TLR9的结合阻断约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0169] 在某些情况下,当竞争物以与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂相似的亲和力结合TLR9时,可认为药剂(即竞争物药剂)竞争结合TLR9。在某些情况下,当在合适的测定条件下,竞争物以与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂相似的亲和力结合TLR9时,可认为药剂(即竞争物药剂)能够竞争结合TLR9。在一些实施方案中,当竞争物以本文所述的一种或多种抗TLR9药剂的亲力的至少约50%的亲力结合TLR9时,认为该药剂(即竞争物药剂)竞争结合TLR9。例如,当竞争物以本文所述的一种或多种抗TLR9药剂的亲力的至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的亲力结合TLR9时,可认为该药剂(即竞争物药剂)竞争结合TLR9。竞争物药剂可包含本文针对抗TLR9药剂描述的任何特征。

[0170] 本文还提供了抗TLR9药剂,其与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂结合相同的表位至或能够与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂结合相同的表位。特别地,本文提供了抗TLR9药剂,其与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂竞争结合TLR9上的相同表位。结合相同表位的此类药剂可称为表位竞争物。在某些情况下,表位竞争物可与本文所述的抗TLR9药

剂结合TLR9的完全相同的区域(例如完全相同的肽(线性表位)或完全相同的表面氨基酸(构象表位))。在某些情况下,表位竞争物阻断本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合。表位竞争物可在竞争试验中将本文所述的一种或多种抗TLR9药剂与TLR9的结合阻断约50%或更多,并且反过来,本文所述的一种或多种抗TLR9药剂可在竞争试验中将表位竞争物与TLR9的结合阻断50%或更多。在某些情况下,表位竞争物以与本文所述的一种或多种抗TLR9药剂相似的亲和力结合TLR9。在一些实施方案中,表位竞争物以本文所述的一种或多种抗TLR9药剂的亲力的至少约50%的亲和力结合TLR9。例如,表位竞争物可以本文所述的一种或多种抗TLR9药剂的亲力的至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的亲和力结合TLR9。表位竞争物可包含本文对于抗TLR9药剂描述的任何特征。

[0171] 抗体制备

[0172] 在一些实施方案中,抗TLR9药剂为抗体。在下面的实施例中描述了用于产生抗TLR9抗体和抗TLR9抗体的变体的方法。在一些实施方案中,抗TLR9药剂为人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗TLR9药剂为结合TLR9的人源化抗体或其衍生物。可基于非人抗TLR9抗体制备人源化抗TLR9抗体。还可例如在遗传工程化的(即转基因)小鼠(例如来自Medarex)中制备完全人抗体,该小鼠,当其呈递免疫原时,可以产生不一定需要CDR移植的人抗体。这些抗体是来自动物诸如小鼠的完全人的(100%人蛋白序列),其中非人抗体基因被抑制并用人抗体基因表达所置换。当将TLR9呈递至能产生针对相关CDR的人框架的这些经遗传工程化的小鼠或其他动物时,可产生抗TLR9的抗体。

[0173] 当产生变体时,制备亲本抗体。用于产生这种非人抗体和亲本抗体的示例性技术在以下部分中描述。

[0174] 抗原制备

[0175] 用于产生抗体的抗原可以为,例如,完整的TLR9(特别是在细胞中表达的),或TLR9的一部分(例如N末端结构域,C末端结构域,胞质结构域,细胞器内结构域,跨膜结构域,胞外结构域,胞外域(ectodomain),TIR结构域,富亮氨酸的结构域或包含所需表位的TLR9片段)。可用于产生抗体的其他形式的抗原对于本领域技术人员是清楚的。

[0176] 多克隆抗体

[0177] 通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂,在动物(脊椎动物或无脊椎动物,包括哺乳动物、鸟类和鱼类,包括软骨鱼)中可产生多克隆抗体。使用双功能或衍生化试剂(例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基缀合)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R和 R^1 是不同的烷基)将相关抗原与在要被免疫物种中具有免疫原性的蛋白质或其他载体(例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)缀合可能是有用的。非蛋白载体(例如胶体金)也可用于在生产抗体。

[0178] 通过将例如100 μg 或5 μg 的蛋白质或缀合物(分别对于兔或小鼠)与三份体积的弗氏完全佐剂组合并在多个位点皮内注射该溶液,使动物针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物进行免疫。一个月后,动物通过在多个位点皮下注射,用弗氏完全佐剂中的原始量的肽或缀合物的五分之一至十分之一加强。7至14天后,将动物放血,并测定血清的抗体滴度。加强动物直到滴度稳定。通常,用相同抗原但与不同蛋白质缀合和/或通过不同交联剂缀合的缀

合物加强动物。还可以在重组细胞培养物中制备缀合物作为蛋白质融合物。另外,聚集剂诸如明矾适合用于增强免疫反应。

[0179] 单克隆抗体

[0180] 单克隆抗体可使用Kohler等人,Nature,256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法制备,或者可通过其他方法诸如重组DNA方法(美国专利号4,816,567)制备。在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其他合适的宿主动物诸如仓鼠或猕猴,以引发淋巴细胞产生或能够产生与用于免疫的蛋白质特异性结合的抗体。或者,淋巴细胞可在体外免疫。然后使用合适的融合剂(诸如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,第59-103页(AcademiCPress, 1986))。

[0181] 将由此制备的杂交瘤细胞接种并生长在合适的培养基中,该培养基可含有一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0182] 优选的骨髓瘤细胞是那些有效融合,支持所选择的抗体生产细胞稳定高水平生产抗体的并对诸如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系为鼠骨髓瘤细胞系,诸如可从美国典型培养物保藏中心(Rockville, Md. USA)获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞。还描述了人骨髓瘤和小鼠-人异种骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0183] 测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基中针对抗原的单克隆抗体的产生。杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可通过免疫沉淀、通过体外结合测定(诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))或通过表达膜抗原的细胞的流式细胞分析来测定。

[0184] 单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson等人, Anal. Biochem., 107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

[0185] 在鉴定产生所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,克隆可通过有限稀释程序并通过标准方法生长进行亚克隆(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,第59-103页(AcademiCPress, 1986))。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水肿瘤在体内生长。

[0186] 通过常规免疫球蛋白纯化方法(诸如如蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析),将亚克隆分泌的单克隆抗体适当地从培养基、腹水或血清中分离。

[0187] 编码单克隆抗体的DNA易于使用常规程序(例如,通过使用能够与编码单克隆抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)进行分离和测序。或者,可从mRNA制备cDNA,然后对该cDNA进行DNA测序。杂交瘤细胞作为用于cDNA制备的此类基因组DNA或RNA的优选来源。一旦分离,可将DNA置于本领域熟知的表达载体中,然后将其转染至宿主细胞(诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,其不会另外产生免疫球蛋白),以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体合成。下面将更详细地描述抗体的重组生产。

[0188] 人源化和氨基酸序列变体

[0189] 抗体人源化的一般方法描述于US5861155、US19960652558、19960606、US6479284、US20000660169、20000912、US6407213、US19930146206、19931117、US6639055、US20000705686、20001102、US6500931、US19950435516、19950504、US5530101、US5585089、US19950477728、19950607、US5693761、US19950474040、19950607、US5693762、US19950487200、19950607、US6180370、US19950484537、19950607、US2003229208、US20030389155、20030313、US5714350、US19950372262、19950113、US6350861、US19970862871、19970523、US5777085、US19950458516、19950517、US5834597、US19960656586、19960531、US5882644、US19960621751、19960322、US5932448、US19910801798、19911129、US6013256、US19970934841、19970922、US6129914、US19950397411、19950301、US6210671、US6329511、US19990450520、19991129、US2003166871、US20020078757、20020219、US5225539、US19910782717、19911025、US6548640、US19950452462、19950526、US5624821以及US19950479752、19950607。在某些实施方案中,可能需要产生这些人源化抗体的氨基酸序列变体,特别是在这些变体改善抗体的结合亲和力或其他生物学特性的情况下。

[0190] 抗TLR9抗体的氨基酸序列变体通过将适当的核苷酸改变引入抗TLR9抗体DNA,或通过肽合成来制备。此类变体包括例如缺失和/或插入进和/或取代本文实施例的抗TLR9抗体的氨基酸序列内的残基。只要最终构建体拥有所需特性,进行缺失、插入和取代的任何组合以制备最终构建体。氨基酸变化还可改变人源化或变体抗TLR9抗体的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0191] 鉴定抗TLR9抗体的用以诱变的优选位置的某些残基或区域的一种有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”(如Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)所述)。在此,鉴定一个残基或一组靶残基(例如带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)置换以影响该氨基酸与TLR9抗原的相互作用。然后通过取代位点处或对于取代位点引入另外或其他变体来修饰那些对取代表现出功能敏感性的氨基酸位置。因此,虽然用于引入氨基酸序列变异的位点是预定的,但突变本身的性质无需是预定的。例如,为了分析在给定点处突变的性能,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变,并筛选所表达的抗TLR9抗体变体的所需活性。氨基酸序列插入包括在一个残基到含有一百个或更多个残基的多肽的长度范围内的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括N末端甲硫氨酰基残基或与表位标签融合的抗体。其他插入变体包括增加抗体血清半衰期的酶或多肽与抗体的N末端或C末端的融合。

[0192] 另一种类型的变体为氨基酸取代变体。这些变体具有从抗体分子去除的至少一个氨基酸残基和在其位置插入的不同残基。取代诱变最目的的位点包括高变区,但也考虑FR改变。优选保守取代,但可引入更多的实质性改变并可筛选产物。取代的实例列举如下:

[0193] 示例性氨基酸残基取代

[0194] Ala (A) val; leu; ile; val

[0195] Arg (R) lys; gln; asn; lys

[0196] Asn (N) gln; his; asp, lys; gln; arg

- [0197] Asp (D) glu;asn
- [0198] Cys (C) ser;ala
- [0199] Gln (Q) asn;glu
- [0200] Glu (E) asp;gln
- [0201] Gly (G) ala
- [0202] His (H) asn;gln;lys;arg
- [0203] Ile (I) leu;val;met;ala;leu;phe;正亮氨酸
- [0204] Leu (L) 正亮氨酸;ile;val;ile;met;ala;phe
- [0205] Lys (K) arg;gln;asn
- [0206] Met (M) leu;phe;ile
- [0207] Phe (F) leu;val;ile;ala;tyr
- [0208] Pro (P) ala
- [0209] Ser (S) thr
- [0210] Thr (T) ser
- [0211] Trp (W) tyr;phe
- [0212] Tyr (Y) trp;phe;thr;ser
- [0213] Val (V) ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸
- [0214] 通过选择在他们对维持 (a) 多肽骨架在取代区域中的结构例如片状或螺旋构象、(b) 在靶位点分子的电荷或疏水性或 (c) 侧链大小的影响方面显著不同的取代来实现抗体生物学特性的实质性修饰。基于常见的侧链特性将天然存在的残基分成组：
- [0215] (1) 疏水性:正亮氨酸,met,ala,val,leu,ile;
- [0216] (2) 中性亲水性:cys,ser,thr;
- [0217] (3) 酸性:asp,glu;
- [0218] (4) 碱性:asn,gln,his,lys,arg;
- [0219] (5) 影响链取向的残基:gly,pro;以及
- [0220] (6) 芳香族:trp,tyr,phe。
- [0221] 非保守取代将这些类别之一的成员交换为另一个类别。
- [0222] 任何不参与维持抗体的适当构象的半胱氨酸残基也可被取代,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可以将半胱氨酸键加入抗体以改善其稳定性(特别是当抗体为抗体片段诸如Fv片段时)。
- [0223] 一种类型的取代变体涉及替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,相对于产生它们的亲本抗体,选择用于进一步开发的所得变体将具有改善的生物学特性。产生这种取代变体的方便方法是使用噬菌体展示的亲和力成熟。简单地说,突变若干高变区位点(例如6-7个位点)以在每个位点产生所有可能的氨基取代。由此产生的抗体变体以单价形式从丝状噬菌体颗粒展示为与包装在每个颗粒内的M13的基因III产物的融合物。然后如本文所公开的筛选噬菌体展示的变体的生物活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有显著贡献的高变区残基。或者,或另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。这种接触残基和相邻残基是根据本文详述的技术的取代的候选

物。一旦产生此类变体,如本文所述对该组变体进行筛选,并且可以选择在一种或多种相关试验中具有优良特性的抗体用于进一步开发。

[0224] 抗体的另一种类型的氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化模式。改变是指缺失抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0225] 抗体的糖基化通常是N-连接的和/或O-连接的。N-连接指碳水化合物部分与天冬酰胺残基侧链的附着。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中X为除了脯氨酸之外的任何氨基酸,是用于将碳水化合物部分酶促附着至天冬酰胺侧链的最常见的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸(尽管也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸,但最常见的是丝氨酸或苏氨酸)的附着。

[0226] 通过改变氨基酸序列使其含有一个或多个上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点)方便地完成将糖基化位点添加至抗体。还可通过原始抗体的序列中添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或由一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代(对于O-连接的糖基化位点而言)来进行改变。

[0227] 通过本领域已知的多种方法制备编码本文抗TLR9抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然氨基酸序列变体的情况下)或通过抗TLR9抗体的早期制备的变体或非变体形式的寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变制备。

[0228] 人抗体

[0229] 作为人源化的替代方案,可以产生人抗体。例如,可以产生在免疫后能够在不产生内源免疫球蛋白的情况下产生完整的人类抗体库的转基因动物(例如,小鼠)。例如,在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到此类种系突变小鼠中能导致在抗原攻击时产生人抗体。参见例如Jakobovits等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits等人,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann等人,Year in Immuno.,7:33(1993);以及美国专利号5,591,669、5,589,369和5,545,807。人抗体也可以衍生自噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991);以及美国专利号5,565,332和5,573,905)。人抗体也可以通过体外活化的B细胞产生(参见美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0230] 抗原结合抗体片段

[0231] 在某些实施方案中,抗TLR9药剂是保留至少一种所需活性(包括抗原结合)的抗体片段。已经开发了各种用于生产抗体片段的技术。在一些情况,这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化衍生的(参见例如Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等人,Science 229:81(1985))。在一些情况,这些片段通过重组宿主细胞直接产生。例如,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。在一些情况,使用促进 $F(ab')_2$ 分子组装的亮氨酸拉链GCN4形成 $F(ab')_2$ 。根据另一种方法,Fv、Fab或 $F(ab')_2$ 片段可以直接从重组宿主细胞培养物中分离。生产抗体片段的其他技术

对于本领域技术人员将是明显的。

[0232] 多特异性抗体和其他药剂

[0233] 在一些实施方案中,抗TLR9药剂包含第一结合部分和第二结合部分,其中第一结合部分与为TLR9的第一分子特异性反应,而第二结合部分与是不同于第一分子的分子种类的第二分子特异性反应。此类药剂可包含多个第一结合部分、多个第二结合部分,或多个第一结合部分和多个第二结合部分。优选地,第一结合部分与第二结合部分的比例为约1:1,尽管其可在约1000:1至约1:1000的范围内,其中该比例根据价(valency)来测量。

[0234] 在第一部分是抗体的那些实施方案中,第二结合部分也可为抗体。在一些实施方案中,第一部分和第二部分通过接头部分连接,该接头部分可具有两个至数百或甚至数千价,用于通过一种或不同的化学作用附着第一和第二结合部分。双特异性抗体的实例包括对两种不同表位有反应性的那些;在一些情况中,一个表位为TLR9表位,而第二个表位在不相关的可溶性分子上。在一些实施方案中,双特异性抗体对TLR9上的表位和同一细胞表面上发现的不同分子上的表位具有反应性。在一些实施方案中,双特异性抗体对TLR9上的表位和对在不同细胞的表面上发现的不同分子上的表位具有反应性。

[0235] 本文组合物还可包含第一药剂和第二药剂,其中第一药剂包含与第一分子(如TLR9)特异性反应的第一结合部分,而第二药剂包含与是不同于第一分子的分子种类的第二分子特异性反应的第二结合部分。第一药剂和/或第二药剂可为抗体。尽管优选比例为约1:1,但第一药剂与第二药剂的比例可在约1000:1至1:1000的范围内。在一些实施方案中,可能需要产生对至少两个不同表位具有结合特异性的多特异性(例如,双特异性)抗TLR9抗体。示例性双特异性抗体可结合TLR9的两个不同表位。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段(例如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体)。

[0236] 根据一种用于制备双特异性抗体的方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行工程化,以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含抗体恒定区的 C_H3 结构域的至少一部分。在该方法中,来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链被置换为更大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)。通过用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“腔”。这提供了增加异二聚体相对其他不需要的终产物(诸如同型二聚体)的产量的机制。参见例如1996年9月6日公布的W096/27011。

[0237] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合物”抗体。例如,异源缀合物中的一个抗体可以与抗生物素蛋白缀合,另一种抗体与生物素缀合。异源缀合物抗体可以使用任何方便的交联方法制备。合适的交联剂是本领域熟知的,并与许多交联技术一起公开于美国专利号4,676,980中。

[0238] 从抗体片段产生双特异性抗体的技术也已在文献中描述。例如,可以使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等人,Science 229:81(1985)描述了一种方法,其中完整的抗体被蛋白水解切割以产生 $F(ab')_2$ 片段。这些片段在二硫酚络合剂亚砷酸钠的存在下被还原,以稳定邻位的二硫酚并防止分子间二硫化物的形成。然后将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原,将 Fab' -TNB衍生物之一再转化为 Fab' -硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。在又进一步的实施方案中,可以将从大肠杆菌直接回收的 Fab' -SH片段在体外化学偶联以形成双

特异性抗体(参见例如Shalaby等人, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992))。

[0239] 还描述了直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如Kostelny等人, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992))。通过基因融合,将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同型二聚体在铰链区被还原以形成单体,以及然后被再氧化以形成抗体异二聚体。这个方法也可用于生产抗体同型二聚体。由Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的另一种机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H),该接头太短以至于无法使相同链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一个片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv(scFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)。或者,双特异性抗体可为如Zapata等人, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)中所述产生的“线性抗体”。

[0240] 考虑了具有两个以上价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体(例如Tutt等人, *J. Immunol.* 147:60 (1991))。

[0241] 每个臂或其片段包含一个或多个结合位点的本文抗体(或聚合物或多肽)在本文中称为“多价”抗体。例如,本文“二价”抗体的每个Fab或其片段包含两个结合位点,而本文“三价”多肽的每个Fab或其片段包含三个结合位点。在本文多价聚合物中,每个Fab的两个或更多个结合位点可与相同或不同的抗原结合。例如,本文多价多肽中的两个或更多个结合位点可针对相同抗原,例如针对所述抗原的相同部分或表位或针对所述抗原的两个或更多个相同或不同部分或表位;和/或可针对不同抗原;或其组合。因此,本文二价多肽例如可包含两个相同的结合位点,可包含针对抗原的第一部分或表位的第一结合位点和针对所述抗原的相同部分或表位或针对所述抗原的另一部分或表位的第二结合位点;或者可包含针对抗原的第一部分或表位的第一结合位点和针对不同抗原的第二结合位点。然而,如从上文的描述将清楚的是,本发明不限于此,因为本文多价多肽可包含针对相同或不同抗原的任何数目的结合位点。在一个实施方案中,多价多肽包含至少两个配体结合元件,其中一个包含本文所示的一个或多个CDR肽序列。在另一实施方案中,多价多肽包含三个配体结合位点,每个独立地选自本文公开的CDR序列。

[0242] 至少一种配体结合元件结合TLR9。在一个实施方案中,至少一个配体结合元件结合另一靶。在一个实施方案中,在多价结合分子中存在多达10000个结合元件,并且配体结合元件可连接至支架。

[0243] 每个Fab或其片段含有至少两个结合位点的本发明的抗体(或聚合物或多肽)也可被称为“多特异性”,其中至少一个结合位点针对第一抗原并且第二结合位点针对不同于第一抗原的第二抗原。因此,“双特异性”聚合物包含至少一个针对第一抗原的位点和至少一个针对第二抗原的第二位点,而“三特异性”是包含至少一个针对第一抗原的结合位点、至少一个针对第二抗原的另外的结合位点和至少一个针对第三抗原的另外的结合位点的聚合物,等。因此,在他们最简单的形式中,本文双特异性多肽是本文所提供的技术的二价多肽(每个Fab)。然而,如从上文的描述将清楚的是,本技术不限于此,因为本文的多特异性多肽可包含针对两种或更多种不同抗原的任何数目的结合位点。

[0244] 其他修饰

[0245] 考虑了抗TLR9抗体的其他修饰。例如,本技术还涉及免疫缀合物,其包含与细胞毒性剂诸如毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(例如放射性缀合物)或细胞毒性药物缀合的本文所述的抗体(如抗TLR9抗体)。此类缀合物有时称为“药剂-药物缀合物”或“ADC”。缀合物使用多种双功能蛋白质偶联剂(诸如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基噻吩(iminothiolane)(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(诸如己二亚胺酸二甲酯HCL)、活性酯(诸如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮基苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)以及双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)制备。

[0246] 本文公开的抗TLR9药剂(如抗TLR9抗体)还可以配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,诸如Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:3688(1985);Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980);以及美国专利号4,485,045和4,544,545中所述。具有增加的循环时间的脂质体公开于美国专利号5,013,556中。例如,脂质体可以通过反相蒸发方法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。脂质体通过限定孔大小的滤器挤出,以产生具有所需直径的脂质体。本文所提供的抗体的Fab'片段可以通过二硫键交换反应与脂质体缀合,如Martin等人,J.Biol.Chem.257:286-288(1982)中所述。另一种活性成分任选地包含在脂质体内。

[0247] 通过本领域所熟知的技术,例如使用上述异双功能交联剂,酶或其他多肽可以与抗TLR9药剂(例如,抗TLR9抗体)共价结合。在一些实施方案中,可以使用本领域所熟知的重组DNA技术来构建融合蛋白,该融合蛋白包含与酶的至少功能活性部分连接的本文提供的抗体的至少抗原结合区(参见,例如,Neuberger et al.,Nature 312:604-608(1984))。

[0248] 在某些实施方案中,可能需要使用抗体片段而非完整抗体,以增加例如靶组织和细胞的穿透。在这种情况下,可能需要修饰抗体片段以增加其血清半衰期。这可以例如通过将补救受体结合表位掺入抗体片段中(例如通过抗体片段中适当区域的突变,或通过将该表位掺入肽标签中,通过DNA或肽合成,该肽标签然后在末端或中间与抗体片段融合)来实现(参见例如1996年10月17日公布的WO 96/32478)。

[0249] 抗TLR9药剂(例如,抗TLR9抗体)的共价修饰也包括在本技术的范围内。例如,可以通过化学合成或通过抗TLR9抗体的酶促或化学裂解进行修饰。通过使抗体的靶向氨基酸残基与能够与选定侧链或N末端或C末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体的其他类型的共价修饰引入到分子中。抗体的共价修饰的一种优选类型包含以美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337中所述的方式将抗体连接到各种非蛋白质聚合物(例如,聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)中的一种。

[0250] 核酸、载体、宿主细胞和重组方法

[0251] 本文所述的技术还提供编码抗TLR9药剂(例如,抗TLR9抗体)的分离的核酸、包含该核酸的载体和宿主细胞,以及用于生产该药剂或抗体的重组技术。

[0252] 本文提供包含编码抗TLR9药剂或抗体或其片段的核苷酸序列的核酸(例如,分离的核酸)。在一些实施方案中,核酸编码本文提供的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域。在一些实施方案中,核酸编码本文提供的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域。在

一些实施方案中,核酸编码本文提供的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链可变结构域。在一些实施方案中,核酸包含编码SEQ ID NO.1-71和73-81的任一个的氨基酸序列的核苷酸序列。例如,核酸可包含编码SEQ ID NO.1-39和73-81的任一个的CDR氨基酸序列的核苷酸序列。核酸可包含编码SEQ ID NO.41-56的任一个的免疫球蛋白重链可变结构域氨基酸序列的核苷酸序列。核酸可包含编码SEQ ID NO.57-71中任一个的免疫球蛋白轻链可变结构域氨基酸序列的核苷酸序列。

[0253] 为了重组产生抗TLR9药剂或抗体,可分离编码抗TLR9药剂或抗体的核酸,并将其插入可复制载体中用于进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。在某些情况下,抗TLR9药剂或抗体可通过同源重组产生,例如如美国专利号5,204,244中所述,其具体通过引用并入本文。编码抗TLR9药剂或抗体的DNA可使用常规程序(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。许多载体是可用的。载体组分通常包括,但不限于,以下的一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列,例如,如于1996年7月9日授权的美国专利号5,534,615中所述的,并具体地通过引用并入本文。

[0254] 用于克隆或表达本文载体中的DNA的合适的宿主细胞为原核生物、酵母或高等真核生物细胞。用于此目的的合适的原核生物包括真细菌,诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),诸如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌(*E.coli*),肠杆菌属(*Enterobacter*),欧文氏菌属(*Erwinia*),克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),变形杆菌属(*Proteus*),沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),沙雷氏菌属(*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*),和志贺氏菌属(*Shigella*),以及芽孢杆菌属(*Bacilli*),诸如枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B.licheniformis*) (例如于1989年4月12日公开的DD 266,710中披露的地衣芽孢杆菌41P),假单胞菌属(*Pseudomonas*),诸如铜绿假单胞菌(*P.aeruginosa*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主为大肠杆菌294(ATCC31,446),尽管诸如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC31,537)和大肠杆菌W3110(ATCC27,325)的其他菌株也是合适的。这些实例是说明性的而非限制性的。

[0255] 除原核生物之外,真核微生物(诸如丝状真菌或酵母)是编码抗TLR9药剂/抗体载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常见的面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。许多其他属、种和菌株是通常可获得的并且在本文中是有用的,诸如裂殖酵母菌丝(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)宿主,诸如例如乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*),脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC12,424),保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC16,045),维克拉克姆克鲁维酵母(*K.wickeramii*) (ATCC24,178),*K.waltii* (ATCC56,500),果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC36,906),耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)以及*K.marxianus*;子囊菌酵母属(*Yarrowia*) (EP 402,226);毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);假丝酵母(*Candida*);*Trichoderma reesia* (EP 244,234);粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);许旺酵母属(*Schwanniomyces*),诸如西方许旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);以及丝状真菌,诸如例如链孢菌属(*Neurospora*),青霉菌属(*Penicillium*),*Tolyocladium*,和曲霉菌属(*Aspergillus*)宿主,诸如构巢曲菌

(*A.nidulans*) 和黑曲霉 (*A.niger*)。

[0256] 用于表达抗TLR9药剂/抗体(例如,糖基化抗TLR9药剂/抗体)的合适宿主细胞衍生自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出来自宿主(诸如草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)(果蝇)、以及家蚕(*Bombyx mori*)(蚕蛾))的多种杆状病毒株和变体以及相应的允许的昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒株是公众可获得的,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且这些病毒可用作本技术的病毒,特别是用于草地贪夜蛾细胞的转染。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

[0257] 用于表达抗TLR9药剂/抗体的合适宿主细胞还可包括脊椎动物细胞(例如,哺乳动物细胞)。脊椎动物细胞可在培养(组织培养)中增殖。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例包括用SV 40(COS-7,ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚肾系(在悬浮培养中亚克隆生长的293或293细胞,Graham et al.,*J.Gen Virol.*36:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO,Urlaub et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216(1980));小鼠支持细胞(TM4,Mather,*Biol.Reprod.*23:243-251(1980));猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather et al.,*Annals N.Y.Acad.Sci.*383:44-68(1982));MRC5细胞;FS4细胞;以及人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0258] 可用上述用于抗体生产的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在常规营养培养基中培养,该营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因。

[0259] 用于产生本文药剂/抗体的宿主细胞可在多种培养基中培养。市售培养基,诸如Ham's F10(Sigma)、最小必需培养基(MEM,Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's改良Eagle's培养基(DMEM,Sigma)适于培养宿主细胞。另外,如Ham等人,*Meth.Enz.*58:44(1979),Barnes等人,*Anal.Biochem.*102:255(1980),美国专利号4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或U.S.Pat.Re.30,985中描述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。这些培养基中的任一种均可根据需要补充激素和/或其他生长因子(诸如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子),盐(诸如氯化钠、钙、镁,和磷酸盐),缓冲液(诸如HEPES),核苷酸(诸如腺苷和胸苷),抗生素(诸如GENTAMYCINTM),微量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)以及葡萄糖或等效能量源。还可包括本领域技术人员已知的适当浓度的任何其他必要补充剂。培养条件(诸如温度、pH等)是先前选择用于表达的宿主细胞使用的那些,并且对于普通技术人员是明显的。

[0260] 当使用重组技术时,药剂/抗体可以在细胞内、周质空间中产生,或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生,则作为第一步骤,例如通过离心或超滤,除去宿主细胞或裂解片段的颗粒碎片。Carter等人,*Bio/Technology* 10:163-167(1992)描述了分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的方法。简单地说,将细胞糊在乙酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)存在下解冻30分钟。可通过离心去除细胞碎片。当抗体分泌到培养基中时,通常首先使用市售蛋白质浓缩过滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自

这种表达体系的上清液。蛋白酶抑制剂(诸如PMSF)可包括在任何前述步骤中,以抑制蛋白水解并且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

[0261] 从细胞制备的药剂/抗体组合物可以使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析进行纯化,其中亲和层析是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可以用于纯化基于人重链的抗体(Lindmark等人,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3(Guss等人,EMBO J.5:15671575(1986))。亲和配体附着的基质最通常为琼脂糖,但也可使用其他基质。机械稳定的基质(诸如受控孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)允许比用琼脂糖可实现的更快的流速和更短的处理时间。其中抗体包含CH3结构域,Bakerbond ABX.TM.树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。根据所要回收的抗体,也可使用其他蛋白质纯化技术诸如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上的层析、在肝素S上的层析、在阴离子或阳离子交换树脂上的层析(诸如聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0262] 在任何初步纯化步骤之后,可使用pH在约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液对包含目的药剂或抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用层析,及可在低盐浓度(例如约0-0.25M的盐)进行。

[0263] 药物制剂、给药和施用途径

[0264] 本技术提供抗TLR9药剂和抗体以及相关组合物,其可用于例如从体内消除表达TLR9的细胞,以及用于例如鉴定和定量组织样品中表达TLR9的细胞的数目。

[0265] 本技术的治疗方法和组合物可称为“基于TLR9的”,以表明这些疗法可改变不希望的或毒性的表达TLR9的细胞(诸如淋巴瘤或自身免疫性B淋巴细胞)的相对或绝对数目。

[0266] 一种控制患者中不期望的表达TLR9的细胞的量的方法是通过提供包含一种或多种抗TLR9抗体的组合物来引起例如对表达TLR9的细胞的细胞毒性活性。

[0267] 抗TLR9抗体可被配制用于各种目的(包括治疗疾病、病症或物理创伤)的药物组合物。可将包含一种或多种本发明的抗TLR9抗体的药物组合物掺入用于这种治疗的试剂盒和医疗装置中。医疗装置可用于将本文药物组合物施用于需要其的患者,并且根据本发明的一个实施方案,提供了包括此类装置的试剂盒。此类装置和试剂盒可设计用于本文的药物组合物的常规施用,包括自我施用。

[0268] 可通过将具有所需纯度的药剂/抗体与任选的生理学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,0sol,A.Ed.(1980))以冻干制剂或水性溶液的形式混合来制备药剂/抗体的治疗制剂以进行储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵(octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride);氯化六甲季铵;苯扎氯铵,苜索氯铵;苯酚,丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯(alkyl parabens),诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精类;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海

藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，诸如钠；金属络合物（例如锌蛋白络合物）；和/或非离子表面活性剂，诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇（PEG）。

[0269] 根据所治疗的特别适应症的需要，本文的制剂还可含有多于一种的活性化合物，优选具有彼此不会不利影响的互补活性的那些。这类分子合适地以对预期目的有效的量组合存在。

[0270] 活性成分也可被包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中，例如分别在胶体药物递送体系（例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊）中或在粗乳液（macroemulsion）中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A. Ed. (1980)。

[0271] 用于体内施用的制剂通常必须是无菌的。这可以容易地实现，例如通过无菌滤膜过滤。

[0272] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有药剂/抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质，该基质为成型制品的形式，例如薄膜、或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯，水凝胶（例如聚（甲基丙烯酸2-羟乙酯）或聚（乙烯醇）），聚丙交酯（美国专利号3,773,919），L-谷氨酸和 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物，不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯，可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如Lupron Depot.TM.（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球），以及聚D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够释放分子超过100天，但某些水凝胶类释放蛋白质的时间段较短。当包封的药剂/抗体长时间在体内保留时，他们可能由于暴露于37°C的湿度而变性或聚集，导致生物活性丧失以及免疫原性可能改变。可以根据所涉及的机制设计合理的策略用于稳定。例如，如果聚集机制被发现会通过硫-二硫键交换形成分子间S-S键，则可通过修饰巯基残基，从酸性溶液冻干，控制水分含量，使用适当的添加剂以及开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定。

[0273] 对于治疗应用，本文所提供的抗TLR9药剂例如抗体以药学上可接受的剂型（诸如以上所讨论的那些）施用于哺乳动物，例如，所述药学上可接受的剂型包括可以以推注或通过一段时间的连续输注静脉内施用于人的剂型，或通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径施用于人的剂型。

[0274] 对于疾病的预防或治疗，药剂/抗体的适当剂量将取决于所将要治疗疾病的类型（如上所定义），疾病的严重度和病程，是否出于预防或治疗目的而施用抗体，既往治疗，患者的临床史和对抗体的反应，以及主治医师的酌处权。可以一次或通过一系列治疗将抗体适当地施用于患者。

[0275] 取决于疾病的类型和严重度，约1 μ g/kg至约50mg/kg（例如0.1-20mg/kg）的抗体可以是用于施用于患者的初始候选剂量，无论例如通过一次或多次单独施用，还是通过连续输注。典型的每日或每周剂量可在约1 μ g/kg至约20mg/kg或更高的范围内，取决于上述提及因素。对于几天或更长的重复施用，根据病症，重复治疗直至出现所期望的疾病症状的抑制。然而，其他剂量方案可能是有用的。通过常规技术和试验，包括例如放射成像，可以容易地监测这种治疗的进展。可以采用使用所述抗体测定体液或组织中的TLR9水平的检测方法以优化患者对治疗性抗体的暴露。

[0276] 在一些实施方案中，包含本文的抗TLR9药剂（例如，干扰TLR9活性的mAb）的组合物作为单一疗法施用，并且在一些实施方案中，包含抗TLR9药剂的组合物作为组合疗法的一

部分施用。在一些情况下,药剂/抗体在预防或治疗疾病中的有效性可通过连续施用药剂/抗体或与对那些目的有效的另一种药剂(诸如用于治疗癌症或微生物感染的化学治疗药物)组合施用来改善。在其他情况下,抗TLR9药剂可用于增强或敏化细胞对化疗治疗的作用,从而在较低剂量和较低毒性下具有功效。除了施用包含减少表达TLR9的细胞的数目的药剂的组合物之外,某些组合疗法还包括递送选自以下组成的组的第二治疗方案:施用化疗剂、放射疗法、手术以及任何前述的组合。

[0277] 此类其他药剂可存在于所施用的组合物中或可单独施用。此外,抗TLR9药剂可适当地连续施用或与其他药剂或形式(例如,用于治疗癌症、感染等的化学治疗药物或放射或免疫抑制药物)组合施用。

[0278] 本文抗TLR9药剂的研究和诊断(包括临床诊断)用途

[0279] 本文提供诊断试剂,其包含本文所述的抗TLR9药剂。例如,本文提供的抗TLR9药剂(例如,抗体)可用于检测和/或纯化TLR9,例如,从体液中或在体液或组织中的细胞上表达的TLR9。本文还提供了用于检测TLR9的方法。例如,一种方法可包含使样品(例如,已知或疑似含有TLR9的生物样品)与本文提供的抗TLR9药剂接触,并且,如果该样品含有TLR9,则检测TLR9:抗TLR9复合物。本文还提供了包含本文所述的抗TLR9药剂的试剂和用于检测TLR9以用于研究目的的方法。

[0280] 例如,抗TLR9抗体可用于TLR9的诊断测定,例如,检测其在特定细胞、组织或体液中的存在。此类诊断方法可用于诊断例如过度增殖性疾病或病症。因此,本文涵盖了临床诊断用途以及研究用途。

[0281] 在一些实施方案中,抗TLR9药剂/抗体包含可检测标记(marker)或标签(label)。在一些实施方案中,抗TLR9药剂/抗体与可检测标记或标签缀合。例如,对于研究和诊断应用,可用可检测部分标记抗TLR9药剂/抗体。有多种标签可用,一般分为以下类别:

[0282] (a) 放射性同位素,诸如³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I。可以使用例如Current Protocols in Immunology,第1和2卷,Coligen等人编辑Wiley-Interscience,New York,N.Y.,Pubs.(1991)中所述的技术,将抗体用放射性同位素标记,并且可以使用闪烁计数来测量放射性。

[0283] (b) 荧光标记物,诸如稀土螯合物(钆螯合物)或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺、丽丝胺、藻红蛋白、德克萨斯红和Brilliant Violet™是可用的。可以使用例如Current Protocols in Immunology(同上)中公开的技术将荧光标记缀合至抗体。荧光可以使用流式细胞仪、成像显微镜或荧光计来定量。

[0284] (c) 各种酶-底物标记是可获得的,并且美国专利号4,275,149对其中一些进行了综述。酶通常催化发色底物的化学变化,其可以使用各种技术测量。例如,酶可催化底物的颜色变化,其可以用分光光度法测量。或者,酶可改变底物的荧光或化学发光。用于定量荧光变化的技术如上所述。化学发光底物通过化学反应变得被电子激发,以及然后发射可以被测量(例如使用化学发光计)的光或将能量供给荧光受体。酶标记的实例包括萤光素酶类(例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利号4,737,456),萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。将酶与抗体缀合的技术描述于O'Sullivan等人,Methods for the Preparation of Enzyme-

Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J.Langone&H.Van Vunakis),AcademiCpress,New York,73:147-166 (1981)。

[0285] 例如,酶-底物组合的实例包括:

[0286] (i) 以过氧化氢酶为底物的辣根过氧化物酶 (HRPO),其中过氧化氢酶氧化染料前体(例如邻苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB));

[0287] (ii) 以对硝基苯基磷酸酯作为发色底物的碱性磷酸酶(AP);和(iii) β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal),其具有发色底物(例如对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物4-甲基伞形酮基- β -D-半乳糖苷酶。

[0288] 本领域技术人员可使用许多其他酶-底物组合。关于这些的一般性综述,参见美国专利号4,275,149和4,318,980。

[0289] 在一些情况,标记与药剂/抗体间接缀合。本领域技术人员将知晓用于实现这一点的各种技术。例如,抗体可以与生物素缀合,并且上述三个宽泛类别标记中的任一种可以与抗生物素蛋白缀合,或反之亦然。生物素选择性地结合抗生物素蛋白,并且因此标记可以以这种间接方式与抗体缀合。或者,为了实现标记与抗体的间接缀合,抗体与小半抗原(例如地高辛)缀合,且上述不同类型标记中的之一与抗-半抗原抗体(例如抗-地高辛抗体)缀合。因此,可以实现标记与抗体的间接缀合。

[0290] 在一些实施方案中,不需要标记抗TLR9药剂/抗体,并且可以例如使用结合抗TLR9抗体的标记抗体来检测其存在。

[0291] 在一些实施方案中,将本文的抗TLR9药剂/抗体固定在固体支持物或基材上。在一些实施方案中,本文的抗TLR9药剂/抗体非扩散地固定在固体支持物上(例如抗TLR9药剂/抗体不会从固体支持物上分离)。固体支持物或基材可以为抗TLR9药剂/抗体可以直接或间接附着于其上的任何物理上可分离的固体,包括但不限于由微阵列和孔提供的表面,以及颗粒诸如珠(例如顺磁珠、磁珠、微珠、纳米珠),微粒和纳米颗粒。固体支持物还可以包括例如芯片,柱,光纤,擦拭物(wipes),过滤器(例如平面过滤器),一个或多个毛细管,玻璃和改性或功能化的玻璃(例如可控孔玻璃(CPG)),石英,云母,重氮化膜(纸或尼龙),聚甲醛,纤维素,醋酸纤维素,纸,陶瓷,金属,类金属,半导体材料,量子点,包覆珠或颗粒,其他色谱材料,磁性颗粒;塑料(包括丙烯酸类,聚苯乙烯,苯乙烯或其他材料的共聚物,聚丁烯,聚氨酯,TEFLONTM,聚乙烯,聚丙烯,聚酰胺,聚酯,聚偏二氟乙烯(PVDF)等),多糖,尼龙或硝化纤维素,树脂,氧化硅或基于氧化硅的材料(包括硅,硅胶和改性硅),Sephadex[®], Sepharose[®],碳,金属(例如钢,金,银,铝,硅和铜),无机玻璃,导电聚合物(包括诸如聚吡咯和聚吲哚的聚合物);微米或纳米结构表面诸如核酸平铺阵列(tiling array),纳米管,纳米线或纳米颗粒装饰表面;或多孔表面或凝胶诸如甲基丙烯酸酯,丙烯酰胺,糖聚合物,纤维素,硅酸盐,或其他纤维或绞合聚合物(stranded polymer)。在一些实施方案中,固体支持物或基材可使用被动的或化学衍生的涂层用任何数量的材料(包括聚合物诸如葡聚糖,丙烯酰胺,明胶或琼脂糖)涂覆。珠和/或颗粒可为游离的或彼此连接的(例如烧结的)。在一些实施方案中,固体支持物或基材可以是颗粒的集合。在一些实施方案中,颗粒可以包含氧化硅,并且氧化硅可包含二氧化硅。在一些实施方案中,硅可以是多孔的,并且在某些实施方案中,氧化硅可以是无孔的。在一些实施方案中,颗粒还包含赋予颗粒顺磁性的物质。在某些实施方案中,该物质包含金属,并且在某些实施方案中,该物质是

金属氧化物(例如铁或铁氧化物,其中铁氧化物含有 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的混合物)。抗TLR9试剂/抗体可通过共价键或通过非共价相互作用连接到固体支持物,并且可直接或间接地(例如通过诸如间隔分子或生物素的中间物质)连接到固体支持物。

[0292] 本文的药剂和抗体可用于任何已知的测定方法中,诸如流式细胞术、免疫组织化学、免疫荧光、质谱流式细胞术(mass cytometry)(例如Cytof仪器)、竞争结合测定、直接和间接夹心测定和免疫沉淀测定。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 第147-158页(CRC Press, Inc. 1987)。

[0293] 流式细胞术和质谱流式细胞术测定通常涉及使用单一的一抗来特异性识别在单个细胞的分散悬浮液的表面上表达的靶分子的存在。分散的细胞通常获自生物流体样品(例如血液),但也可获自由固体组织样品(诸如脾或肿瘤活检)制备的单细胞分散体。一抗可直接与可检测部分(例如荧光团诸如用于流式细胞术的藻红蛋白或用于质谱流式细胞术的重金属螯合物)缀合。或者,一抗可未标记或使用诸如生物素的不可检测的标签进行标记,然后由可检测标记的二抗检测一抗,该二抗特异性识别一抗本身或一抗上的标签。然后在能够进行单细胞检测的仪器(例如流式细胞仪、质谱流式细胞仪、荧光显微镜或明视场光学显微镜)中分析经标记的细胞,以鉴定在分散的群体或组织样品中表达被一抗识别的靶的那些单个细胞。流式细胞术原理的技术基础和实际应用的详细说明可在例如Shapiro, Practical Flow Cytometry, 第4版, Wiley, 2003中找到。

[0294] 夹心测定涉及使用两种抗体,每种抗体能够与被检测蛋白的不同免疫原性部分或表位结合。在夹心测定中,测试样品分析物与固定在固体支持物上的第一抗体结合,之后第二抗体与分析物结合,从而形成不溶的三部分复合物。参见,例如,美国专利号4,376,110。第二抗体本身可用可检测部分标记(直接夹心测定)或可使用用可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体测量(间接夹心测定)。例如,一种类型的夹心测定为ELISA测定,在这种情况下,可检测部分为酶。在细胞ELISA中,可使用首先附着于支持物并识别不同细胞表面蛋白的抗体将靶细胞群附着于固体支持物。这些第一抗体将细胞捕获到支持物上。然后可通过向捕获的细胞中加入抗TLR9抗体并检测附着于细胞的TLR9抗体的量来检测细胞表面上的TLR9。在某些情况下,可使用固定的和透化的细胞,并且在这种情况下,可检测表面TLR9和胞内TLR9。

[0295] 对于免疫组织化学,血液或组织样品可为新鲜的或冷冻的,或者可包埋在石蜡中,并用例如防腐剂(诸如福尔马林)固定。

[0296] 本文的药剂/抗体也可用于体内诊断测定。通常,抗体用放射性核素(诸如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 或 ^{35}S)标记,使得结合的靶分子可以使用免疫闪烁成像术定位。

[0297] 免疫细胞中的TLR9的检测

[0298] 本文提供了用于检测免疫细胞中的TLR9的药剂和方法。免疫细胞中TLR9的检测可指在免疫细胞表面上(例如通过表面染色)和/或在免疫细胞内(例如通过细胞内染色)检测。在一些实施方案中,提供了用于检测免疫细胞的异质群体中的TLR9的药剂和方法。免疫细胞的异质群体可包含两种或更多种类型的免疫细胞。例如,免疫细胞的异质群体可包含以下两种或更多种:B细胞、浆细胞样树突细胞(pDC)、淋巴细胞、白细胞、T细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、髓样树突细胞(mDC)、先天淋巴细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞等。在一些实施方案中,免疫细胞的异质群体包含外周血液单个

核细胞(PBMC),其可包括例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞和单核细胞。

[0299] 通常,使细胞与本文所述的抗TLR9药剂接触(例如在如实施例3中所述的流式细胞术测定中;或在任何合适的蛋白质或细胞检测测定中)。在一些实施方案中,TLR9在某些免疫细胞中被本文所述的抗TLR9药剂以显著水平检测到。TLR9可在某些免疫细胞中被本文所述的抗TLR9药剂以显著水平检测到,而在其他免疫细胞中没有被显著检测到。在某些免疫细胞中检测TLR9的水平可根据某些因素诸如例如检测测定的类型、检测试剂的类型(例如染料类型)、抗体浓度、供体细胞变异性等而变化。

[0300] 以显著水平检测到TLR9可指在流式细胞术测定中测量的特定信噪比(S:N)(例如阈值或范围)。在一些实施方案中,以显著水平检测到TLR9是指信噪比(S:N)为约2.0或更大。例如,以显著水平检测到TLR9可指信噪比(S:N)为约2或更大、约2.5或更大、约3或更大、约4或更大、约5或更大、约6或更大、约7或更大、约8或更大、约9或更大、约10或更大、约11或更大、约12或更大、约13或更大、约14或更大、约15或更大、约16或更大、约17或更大、约18或更大、约19或更大、约20或更大、约25或更大、约30或更大、约35或更大、约40或更大、约45或更大、约50或更大、约55或更大、或约60或更大。没有显著检测到TLR9可指在流式细胞术测定中测量的特定信噪比(S:N)(例如阈值或范围)。在一些实施方案中,没有显著检测到TLR9是指信噪比(S:N)为约1.5或更小。在一些实施方案中,没有显著检测到TLR9是指信噪比(S:N)为约1或更小。

[0301] 在一些实施方案中,在浆细胞样树突细胞(pDC)中以显著水平检测到TLR9。在某些情况下,浆细胞样树突细胞(pDC)可以通过CD304的表达来鉴定。因此,在一些实施方案中,在CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC)中检测到显著水平的TLR9。CD304,也称为神经纤毛蛋白-1(neuropilin-1)、BDCA-4和VEGF165R,是一种140kD的I型跨膜蛋白。其胞外区含有2个CUB,2个FV/FVIII,和一个MAM结构域;通过mRNA可变剪接(alternative mRNA splicing)产生可溶性同种型。CD304参与血管生成、神经发育和肿瘤转移,并可由浆细胞样树突细胞、胸腺细胞、神经元、内皮和TFH细胞亚群表达。CD304还可以在几种癌中表达,并且该分子在前列腺癌中的高表达可能与不良预后相关。

[0302] 在一些实施方案中,在B细胞中以显著水平检测到TLR9。在某些情况下,可以通过CD19的表达和CD3的缺乏来鉴定B细胞。因此,在一些实施例中,在CD19⁺CD3⁻B细胞中以显著水平检测到TLR9。CD19是一种95kD的I型跨膜糖蛋白,也称为B4。其是在B细胞(从前B细胞到胚泡(blastoid)B细胞,在浆细胞上不存在)和滤泡树突细胞上表达的免疫球蛋白超家族的成员。CD19通常参与B细胞发育、活化和分化。CD19与CD21(CR2)和CD81(TAPA-1)形成复合物,并作为BCR共受体。CD3,也称为T3,是Ig超家族的成员,主要在T细胞、NK-T细胞上表达,并且在T细胞分化期间在胸腺细胞上以不同水平表达。CD3由CD3 ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 链组成,并且通过与TCR α/β 或 γ/δ 链缔合形成TCR复合物。通过结合肽/MHC抗原复合物,CD3参与TCR信号转导、T细胞活化和抗原识别。

[0303] 在一些实施方案中,在某CD3⁻CD19⁻些免疫细胞中未通过本文所述的抗TLR9药剂显著检测到TLR9。例如,在某些淋巴细胞(例如,CD3⁻CD19⁻淋巴细胞)、T细胞(例如,CD3⁺CD19⁻T细胞)和/或单核细胞中可能没有显著检测到TLR9。在某些淋巴细胞(例如,CD3⁻CD19⁻淋巴细胞)、T细胞(例如,CD3⁺CD19⁻T细胞)和/或单核细胞中没有显著检测到TLR9可以指在流式细胞术测定中测量的特定信噪(S:N)(例如,阈值或范围)。在一些实施方案中,在某些淋巴细

胞(例如,CD3⁻CD19⁻淋巴细胞)、T细胞(例如,CD3⁺CD19⁻T细胞)和/或单核细胞中没有显著检测到TLR9是指信噪比(S:N)为约1.5或更小。在一些实施方案中,在某些淋巴细胞(例如,CD3⁻CD19⁻淋巴细胞)、T细胞(例如,CD3⁺CD19⁻T细胞)和/或单核细胞中没有显著检测到TLR9是指信噪比(S:N)为约1或更小。

[0304] 本文提供了用于检测免疫细胞表面上的TLR9的药剂和方法(例如,通过表面染色)。在一些实施方案中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的表面上检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的表面上检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的表面上检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约15或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的表面上检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约16或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的表面上检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约17或更大。上述用于检测浆细胞样树突细胞(pDC)表面上的TLR9的信噪比(S:N)可根据某些因素而变化,诸如,例如,检测测定的类型,检测试剂的类型(例如,染料类型),抗体浓度,供体细胞变异性等。

[0305] 在一些实施方案中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的表面上检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的表面上检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的表面上检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约2.0或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的表面上检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约2.4或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的表面上检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约2.5或更大。上述用于检测B细胞表面TLR9的信噪比(S:N)实例可根据某些因素而变化,诸如,例如,检测测定的类型,检测试剂的类型(例如,染料类型),抗体浓度,供体细胞变异性等。

[0306] 本文提供了用于检测免疫细胞内部的TLR9的药剂和方法(例如,通过胞内染色)。在一些实施方案中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的内部检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的内部检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的内部检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约40或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的内部检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约45或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在浆细胞样树突细胞(pDC)(例如,CD304⁺浆细胞样树突细胞(pDC))的内部检测到TLR9,其中信噪比(S:N)为约50或更大。上述用于检测浆细胞样树突细胞(pDC)内部的TLR9的信噪比(S:N)可以根据某些因素而变化,诸如,例如,检测测定的类型,检测试剂的类型(例如,染料类型),抗体浓度,供体细胞变异性等。

[0307] 在一些实施方案中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的内部检测到TLR9。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的内部检测TLR9。在一些

实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的内部检测TLR9,其中信噪比(S:N)为约10或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的内部检测TLR9,其中信噪比(S:N)为约11或更大。在一些实施方案中,在流式细胞术测定中,在B细胞(例如,CD19⁺CD3⁻B细胞)的内部检测TLR9,其中信噪比(S:N)为约12或更大。上述用于检测B细胞内部TLR9的信噪比(S:N)实例可根据某些因素而变化,诸如,例如,检测测定的类型,检测试剂的类型(例如,染料类型),抗体浓度,供体细胞变异性等。

[0308] 加入本文的抗TLR9药剂的试剂盒

[0309] 为方便起见,本文的抗TLR9药剂(例如,抗TLR9 mAb)可以在试剂盒(例如,预定量的试剂与使用说明(例如进行诊断性测定的说明)的包装组合)中提供。在一些实施方案中,试剂盒为配置为检测样品(例如,生物样品)中的TLR9的诊断试剂盒。当抗TLR9试剂用荧光团标记时,试剂盒可包括与对照抗TLR9试剂的非特异性结合相同的同种型阴性对照无关抗体。当抗TLR9药剂用酶标记时,则试剂盒可包括酶所需的底物和辅因子(例如,提供可检测发色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包括其他添加剂,诸如稳定剂,缓冲液(例如,封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以广泛变化以提供基本上优化测定灵敏度的试剂溶液浓度。特别地,试剂可作为干粉(通常是冻干的)提供,其包括在溶解时将提供具有适当浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0310] 制品

[0311] 在本技术的另一方面,提供了含有用于治疗或诊断上述病症的材料的制品。该制品包含容器和标签。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。容器可由多种材料(诸如玻璃或塑料)形成。容器存有对治疗状况有效的组合物并可具有无菌进入端口(例如该容器可为静脉注射溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。该组合物中的活性抗TLR9药剂可为抗TLR9抗体。容器上或与容器相关的标签指示组合物用于治疗或诊断所选择的状况。制品还可包含第二容器,该第二容器包含药学上可接受的缓冲液,诸如磷酸盐缓冲液、林格氏溶液和右旋糖溶液。其还可包括从商业和使用者的观点所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器和具有使用说明的包装插页。

[0312] 实施例

[0313] 下文阐述的实施例说明了某些实施方案,但并不限制本技术。

[0314] 实施例1:抗TLR9杂交瘤的产生和鉴定

[0315] 如本实施例所述,可以制备分泌与体内表达的TLR9反应的单克隆抗体的杂交瘤。所得抗TLR9抗体可用于多种目的,包括用于诊断测定,其实例提供于以下实施例3和4中。

[0316] 实验小鼠的常见品系(例如BALB/c或C57/B16)或大鼠的常见品系(例如Sprague Dawley)是用于用TLR9免疫原进行免疫的合适宿主。在成功免疫小鼠后,使用标准方案形成杂交瘤,将骨髓瘤细胞与从动物收集的脾和引流淋巴结细胞进行融合。在HAT培养基中选择成功的融合物并在微量滴定板中克隆到约一个细胞/孔后,可以通过流式细胞术针对表达TLR9的细胞转染子(例如HEK 293或RBL)测试培养上清液。然后将具有成功染色谱(staining profiles)的孔传代培养进更大器皿中,直到存在足够的细胞以允许亚克隆。可以使用TLR9-转染的细胞通过流式细胞术再次进行杂交瘤亚克隆候选物的进一步表征。然后,例如通过针对分成不同亚群(例如淋巴细胞,单核细胞等)的人血细胞以及针对病变和/感染的人细胞产生的一种或多种细胞系的流式细胞术,对选择作为最佳候选物的克隆进一

步筛选。与同种型对照相比,可以定量每个血细胞亚群中阳性细胞的百分比。

[0317] 理想候选克隆的一个实例将对表达TLR9的免疫细胞(例如,浆细胞样树突细胞(pDC),B细胞)具有强反应性,但对其他血细胞群(例如,某些淋巴细胞,T细胞,单核细胞)无明显反应性。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测细胞表面上的TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测浆细胞样树突细胞(pDC)的细胞表面上的TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测B细胞表面上的TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测浆细胞样树突细胞(pDC)和B细胞的细胞表面上的TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测细胞内TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测浆细胞样树突细胞(pDC)中的细胞内TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测B细胞中的细胞内TLR9。在某些情况下,理想的候选克隆可以检测浆细胞样树突细胞(pDC)和B细胞中的细胞内TLR9。

[0318] 实施例2:抗TLR9抗体可变区的测序

[0319] 使来自性能良好的抗TLR9杂交瘤细胞系(如上述实施例1所述)的细胞在标准哺乳动物组织培养基中生长。使用基于RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)的方法从表达抗TLR单克隆抗体的各种克隆的杂交瘤细胞中分离总RNA。该RNA用于产生第一链cDNA。轻链和重链可变结构域cDNA均通过5'-RACE技术扩增。通过PCR制备阳性克隆,然后对多个克隆进行DNA测序。

[0320] 图2中显示了命名为AB 1-15(在本文也称为抗体1-15和克隆1-15)的15种不同抗体(克隆)的重链和轻链的单个可变结构域(CDR和框架区)(包括CDR1、CDR2和CDR3区)的氨基酸序列。各重链和轻链CDR序列示于下表1中。

[0321]

表 1: 代表性小鼠抗 TLR9 单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域的 CDR 序列和序列 ID 号				
SEQ ID NO	CDR 类型	AB (克隆) 编号	氨基酸序列	
1	CDRH1	1, 6-8, 10, 13, 15, VH Con	NYGMN	
2	CDRH1	2, 3, 5, 9	NFGMN	
73	CDRH1	4	NFGMH	
74	CDRH1	11, 14	NYEMN	
75	CDRH1	12	NYGMT	

表 1: 代表性小鼠抗 TLR9 单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域的 CDR 序列和序列 ID 号

SEQ ID NO	CDR 类型	AB (克隆) 编号	氨基酸序列
3	CDRH2	1, 7, 8, 10	SISSSSYIYYADTVKG
4	CDRH2	2, 3, 5, 6, 9, 11, 14, VH Con	SISSTSSYIYYADTVKG
5	CDRH2	4	SISSTSSYISYADTVKG
6	CDRH2	12	SISSTSSYIYYVDTVKG
7	CDRH2	13	SISSTSSYIYYADSVKG
8	CDRH2	15	SISSTRSYIYYAETVKG
9	CDRH3	1	YTLGIT-IDY
10	CDRH3	2, 3, 5	ADITIAAPHY
11	CDRH3	4	QDITTP-FDY
12	CDRH3	6	FTLGIT-LDY
13	CDRH3	7	SPMGITGFY
14	CDRH3	8	HWVGGY-FDY
15	CDRH3	9	HTIGIT-FDY
16	CDRH3	10	YTLGIT-LDY
17	CDRH3	11, 14	RGLAVGPFDY
18	CDRH3	12	QSITVP-FDY
19	CDRH3	13	QSTYGD-FDY
20	CDRH3	15	HTVDTP-FAH
21	CDRH3	VH Con	xTIGIT-FDY

[0322]

表 1: 代表性小鼠抗 TLR9 单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域的 CDR 序列和序列 ID 号				
SEQ ID NO	CDR 类型	AB (克隆) 编号	氨基酸序列	
22	CDRL1	1-7, 9-12, 14, 15, VL Con	LASEDIYNNLA	
23	CDRL1	8, 13	RASEDIYNGLA	
24	CDRL2	1	YASTLQD	
25	CDRL2	2, 3, 5-7, 9-11, 14, VL Con	YASSLQD	
26	CDRL2	4	YASTLQY	
27	CDRL2	8	NANSLHT	
28	CDRL2	12	YTSNLQD	
29	CDRL2	13	NANTLHI	
30	CDRL2	15	HASRLQD	
31	CDRL3	1, 12	LQDSEYPFT	
32	CDRL3	2, 3, 5	LQDSEFPYT	
33	CDRL3	4	LQDSEFPNT	
34	CDRL3	6, 9, 15, VL Con	LQDSEYPWT	
35	CDRL3	7	LQDSEYPYT	
36	CDRL3	8	QQYYDYLP	
37	CDRL3	10	LQSEYPWT	
38	CDRL3	11, 14	LQDSEYPLT	

[0323]

表 1: 代表性小鼠抗 TLR9 单克隆抗体的 VH 和 VL 结构域的 CDR 序列和序列 ID 号				
SEQ NO	ID	CDR 类型	AB (克隆) 编号	氨基酸序列
39		CDRL3	13	QQYSDYPWT

[0325] “x”表示任何残基。在一些实施方案中，“x”为Y、A、Q、F、S、H或R。

[0326] 实施例3:检测表达TLR9的细胞

[0327] 本实施例描述了使用本文提供的某些鼠抗TLR9单克隆抗体基于流式细胞术对人外周血单个核细胞(PBMC)的检测。

[0328] 材料和方法

[0329] PBMC分离

[0330] 根据制造商的说明,在无菌条件通过Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 梯度分离人外周血单个核细胞(PBMC)。

[0331] 表面和细胞内染色

[0332] 在细胞染色缓冲液(Cell Staining Buffer) (BioLegend, 目录号#420201) 中对PBMC进行计数和调整,使其细胞密度为 $0.7-1 \times 10^7$ 细胞/mL。在黑暗中,将100 μ l细胞悬浮液($0.7-1 \times 10^6$ 总细胞)对CD3、CD19和CD304染色15分钟。为了检测表面CD289/TLR9,同种型(大鼠IgG2a,k或小鼠IgG1,k)或单克隆TLR9抗体(参见图3;AB1,AB2,AB3,AB4,市售ABI或市售ABII)包含在表面cocktail中并在黑暗中染色15分钟。将细胞用2mL细胞染色缓冲液(Cell Staining Buffer)洗涤两次。为了检测表面CD289/TLR9,将细胞重悬于300 μ L 1%多聚甲醛中并在细胞仪(cytometer)上采集。为了检测细胞内CD289/TLR9,在黑暗中将细胞重悬于300-500 μ L固定缓冲液(Fixation Buffer) (BioLegend, 目录号#420801) 20分钟。将细胞用2mL的1X细胞内染色透化洗涤缓冲液(Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer) (BioLegend, 目录号#421002) 洗涤两次,然后对同种型(大鼠IgG2a,k或小鼠IgG1,k)或单克隆TLR9抗体(AB1,AB2,AB3,AB4,市售ABI,市售ABII)在黑暗中染色30分钟。将细胞用2mL的1X细胞内染色透化洗涤缓冲液洗涤,然后用2mL细胞染色缓冲液洗涤。将细胞重悬于300 μ L细胞染色缓冲液中并在细胞仪上采集。在BD CantoII上采集样品并使用FlowJo软件进行分析。

[0333] 除非另有说明,否则所有使用的试剂均来自BioLegend。

[0334] 流式细胞术/门控分级(Gating Hierarchy)

[0335] 将淋巴细胞和单核细胞基于其前向(FSC)和侧向散射(SSC)图谱进行门控(图4,图A)。淋巴细胞为FSC^{lo}SSC^{lo},而单核细胞为FSC^{int}SSC^{int}(图4,图B)。从淋巴细胞门开始,B细胞为CD19⁺CD3⁻,而T细胞为CD3⁺CD19⁻(图4,图D)。淋巴细胞*落入淋巴细胞门,但不是T细胞或B细胞(CD19⁻CD3⁻)。通过FSC和SSC,浆细胞样树突细胞(pDC)介于淋巴细胞和单核细胞之间,因此pDC被鉴定为SSC^{int}CD304⁺(图4,图C)。产生每个细胞群的直方图并对中值荧光强度(MFI)进行定量。用各TLR9抗体(克隆)和各同种型对照的MFI计算各抗体(克隆)的信噪比(S:N)。

[0336] 结果

[0337] 对于TLR9的表面表达,通过所有BioLegend抗体(即,抗体1-15;显示了抗体1-4的结果)在B细胞上检测到暗淡表达(dim expression),其平均信噪比(S:N)为2.5。通过所有BioLegend抗体(即,抗体1-15;显示了抗体1-4的结果)在pDC上观察到更高的TLR9表达,其平均S:N为16。市售ABI或市售ABII抗体均未检测到在B细胞或pDC上TLR9的表面表达,并且所有抗体(即,抗体1-15;显示了抗体1-4的结果;以及市售ABI和市售ABII)在淋巴细胞*、T细胞和单核细胞上染色为阴性。某些细胞表面染色实验的结果示于图5,图A-K。

[0338] 对于TLR9的细胞内测量,所有BioLegend抗体(即,抗体1-15;显示了抗体1-4的结果)在B细胞和pDC中检测到TLR9的显著表达,其平均S:N分别为12和51.3。所有BioLegend抗体(即,抗体1-15;显示了抗体1-4的结果)在淋巴细胞*、T细胞和单核细胞上染色为阴性。相反,市售ABI在所有PBMC群体上染色为阳性,而市售ABII在所有PBMC群体上染色为暗淡(dim)/阴性。某些细胞内染色实验的结果示于图6,图A-K。

[0339] 实施例4:功能测定

[0340] 本实施例描述了基于过表达靶的细胞中的TLR9检测的功能测定。

[0341] 实验

[0342] 根据制造商的说明,培养和刺激过表达人TLR9的HEK293细胞(293XL-hTLR9A, InvivoGen)。简而言之,将50000个293XL-hTLR9A细胞接种于96孔板中,培养过夜,然后用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CpG-B (InvivoGen) 和多种浓度的TLR9抗体(0.00061-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激24小时。收集上清液并评估IL-8的分泌(BioLegend,目录号#431507)。

[0343] 结果

[0344] 使用CpG-B进行体外细胞刺激研究表明,分别在低浓度和高浓度,有些抗体能增强和抑制TLR9诱导的283XL-hTLR9细胞分泌IL-8。图7,图A和图B图示了这些结果。抗体13(AB13;克隆13)以1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑制了CpG-B诱导的IL-8分泌的50% (IC_{50}),且抗体1(AB 1;克隆1)的 IC_{50} 为0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0345] 实施例6:阻断测定

[0346] 本实施例描述了使用本文所述的抗TLR9抗体的代表性亚群进行的阻断测定。

[0347] PBMC分离

[0348] 根据制造商的说明,通过Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 梯度分离人外周血单个核细胞(PBMC)。

[0349] 阻断测定

[0350] 对于阻断研究,将PBMC进行CD19和CD304染色,固定,透化,然后与5 μg 纯化的抗体(大鼠IgG2a, Rag IgG2b, AB1, AB2, AB8或AB13)在黑暗中温育30分钟。大鼠IgG2a、Rag IgG2b、AB1、AB2、AB8和AB13用作阻断剂。在某些情况下,不使用阻断剂。然后将细胞与PE缀合的抗体(AB1, AB2, AB3, AB4, AB8, AB9, AB10, AB12, AB13, AB14, AB15) 或同种型对照温育30分钟。将细胞用1X透化缓冲液(Permeabilization Buffer) (细胞内染色透化洗涤缓冲液(BioLegend,目录号#421002) 洗涤,在BD CantoII采集,并使用FlowJo软件进行分析。

[0351] 阻断百分比的计算

[0352] 通过将用同种型对照、AB1、AB2、AB8或AB13阻断的样品的MFI除以无阻断的MFI来计算原始MFI的百分比。100减去该值得到阻断百分比。公式如下所示:

$$[0353] \quad 100 - \left(\frac{[MFI_{\text{阻断}}]}{[MFI_{\text{无阻断}}]} * 100 \right)$$

[0354] 结果

[0355] 同种型对照(无阻断;图8的各图中的顶部直方图)和各抗TLR9抗体AB1、AB2、AB3、AB4、AB8、AB9、AB10、AB12、AB13、AB14、AB15(无阻断;图8的各图中的从顶部开始的第二直方图;各图根据各染色抗体#进行编号)的染色结果示于图8中。对于阻断测定,大鼠IgG2a和大鼠IgG2b未显著改变由B细胞或pDC表达的TLR9的MFI(中值荧光强度)(图8的各图中的第三和第四直方图(从顶部开始))。阻断测定中使用的AB1、AB2、AB8和AB13使TLR9表达的MFI在B细胞上降低了70%-100%,而在pDC上降低了76%-100%。总体而言,在阻断测定中使用的AB1、AB2、AB8和AB13使TLR9表达的MFI在B细胞上平均降低了84%,而在pDC上平均降低了91%(图8的各图中的底部四个直方图)。下表2和3分别显示了B细胞和pDC的MFI和阻断百分比结果。

[0356]

表 2: B 细胞亚群			
PE 缀合物	阻断	MFI	阻断百分比
大 鼠 IgG2a	N/A	142	N/A
大 鼠 IgG2b	N/A	52	N/A
AB1	N/A	380	N/A
	大 鼠 IgG2a	369	3
	大 鼠 IgG2b	351	8
	AB1	30	92
	AB2	30	92
	AB8	52	86
	AB13	52	86
	AB2	N/A	317
大 鼠 IgG2a		360	0
大 鼠 IgG2b		365	0
AB1		40	87
AB2		27	91
AB8		36	89
AB13		27	91
AB3		N/A	366
	大 鼠 IgG2a	377	0

[0357]

	大 鼠		
	IgG2b	264	28
	AB1	58	84
	AB2	42	88
	AB8	43	88
	AB13	46	88
AB4	N/A	337	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	340	0
	大 鼠		
	IgG2b	350	0
	AB1	68	80
	AB2	58	83
AB8	AB8	47	86
	AB13	56	83
	N/A	297	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	308	0
	大 鼠		
	IgG2b	316	0
AB9	AB1	89	70
	AB2	71	76
	AB8	62	79
	AB13	69	77
	N/A	353	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	350	1
大 鼠			
IgG2b	368	0	
	AB1	54	85

[0358]

	AB2	49	86
	AB8	51	86
	AB13	49	86
AB10	N/A	392	N/A
	大 鼠 IgG2a	370	6
	大 鼠 IgG2b	380	3
	AB1	61	84
	AB2	53	86
	AB8	52	87
	AB13	53	86
	AB12	N/A	387
大 鼠 IgG2a		399	0
大 鼠 IgG2b		385	1
AB1		65	83
AB2		52	87
AB8		52	86
AB13		53	86
AB13	N/A	272	N/A
	大 鼠 IgG2a	276	0
	大 鼠 IgG2b	297	0
	AB1	72	74
	AB2	56	79
	AB8	52	81
	AB13	55	80

[0359]

AB14	N/A	308	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	321	0
	大 鼠		
	IgG2b	375	0
	AB1	88	71
	AB2	59	81
	AB8	52	83
AB15	AB13	58	81
	N/A	313	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	276	12
	大 鼠		
	IgG2b	280	11
	AB1	0	100
	AB2	0	100
AB8	0	100	
AB13	12	96	

[0360]

PE 缀合物	阻断	MFI	阻断百分比
大 鼠			
IgG2a	N/A	490	N/A
大 鼠			
IgG2b	N/A	138	N/A
AB1	N/A	5797	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	5614	3

[0361]

	大 鼠		
	IgG2b	5048	13
	AB1	404	93
	AB2	262	95
	AB8	210	96
	AB13	244	96
AB2	N/A	4785	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	5247	0
	大 鼠		
	IgG2b	5125	0
	AB1	441	91
	AB2	239	95
AB3	AB8	186	96
	AB13	235	95
	N/A	5116	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	5185	0
	大 鼠		
	IgG2b	3794	26
AB4	AB1	472	91
	AB2	233	95
	AB8	188	96
	AB13	243	95
	N/A	4419	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	4353	1
AB4	大 鼠		
	IgG2b	4522	0
	AB1	500	89

[0362]

	AB2	257	94
	AB8	168	96
	AB13	274	94
AB8	N/A	3745	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	3958	0
	大 鼠		
	IgG2b	4083	0
	AB1	841	78
	AB2	569	85
	AB8	298	92
AB9	AB13	469	87
	N/A	4339	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	4240	2
	大 鼠		
	IgG2b	4485	0
	AB1	254	94
AB10	AB2	169	96
	AB8	141	97
	AB13	155	96
	N/A	4825	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	4463	8
	大 鼠		
	IgG2b	4583	5
AB1	280	94	
AB2	185	96	
AB8	144	97	
AB13	165	97	

[0363]

AB12	N/A	4833	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	4906	0
	大 鼠		
	IgG2b	4745	2
	AB1	411	91
	AB2	220	95
	AB8	164	97
AB13	AB13	203	96
	N/A	3516	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	3499	0
	大 鼠		
	IgG2b	3788	0
	AB1	583	83
	AB2	376	89
AB14	AB8	218	94
	AB13	264	92
	N/A	4185	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	4382	0
	大 鼠		
	IgG2b	5108	0
	AB1	1010	76
AB15	AB2	582	86
	AB8	332	92
	AB13	430	90
AB15	N/A	4698	N/A
	大 鼠		
	IgG2a	4515	4

[0364]	大 鼠		
	IgG2b	4545	3
	AB1	423	91
	AB2	231	95
	AB8	132	97
	AB13	224	95

[0365] 实施例7:实施方案的实例

[0366] 下文阐述的实例说明某些实施方案,但不限制本技术。

[0367] A1. 一种抗TLR9药剂,任选地,一种分离的非天然存在的抗体,或其抗原结合片段或衍生物,其在实验室或生理条件与Toll样受体9 (TLR9) 结合,其中所述药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:

[0368] a) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR),其中所述第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列NYGMN或NFGMN (分别为SEQ ID NO:1和2) 具有至少65%的序列同一性,任选地具有至少80%,至少90%,至少95%,和100%的序列同一性的氨基酸序列,所述第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列SISSSSYIYYADTVKG、SISSTSSYIYYADTVKG、SISSTSSYISYADTVKG、SISSTSSYIYYVDTVKG、SISSTSSYIYYADSVKG或SISSTRSYIYYAETVKG (分别为SEQ ID NO:3-8) 具有至少65%的序列同一性,任选地具有至少80%,至少90%,至少95%,和100%的序列同一性的氨基酸序列,以及所述第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列YTLGIT-IDY、ADITIAAPHY、QDITTP-FDY、FTLGIT-LDY、SPMGITGFEY、HWVGGY-FDY、HTIGIT-FDY、YTLGIT-LDY、RGLAVGPFY、QSITVP-FDY、QSTYGD-FDY、HTVDTP-FAH或xTIGIT-FDY (分别为SEQ ID NO:9-21) 具有至少65%的序列同一性,任选地具有至少80%,至少90%,至少95%,和100%的序列同一性的氨基酸序列;并且

[0369] b) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR,其中所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列LASEDIYNNLA或RASEDIYNGLA (分别为SEQ ID NO:22和23) 具有至少65%的序列同一性,任选地具有至少80%,至少90%,至少95%,和100%的序列同一性的氨基酸序列,所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列YASTLQD、YASSLQD、YASTLQY、NANSLHT、YTSNLQD、NANTLHI或HASRLQD (分别为SEQ ID NO:24-30) 具有至少65%的序列同一性,任选地具有100%的序列同一性的氨基酸序列,以及所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列LQDSEYPFT、LQDSEFPYT、LQDSEFPNT、LQDSEYPWT、LQDSEYPYT、QQYYDYLPY、LQSEYPWT、LQDSEYPLT或QQYSDYPWT (分别为SEQ ID NO:31-39) 具有至少65%的序列同一性,任选地具有至少80%,至少90%,至少95%,和100%的序列同一性的氨基酸序列。

[0370] A2. 实施方案A1的抗TLR9药剂,其包含非天然存在的抗TLR9抗体 (mAb),所述mAb包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域,所述免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (分别为CDRH1-3),所述免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链互补决定区 (分别为CDRL1-3),其中所述抗体包含具有选自以下的CDRH1-3和CDRL1-3的组的免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链

可变结构域:

[0371]

m	CDRH	CDRH2 (SEQ ID	CDRH3 (SEQ	CDRL1 (SEQ	CDRL2	CDRL3
Ab	1 (SEQ	NO:)	ID NO:)	ID NO:)	(SEQ ID	(SEQ ID
	ID				NO:)	NO:)
	NO:)					
1	NYGM N (1)	SISSSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)
2	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYAD TVKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

m Ab	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
7	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	HWVGGY-FD Y (14)	RASEDIYNGL A (23)	NANSLH T (27)	QQYYDYLP T (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-LDY (16)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQESEYPW T (37)
[0372] 11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGM T (1)	SISSTSSYIYYVD TVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPFT (31)
13	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD SVKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNGL A (23)	NANTLHI (29)	QQYSDYPW T (39)
14	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
15	NYGM N (1)	SISSTRSYIYYAE TVKG (8)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNNL A (22)	HASRLQ D (30)	LQDSEYPW T (34)
16	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

[0373] A3. 实施方案A1或A2的抗TLR9药剂,其为人源化抗体或与TLR9结合的人源化抗体的抗原结合片段或衍生物。

[0374] A4. 一种诊断试剂,其包含实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂。

[0375] A5. 一种诊断试剂盒,其配置为检测生物样品中的Toll样受体9 (TLR9),所述试剂盒包含实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂,所述抗TLR9药剂与可检测标记缀合或非扩散地固定在固体支持物上。

[0376] A6. 实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂,其进一步包含可检测标签。

[0377] A7. 一种分离的核酸分子,其编码实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域。

[0378] A8.一种分离的核酸分子,其编码实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域。

[0379] A9.一种重组表达载体,其包含第一和第二表达盒,所述第一表达盒包含启动子和编码实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域和免疫球蛋白轻链可变结构域的核酸分子。

[0380] A10.一种用实施方案A9的重组表达载体转染的重组宿主细胞。

[0381] A11.一种检测TLR9的方法,其包含使已知或疑似含有TLR9的样品与实施方案A1、A2或A3的抗TLR9药剂接触,并且如果所述样品含有TLR9,则检测TLR9:抗TLR9复合物。

[0382] B1.一种抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与To11样受体9 (TLR9) 结合,其中所述药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:

[0383] a) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR), 其中

[0384] 所述第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列NX₁X₂MX₃ (SEQ ID NO:76) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0385] X₁为Y或F,

[0386] X₂为G或E,以及

[0387] X₃为N、H或T;

[0388] 所述第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列SISSX₁X₂SYIX₃YX₄X₅X₆VKG (SEQ ID NO:77) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0389] X₁为S或T,

[0390] X₂为S或R,

[0391] X₃为Y或S,

[0392] X₄为A或V,

[0393] X₅为D或E,以及

[0394] X₆为T或S; 并且

[0395] 所述第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0396] X₁为Y、A、Q、F、S、H或R,

[0397] X₂为T、D、P、W、G或S,

[0398] X₃为L、I、M、V或T,

[0399] X₄为G、T、A、D或Y,

[0400] X₅为I、T、G或V,

[0401] X₆为T、A、P、Y、G或D,

[0402] X₇为无氨基酸、A、G或P,

[0403] X₈为I、P、F或L,

[0404] X₉为D、H、E或A, 以及

[0405] X₁₀为Y或H; 并且

[0406] b) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链

CDR,其中

[0407] 所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 X_1 ASEDIYN X_2 LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0408] X_1 为L或R;以及

[0409] X_2 为N或G;

[0410] 所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4LX_5X_6$ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0411] X_1 为Y、N或H,

[0412] X_2 为A或T,

[0413] X_3 为S或N,

[0414] X_4 为T、S、N或R,

[0415] X_5 为Q或H,以及

[0416] X_6 为D、Y、T或I;并且

[0417] 所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 $X_1QX_2X_3X_4X_5X_6X_7T$ (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0418] X_1 为L或Q,

[0419] X_2 为D、Y或E,

[0420] X_3 为S或Y,

[0421] X_4 为E或D,

[0422] X_5 为Y或F,

[0423] X_6 为P或L,以及

[0424] X_7 为F、Y、N、W、L或P。

[0425] B2. 实施方案B1所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0426] B3. 实施方案B1所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0427] B4. 实施方案B1所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0428] B5. 实施方案B1至B4中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0429] B6. 实施方案B1至B4中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0430] B7. 实施方案B1至B4中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0431] B8. 实施方案B1至B7中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0432] B9. 实施方案B1至B7中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0433] B10. 实施方案B1至B7中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID

NO:78的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0434] B11.实施方案B1至B10中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0435] B12.实施方案B1至B10中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0436] B13.实施方案B1至B10中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0437] B14.实施方案B1至B13中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0438] B15.实施方案B1至B13中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0439] B16.实施方案B1至B13中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0440] B17.实施方案B1至B16中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0441] B18.实施方案B1至B16中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0442] B19.实施方案B1至B16中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0443] B20.实施方案B1至B19中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH1包含选自NYGMN(SEQ ID NO:1)、NFGMN(SEQ ID NO:2)、NFGMH(SEQ ID NO:73)、NYEMN(SEQ ID NO:74)和NYGMT(SEQ ID NO:75)的氨基酸序列。

[0444] B21.实施方案B1至B20中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含选自SISSSSSYIYYADTVKG(SEQ ID NO:3)、SISSTSSYIYYADTVKG(SEQ ID NO:4)、SISSTSSYISYADTVKG(SEQ ID NO:5)、SISSTSSYIYYVDTVKG(SEQ ID NO:6)、SISSTSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:7)和SISSTRSYIYYAETVKG(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。

[0445] B22.实施方案B1至B21中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含选自YTLGIT-IDY(SEQ ID NO:9)、ADITIAAPHY(SEQ ID NO:10)、QDITTP-FDY(SEQ ID NO:11)、FTLGIT-LDY(SEQ ID NO:12)、SPMGITGFEY(SEQ ID NO:13)、HWVGGY-FDY(SEQ ID NO:14)、HTIGIT-FDY(SEQ ID NO:15)、YTLGIT-LDY(SEQ ID NO:16)、RGLAVGPFY(SEQ ID NO:17)、QSITVP-FDY(SEQ ID NO:18)、QSTYGD-FDY(SEQ ID NO:19)、HTVDTP-FAH(SEQ ID NO:20)和xTIGIT-FDY(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。

[0446] B23.实施方案B1至B22中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含选自LASEDIYNNLA(SEQ ID NO:22)和RASEDIYNGLA(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列。

[0447] B24.实施方案B1至B23任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含选自YASTLQD(SEQ ID NO:24)、YASSLQD(SEQ ID NO:25)、YASTLQY(SEQ ID NO:26)、NANSLHT(SEQ ID NO:27)、YTSNLQD(SEQ ID NO:28)、NANTLHI(SEQ ID NO:29)和HASRLQD(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。

[0448] B25.实施方案B1至B24中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含选自

LQDSEYPFT (SEQ ID NO:31)、LQDSEFPYT (SEQ ID NO:32)、LQDSEFPNT (SEQ ID NO:33)、LQDSEYPWT (SEQ ID NO:34)、LQDSEYPYT (SEQ ID NO:35)、QQYYDYLP (SEQ ID NO:36)、LQSEYPWT (SEQ ID NO:37)、LQDSEYPLT (SEQ ID NO:38) 和QQYSDYPWT (SEQ ID NO:39) 的氨基酸序列。

[0449] B26. 实施方案B1至B25中任一项所述的抗TLR9药剂,其包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域。

[0450] B27. 实施方案B26所述的抗TLR9药剂,其中所述两个免疫球蛋白重链可变结构域各自包含一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0451] B28. 实施方案B26或B27所述的抗TLR9药剂,其中所述两个免疫球蛋白轻链可变结构域各自包含一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0452] B29. 实施方案B1至B28中任一项所述的抗TLR9药剂,其中每个免疫球蛋白重链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
[0453] 1	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)
2	NFGM	SISSTSSYIYYAD	ADITIAAPHY	LASEDIYNNL	YASSLQD	LQDSEFPYT

[0454]

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
	N (2)	TVKG (4)	(10)	A (22)	(25)	(32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYAD TVKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	HWVGGY-FD Y (14)	RASEDIYNNL A (23)	NANSLH T (27)	QQYYDYLP T (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-LDY (16)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQSEYPW T (37)
11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGM T (1)	SISSTSSYIYYVD TVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPFT (31)
13	NYGM	SISSTSSYIYYAD	QSTYGD-FD	RASEDIYNNL	NANTLHI	QQYSDYPW

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
	N (1)	SVKG (7)	Y (19)	A (23)	(29)	T (39)
[0455]	14 N (1)	NYEM TVKG (4)	SISSTSSYIYYAD Y (17)	RGLAVGPPFD A (22)	LASEDIYNNL (25)	YASSLQD (38)
	15 N (1)	NYGM TVKG (8)	SISSTRSYIYYAE H (20)	HTVDTP-FA A (22)	LASEDIYNNL D (30)	HASRLQ T (34)
	16 N (1)	NYGM TVKG (4)	SISSTSSYIYYAD (21)	xTIGIT-FDY A (22)	LASEDIYNNL (25)	YASSLQD T (34)

[0456] B30. 实施方案B29所述的抗TLR9药剂, 其中所有CDR序列来自同一组。

[0457] B31. 实施方案B1至B30中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述抗TLR9药剂是分离的。

[0458] B32. 实施方案B1至B31中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂是非天然存在的。

[0459] B33. 实施方案B1至B32中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂为抗体或其抗原结合片段。

[0460] B34. 实施方案B1至B32中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂为抗体或其衍生物。

[0461] B35. 实施方案B1至B34中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂为人源化抗体或其抗原结合片段。

[0462] B36. 实施方案B1至B34中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂为与TLR9结合的人源化抗体的衍生物。

[0463] B37. 实施方案B1至B36中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂包含可检测的标记物或标签。

[0464] B38. 实施方案B1至B37中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂与可检测的标记或标签缀合。

[0465] B39. 实施方案B1至B38中任一项所述的抗TLR9药剂, 其中所述药剂非扩散地固定在固体支持物上。

[0466] B40. 一种诊断试剂, 其包含实施方案B1至B39中任一项所述的抗TLR9药剂。

[0467] B41. 一种试剂盒, 其包含实施方案B1至B39中任一项所述的抗TLR9药剂或实施方案B40所述的诊断试剂。

[0468] B42. 一种诊断试剂盒, 其配置为检测生物样品中的Toll样受体9 (TLR9), 其中所述试剂盒包含实施方案B1到B39中任一项所述的抗TLR9药剂或实施方案B40所述的诊断试剂。

[0469] B43. 一种分离的核酸分子, 其包含编码实施方案B1至B39中任一项所述的抗TLR9

药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列。

[0470] B44. 一种分离的核酸分子,其包含编码实施方案B1至B39中任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0471] B45. 一种重组表达载体,其包含第一表达盒和第二表达盒,其中所述第一表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码实施方案B1至B39中的任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列,并且所述第二表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码实施方案B1至B39中的任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0472] B46. 一种用实施方案B45所述的重组表达载体转染的重组宿主细胞。

[0473] B47. 一种检测TLR9的方法,其包含使已知或疑似含有TLR9的样品与实施方案B1至B39中任一项所述的抗TLR9药剂接触,并且如果所述样品含有TLR9,则检测TLR9:抗TLR9复合物。

[0474] C1. 一种第一抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与Toll样受体9 (TLR9) 结合,其中所述第一药剂与第二抗TLR9药剂竞争性结合或能够与第二抗TLR9药剂竞争性结合,所述第二药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:

[0475] a) 所述第二药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR), 其中

[0476] 所述第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列 $NX_1X_2MX_3$ (SEQ ID NO:76) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0477] X_1 为Y或F,

[0478] X_2 为G或E, 以及

[0479] X_3 为N、H或T;

[0480] 所述第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列 $SISSX_1X_2SYIX_3YX_4X_5X_6VKG$ (SEQ ID NO:77) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0481] X_1 为S或T,

[0482] X_2 为S或R,

[0483] X_3 为Y或S,

[0484] X_4 为A或V,

[0485] X_5 为D或E, 以及

[0486] X_6 为T或S; 并且

[0487] 所述第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0488] X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R,

[0489] X_2 为T、D、P、W、G或S,

[0490] X_3 为L、I、M、V或T,

[0491] X_4 为G、T、A、D或Y,

[0492] X_5 为I、T、G或V,

[0493] X_6 为T、A、P、Y、G或D,

[0494] X_7 为无氨基酸、A、G或P,

[0495] X_8 为I、P、F或L,

[0496] X_9 为D、H、E或A,以及

[0497] X_{10} 为Y或H;并且

[0498] b) 所述第二药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR,其中

[0499] 所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 X_1 ASEDIYN X_2 LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0500] X_1 为L或R;以及

[0501] X_2 为N或G;

[0502] 所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4LX_5X_6$ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0503] X_1 为Y、N或H;

[0504] X_2 为A或T;

[0505] X_3 为S或N;

[0506] X_4 为T、S、N或R;

[0507] X_5 为Q或H;以及

[0508] X_6 为D、Y、T或I;并且

[0509] 所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 $X_1QX_2X_3X_4X_5X_6X_7T$ (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0510] X_1 为L或Q,

[0511] X_2 为D、Y或E,

[0512] X_3 为S或Y,

[0513] X_4 为E或D,

[0514] X_5 为Y或F,

[0515] X_6 为P或L,以及

[0516] X_7 为F、Y、N、W、L或P。

[0517] C2. 一种第一抗TLR9药剂,其在实验室或生理条件与To11样受体9 (TLR9) 结合,其中所述第一药剂与第二抗TLR9药剂结合相同的表位或能够与第二抗TLR9药剂结合相同的表位,所述第二药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:

[0518] a) 所述第二药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区 (CDR),其中

[0519] 所述第一重链CDR (CDRH1) 包含与氨基酸序列 $NX_1X_2MX_3$ (SEQ ID NO:76) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0520] X_1 为Y或F,

[0521] X_2 为G或E,以及

[0522] X_3 为N、H或T;

[0523] 所述第二重链CDR (CDRH2) 包含与氨基酸序列 $SISSX_1X_2SYIX_3YX_4X_5X_6VKG$ (SEQ ID

NO:77) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0524] X_1 为S或T,

[0525] X_2 为S或R,

[0526] X_3 为Y或S,

[0527] X_4 为A或V,

[0528] X_5 为D或E,以及

[0529] X_6 为T或S;并且

[0530] 所述第三重链CDR (CDRH3) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78)

至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0531] X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R,

[0532] X_2 为T、D、P、W、G或S,

[0533] X_3 为L、I、M、V或T,

[0534] X_4 为G、T、A、D或Y,

[0535] X_5 为I、T、G或V,

[0536] X_6 为T、A、P、Y、G或D,

[0537] X_7 为无氨基酸、A、G或P,

[0538] X_8 为I、P、F或L,

[0539] X_9 为D、H、E或A,以及

[0540] X_{10} 为Y或H;并且

[0541] b) 所述第二药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构包含第一、第二和第三轻链CDR, 其中

[0542] 所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 $X_1ASEDIYNX_2LA$ (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0543] X_1 为L或R;以及

[0544] X_2 为N或G;

[0545] 所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4LX_5X_6$ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0546] X_1 为Y、N或H;

[0547] X_2 为A或T;

[0548] X_3 为S或N;

[0549] X_4 为T、S、N或R;

[0550] X_5 为Q或H;以及

[0551] X_6 为D、Y、T或I;并且

[0552] 所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 $X_1QX_2X_3X_4X_5X_6X_7T$ (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0553] X_1 为L或Q,

[0554] X_2 为D、Y或E,

[0555] X_3 为S或Y,

[0556] X_4 为E或D,

- [0557] X₅为Y或F,
- [0558] X₆为P或L,以及
- [0559] X₇为F、Y、N、W、L或P。
- [0560] C3. 实施方案C1或C2所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0561] C4. 实施方案C1或C2所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0562] C5. 实施方案C1或C2所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。
- [0563] C6. 实施方案C1至C5中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0564] C7. 实施方案C1至C5中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0565] C8. 实施方案C1至C5中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。
- [0566] C9. 实施方案C1至C8中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0567] C10. 实施方案C1至C8中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0568] C11. 实施方案C1至C8中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。
- [0569] C12. 实施方案C1至C11中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0570] C13. 实施方案C1至C11中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0571] C14. 实施方案C1至C11中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。
- [0572] C15. 实施方案C1至C14中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0573] C16. 实施方案C1至C14中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0574] C17. 实施方案C1至C14中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。
- [0575] C18. 实施方案C1至C17中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0576] C19. 实施方案C1至C17中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0577] C20. 实施方案C1至C17中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0578] C21. 实施方案C1至C20中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH1包含选自NYGMN(SEQ ID NO:1)、NFGMN(SEQ ID NO:2)、NFGMH(SEQ ID NO:73)、NYEMN(SEQ ID NO:74)和NYGMT(SEQ ID NO:75)的氨基酸序列。

[0579] C22. 实施方案C1至C21任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH2包含选自SISSSSYIYYADTVKG(SEQ ID NO:3)、SISSTSSYIYYADTVKG(SEQ ID NO:4)、SISSTSSYISYADTVKG(SEQ ID NO:5)、SISSTSSYIYYVDTVKG(SEQ ID NO:6)、SISSTSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:7)和SISSTRSYIYYAETVKG(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。

[0580] C23. 实施方案C1至C22中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRH3包含选自YTLGIT-IDY(SEQ ID NO:9)、ADITIAAPHY(SEQ ID NO:10)、QDITTP-FDY(SEQ ID NO:11)、FTLGIT-LDY(SEQ ID NO:12)、SPMGITGFEY(SEQ ID NO:13)、HWVGGY-FDY(SEQ ID NO:14)、HTIGIT-FDY(SEQ ID NO:15)、YTLGIT-LDY(SEQ ID NO:16)、RGLAVGPFDY(SEQ ID NO:17)、QSITVP-FDY(SEQ ID NO:18)、QSTYGD-FDY(SEQ ID NO:19)、HTVDTP-FAH(SEQ ID NO:20)和_xTIGIT-FDY(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。

[0581] C24. 实施方案C1至C23中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL1包含选自LASEDIYNNLA(SEQ ID NO:22)和RASEDIYNGLA(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列。

[0582] C25. 实施方案C1至C24任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的YASTLQD(SEQ ID NO:24)、YASSLQD(SEQ ID NO:25)、YASTLQY(SEQ ID NO:26)、NANSLHT(SEQ ID NO:27)、YTSNLQD(SEQ ID NO:28)、NANTLHI(SEQ ID NO:29)和HASRLQD(SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。

[0583] C26. 实施方案C1至C25任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的CDRL3包含选自LQDSEYPFT(SEQ ID NO:31)、LQDSEFPYT(SEQ ID NO:32)、LQDSEFPNT(SEQ ID NO:33)、LQDSEYPWT(SEQ ID NO:34)、LQDSEYPYT(SEQ ID NO:35)、QQYYDYLPY(SEQ ID NO:36)、LQESEYPWT(SEQ ID NO:37)、LQDSEYPLT(SEQ ID NO:38)和QQYSDYPWT(SEQ ID NO:39)的氨基酸序列。

[0584] C27. 实施方案C1至C26中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域。

[0585] C28. 实施方案C27所述的第一抗TLR9药剂,其中所述两个免疫球蛋白重链可变结构域各自包含一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0586] C29. 实施方案C27或C28所述的第一抗TLR9药剂,其中所述两个免疫球蛋白轻链可变结构域各自包含一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0587] C30. 实施方案C1至C29中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第二抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且所述第二抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:

[0588]

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
1	NYGM N (1)	SISSSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)

[0589]

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
2	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYAD TVKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	HWVGGY-FD Y (14)	RASEDIYNGL A (23)	NANSLH T (27)	QQYYDYLP T (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-LDY (16)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQSEYPW T (37)
11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGM T (1)	SISSTSSYIYYVD TVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPFT (31)

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
[0590] 13	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD SVKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNGL A (23)	NANTLHI (29)	QQYSDYPW T (39)
14	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
15	NYGM N (1)	SISSTRSYIYYAE TVKG (8)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNNL A (22)	HASRLQ D (30)	LQDSEYPW T (34)
16	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

[0591] C31. 实施方案C30所述的第一抗TLR9药剂,其中所有CDR序列来自同一组。

[0592] C32. 实施方案C1至C31中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂和/或第二药剂是分离的。

[0593] C33. 实施方案C1至C32中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂和/或第二药剂是非天然存在的。

[0594] C34. 实施方案C1至C33中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂和/或第二药剂为抗体或其抗原结合片段。

[0595] C35. 实施方案C1至C33中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂和/或第二药剂为抗体或其衍生物。

[0596] C36. 实施方案C1至C35中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂和/或第二药剂为人源化抗体或其抗原结合片段。

[0597] C37. 实施方案C1至C35中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂和/或第二药剂为与TLR9结合的人源化抗体的衍生物。

[0598] C38. 实施方案C1至C37中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其包含可检测的标记或标签。

[0599] C39. 实施方案C1至C38中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂与可检测的标记或标签缀合。

[0600] C40. 实施方案C1至C39中任一项所述的第一抗TLR9药剂,其中所述第一药剂非扩散地固定在固体支持物上。

[0601] C41. 一种诊断试剂,其包含实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂。

[0602] C42. 一种试剂盒,其包含实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂或实施方案C41所述的诊断试剂。

[0603] C43. 一种诊断试剂盒,其配置为检测生物样品中的To11样受体9 (TLR9),其中所述试剂盒包含实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂或实施方案C41所述的诊断

试剂。

[0604] C44. 一种分离的核酸分子,其包含编码实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列。

[0605] C45. 一种分离的核酸分子,其包含编码实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0606] C46. 一种重组表达载体,其包含第一表达盒和第二表达盒,其中所述第一表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列,并且所述第二表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0607] C47. 一种用实施方案C46所述的重组表达载体转染的重组宿主细胞。

[0608] C48. 一种检测TLR9的方法,其包含使已知或疑似含有TLR9的样品与实施方案C1至C40中任一项所述的第一抗TLR9药剂接触,并且如果所述样品含有TLR9,则检测TLR9:抗TLR9复合物。

[0609] D1. 一种用于检测免疫细胞的异质群体中的TLR9的抗TLR9药剂,其中在所述群体中的浆细胞样树突细胞和/或B细胞中以显著水平检测到TLR9,且在所述群体中的其他免疫细胞中没有显著检测到TLR9。

[0610] D2. 实施方案D1所述的抗TLR9药剂,其中所述抗TLR9药剂包含至少一个免疫球蛋白重链可变结构域和至少一个免疫球蛋白轻链可变结构域,其中:

[0611] i) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白重链可变结构域包含第一、第二和第三重链互补决定区(CDR);并且

[0612] ii) 所述抗TLR9药剂的每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含第一、第二和第三轻链CDR。

[0613] D3. 实施方案D2所述的抗TLR9药剂,其中所述第一重链CDR(CDRH1)包含与氨基酸序列 $NX_1X_2MX_3$ (SEQ ID NO:76)至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0614] X_1 为Y或F,

[0615] X_2 为G或E,以及

[0616] X_3 为N、H或T。

[0617] D4. 实施方案D2或D3所述的抗TLR9药剂,其中所述第二重链CDR(CDRH2)包含与氨基酸序列 $SISSX_1X_2SYIX_3YX_4X_5X_6VKG$ (SEQ ID NO:77)至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0618] X_1 为S或T,

[0619] X_2 为S或R,

[0620] X_3 为Y或S,

[0621] X_4 为A或V,

[0622] X_5 为D或E,以及

[0623] X_6 为T或S。

[0624] D5. 实施方案D2、D3或D4所述的抗TLR9药剂,其中所述第三重链CDR(CDRH3)包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ (SEQ ID NO:78)至少80%相同的氨基酸序列,其中:

[0625] X_1 为Y、A、Q、F、S、H或R,

- [0626] X_2 为T、D、P、W、G或S，
- [0627] X_3 为L、I、M、V或T，
- [0628] X_4 为G、T、A、D或Y，
- [0629] X_5 为I、T、G或V，
- [0630] X_6 为T、A、P、Y、G或D，
- [0631] X_7 为无氨基酸、A、G或P，
- [0632] X_8 为I、P、F或L，
- [0633] X_9 为D、H、E或A，以及
- [0634] X_{10} 为Y或H。
- [0635] D6. 实施方案D2至D5中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述第一轻链CDR (CDRL1) 包含与氨基酸序列 X_1 ASEDIYN X_2 LA (SEQ ID NO:79) 至少80%相同的氨基酸序列，其中：
- [0636] X_1 为L或R；以及
- [0637] X_2 为N或G。
- [0638] D7. 实施方案D2至D6中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述第二轻链CDR (CDRL2) 包含与氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4LX_5X_6$ (SEQ ID NO:80) 至少80%相同的氨基酸序列，其中：
- [0639] X_1 为Y、N或H；
- [0640] X_2 为A或T；
- [0641] X_3 为S或N；
- [0642] X_4 为T、S、N或R；
- [0643] X_5 为Q或H；以及
- [0644] X_6 为D、Y、T或I。
- [0645] D8. 实施方案D2至D7中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述第三轻链CDR (CDRL3) 包含与氨基酸序列 $X_1QX_2X_3X_4X_5X_6X_7T$ (SEQ ID NO:81) 至少80%相同的氨基酸序列，其中：
- [0646] X_1 为L或Q，
- [0647] X_2 为D、Y或E，
- [0648] X_3 为S或Y，
- [0649] X_4 为E或D，
- [0650] X_5 为Y或F，
- [0651] X_6 为P或L，以及
- [0652] X_7 为F、Y、N、W、L或P。
- [0653] D9. 实施方案D2至D8中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0654] D10. 实施方案D2至D8中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。
- [0655] D11. 实施方案D2至D8中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述CDRH1包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。
- [0656] D12. 实施方案D2至D11中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。
- [0657] D13. 实施方案D2至D11中任一项所述的抗TLR9药剂，其中所述CDRH2包含与SEQ ID

NO:77的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0658] D14.实施方案D2至D11中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含与SEQ ID NO:77的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0659] D15.实施方案D2至D14中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0660] D16.实施方案D2至D14中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0661] D17.实施方案D2至D14中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含与SEQ ID NO:78的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0662] D18.实施方案D2至D17中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0663] D19.实施方案D2至D17中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0664] D20.实施方案D2至D17中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含与SEQ ID NO:79的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0665] D21.实施方案D2至D20中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0666] D22.实施方案D2至D20中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0667] D23.实施方案D2至D20中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含与SEQ ID NO:80的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0668] D24.实施方案D2至D23中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列。

[0669] D25.实施方案D2至D23中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列至少95%相同的氨基酸序列。

[0670] D26.实施方案D2至D23中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含与SEQ ID NO:81的氨基酸序列100%相同的氨基酸序列。

[0671] D27.实施方案D2至D26中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH1包含选自NYGMN(SEQ ID NO:1)、NFGMN(SEQ ID NO:2)、NFGMH(SEQ ID NO:73)、NYEMN(SEQ ID NO:74)和NYGMT(SEQ ID NO:75)的氨基酸序列。

[0672] D28.实施方案D2至D27中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH2包含选自SISSSSSYIYYADTVKG(SEQ ID NO:3)、SISSTSSYIYYADTVKG(SEQ ID NO:4)、SISSTSSYISYADTVKG(SEQ ID NO:5)、SISSTSSYIYYVDTVKG(SEQ ID NO:6)、SISSTSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:7)和SISSTRSYIYYAETVKG(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。

[0673] D29.实施方案D2至D28中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRH3包含选自YTLGIT-IDY(SEQ ID NO:9)、ADITIAAPHY(SEQ ID NO:10)、QDITTP-FDY(SEQ ID NO:11)、FTLGIT-LDY(SEQ ID NO:12)、SPMGITGFEY(SEQ ID NO:13)、HWVGGY-FDY(SEQ ID NO:14)、HTIGIT-FDY(SEQ ID NO:15)、YTLGIT-LDY(SEQ ID NO:16)、RGLAVGPFY(SEQ ID NO:17)、QSITVP-FDY(SEQ ID NO:18)、QSTYGD-FDY(SEQ ID NO:19)、HTVDTP-FAH(SEQ ID NO:20)和

xTIGIT-FDY (SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。

[0674] D30.实施方案D2至D29中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL1包含选自LASEDIYNNLA (SEQ ID NO:22)和RASEDIYNGLA (SEQ ID NO:23)的氨基酸序列。

[0675] D31.实施方案D2至D30任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL2包含选自YASTLQD (SEQ ID NO:24)、YASSLQD (SEQ ID NO:25)、YASTLQY (SEQ ID NO:26)、NANSLHT (SEQ ID NO:27)、YTSNLQD (SEQ ID NO:28)、NANTLHI (SEQ ID NO:29)和HASRLQD (SEQ ID NO:30)的氨基酸序列。

[0676] D32.实施方案D2至D31任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述CDRL3包含选自LQDSEYPFT (SEQ ID NO:31)、LQDSEFPYT (SEQ ID NO:32)、LQDSEFPNT (SEQ ID NO:33)、LQDSEYPWT (SEQ ID NO:34)、LQDSEYPYT (SEQ ID NO:35)、QQYYDYLP (SEQ ID NO:36)、LQSEYPWT (SEQ ID NO:37)、LQDSEYPLT (SEQ ID NO:38)和QQYSDYPWT (SEQ ID NO:39)的氨基酸序列。

[0677] D33.实施方案D1至D32中任一项所述的抗TLR9药剂,其包含两个免疫球蛋白重链可变结构域和两个免疫球蛋白轻链可变结构域。

[0678] D34.实施方案D33所述的抗TLR9药剂,其中所述两个免疫球蛋白重链可变结构域各自包含一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0679] D35.实施方案D33或D34所述的抗TLR9药剂,其中所述两个免疫球蛋白轻链可变结构域各自包含一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0680] D36.实施方案D2至D35中任一项所述的抗TLR9药剂,其中每个免疫球蛋白重链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列,并且每个免疫球蛋白轻链可变结构域包含选自组1-16的一组CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列:

[0681]

组	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
1	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	YTLGIT-IDY (9)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQD (24)	LQDSEYPFT (31)
2	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
3	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
4	NFGM H (2)	SISSTSSYISYAD TVKG (5)	QDITTP-FDY (11)	LASEDIYNNL A (22)	YASTLQY (26)	LQDSEFPNT (33)
5	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	ADITIAAPHY (10)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEFPYT (32)
6	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	FTLGIT-LDY (12)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
7	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	SPMGITGFE Y (13)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPY T (35)
8	NYGM N (1)	SISSSSYIYYAD TVKG (3)	HWVGGY-FD Y (14)	RASEDIYNNL A (23)	NANSLH T (27)	QQYYDYLP T (36)
9	NFGM N (2)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	HTIGIT-FDY (15)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)
10	NYGM	SISSSSYIYYAD	YTLGIT-LDY	LASEDIYNNL	YASSLQD	LQSEYPW

组	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
	N (1)	TVKG (3)	(16)	A (22)	(25)	T (37)
11	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
12	NYGM T (1)	SISSTSSYIYYVD TVKG (6)	QSITVP-FDY (18)	LASEDIYNNL A (22)	YTSNLQ D (28)	LQDSEYPFT (31)
13	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD SVKG (7)	QSTYGD-FD Y (19)	RASEDIYNNL A (23)	NANTLHI (29)	QQYSDYPW T (39)
14	NYEM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	RGLAVGPF Y (17)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPLT (38)
15	NYGM N (1)	SISSTRSYIYYAE TVKG (8)	HTVDTP-FA H (20)	LASEDIYNNL A (22)	HASRLQ D (30)	LQDSEYPW T (34)
16	NYGM N (1)	SISSTSSYIYYAD TVKG (4)	xTIGIT-FDY (21)	LASEDIYNNL A (22)	YASSLQD (25)	LQDSEYPW T (34)

[0683] D37. 实施方案D36所述的抗TLR9药剂,其中所有CDR序列来自同一组。

[0684] D38. 实施方案D1至D37中任一项所述的抗TLR9药剂,其中在浆细胞样树突细胞中以显著水平检测到TLR9。

[0685] D39. 实施方案D38所述的抗TLR9药剂,其中使用流式细胞术测定在浆细胞样树突细胞中检测TLR9。

[0686] D40. 实施方案D39所述的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9。

[0687] D41. 实施方案D40所述的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9,其信噪比为约2或更大。

[0688] D42. 实施方案D40所述的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9,其信噪比为约15或更大。

[0689] D43. 实施方案D39所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9。

[0690] D44. 实施方案D43所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9,其信噪比为约15或更大。

[0691] D45. 实施方案D43所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在浆细胞样树突细胞中检测TLR9,其信噪比为约45或更大。

[0692] D46. 实施方案D43所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在浆细胞样树突细胞

中检测TLR9,其信噪比为约50或更大。

[0693] D47.实施方案D1至D46中任一项所述的抗TLR9药剂,其中在B细胞中以显著水平检测到TLR9。

[0694] D48.实施方案D47所述的抗TLR9药剂,其中使用流式细胞术测定在B细胞中检测TLR9。

[0695] D49.实施方案D48所述的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在B细胞中检测TLR9。

[0696] D50.实施方案D49所述的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在B细胞中检测TLR9,其信噪比为约2或更大。

[0697] D51.实施方案D49所述的抗TLR9药剂,其中通过表面染色在B细胞中检测TLR9,其信噪比为约2.5或更大。

[0698] D52.实施方案D48所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在B细胞中检测TLR9。

[0699] D53.实施方案D52所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在B细胞中检测TLR9,其信噪比为约10或更大。

[0700] D54.实施方案D52所述的抗TLR9药剂,其中通过细胞内染色在B细胞中检测TLR9,其信噪比为约11或更大。

[0701] D55.实施方案D1至D54中任一项所述的抗TLR9药剂,其中在所述群体中的其他免疫细胞中没有显著检测到TLR9,其中所述其他免疫细胞包含CD3⁻CD19⁻淋巴细胞、CD3⁺CD19⁻T细胞和单核细胞中的一种或多种。

[0702] D56.实施方案D1至D55中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂是分离的。

[0703] D57.实施方案D1至D56中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂是非天然存在的。

[0704] D58.实施方案D1至D57中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂为抗体或其抗原结合片段。

[0705] D59.实施方案D1至D57中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂为抗体或其衍生物。

[0706] D60.实施方案D1至D59中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂为人源化抗体或其抗原结合片段。

[0707] D61.实施方案D1至D59中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂为与TLR9结合的人源化抗体的衍生物。

[0708] D62.实施方案D1至D61中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂包含可检测的标记或标签。

[0709] D63.实施方案D1至D62中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂与可检测的标记或标签缀合。

[0710] D64.实施方案D1至D63中任一项所述的抗TLR9药剂,其中所述药剂非扩散地固定在固体支持物上。

[0711] D65.一种诊断试剂,其包含实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂。

[0712] D66.一种试剂盒,其包含实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂或实施方案D65所述的诊断试剂。

[0713] D67.一种诊断试剂盒,其配置为检测生物样品中的Toll样受体9 (TLR9),其中所述

试剂盒包含实施方案D1到D64中任一项所述的抗TLR9药剂或实施方案D65所述的诊断试剂。

[0714] D68.一种分离的核酸分子,其包含编码实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列。

[0715] D69.一种分离的核酸分子,其包含编码实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0716] D70.一种重组表达载体,其包含第一表达盒和第二表达盒,其中所述第一表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白重链可变结构域的核苷酸序列,并且所述第二表达盒包含启动子和核酸分子,所述核酸分子包含编码实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂的免疫球蛋白轻链可变结构域的核苷酸序列。

[0717] D71.一种用实施方案D70所述的重组表达载体转染的重组宿主细胞。

[0718] D72.一种检测TLR9的方法,其包含使已知或疑似含有TLR9的样品与实施方案D1至D64中任一项所述的抗TLR9药剂接触,并且如果所述样品含有TLR9,则检测TLR9:抗TLR9复合物。

[0719] D73.一种检测免疫细胞的异质群体中的TLR9的方法,其包含使所述群体与实施方案D1至D72中任一项所述的抗TLR9药剂接触,并且如果所述群体包含表达TLR9的细胞,则检测TLR9:抗TLR9复合物。

[0720] ***

[0721] 本文引用的每个专利、专利申请、出版物和文件的全部通过引用并入本文。以上专利、专利申请、出版物和文件的引用并不是承认前述任何是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的任何承认。他们的引用并不是检索相关披露的指示。关于文件的日期或内容的所有陈述均基于可用信息而并非承认他们的准确性或正确性。

[0722] 在不偏离本技术的基本方面的情况下,可以对前述内容进行修改。尽管已经参考一个或多个具体实施方案对本技术进行了相当详细的描述,但是本领域的普通技术人员将认识到,可以对本申请中具体公开的实施方案进行改变,然而这些修改和改进在本技术的范围和精神内。

[0723] 本文说明性地描述的技术可在不存在本文未具体公开的任何要素的一种或多种的情况下适当地实施。因此,例如在本文的每种情况下,术语“包含”、“基本上由…组成”和“由…组成”中的任一个均可以用另外两个术语中的任一个代替。已经采用的术语和表达用作描述而非限制的术语,并且这些术语和表达的使用不排除所示出和描述的特征或其部分的任何等同,并且在所要求保护的技术的范围内各种修改是可能的。术语“一种”或“一个”可以指其修饰的一个或多个要素(例如“一种试剂”可以指一种或多种试剂),除非上下文清楚地描述了一个要素或多于一个要素。如本文所用,术语“约”是指在基础参数的10%以内的值(即,正或负10%),并且在一串值的开始处使用术语“约”修饰每个所述值(即,“约1、2和3”是指约1、约2和约3)。例如“约100克”的重量可以包括90克与110克之间的重量。此外,当本文描述一系列值(例如约50%、60%、70%、80%、85%或86%)时,该列包括其所有中间值和分数值(例如54%、85.4%)。因此,应当理解,尽管已经通过代表性实施方案和任选特征具体公开了本技术,但是对本领域技术人员可以采用本文所公开的概念的修改和变化,并且这样的修改和变化被认为在本技术的范围内。

[0724] 以下权利要求中阐述了该技术的某些实施方案。

全长人TLR9前体的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 72)

```

1  mgfersalhp lsllvqaiml amtlaigtlp aflpcelqph glvncnwlfl ksvphfsmaa
61  prgnvtslsl ssnrihhhd sdfahlpshr hlnlkwncpp vglspmhfpc hmtiepstfl
121 avptleelnl synnimtvpv lpkslslsl shtnilmlds aslaglhalr flfmdgncyy
181 knpcrqalev apgallglgn lthslkynn ltvvprnlps sleylllsyn rivklapedl
241 anltaalrvld vggncrrcdh apncmecpr hfpqlhpdtf shlsrleglv lkdsllswln
301 aswfrglgnl rvlldsenfl ykcitktkaf qglqtqrkln lsfnyqkrvs fahlslapsf
361 gslvalkeld mhgiffrrld ettlrplarl pmlqtlrqgm nfinqagligi frafpglryv
421 dlscnrisga seltatmgea dggekvwlqp gdlapapvdt pssedfrpnc stlnftldls
481 rnlvtvqpe mfaqlshlqc lrlshncisq avngsqflpl tglqvlldsh nkldlyhehs
541 ftelprleal dlsynsqpfg mggvghnfsf vahlrtrhl slahnnihsq vsqqlcstsl
601 raldfsgnal ghmwaegdly lhffqglsgl iwldlsgnrl htllpqtlnr lpkslqlvrlr
661 rdnylaffkw wslhflpkle vldlagnqk altngslpag trlrrldvsc nsisfvapgf
721 fskakerel nlsanalktv dhswfqplas alqildvsan plhcacgaaf mdfllevqaa
781 vpglpsrvkc gspgqlqgls ifaqdlrlcl dealswdcfa lsllavalgl gvpmlhhlcg
841 wdlwycfhlc lawlpwrgrq sgrdedalpy dafvvfdktq savadwvwyne lrgqleecrg
901 rwalrlclee rdwlpgktlf enlwasvygs rktlfvlaht drvsgllras fllaqgrlle
961 drkdvvvlvi lspdgrrsry vrlrqrllcrq svllwphqps gqrsfwaqlg maltrdnhhf
1021 ynrnfcqgpt ae

```

图1

抗TLR9抗体重链和轻链可变区和CDR氨基酸序列和比对

重链可变区	FRH1	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	SID#
1	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	41
2	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	42
3	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	43
4	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	44
5	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	45
6	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	46
7	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	47
8	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	48
9	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	49
10	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	50
11	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	51
12	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	52
13	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	53
14	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	54
15	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	55
CON	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCLASGFTFSNYGMNWRQAPGKLEWASISSTSSIIYADTVKGRFTI	CDRH1	FRH2	CDRH2	FRH3	CDRH3	56

轻链可变区	FRH1	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	SID#
1	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	57
2	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	58
3	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	59
4	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	60
5	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	61
6	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	62
7	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	63
8	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	64
9	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	65
10	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	66
11	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	67
12	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	68
13	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	69
14	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	70
CON	DIQMTQSPASLSASLGFTVTECLASEDIYNNLAWYQOKPKSPQLLIYASLLQD	CDRL1	FRH2	CDRL2	FRH3	CDRL3	71

图2

克隆信息

ID	来源	克隆	同种型	形式	ug/T
AB1	BioLegend	1	大鼠 IgG2a, k	PE	0.5
AB2	BioLegend	2	大鼠 IgG2a, k	PE	0.5
AB3	BioLegend	3	大鼠 IgG2a, k	PE	0.5
AB4	BioLegend	4	大鼠 IgG2a, k	PE	0.5
Commercial ABI	市售	n/a	小鼠 IgG1, k	PE	0.5
Commercial ABII	市售	n/a	大鼠 IgG2a, k	APC	0.5

图3

门控策略

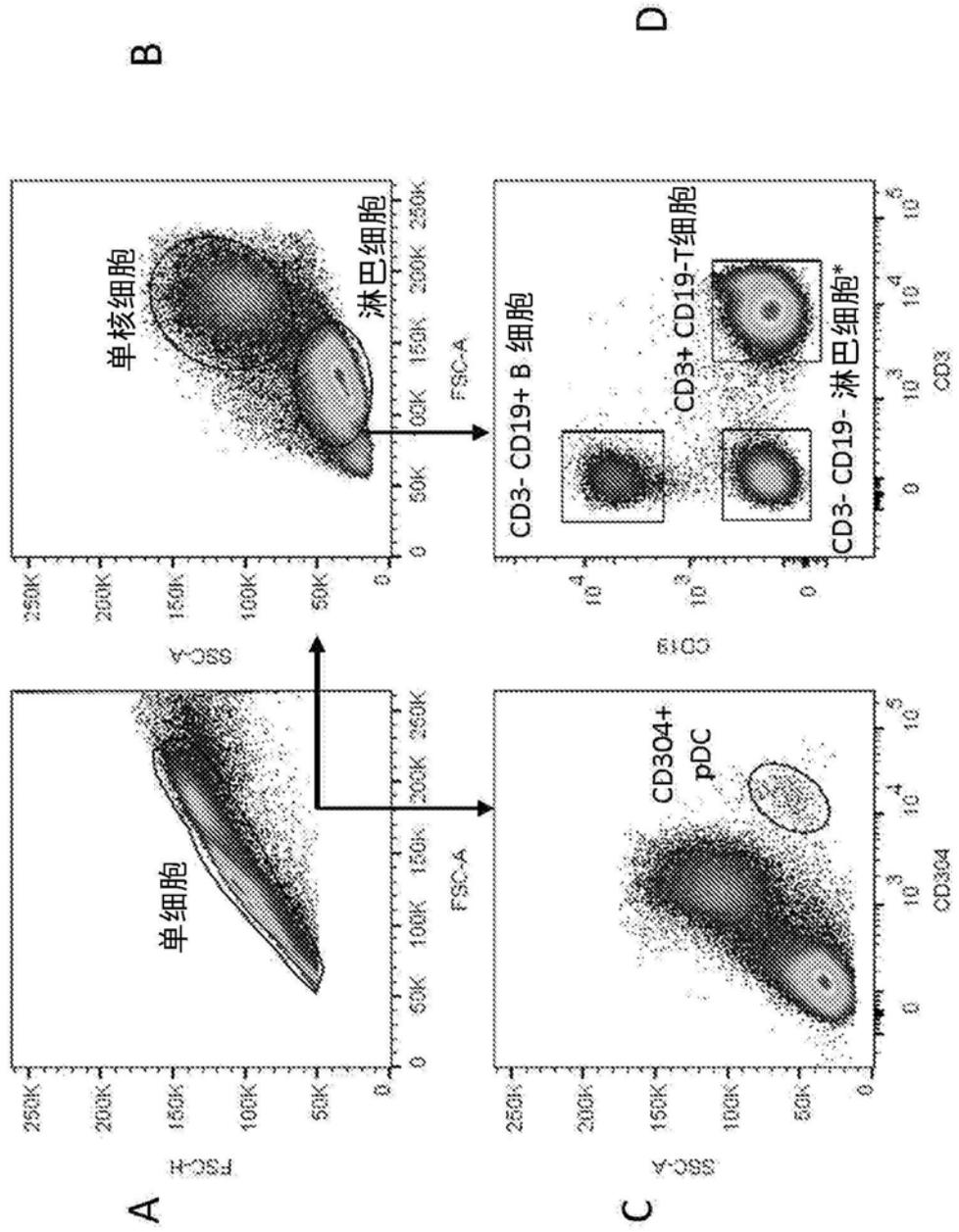


图4

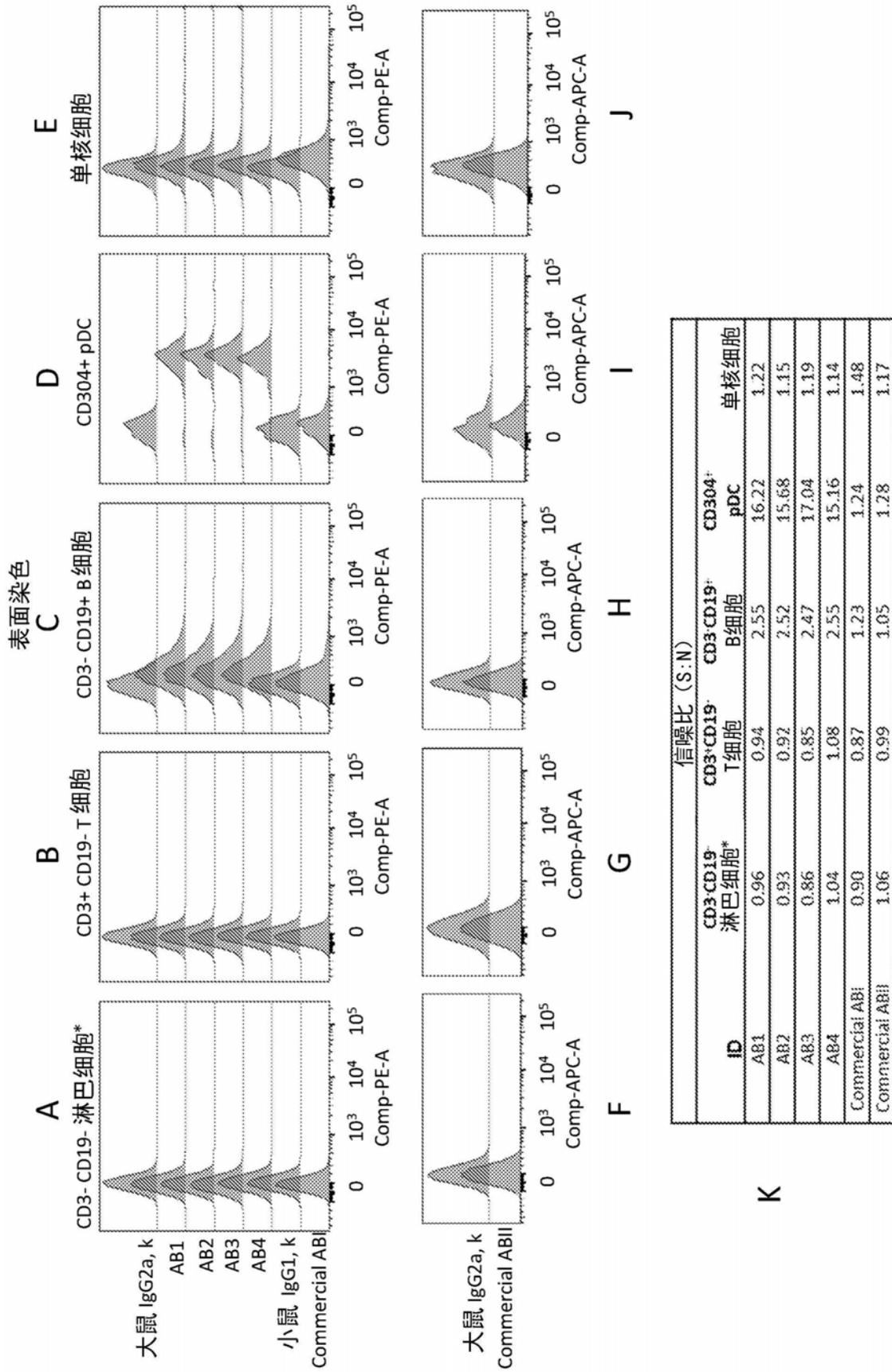


图5

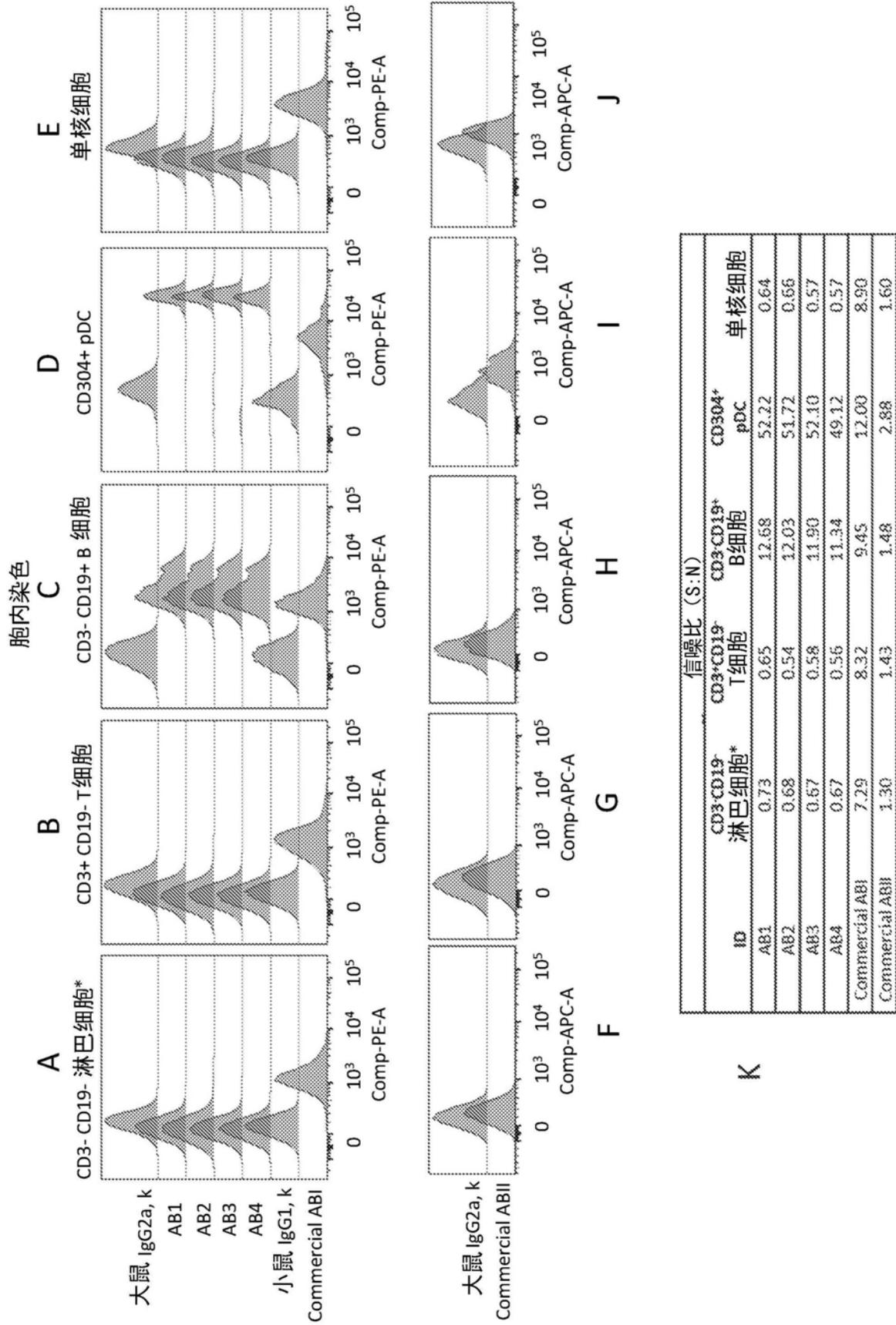


图6

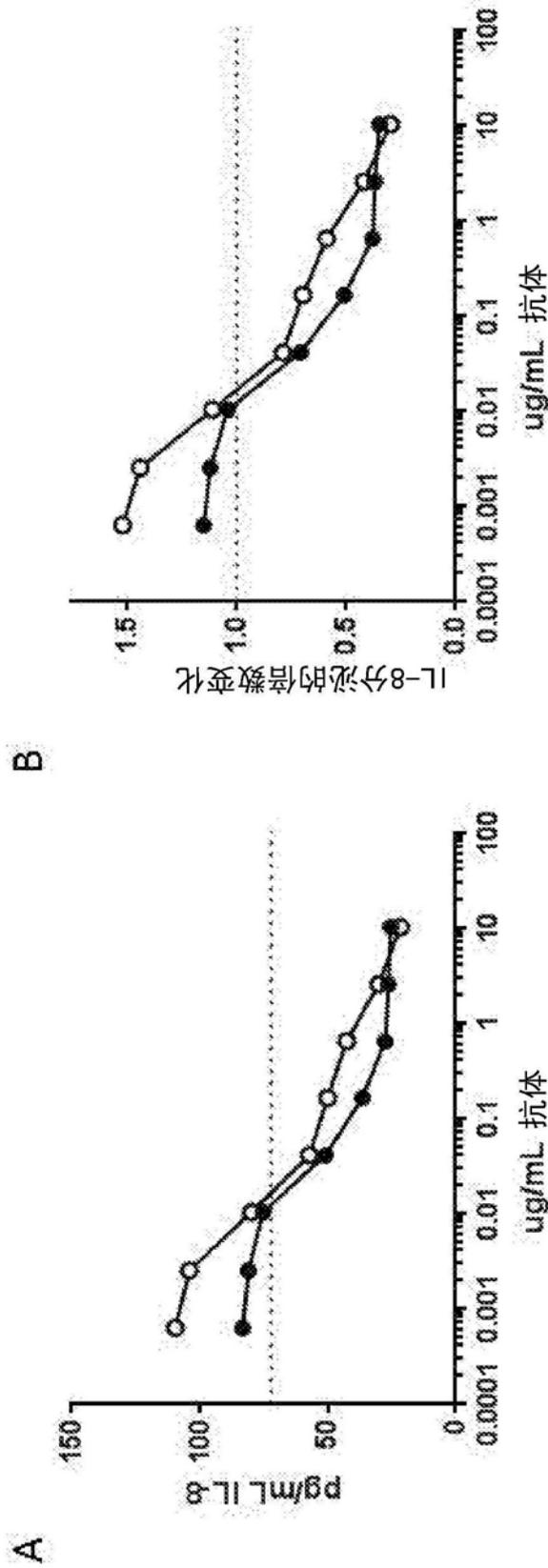


图7

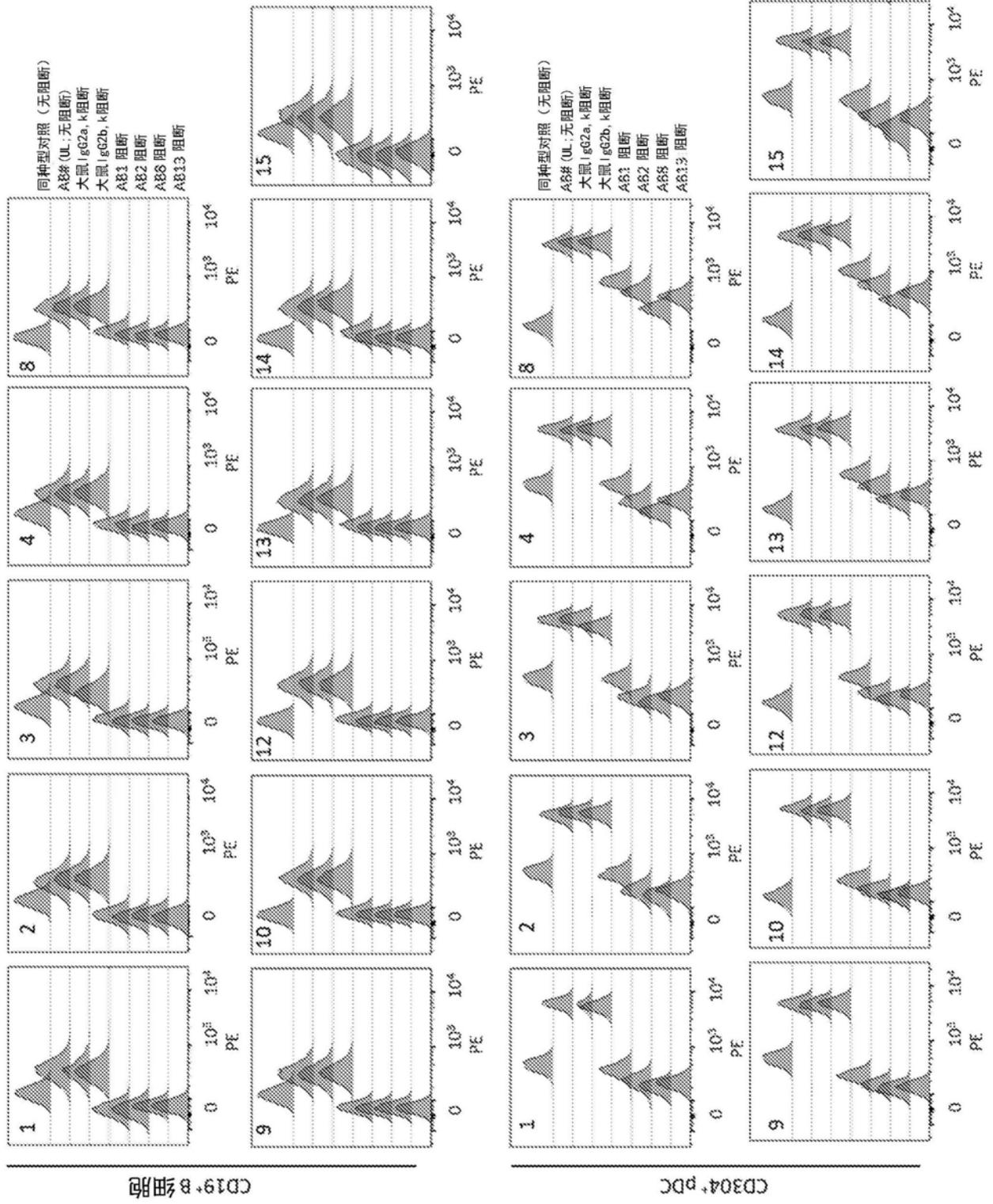


图8