

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290436 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.02

(51) Int. Cl. A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.30

(54) АНТИТЕЛА К MS4A4A И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/881,187; 62/892,467; 62/947,449;
62/960,606; 63/057,142

(32) 2019.07.31; 2019.08.27; 2019.12.12;
2020.01.13; 2020.07.27

(33) US

(86) PCT/US2020/044335

(87) WO 2021/022083 2021.02.04

(88) 2021.03.11

(71) Заявитель:
АЛЕКТОР ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:

Сун Джеонгхоон, Хо Вей-Хсиен,
Алхавагри Мухаммад А., Конг
Филип Линг, Рхинн Херве, Лонг
Хуа, Сринивасан Карпагам, Митра
Ананья, Бермингем Дэниэл П., Хегер
Клаус-Дитер, Салазар Сантьяго
Виверос, Сигнарелла Франческа,
Тасси Илариа, Швабе Тина, Йи
Энджи Грейс, Розенталь Арнон (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)

(57) Изобретение в целом относится к композициям, которые включают антитела, например моноклональные антитела, гуманизированные антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с полипептидом MS4A4A, например MS4A4A млекопитающего или MS4A4A человека, и применению таких композиций для предотвращения, снижения риска развития заболевания или лечения нуждающегося в этом индивидуума.

A1

202290436

202290436

A1

АНТИТЕЛА К MS4A4А И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0001] Содержание поданного в текстовом файле ASCII полностью включено в данный документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 4503_008PC06_Seqlisting_ST25.TXT; дата создания: 28 июля 2020 г.; размер: 289,448 байт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Данное изобретение относится к антителам к MS4A4А и терапевтическому применению таких антител.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Кластер генов подсемейства А белков, имеющих 4 трансмембранных домена, (MS4A) присутствует на хромосоме 11q12 и включает восемнадцать генов. Семейство генов MS4A кодирует мембранные белки, обычно имеющие топологию белка с четырьмя трансмембранными доменами (Ishibashi *et al*, 2001, Gene, 265:87-93; Liang and Tedder, 2001, Genomics, 72:119-127; Efthymiou and Goate, 2017, Molecular Neurodegeneration, 12:43). Трансмембранные домены связаны между собой одной внутриклеточной петлей и двумя внеклеточными петлями, при этом как N-, так и C-концы находятся в цитозоле. Большинство белков MS4A имеют гомологию аминокислотной последовательности с последовательностью MS4A1 (CD20) (20-30% сходства), при этом наибольшая степень идентичности последовательности наблюдается в первых трех трансмембранных доменах. Высококонсервативные мотивы в этих трансмембранных областях различных белков MS4A позволяют предположить, что трансмембранные домены играют важную общую роль в функционировании белка MS4A. Области наибольшей вариации между белками MS4A встречаются в пределах их N- и C-концевых цитоплазматических доменов и предполагаемой второй внеклеточной петли (Ishibashi *et al*, 2001, Gene, 265:87-93), что позволяет предположить, что эти области придают уникальные функциональные свойства.

[0004] Несмотря на это разнообразие, домены MS4A обладают некоторыми общими элементами. Например, одной примечательной особенностью, консервативной в белках MS4A (за исключением MS4A8B и MS4A12), является консервация двух остатков цистеина в предполагаемой второй внеклеточной петле, которая может образовывать дисульфидный мостик. N- и C-концевые домены белков MS4A также богаты остатками пролина, хотя функциональное значение этого еще предстоит выяснить (Hulett *et al*, 2001, Genomics, 72:119-127). Однако богатые пролином области, как правило, участвуют в различных клеточных процессах, таких как перестройка цитоскелета, инициация транскрипции, сигнальные каскады и ассоциация с доменами SH3 в качестве части адаптерной системы для облегчения межбелковых взаимодействий (Kay *et al*, 2000, FASEB J, 14:231-241).

[0005] Семейство белков MS4A относительно не охарактеризовано функционально, за некоторыми важными исключениями: MS4A1 (CD20) экспрессируется исключительно в В-лимфоцитах, где этот белок участвует в сигналинге антигенным рецептором В-клеток и притоке кальция. CD20 является мишенью иммунотерапевтических антител, используемых для истощения патогенных В-клеток при хроническом лимфоцитарном лейкозе, лимфомах, аутоиммунных заболеваниях и при трансплантации паренхиматозных органов. MS4A2 (FcεRβ) представляет собой сигнальную субъединицу высокоаффинного рецептора IgE (FcεRI) и низкоаффинного рецептора IgG (FcεRIII) на тучных клетках, играющую ключевую роль в гиперчувствительности и аллергических реакциях. MS4A2 представляет собой белок с доменом ITAM,

который усиливает сигналы через 4-белковый высокоаффинный комплекс рецептора IgE. MS4A3 (Htm4) экспрессируется на внутриклеточных мембранах лимфоидных и миелоидных клеток и функционирует как адапторный белок в регуляции клеточного цикла.

[0006] В то время как большинство членов семейства MS4A не охарактеризованы, в опубликованной литературе имеются предположения, что белки MS4A действуют как хемосенсоры и хеморецепторы для различных экзогенных и эндогенных лигандов, включая жирные кислоты, пептиды и сульфатированные стероиды, и участвуют в опосредовании притока кальция, регуляции эндоцитоза, миграции и могут действовать как адаптеры для комплексов сигнальной трансдукции (Cruse *et al*, 2015, Mol Biol Cell, 26:1711-1727; Greer *et al*, 2016, Cell, 165:1734-1748; Eon Kuek *et al*, 2016, Cell, 165:1734-1748; Koslowski *et al*, 2008, Cancer Res, 68:3458-3466; Bubien *et al*, 1993; J Cell Biol, 121:1121-1132).

[0007] Определенные гены MS4A генетически связаны с различными нарушениями и заболеваниями, в частности с нейродегенеративными расстройствами. Например, полногеномный анализ значимости ассоциации определил кластер генов MS4A, расположенный на хромосоме 11q12, как один из наиболее значимых локусов, связанных с болезнью Альцгеймера. Выявлен один представляющий особый интерес ген – MS4A4A. (Lambert *et al*, 2013, Nat Genet, 45:1452-1458; Hollingworth *et al*, 2011, Nat Genet, 43:429-435; Naj *et al*, 2011, Nat Genet, 43:436-441).

[0008] Соответственно, существует потребность в терапии, нацеленной на MS4A4A, включая антитела, которые специфически связываются с MS4A4A, и/или терапии, которые способны модулировать (например, ингибировать или снижать, активировать или усиливать) активность MS4A4A, например, снижая или увеличивая уровни или активность белка MS4A4A для лечения различных заболеваний, нарушений и патологических состояний, ассоциированных с активностью MS4A4A.

[0009] Все ссылки, приведенные в данном документе, включая заявки на патенты и публикации, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Настоящее изобретение в целом относится к антителам к MS4A4A и способам применения таких антител. Представленные в данном документе способы находят применение для профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего нейродегенеративное заболевание, нарушение или патологическое состояние. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего нейродегенеративное заболевание, нарушение или патологическое состояние, выбранное из болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом, деменции и когнитивных нарушений, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, нарушение или патологическое состояние, ассоциированное с повышенной экспрессией или активностью MS4A4A, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A.

[0011] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с белком MS4A4A, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:94, 108, 116, 146, 147, 308, и 311; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122,

149, 150, 151, 152, 153, 309, и 312; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, и 313; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314, и 317; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 159, 160, 161, 315, и 318; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:107, 115, 144, 145, 163, 316, и 319.

[0012] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:94; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:96-99; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:100-102; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:103-104; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:105-106; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:107.

[0013] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:308; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:309; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:310; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:314; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:315; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:316.

[0014] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:312; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:313; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:317; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:318; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:319.

[0015] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:108; HVR-

H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:110-111; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.

[0016] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:116; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:118-122; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:123-129; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:130-138; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:139-143; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 144-145.

[0017] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:146-147; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:149-153; и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:154; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:156-158; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:159-161; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:163.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5-15, 304 и 306. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:24-30. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:40-53. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A,

тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76-84, и переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 86-93.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 320-343. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 336-343 (необязательно, при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, дополнительно, необязательно, при этом легкая цепь дополнительно содержит константную область, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 320-327 (необязательно, при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 304, дополнительно, необязательно, при этом легкая цепь дополнительно содержит константную область, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344). В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 328-335 (необязательно, при этом легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, дополнительно, необязательно, при этом легкая цепь дополнительно содержит константную область, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344).

[0022] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94, HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96, и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102; и переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104, HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105, и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, а переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 359 или 360, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:365.

[0023] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов

осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:308, HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:309, и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:310; и переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:314, HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:315, и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:316. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304, а переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324 или 325, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:363.

[0024] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311, HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:312, и HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:313; и переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:317, HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:318, и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:319. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:306, а переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:307. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 332 или 333, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:364.

[0025] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело конкурентно ингибирует связывание MS4A4A с одним или более антителами по любому из вариантов осуществления настоящего документа.

[0026] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело связывается по существу с тем же или перекрывающимся эпитопом на MS4A4A, что и антитело по любому из вариантов осуществления в данном документе.

[0027] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело связывается с внеклеточным доменом 1 MS4A4A человека. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками в аминокислотной последовательности CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:177) SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело связывается с внеклеточным доменом 2 MS4A4A человека. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками в аминокислотной последовательности SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, при этом антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками в аминокислотной последовательности SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) SEQ ID NO:1, и, кроме того, антитело не связывается с аминокислотным остатком пролина 163 (P163) SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A представляет собой человеческое антитело к MS4A4A или гуманизированное антитело к MS4A4A.

[0028] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело снижает уровни MS4A4A на клеточной поверхности или снижает внутриклеточные уровни MS4A4A.

[0029] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, белок MS4A4A представляет собой белок млекопитающего или белок человека. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, белок MS4A4A представляет собой белок дикого типа. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, белок MS4A4A представляет собой встречающийся в природе вариант.

[0030] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2, повышает уровни мембранного TREM2 или повышает растворимый TREM2 и повышает уровни мембранного TREM2 в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2. В некоторых вариантах

осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мембранного TREM2. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 и уровни мембранного TREM2. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 в спинномозговой жидкости (СМЖ) *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 в сыворотке и в спинномозговой жидкости *in vivo*.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает экспрессию маркеров поверхности M2 клеток (например, рецепторов) на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению уменьшает или снижает уровни маркеров поверхности M2 клеток в миелоидной клетке, например, макрофаге.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает экспрессию CD200R, дектина-1 или CD163 на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает или уменьшает уровни CD200R, дектина-1 и/или CD163 на клеточной поверхности в миелоидных клетках, например, макрофагах.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает экспрессию мРНК и/или белка гельзолина и/или остеопонтина на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления настоящего изобретения, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка IL1RN на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления настоящего изобретения, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка CSF1R на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает уровни мРНК и/или белка пуринаергического рецептора P2RY12 и/или рецептора 1 CX3C-хемокина (CX3CR1) на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка 1-фосфотидилинозитол-4,5-бисфосфатфосфодиэстеразы гамма-2 (PLCG2), члена А семейства 7 лектиновых доменов С-типа (CLEC7A), рецептора 2 инозитол-1,4,5-трифосфата (ITPR2) и/или антиген KI-67 (MK167) на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления

в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает уровни мРНК и/или белка трансмембранного гликопротеина NMB (GPNMB) на миелоидных клетках.

[0034] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело увеличивает экспрессию мРНК и/или белка гелъолина и/или остеопонтина на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, миелоидные клетки представляют собой макрофаги человека. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, поливалентное антитело, конъюгированное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из 4A-18, 4A-25, 4A-214, 4A-21 и 4A-202. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, снижает экспрессию маркеров M2 на миелоидных клетках. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, миелоидные клетки представляют собой макрофаги человека. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, маркеры M2 представляют собой CD200R, дектин-1 и/или CD163. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, увеличивает TREM2 плазматической мембраны или клеточной поверхности на макрофагах человека по меньшей мере на 50%, 90%, 100%, 150%, 200% или 250%. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, увеличивает растворимый TREM2 в супернатанте макрофагов человека по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, или 70%.

[0035] В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, первый антиген представляет собой MS4A4A, а второй антиген представляет собой антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, второй антиген выбран из MS4A4A, рецептора трансферрина (TR), рецептора инсулина (HIR), рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, связанных с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептора дифтерийного токсина, CRM197, однодоменного антитела ламы, TMEM 30(A), домена трансдукции белка, TAT, Syn-B, пенетратина, полиаргининового пептида, пептида Ангиопеп, базигина, Glut1, CD98hc и ANG1005.

[0036] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым

из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой поливалентное антитело. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой химерное антитело.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A по настоящему изобретению относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2 или IgG4. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело представляет собой фрагмент антитела, который связывается с эпитопом, включающим аминокислотные остатки на белке MS4A4A человека или MS4A4A млекопитающего. В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, первый антиген представляет собой MS4A4A, а второй антиген представляет собой:

- (a) антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер;
- (b) антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер, выбранный из рецептора трансферрина (TR), рецептора инсулина (HIR), рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, связанных с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептора дифтерийного токсина, CRM197, однодоменного антитела ламы, TMEM 30(A), домена трансдукции белка, TAT, Syn-B, пенетратина, полиаргининового пептида, ангиопептида и ANG1005;
- (c) вызывающий заболевание агент, выбранный из вызывающих заболевание пептидов или белков или вызывающих заболевание нуклеиновых кислот, причем вызывающие заболевание нуклеиновые кислоты представляют собой антисмысловую РНК с экспансией GGCCC-повтора (G2C4), белки, вызывающие заболевание, выбраны из бета-амилоида, олигомерного бета-амилоида, бета-амилоидных бляшек, белка-предшественника амилоида или его фрагментов, тау-белка, IAPP, альфа-синуклена, TDP-43, белка FUS, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), белка с9RAN, прионного белка, PrPSc, гентингина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, амилоида А сыворотки, медины, пролактина, транстиретины, лизоцима, бета 2 микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, связанных с повторами продуктов трансляции, не относящиеся к ATG (RAN), пептидов с дипептидными повторами (DPR), пептидов с повторами глицин-аланин (GA), пептидов с повторами глицин-пролин (GP),

пептидов с повторами глицин-аргинин (GR), пептидов с повторами пролин-аланин (PA), убиквитина и пептидов с повторами пролин-аргинин (PR);

(d) лиганды и/или белки, экспрессируемые на иммунных клетках, при этом лиганды и/или белки выбраны из CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3 и фосфатидилсерина; или

(e) белок, липид, полисахарид или гликолипид, экспрессируемые на одной или более опухолевых клетках.

[0039] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, включающей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по любому из предыдущих вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к вектору, включающему нуклеиновую кислоту по любому из предыдущих вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной клетке-хозяину, включающей вектор по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[0040] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения антитела, которое связывается с антителом к MS4A4A человека, включая культивирование клетки-хозяина в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления с получением антитела к MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение антитела к MS4A4A, продуцируемого клеткой.

[0041] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело по любому из предыдущих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[0042] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом и когнитивного нарушения, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из предшествующих вариантов осуществления. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство, патологическое состояние или повреждение, вызванное или ассоциированное с чрезмерной экспрессией или повышенной активностью MS4A4A, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает определение уровней остеооптина, гелзолина, TREM2 плазматической мембраны или клеточной поверхности и/или растворимого TREM2 до и/или после введения антитела.

[0043] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего обусловленное дефицитом CSF1R заболевание или расстройство, причем указанный способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из предыдущих вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления обусловленное дефицитом CSF1R заболевание или расстройство представляет собой лейкоэнцефалопатию взрослых с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP) или наследственную диффузную лейкоэнцефалопатию (HDLs).

[0044] Другие аспекты данного изобретения относятся к выделенному антителу к MS4A4A, полученному способом по любому из предшествующих вариантов осуществления. Другие аспекты данного изобретения относятся к фармацевтической композиции, содержащей антитело к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[0045] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком

MS4A4A, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2, и HVR-H3 антитела 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419, или 4A-450 (как показано в **таблице 1, таблице 5, таблице 30, и таблице 31**).

[0046] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 антитела 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419, или 4A-450 (как показано в **таблице 1, таблице 5, таблице 30, и таблице 31**).

[0047] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 антитела 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419, или 4A-450 (как показано в **таблице 1, таблице 5, таблице 30, и таблице 31**).

[0048] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, или 4A-331 (как показано в **таблице 2 и таблице 6**).

[0049] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело включает переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, или 4A-331 (как показано в **таблице 2 и таблице 6**).

[0050] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, или 4A-331 (как показано в **таблице 2 и таблице 6**).

[0051] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2, и HVR-H3 из антитела 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, или 4A-381 (как показано в **таблице 3 и таблице 7**).

[0052] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 из антитела 4A-332,

4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, или 4A-381 (как показано в **таблице 3** и **таблице 7**).

[0053] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 из антитела 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, или 4A-381 (как показано в **таблице 3** и **таблице 7**).

[0054] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2, и HVR-H3 антитела 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, или 4A-390 (как показано в **таблице 4** и **таблице 8**).

[0055] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем указанное антитело включает вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2, и HVR-L3 антитела 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, или 4A-390 (как показано в **таблице 4** и **таблице 8**).

[0056] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и вариабельную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389 или 4A-390 (как показано в **таблице 4** и **таблице 8**).

[0057] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело увеличивает экспрессию мРНК и/или белка гелъолина и/или остеопонтина на миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой макрофаги.

[0058] В определенных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из вариантов осуществления в данном документе, антитело к MS4A4A специфически связывается с MS4A4A человека, MS4A4A мыши, MS4A4A яванского макака или их комбинацией.

[0059] Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть объединены для формирования других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления изобретения дополнительно описаны в подробном описании, которое следует ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0060] Патент или файл заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии данного патента или патентной заявки с цветными графическими материалами будут предоставлены Ведомством по запросу и при уплате необходимой пошлины.

[0061] На Фиг. 1 показана первичная аминокислотная последовательность MS4A4A человека. Внутриклеточные домены выделены курсивом, трансмембранные домены подчеркнуты, внеклеточные петли выделены жирным курсивом.

[0062] На Фиг. 2А показана схема структуры растворимого каркаса четырехспирального пучка (PDB_ID:1P68), полученного из банка данных белковых структур RCSB, имеющего четыре трансмембранных домена, показанных в виде спиральных лент в структуре. На Фиг. 2В и Фиг. 2С показана первичная аминокислотная последовательность растворимого каркаса четырехспирального пучка PDB-ID:1P68 и PDB_ID: 1M6T соответственно; четыре трансмембранных домена подчеркнуты в аминокислотных последовательностях.

[0063] На Фиг. 3А показаны первичные аминокислотные последовательности растворимых каркасов четырехспирального пучка JS1, JS5 и JS6, в которые были добавлены две внеклеточные петли MS4A4A человека (показаны жирным подчеркиванием). На Фиг. 3В показаны первичные аминокислотные последовательности растворимых каркасов четырехспирального пучка JS4 и JS10, используемых в качестве вариантов отрицательного контроля.

[0064] На Фиг. 4 показаны некоторые антитела к MS4A4A по настоящему изобретению, связывающиеся с растворимыми полипептидами с привитыми петлями JS1, JS4, JS5, JS6 и JS10 рекомбинантного MS4A4A с помощью ИФА.

[0065] На Фиг. 5 показаны некоторые варианты гуманизированного антитела к MS4A4A для мышинного антитела к MS4A4A 4A-21, которые связываются с растворимым полипептидом с привитыми петлями JS1 рекомбинантного MS4A4A.

[0066] На Фиг. 6 показаны некоторые варианты гуманизированного антитела к MS4A4A для мышинного антитела к MS4A4A 4A-202, которые связываются с растворимым полипептидом с привитыми петлями JS1 рекомбинантного MS4A4A.

[0067] На Фиг. 7 показаны некоторые варианты гуманизированного антитела к MS4A4A с созревшей аффинностью для мышинного антитела к MS4A4A 4A-202, связывающегося с растворимым полипептидом с привитыми петлями JS5 рекомбинантного MS4A4A.

[0068] На Фиг. 8 показаны некоторые варианты гуманизированного антитела к MS4A4A с созревшей аффинностью для мышинного антитела к MS4A4A 4A-21, которые связываются с растворимым полипептидом с привитыми петлями JS5 рекомбинантного MS4A4A.

[0069] На Фиг. 9 показаны некоторые варианты гуманизированного антитела к MS4A4A с созревшей аффинностью для мышинного антитела к MS4A4A 4A-21, которые связываются с растворимым полипептидом с привитыми петлями JS5 рекомбинантного MS4A4A.

[0070] На Фиг. 10А-10В показано влияние антитела к MS4A4A 4A-202 на уровни sTREM2 в сыворотке яванских макаков. На Фиг. 10А представлены уровни (нг/мл) sTREM2 в сыворотке яванских макаков в указанные моменты времени (часы) после введения антитела к MS4A4A 4A-202 или антитела изотипического контроля (huIgG1), оба в дозе 80 мг/кг. На Фиг. 10В представлены уровни sTREM2 (в процентах от исходного уровня) в сыворотке крови яванских обезьян в указанное время (часы) после введения антитела к MS4A4A 4A-202 или антитела изотипического контроля (huIgG1), оба в дозе 80 мг/кг.

[0071] **На Фиг. 11А-11В** показано влияние антитела к MS4A4A 4А-202 на уровни sTREM2 в спинномозговой жидкости (СМЖ) яванских макаков. **На Фиг. 11А** представлены уровни (нг/мл) sTREM2 в спинномозговой жидкости яванских макаков в указанные моменты времени (часы) после введения антитела к MS4A4A 4А-202 или изотипического контрольного антитела (huIgG1), оба в дозе 80 мг/кг. **На Фиг. 11В** представлены уровни sTREM2 (в процентах от исходного уровня) в спинномозговой жидкости яванских макаков в указанные моменты времени (часы) после введения антитела к MS4A4A 4А-202 или изотипического контрольного антитела (huIgG1), оба в дозе 80 мг/кг.

[0072] **На Фиг. 12** представлены данные, демонстрирующие кривые связывания антитела к MS4A4A huIgG1 дикого типа (WT) 4А-313 и 4А-450 WT huIgG1 с клетками U937, экспрессирующими рекомбинантный MS4A4A человека.

[0073] **На Фиг. 13** представлены данные, демонстрирующие уровни мембранного TREM2 в первичных макрофагах человека, обработанных антителами к MS4A4A 4А-450 WT huIgG1, 4А-450 NSLF huIgG1 и 4А-450 K322A huIgG1.

[0074] **На Фиг. 14** представлены данные, демонстрирующие уровни мембранного TREM2 в первичных макрофагах человека, обработанных антителами к MS4A4A 4А-313 WT huIgG1, 4А-313 NSLF huIgG1 и 4А-313 K322A huIgG1.

[0075] **На Фиг. 15** представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни растворимого TREM2 в супернатанте первичных макрофагов человека, обработанных антителом к MS4A4A huIgG1 4А-450.

[0076] **На Фиг. 16** представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни растворимого TREM2 в супернатанте первичных макрофагов человека, обработанных антителом к MS4A4A huIgG1 4А-313.

[0077] **На Фиг. 17** представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни АТФ в первичных макрофагах человека, обработанных антителами к MS4A4A 4S-313 NSLF huIgG1, 4А-313 PS huIgG1, 4А-450.NSLF huIgG1 и 4А-450.PS hu IgG1.

[0078] **На Фиг. 18А, 18В и 18С** представлены данные, демонстрирующие изменения уровней CD14, CD163 и CD200R (соответственно) в первичных макрофагах человека, обработанных антителами к MS4A4A 4А-313 NSLF huIgG1 и 4А-419 WT huIgG1.

[0079] **На Фиг. 19** представлены данные, демонстрирующие комплементзависимую цитотоксическую (CDC) активность антител к MS4A4A 4А-313 NSLF huIgG1, 4А-313 K322A huIgG1 и 4А-313 WT huIgG1 в клетках U937, экспрессирующих рекомбинантный человеческий MS4A4A, как измерено по поглощению пропидий йодида.

[0080] **На Фиг. 20** представлены данные, демонстрирующие активность ADCP антител к MS4A4A 4А-313 NSLF huIgG1, 4А-313 K322A huIgG1 и 4А-313 WT huIgG1 в первичных макрофагах человека, измеренную по активации FcγRIIIa.

[0081] **На Фиг. 21** представлены данные, демонстрирующие активность ADCC антител к MS4A4A 4А-313 NSLF huIgG1, 4А-313 K322A huIgG1 и 4А-313 WT huIgG1 в первичных макрофагах человека, измеренную по активации FcγRIIIa.

[0082] **На Фиг. 22А и 22В** представлены данные, демонстрирующие влияние нокаута MS4A4A на мембранный TREM2 (Фиг. 22А) и растворимый TREM2 (Фиг. 22В) в первичных макрофагах человека.

[0083] **На Фиг. 23А, 23В и 23С** представлены данные, демонстрирующие кинетику изменений уровней растворимого белка TREM2, уровней мембранного белка TREM2 и уровней мРНК TREM2, соответственно, в макрофагах человека, обработанных антителами к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0084] **На Фиг. 24А и 24В** представлены данные, демонстрирующие, что кнРНК-нокаун MS4A4A

повышает уровни мембранного TREM2 и растворимого TREM2 в макрофагах человека.

[0085] На Фиг. 25A, 25B и 25C представлены данные, демонстрирующие дозозависимое увеличение уровней мембранного TREM2 в первичных макрофагах человека от трех разных доноров после добавления антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0086] На Фиг. 26A, 26B и 26C представлены данные, демонстрирующие дозозависимое увеличение уровней растворимого TREM2 в первичных макрофагах человека от трех разных доноров после добавления антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0087] На Фиг. 27A, 27B и 27C представлены данные, демонстрирующие дозозависимое увеличение уровней АТФ в первичных макрофагах человека от трех разных доноров после добавления антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0088] На Фиг. 28A и 28B представлены данные, свидетельствующие о том, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в предотвращении гибели клеток, вызванной ингибированием CSF1R.

[0089] На Фиг. 29 показана вулканная диаграмма эффектов на весь протеом в спинномозговой жидкости яванского макака после введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0090] На Фиг. 30 представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни sTREM2 в сыворотке яванского макака после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0091] На Фиг. 31A, 31B, 31C и 31D представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни остеопонтина в СМЖ яванского макака после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0092] На Фиг. 32A и 32B представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни остеопонтина в лобной коре и гиппокампе, соответственно, в мозге яванского макака после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0093] На Фиг. 33A и 33B представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни CSF1R в лобной коре и гиппокампе, соответственно, в мозге яванского макака после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0094] На Фиг. 34A и 34B представлены данные, демонстрирующие повышенные уровни общего белка TREM2 в лобной коре и гиппокампе, соответственно, в головном мозге яванского макака после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0095] На Фиг. 35A, 35B и 35C представлены данные, демонстрирующие изменения уровней мРНК в маркерах активации, миграции и пролиферации микроглии, выделенной из мозга яванских макаков, которым вводили антитела к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0096] На Фиг. 36 представлены данные, демонстрирующие, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению снижают экспрессию на клеточной поверхности меченого HA-Snorkel белка MS4A4A, рекомбинантно экспрессируемого в клетках U937.

[0097] На Фиг. 37 представлены данные, демонстрирующие, что антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает экспрессию GPNMB на клеточной поверхности в первичных макрофагах человека.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0098] Настоящее изобретение относится к антителам к MS4A4A (например, моноклональным антителам); способам получения и применению таких антител; фармацевтических композиций, содержащих такие антитела; нуклеиновых кислот, кодирующих такие антитела; и клеток-хозяевам, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антитела.

[0099] Способы и процедуры, описанные или на которые в настоящем документе делается ссылка, как

правило, хорошо поняты и обычно используются с использованием обычной методики специалистами в данной области техники, например, широко используемые методологии, такие как те, что описаны в Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., (2003); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000).

I. Определения

[0100] Термины «MS4A4A» или «полипептид MS4A4A» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому нативному MS4A4A из любого источника, относящегося к позвоночным, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди и яванские макаки) и грызуны (например, мыши и крысы), если не указано иное. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает как последовательности дикого типа, так и последовательности встречающихся в природе вариантов, например, сплайсированные варианты или аллельные варианты. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает «полноразмерный» непротессированный MS4A4A, а также любую форму MS4A4A, возникающую в результате процессинга в клетке. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A представляет собой MS4A4A человека. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность иллюстративного MS4A4A имеет номер доступа в базе данных Uniprot Q96JQ5 от 1 декабря 2001 г. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность иллюстративного MS4A4A человека представляет собой SEQ ID NO: 1.

[0101] Термины «антитело к MS4A4A», «антитело, которое связывается с MS4A4A» и «антитело, которое специфически связывает MS4A4A» относятся к антителу, которое способно связывать MS4A4A с достаточной аффинностью, так что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на MS4A4A. В одном варианте осуществления степень связывания антитела к MS4A4A с неродственным полипептидом, не являющимся MS4A4A, составляет менее около 10% связывания антитела с MS4A4A, как измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В определенных вариантах осуществления антитело, которое связывается с MS4A4A, имеет константу диссоциации (KD) < 1 мкМ, < 100 нМ, < 10 нМ, < 1 нМ, < 0,1 нМ, < 0,01 нМ, или < 0,001 нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В определенных вариантах осуществления антитело к MS4A4A связывается с эпитопом MS4A4A, который является консервативным среди MS4A4A от разных видов.

[0102] Применительно к связыванию антитела с молекулой-мишенью, термин «специфическое связывание» или «специфически связываться с» или является «специфическим к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретной полипептидной мишени означает связывание, которое измеряемо отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть измерено, например, при помощи определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы. Например, специфическое связывание может определяться конкуренцией с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью, к примеру, при избытке немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание демонстрирует может ли связывание меченой мишени с зондом полностью ингибироваться избытком немеченой мишени. Термин «специфическое связывание» или «специфически связывается с» или «специфичен для» конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени, используемый в данном документе, может проявляться, например, молекулой, имеющей KD для мишени примерно любой из 10^{-4} М или ниже, 10^{-5} М или ниже, 10^{-6} М или ниже, 10^{-7} М или ниже, 10^{-8} М или ниже, 10^{-9} М или ниже, 10^{-10} М или ниже, 10^{-11} М или ниже, 10^{-12} М или ниже, или KD в диапазоне от 10^{-4} М до 10^{-6} М или от 10^{-6} М до 10^{-10} М или от 10^{-7} М до 10^{-9} М. Как будет понятно специалисту в данной области техники,

значения аффинности и KD связаны обратной зависимостью. Высокая аффинность для антигена измеряется низким значением KD. В одном варианте осуществления термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде без значительного связывания с любым другим полипептидом или полипептидным эпитопом.

[0103] Термин «*иммуноглобулин*» (Ig) используется в данном документе взаимозаменяемо с термином «*антитело*». Термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), включая образованные по меньшей мере из двух интактных антител и фрагменты антител, если они проявляют желаемую биологическую активность.

[0104] «*Нативные антитела*» обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины около 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьирует среди тяжелых цепей различных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет переменный домен на одном конце (V_L) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а переменный домен легкой цепи выровнен с переменным доменом тяжелой цепи. Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют область контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

[0105] Для получения информации о структуре и свойствах различных классов антител, см, например, Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Sittes, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, страница 71 и глава 6.

[0106] Легкая цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко отличимых типов, называемых каппа («κ») и лямбда («λ»), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины могут быть определены в разные классы или изотипы. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены альфа («α»), дельта («δ»), эпсилон («ε»), гамма («γ») и мю («μ»), соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы (изотипы) на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции CH, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в целом описаны, например, в Abbas *et al.*, Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

[0107] «*Переменная область*» или «*переменный домен*» антитела, такого как антитело к MS4A4A по данному изобретению, относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи можно обозначать как « V_H » и « V_L », соответственно. Эти домены обычно являются наиболее переменными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат сайты связывания антигена.

[0108] Термин «*переменный*» относится к тому факту, что определенные сегменты переменных доменов сильно различаются по последовательности среди антител, таких как антитела к MS4A4A по данному изобретению. Переменный домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако переменность не распределяется равномерно по

всему диапазону переменных доменов. Напротив, она сосредоточена в трех сегментах переменных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гиперпеременными (HVR) областями. Более высококонсервативные части переменных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелых и легких цепей состоит из четырех областей FR, в значительной степени принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя HVR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть структуры бета-слоев. HVR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью областей FR и вместе с HVR из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности.

[0109] Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, такому как моноклональное антитело к MS4A4A по настоящему изобретению, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования и т.д.), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного антигенного сайта. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к своей специфичности, моноклональные антитела выгодны тем, что они синтезируются гибридной культурой, поэтому не загрязнены другими иммуноглобулинами. Модификатор «моноклональный» указывает на характер антитела, получаемого из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методиками, включая, например, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК и технологии получения человеческих или человекоподобных антител у животных, которые имеют части или все локусы или гены иммуноглобулина человека, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека.

[0110] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, такого как антитело к MS4A4A по данному изобретению, в его по существу интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полные антитела включают антитела с тяжелой и легкой цепями, включая область Fc. Константные домены могут быть константными доменами нативной последовательности (например, константными доменами нативной последовательности человека) или вариантами их аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может выполнять одну или более эффекторных функций.

[0111] «Фрагмент антитела» относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и фрагменты Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США 5641870, пример 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0112] Расщепление папаином антител, таких как антитела к MS4A4A по данному изобретению, дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами «Fab», и остаточный фрагмент «Fc»,

имеющий название, отражающее способность легко кристаллизоваться. Фрагмент Fab состоит из целой легкой цепи вместе с доменом переменной области тяжелой цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый фрагмент Fab является моновалентным по отношению к связыванию антигена, то есть он имеет единственный антигенсвязывающий сайт. Расщепление антитела пепсином приводит к образованию одного большого фрагмента $F(ab')_2$, который примерно соответствует двум дисульфидно связанным фрагментам Fab, имеющим разную антигенсвязывающую активность и все еще способным к перекрестному связыванию антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси-конце домена C_{H1} , включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH является обозначением для Fab'-фрагмента, в котором цистеиновые остатки константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты $F(ab')_2$ антитела первоначально получали в виде пар фрагментов Fab, которые имеют шарнирные цистеины между ними. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела.

[0113] Фрагмент Fc содержит C-концевые части обеих тяжелых цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в области Fc, области, которая также распознается Fc-рецепторами (FcR), обнаруженными на определенных типах клеток.

[0114] «Функциональные фрагменты» антител, таких как антитела к MS4A4A по данному изобретению, содержат часть интактного антитела, обычно содержащую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела или область Fc антитела, которая сохраняет или модифицировал способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0115] Термин «диатела» относится к небольшим фрагментам антител, полученным путем конструирования фрагментов sFv (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (около 5-10 остатков) между доменами V_H и V_L , так что достигаются межцепочечное, но не внутрицепочечное спаривание переменных доменов, в результате чего получается двухвалентный фрагмент, то есть фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих сайта. Биспецифические диатела представляют собой гетеродимеры двух «поперечно сшитых» фрагментов sFv, в которых домены V_H и V_L двух антител присутствуют на разных полипептидных цепях.

[0116] Используемый в данном документе термин «химерное антитело» относится к антителу (иммуноглобулину), такому как антитело к MS4A4A по настоящему изобретению, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. Представляющие интерес химерные антитела включают антитела PRIMATIZED®, в которых антигенсвязывающая область антитела происходит из антитела, продуцируемого, например, иммунизацией макака представляющим интерес антигеном. В контексте данного документа термин «гуманизированное антитело» означает подгруппу «химерных антител».

[0117] «Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышиных) антител, такие как гуманизированные формы антител к MS4A4A по настоящему изобретению, представляют собой химерные антитела, содержащие аминокислотные остатки из нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки из человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все HVR

(например, CDR) соответствуют таковым из нечеловеческого антитела, и все или практически каждом FR соответствуют антителам человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере часть константной области антитела, полученной из антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

[0118] «Человеческое антитело» представляет собой антитело, такое как антитело к MS4A4A по настоящему изобретению, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или полученное с использованием любой из методик получения человеческих антител, описанных в данном документе. Из этого определения человеческого антитела явным образом исключено гуманизированное антитело, содержащее не принадлежащие человеку антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела можно получить с использованием различных методик, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея и библиотеки дрожжевого дисплея. Антитела человека могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы были инактивированы, например, у иммунизированных ксеномышей, а также полученные с помощью технологии человеческой В-клеточной гибридомы.

[0119] Термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV» в контексте данного документа относится к областям вариабельного домена антитела, таким как область антитела к MS4A4A по данному изобретению, которые являются гипервариабельными в последовательность и/или образуют структурно определенные петли. Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в V_H (H1, H2, H3) и три в V_L (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и, как полагают, в частности, H3 играет уникальную роль в придании антителам высокой специфичности. Встречающиеся в природе антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными без легкой цепи.

[0120] Применяют большое число вариантов разграничения HVR, которые включены в данный документ. В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat, в основе которых лежит вариабельность последовательностей и которые являются наиболее часто используемыми (Kabat *et al.*, выше). В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой CDR по Chothia. Chothia, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой HVR по AbM. HVR по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat, и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM. В некоторых вариантах осуществления HVR могут представлять собой HVR по «Contact». HVR по «Contact» определяют в анализе доступных кристаллических структур комплексов. Остатки из каждой из этих HVR приведены ниже.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация по Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация по Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0121] HVR могут включать «расширенные HVR» следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (предпочтительный вариант) (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки варибельного домена пронумерованы в соответствии с Kabat *et al.*, *выше*, для каждого из этих определений расширенного HVR.

[0122] «Каркасные» или «FR» остатки представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в данном документе.

[0123] «Акцепторная каркасная область человека», как используется в данном документе, представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области V_L или V_H, полученную из каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, «полученная из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, число ранее существовавших аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее. Если в VH присутствуют ранее существовавшие аминокислотные изменения, предпочтительно, эти изменения происходят только в трех, двух или одном из положений 71H, 73H и 78H; например, аминокислотные остатки в этих положениях могут быть 71A, 73T и/или 78A. В одном варианте осуществления последовательность акцепторной человеческой каркасной области V_L идентична последовательности каркасной области V_L иммуноглобулина человека или последовательности консенсусной каркасной области человека.

[0124] «Консенсусная каркасная область человека» представляет собой каркасную область, которая содержит наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе последовательностей каркасной области V_L или V_H иммуноглобулина человека. Как правило, каркасные последовательности V_L или V_H иммуноглобулина человека выбраны из подгруппы последовательностей варибельных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей является подгруппой, как в Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Примеры включают для V_L, подгруппа может быть подгруппой каппа I, каппа II, каппа III или каппа IV, как в Kabat *et al.*, *выше*. Кроме того, для V_H подгруппа может быть подгруппой I, подгруппой II или подгруппой III, как в Kabat *et al.*, *выше*.

[0125] «Аминокислотная модификация» в определенном положении, например, антитела к MS4A4A по данному изобретению, относится к замене или делеции указанного остатка или вставке по крайней мере одного аминокислотного остатка, примыкающего к указанному остатку. «Рядом» с указанным остатком означает вставку в пределах одного-двух его остатков. Вставка может быть N-концевой или C-концевой по отношению к указанному остатку. В контексте данного документа предпочтительной модификацией аминокислоты является замена.

[0126] Антитело с «созревшей аффинностью», такое как антитело к MS4A4A с созревшей аффинностью по настоящему изобретению, представляет собой антитело с одним или более изменениями в одной или более его HVR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не имеющим этих изменений(-я). В одном варианте осуществления антитело с созревшей аффинностью имеет наномолярную или даже пикомолярную аффинность к антигену-мишени. Антитела с созревшей аффинностью получают способами, известными в данной области техники. Например, в Marks *et al.* *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) описано созревание аффинности путем перестановки доменов V_H и V_L. Случайный мутагенез HVR

и/или каркасных остатков описан в, например, Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.* *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); и Hawkins *et al.* *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0127] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в плотной нековалентной ассоциации. При фолдинге этих двух доменов наружу выступают шесть гипервариабельных петель (по 3 петли на каждой H- и L-цепи), аминокислотные остатки которых участвуют в связывании антигена и придают антителу специфичность по отношению к связыванию антигена. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных по отношению к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и при более низкой аффинности, чем весь сайт связывания.

[0128] «Одноцепочечный Fv», также сокращенно обозначаемый как «sFv» или «scFv», представляет собой фрагменты антител, которые содержат домены антител V_H и V_L, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий sFv образовывать структуру, необходимую для связывания с антигеном.

[0129] «Эффекторные функции антитела» относятся к видам биологической активности, обусловленным областью Fc (нативной последовательностью области Fc или вариантом аминокислотной последовательности области Fc) антитела, и варьируются в зависимости от изотипа антитела.

[0130] Термин «область Fc» в контексте данного документа используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая области Fc с нативной последовательностью и варианты областей Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулинов могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют как участок от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его C-конца. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител, в которых удалены все остатки K447, популяции антител, в которых не удалены остатки K447, и популяции антител, содержащие смесь из антител с остатком K447 и без него. Подходящие области Fc с нативной последовательностью для применения в антителах по настоящему изобретению включают области из человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0131] «Область Fc с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. Нативная последовательность областей Fc человека включают нативную последовательность области Fc IgG1 человека (аллотипы не A и A); нативную последовательность области Fc IgG2 человека; нативную последовательность области Fc IgG3 человека; и нативную последовательность области Fc IgG4 человека, а также существующие в природе варианты указанных последовательностей.

[0132] «Вариант области Fc» включает аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности области Fc с нативной последовательностью в силу по меньшей мере одной модификации аминокислоты, предпочтительно одной или более аминокислотных замен. Предпочтительно вариант области Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью области Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в нативной

последовательности области Fc или в области Fc исходного полипептида. В данном документе вариант области Fc предпочтительно будут иметь по меньшей мере около 80 % гомологии с нативной последовательности области Fc и/или с областью Fc исходного полипептида, и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90 % гомологии с ними, наиболее предпочтительно, по меньшей мере около 95 % гомологии с ними.

[0133] Термины «Fc-рецептор» или «FcR» описывают рецептор, который связывается с областью Fc антитела. Предпочтительный FcR представляет собой нативную последовательность человеческого FcR. Более того, предпочтительным FcR является тот, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, and FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене. Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, включены в термин «FcR» в данном документе. FcR также могут увеличивать период полужизни антител в сыворотке.

[0134] В контексте данного документа, термины «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «гомология» в отношении последовательности пептида, полипептида или антитела определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатской последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если необходимо, для достижения наибольшего процента идентичности последовательности и без принятия каких-либо консервативных замен за часть идентичной последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, известные в данной области техники, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей - длине сравниваемых последовательностей.

[0135] Термин «конкурировать» при использовании в контексте антител (например, нейтрализующих антител), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антителами, как определено при помощи анализа, в котором тестируемое антитело предотвращает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонной молекулы (например, лиганда или эталонного антитела) с общим антигеном (например, MS4A4A или его фрагментом). Могут применяться различные типы анализов конкурентного связывания для определения того, конкурирует ли антитело с другим, можно использовать многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ (см., например, Stahl et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); прямой биотин-авидиновый EIA твердой фазы (см., например, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619) твердофазный прямой анализ с мечением, твердофазный прямой сэндвич-анализ с мечением (см., например, Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой РИА с мечением с применением метки 1-125 (см., например, Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); прямой

твердофазный биотин-авидиновый EIA (см., например, Cheung, *et al.*, 1990, Virology 176:546-552); и прямой РИА с меткой (Moldenhauer *et al.*, 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Как правило, такой анализ включает использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из них, немеченого тестируемого антитела и меченого эталонного антитела. Конкурентное ингибирование измеряется путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого антитела. Как правило, тестируемое антитело присутствует в избытке. Антитела, идентифицируемые в конкурентном анализе (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонному антителу, для появления стерического затруднения для антител. Дополнительные подробности касательно способов определения конкурентного связывания представлены в примерах в данном документе. Как правило, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать (например, уменьшать) специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5% и/или около 100%.

[0136] В контексте данного документа термин «взаимодействие» между полипептидом MS4A4A и вторым полипептидом включает, без ограничения, белок-белковое взаимодействие, физическое взаимодействие, химическое взаимодействие, связывание, ковалентное связывание и ионное связывание. В данном контексте антитело «ингибирует взаимодействие» между двумя полипептидами, если антитело нарушает, уменьшает или полностью устраняет взаимодействие между полипептидами. Антитело по настоящему изобретению «ингибирует взаимодействие» между двумя полипептидами, когда их антитело связывается с одним из двух полипептидов. В некоторых вариантах осуществления взаимодействие может быть ингибировано на по меньшей мере около 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5% и/или около 100%.

[0137] Термин «эпитоп» включает любую детерминанту, способную связываться с антителом. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связана с антителом, нацеленным на этот антиген, и, когда антиген представляет собой полипептид, включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антителом. Чаще всего эпитопы располагаются на полипептидах, но в некоторых случаях могут располагаться на других типах молекул, таких как нуклеиновые кислоты. Детерминанты эпитопа могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут иметь специфические характеристики трехмерной структуры и/или специфические характеристики заряда. Как правило, антитела, специфичные к конкретному антигену-мишени, предпочтительно распознают эпитоп на антигене-мишени в сложной смеси полипептидов и/или макромолекул.

[0138] «Агонистическое» антитело или «активирующее» антитело представляет собой антитело, которое индуцирует (например, увеличивает) одну или более активностей или функций антигена после того, как антитело связывает антиген.

[0139] «Антагонистическое» антитело, «блокирующее» антитело или «ингибирующее» антитело представляет собой антитело, которое снижает, ингибирует и/или устраняет (например, снижает) связывание антигена с одним или более лигандами после того, как антитело связывает антиген, и/или которое снижает, ингибирует и/или устраняет (например, снижает) одну или более активностей или функций антигена после того, как антитело связывает антиген. В некоторых вариантах осуществления антагонистические антитела, или блокирующие антитела, или ингибирующие антитела, по существу или полностью ингибируют связывание антигена с одним или более лигандами и/или одну или более активностей или функций антигена.

[0140] «Выделенное» антитело, такое как выделенное антитело к MS4A4A по настоящему изобретению, представляет собой антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или отделено от компонента его производственной среды (например, естественным или рекомбинантным путем). Предпочтительно выделенное антитело не связано со всеми другими загрязняющими компонентами из его производственной среды. Загрязняющими компонентами среды выработки, такими как рекомбинантные трансфицированные клетки, являются материалы, которые, как правило, препятствуют исследовательскому, диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитела будет очищен: (1) до более 95% по массе антитела, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, предпочтительно, красителя на основе серебра. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных Т-клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид или антитело будут получены с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

[0141] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, такое как антитело к MS4A4A по данному изобретению, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицируется и отделяется от по меньшей мере одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой она была произведена. Предпочтительно, выделенная нуклеиновая кислота не имеет связей со всеми компонентами, связанными с производственной средой. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, по настоящему описанию находятся в форме, отличной от той формы или условий, в которых они встречаются в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела, которые в данном документе естественным образом присутствуют в клетках.

[0142] Термин «вектор», в контексте данного документа предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к двухцепочечной кольцевой ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой фаговый вектор. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эпизомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэпизомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы могут управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «рекомбинантными экспрессионными векторами», или просто «экспрессионными векторами». В целом, векторы, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В данном описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора.

[0143] Взаимозаменяемо употребляемые в данном документе термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут

представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой или с помощью синтетической реакции.

[0144] «Клетка-хозяин» включает отдельную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была реципиентом вектора(-ов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или по комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке из-за естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) по данному изобретению.

[0145] Термины «мембранный *TREM2*», «*TREM2* плазматической мембраны» и «*TREM2* клеточной поверхности», используемые в данном документе, используются взаимозаменяемо.

[0146] В контексте данного документа «носители» включают фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, которое подвергается их воздействию, в применяемых дозировках и концентрациях.

[0147] В контексте данного документа термин «предотвращение» включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива конкретного заболевания, расстройства или состояния у индивидуума. Человек может быть предрасположен к определенному заболеванию, нарушению или состоянию, быть восприимчивым к нему или иметь риск развития такого заболевания, нарушения или патологического состояния, но у него еще не диагностировано заболевание, нарушение или патологическое состояние.

[0148] В контексте данного документа индивидуум, «подверженный риску» развития конкретного заболевания, расстройства или патологического состояния, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, а также может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в данном документе. «Подверженный риску» означает, что у индивидуума есть один или более факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, которые коррелируют с развитием конкретного заболевания, расстройства или патологического состояния, как известно в данной области техники. Индивидуум, имеющий один или более из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития конкретного заболевания, расстройства или состояния, чем индивидуум без одного или более из этих факторов риска.

[0149] В контексте данного документа термин «лечение» относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного течения хода клинической патологии индивидуума, подвергающегося лечению. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования, улучшение или облегчения патологического состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза конкретного заболевания, расстройства или патологического состояния. Индивидуум успешно «лечится», например, если один или более симптомов, связанных с конкретным заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, смягчены или устранены.

[0150] «Эффективное количество» относится к по меньшей мере эффективному количеству в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. Эффективное количество можно вводить за одно или более введений. Эффективное количество в контексте данного документа может варьировать в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность лечения вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективным количеством также является такое количество, при котором

любые токсические или вредные эффекты лечения перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Для профилактического применения полезные или желаемые результаты включают такие результаты, как устранение или снижение риска, уменьшение степени тяжести или отсрочка начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы во время развития болезни. Для терапевтического применения полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение одного или более симптомов, вызванных заболеванием, повышение качества жизни людей, страдающих этим заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, такое как нацеливание, замедление прогрессирования заболевания и/или продление выживаемости. Эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения прямо или косвенно. Как понятно в клиническом контексте, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнуто или не достигнуто в комбинации с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» можно рассматривать в контексте введения одного или более терапевтических агентов, и можно считать, что один агент вводит в эффективном количестве, если в комбинации с одним или более другими агентами может быть получен или достигнут желаемый результат.

[0151] «*Индивидуум*» в целях лечения, профилактики или снижения риска относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т. д. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека.

[0152] В контексте данного документа введение «*в комбинации*» с другим соединением или композицией включает одновременное введение и/или введение в разное время. Совместное введение также включает введение в виде совместного препарата или введение в виде отдельных композиций, в том числе с разными частотами или интервалами дозирования и с использованием одного и того же пути введения или разных путей введения. В некоторых вариантах осуществления совместное введение представляет собой введение в виде части той же схемы лечения.

[0153] Термин «*около*», используемый в данном документе, относится к обычному диапазону погрешностей для соответствующего значения и хорошо известный специалисту в данной области техники. Ссылка на «*около*» в отношении значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр *per se*.

[0154] Использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Например, ссылка на «*антитело*» означает от одного до многих антител, таких как молярные количества, и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и так далее.

[0155] Понятно, что аспект и варианты осуществления данного изобретения, описанные в данном документе, включают в себя аспекты и варианты «содержащий», «состоящий из» и «состоящий по существу из».

II. Антитела к MS4A4A

[0156] В данном документе представлены антитела к MS4A4A. Представленные в данном документе антитела можно использовать, например, для диагностики или лечения ассоциированных с MS4A4A

расстройств.

[0157] В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенным (например, моноклональным) антителам, которые связываются с эпитопом в белке MS4A4A по настоящему изобретению. Белки MS4A4A по данному изобретению включают, без ограничения, белок MS4A4A млекопитающих, белок MS4A4A человека, белок MS4A4A мыши и белок MS4A4A яванского макака. Белки MS4A4A по настоящему изобретению включают встречающиеся в природе варианты MS4A4A.

[0158] MS4A4A человека представляет собой белок из 239 аминокислот, кодирующий мембранный гликопротеин. Аминокислотная последовательность MS4A4A человека представлена в SEQ ID NO:1:

MHQTYSRHC RPEESTFSAAMTTMQGMEQAMPGAGPGVPQLGNMAVIHSHLWKGLQEKF LKGEPKVLGVV
QILTALMSLSMGITMMCMASNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIISGSL SIAAGIRTTKGLVRGSLGMNITSSVL
AASGILINTFSLAFYSFHHPYCNYYGNSNNCHGTMSILMGLDGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFGCKVLCCTPG
GVVLILPSHSHMAETASPTPLNEV

[0159] Кроме того, аминокислотная последовательность MS4A4A мыши представлена в SEQ ID NO:2:

MLVIQGTEQSALEAGYGAQQNGQPLYVNSHSWKRMTEKFLKGEPKILGIVQIVIAIMNLSIGIMMIATVSTG
EIPPSSVYIGYPIWGS LMFIIISGFSIVAGRRTTKGLVRSSLGLNITSSVFAFSGIVISSLSPGIYSFHVYYCTYRG
SSEGCHMTLSILMGLDIVVVVLSVLEFCIGVSLSAFGCRVMCCNPGGVMIIMPSNPTKAETANPVTLQSGLM
PPEHQERNVPENMH

[0160] Кроме того, аминокислотная последовательность MS4A4A яванского макака (супо) представлена в SEQ ID NO:3:

HQTYRRHCRPEESTFSAAMTTMQGMEQATPGAGPGVPQLGNMAVVHSHLWKGLQEKF LKGEPK
VLGVVQILIALMSLSMGITMMCVAFSAYGHYPISVYIGYTIWGSVMFIISGSL SIAAGIRTTKGLVRGSLGMNI
TSSVLAVSAILINTISLTIFYHRYCNYYGNPNCHGTVSILMGMMDGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFGCKAICC
TPGGVVLIPSNHMAEAAPLTPLNEV

[0162] В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в клетке. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в миелоидных клетках. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в клетках головного мозга. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в астроцитах, включая, без ограничения, зрелые астроциты. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в олигодендроцитах. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в клетках микроглии. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в иммунных клетках, включая, помимо прочего, макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, дендритные клетки, натуральные клетки-киллеры, нейтрофилы и Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется в обонятельных клетках. В некоторых вариантах осуществления MS4A4A экспрессируется на клеточной поверхности.

[0163] Белки MS4A4A по настоящему изобретению включают несколько доменов, включая, без ограничения, цитоплазматический домен (аминокислотные остатки 1-64 MS4A4A человека; см. SEQ ID NO:1); трансмембранный домен (аминокислотные остатки 65-85 MS4A4A человека); внеклеточный домен (внеклеточный домен 1; ECL1), соответствующий аминокислотным остаткам 86-98 MS4A4A человека; трансмембранный домен (аминокислотные остатки 99-119 MS4A4A человека); цитоплазматический домен (аминокислотные остатки 120-137 MS4A4A человека); трансмембранный домен (аминокислотные остатки 138-158 MS4A4A человека); внеклеточный домен (внеклеточный домен 2; ECL2), соответствующий аминокислотным остаткам 159-179; трансмембранный домен (аминокислотные остатки 180-200 MS4A4A человека); и цитоплазматический домен (аминокислотные остатки 201-239 MS4A4A человека). Кроме того,

белки MS4A4A по настоящему изобретению экспрессируются в ряде тканей и клеток, включая, помимо прочего, головной мозг, нейроны, глиальные клетки, эндотелиальные клетки, периваскулярные клетки, перициты и т. д.

MS4A4A в функционировании макрофагов и клеток микроглии

[0164] Макрофаги и миелоидные клетки центральной нервной системы (ЦНС), такие как микроглия, по своей природе пластичны по своему фенотипу и функциям. Макрофаги *in vitro* можно разделить на макрофаги M1 и макрофаги M2, которые имеют различные фагоцитарные и воспалительные потенциалы, фенотипы и активности. Например, считается, что в периферических органах макрофаги с фенотипом M1 обладают провоспалительным и антимикробным фенотипом и функцией, в то время как макрофаги с фенотипом M2 считаются находящимися в более гомеостатическом состоянии, обладающими противовоспалительным фенотипом и функцией.

[0165] Микроглия, связанная со нормальными гомеостатическими состояниями, экспрессирует больше маркеров M2 на своей клеточной поверхности (например, CD200R, CD163 и CD115) по сравнению с маркерами M1 (например, CD16, MHC класса II, CD86) (Ginhoux and Prinz, 2015, Cold Spring Harb Perspect Biol, 7:a020537). Однако ассоциированная с заболеванием микроглии (DAM) как в моделях болезни Альцгеймера на мышах, так и при болезни Альцгеймера у человека находится в провоспалительном или активированном состоянии. Ассоциированная с заболеванием микроглии в провоспалительном или активированном состоянии считается полезной, поскольку играет активную роль в уменьшении патологии, связанной с болезнью Альцгеймера и другими нейродегенеративными расстройствами.

[0166] Экспрессия MS4A4A повышена в макрофагах M2 *in vitro*, и было высказано предположение, что MS4A4A является новым маркером клеточной поверхности для макрофагов M2. Кроме того, было показано, что MS4A4A регулирует транспорт cKit на клеточной поверхности тучных клеток, что указывает на роль MS4A4A в модуляции дегрануляции и выживаемости тучных клеток (Cruse *et al*, 2015, Molecular Biol Cell, 26:1711-1727). Взяты вместе, эти опубликованные данные свидетельствуют о том, что нацеливание на MS4A4A может влиять на рециклинг, экспрессию и/или деградацию различных рецепторов на поверхности макрофагов, ассоциированных с фенотипами макрофагов M1 и M2, тем самым влияя на их функции и активность.

[0167] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению влияют на экспрессию маркеров поверхности макрофагов M2. В частности, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению снижают экспрессию CD200R, дектина-1 и CD163 на поверхности макрофагов, что свидетельствует о том, что антитела к MS4A4A модулируют поляризацию, функцию и/или активность макрофагов путем снижения экспрессии рецепторов поверхности макрофагов M2. Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению снижают уровень рецепторов на поверхности макрофагов M2, что свидетельствует о том, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в изменении физиологического состояния клеток микроглии к более защитному фенотипу, например, к более провоспалительному или активированному состоянию (например, больше к фенотипу M1). Соответственно, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению применимы для лечения болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных расстройств, частично путем изменения фенотипа макрофагов и микроглии до провоспалительного и активированного состояния.

[0168] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению влияют на состояние активации микроглии. Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни мРНК белков, ассоциированных с активацией микроглии (например, член А семейства 7 лектиновых доменов С-типа (CLEC7A)), миграцию микроглии (например, рецептором 2 инозитол-1,4,5-трифосфата (ITPR2)) и пролиферацию микроглии

(например, антиген KI-67 (MKI67)) *in vivo*. Кроме того, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни мРНК маркеров активации микроглии IL1RN, SPP1 и PLCG2. Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению также снижали уровни мРНК маркеров гомеостаза микроглии пуринергического рецептора P2RY12 и рецептора 1 CX3C-хемокина (CX3CR1). Соответственно, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны при активации микроглии *in vivo*, о чем свидетельствует увеличение различных уровней мРНК белков, связанных с активацией, миграцией и пролиферацией микроглии; и снижением различных уровней мРНК белков, ассоциированных с гомеостазом микроглии.

Экспрессия MS4A4A и TREM2

[0169] Нейродегенеративные заболевания частично характеризуются нарушением иммунной функции центральной нервной системы (ЦНС). Например, считается, что снижение жизнеспособности и функции в компартменте миелоидных клеток ЦНС, включая, помимо прочего, микроглию, способствует предрасположенности к нейродегенеративным расстройствам, таким как болезнь Альцгеймера. Фармакологическое вмешательство, повышающее жизнеспособность и/или функционирование миелоидных клеток, могло бы обеспечить эффективное лечение для облегчения манифестации, степени тяжести или прогрессирования таких нейродегенеративных заболеваний и расстройств.

[0170] Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-2, (TREM2) представляет собой иммуноглобулиноподобный рецептор, который экспрессируется преимущественно на миелоидных клетках, таких как макрофаги, дендритные клетки, моноциты, клетки Лангерганса кожи, клетки Купфера, остеокласты и микроглия. TREM2 высоко экспрессируется на микроглии и инфильтрирующих макрофагах в ЦНС во время экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита и болезни Альцгеймера (Piccio et al, 2007, Eur J Immunol, 37:1290-1301; Wang, 2015, Cell, 160:1061-1071). Путь TREM2 считается ключевым модулятором жизнеспособности и функционирования миелоидных клеток ЦНС.

[0171] Данные генетических исследований человека предполагают сильную генетическую связь между MS4A4A и TREM2 и с предрасположенностью к болезни Альцгеймера (Piccio et al., 2016, Acta Neuropathol, 131:925-9330). В частности, аллели MS4A4A, защищающие от болезни Альцгеймера, связаны с повышенным уровнем sTREM2 в спинномозговой жидкости у пациентов.

[0172] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни клеточного АТФ в макрофагах, указывая на то, что антитела к MS4A4A эффективны в повышении, поддержании или усилении жизнеспособности и функции клеток (например, макрофагов, миелоидных клеток, микроглии). Кроме того, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни sTREM2 и mTREM2 в макрофагах, в отличие от того, что сообщалось ранее, в котором коммерчески доступное антитело к MS4A4A 5C12 снижало уровни sTREM2 в супернатантах культивируемых макрофагов человека (Deming et al, 2018, bioRxiv, doi: dx.doi.org / 10.1101/352179). Поскольку защитные аллели MS4A4A для болезни Альцгеймера связаны с повышенными уровнями sTREM2, результаты, представленные в данном документе, указывают на то, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению имитируют или реплицируют защитный фенотип при нейродегенеративных заболеваниях и расстройствах, таких как болезнь Альцгеймера, за счет повышения уровней sTREM2 и mTREM2. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает экспрессию TREM2 на клеточной поверхности в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 125% по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или на по меньшей мере 250%. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает уровни

растворимого TREM2 в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или на по меньшей мере 100%.

[0173] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни белка mTREM в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) с EC50 от около 0,028 мкг/мл до около 0,039 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни белка sTREM в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) с EC50 от около 0,025 мкг/мл до около 0,069 мкг/мл. В еще других вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает уровни АТФ в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) с EC50 от около 0,010 мкг/мл до около 0,021 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает уровни АТФ в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) примерно в 1,2 раза, примерно в 1,4 раза или примерно в 1,7 раза по сравнению с уровнем АТФ в таких клетках в отсутствие антитела к MS4A4A.

[0174] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 *in vivo* (например, у отличного от человека примата или человека). В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает уровни растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 125% или на по меньшей мере 150% от исходных уровней растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* до введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* примерно на 50% по сравнению с исходными уровнями растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* до введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0175] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает уровни растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* в по меньшей мере 1,1 раза, по меньшей мере 1,2 раза, по меньшей мере 1,3 раза, по меньшей мере 1,4 раза, по меньшей мере 1,5 раза, по меньшей мере 1,6 раза, по меньшей мере 1,7 раза, по меньшей мере 1,8 раза, по меньшей мере 1,9 раза или в по меньшей мере 2 раза относительно уровней растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* до введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению увеличивает уровни растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* примерно в 1,5 раза по сравнению с уровнями растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* до введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению.

[0176] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* по сравнению с уровнями растворимого TREM2 в сыворотке *in vivo* до введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 суток, по меньшей мере 3 суток, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 8 суток, по меньшей мере 9 суток, по меньшей мере 10 суток, по меньшей мере 11 суток, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней или по меньшей мере 20 дней. В некоторых вариантах

мере 24 часов, по меньшей мере 48 часов, по меньшей мере 72 часов или по меньшей мере 96 часов. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни растворимого TREM2 в СМЖ *in vivo* по сравнению с уровнями растворимого TREM2 в СМЖ *in vivo* до введения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению в течение по меньшей мере 96 часов.

[0180] Доказательства, представленные в данном документе, демонстрируют, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению влияют на TREM2, но не исключают антител, действующих другими путями.

Антагонистические антитела

[0181] В некоторых вариантах осуществления антитела, которые связывают белок MS4A4A, могут включать антагонистические антитела, которые связывают MS4A4A, ингибируют одну или более активностей MS4A4A либо путем предотвращения взаимодействия между MS4A4A и его лигандом(-ами), либо путем предотвращения трансдукции сигнала MS4A4A в цитоплазму клетки в присутствии лиганда. В некоторых вариантах осуществления антагонистические антитела по настоящему изобретению могут иметь эпитопную специфичность агонистические антитела по настоящему изобретению, но иметь домен Fc, который не способен связывать Fc-гамма-рецепторы и, таким образом, не способен, например, кластеризовать рецептор MS4A4A.

[0182] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой антагонистическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело ингибирует одну или более активностей MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело снижает активность одного или более MS4A4A-зависимых генов. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело ингибирует взаимодействие между MS4A4A и одним или более лигандами MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело ингибирует трансдукцию сигнала MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антагонистическое антитело ингибирует взаимодействие между MS4A4A и одним или более лигандами MS4A4A и ингибирует трансдукцию сигнала MS4A4A.

[0183] В некоторых вариантах осуществления снижение уровней белка MS4A4A или снижение активности MS4A4A достигается с помощью антитела к MS4A4A, которое уменьшает или снижает уровни белка MS4A4A в клетке. В некоторых вариантах осуществления снижение уровней белка MS4A4A или снижение активности MS4A4A достигается путем снижения экспрессии или уровней нуклеиновой кислоты MS4A4A, например, с использованием методик на основе антисмысловых олигонуклеотидов, генной терапии и т. д., с использованием антисмысловых методологий, генной терапии и т. д. с использованием методов, известных и доступных специалистам в данной области техники. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления снижение уровней или активности белка MS4A4A достигается с помощью антитела к MS4A4A по настоящему изобретению или путем снижения экспрессии или уровней нуклеиновой кислоты MS4A4A (например, мРНК).

[0184] В некоторых вариантах осуществления перекрестное связывание антител необходимо для функционирования агонистического антитела. Перекрестное сшивание антител может происходить посредством связывания со вторичным антителом *in vitro* или посредством связывания с Fc-рецепторами *in vivo*. Например, антагонистические антитела могут быть преобразованы в агонистические антитела посредством перекрестного сшивания биотина/стрептавидина или связывания со вторичным антителом *in vitro* (см., например, Gravestien *et al.*, 1996, J. Exp. Med. 184:675-685; Gravestien *et al.*, 1994, International Immunol, 7:551-557). Агонистические антитела могут проявлять свою активность, имитируя биологическую активность лиганда рецептора или усиливая агрегацию рецептора, тем самым активируя сигналинг рецептора. В некоторых вариантах осуществления для антагонистической активности требуется отсутствие перекрестного

сшивания антител. Антагонистические антитела могут проявлять свою активность, блокируя взаимодействие рецептор-лиганд.

Гельзолин, остеопонтин и фенкопия защитного аллеля для болезни Альцгеймера

[0185] В кластере генов MS4A есть три SNP, которые связаны с повышенным риском болезни Альцгеймера с поздним началом. К ним относятся rs4938933 в MS4A4A, rs670139 в MS4A4E и rs610932 в MS4A6A (Hollingworth *et al*, 2011, Nat Genetics, 43:429-435; Naj *et al*, 2011, Nature Genetics, 43:436-441; Antunez *et al*, 2011, Genome Medicine, 3, article 33). Кроме того, SNP локуса MS4A4A (rs2304933 и rs2304935) связаны с более высокими уровнями MS4A4A и повышенным риском болезни Альцгеймера, включая болезнь Альцгеймера с поздним началом (LOAD) (Allen *et al*, 2012, Neurology, 79:221-228).

[0186] Были идентифицированы ассоциированные с болезнью Альцгеймера генетические варианты (SNP), связанные с кластером генов MS4A. Одним из этих вариантных аллелей является rs1582763, который связан с повышенными уровнями sTREM2 в СМЖ, сниженным риском болезни Альцгеймера и отсроченным началом болезни, и, таким образом, считается защитным аллелем. (Deming *et al*, 2018, bioRxiv, doi: dx doi org / 10.1101/352179). Защитный аллель rs1582763 связан со сниженным уровнем мРНК MS4A4A в крови. Эти результаты также предполагают, что аллель rs1582763 выполняет защитную роль, снижая уровни MS4A4A и снижая риск или степень тяжести болезни Альцгеймера. Защитный rs1582763 связан также с повышенными уровнями экспрессии остеопонтина и повышенными уровнями гельзолина. Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны при фенкопировании этих аспектов защитных аллелей, по меньшей мере, в отношении снижения экспрессии MS4A4A, повышения экспрессии остеопонтина, повышения экспрессии гельзолина и/или повышения уровней sTREM. В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагаются антитела к MS4A4A, где антитела фенкопируют один или более аллелей MS4A, которые связаны со сниженным риском болезни Альцгеймера и/или отсроченным началом болезни Альцгеймера.

[0187] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни мРНК остеопонтина (SPP1) и повышали уровни мРНК гельзолина (GSN) в макрофагах, происходящих из мононуклеарных клеток периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни мРНК и/или белка остеопонтина. В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни мРНК и/или белка гельзолина. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка остеопонтина в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или на по меньшей мере 250%. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка гельзолина в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100 %, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или на по меньшей мере 250%.

[0188] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни остеопонтина (SSP1) у отличных от человека приматов. В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни мРНК и/или белка остеопонтина *in vivo* (например, у отличных от человека

приматов или людей). В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка остеопонтина в сыворотке и/или в СМЖ. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка остеопонтина в сыворотке и/или в спинномозговой жидкости на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или на по меньшей мере 250%. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровень белка остеопонтина в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровень белка остеопонтина в лобной коре и/или в гиппокампе.

[0189] В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению фенотипируют защитный аллель rs1582763 в отношении увеличения экспрессии остеопонтина и гелязолина. В других аспектах антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в повышении экспрессии остеопонтина, гелязолина и/или sTREM2 и являются биологически активными в отношении снижения риска и/или степени тяжести болезни Альцгеймера, подобно активности защитного аллеля rs1582763. Данные показали, что SPP1 и GSN являются фармакодинамическими маркерами для защитной биологической активности, связанной с аллелем rs158273.

Экспрессия CSF1R и IL1RN

[0190] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни CSF1R у отличных от человека приматов. В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни мРНК и/или белка CSF1R *in vivo* (например, у отличных от человека приматов или людей). В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка CSF1R в сыворотке и/или в СМЖ. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка CSF1R в сыворотке и/или в спинномозговой жидкости на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или на по меньшей мере 250%. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровень белка CSF1R в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровень белка CSF1R лобной коре и/или в гиппокампе.

[0191] Дефицит CSF1R отрицательно влияет на развитие микроглии в головном мозге (Swerdlow et al (2000) *Neurology*, 111:300-311; Baba et al (2006) *Acta Neuropath*, 111:300-311), а недавние исследования связывают мутации в CSF1R с различными заболеваниями, включая лейкоэнцефалопатию взрослых с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP) и наследственную диффузную лейкоэнцефалопатию со сфероидными (HDLS) (Oosterhof et al (2019) *Am J Hum Genet*, 104:936-947; Rademaker et al (2011) *Nat Genet*, 44:200-205; Nicholson et al (2013) *Neurology*, 80:1033-1040). Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению снижали гибель клеток и поддерживали выживаемости макрофагов человека после ингибирования CSF1R. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению применимы для лечения индивидуума с обусловленным дефицитом CSF1R заболеванием или расстройством, таким как ALSP или HDLS.

[0192] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни IL1RN в макрофагах,

происходящих из моноклеарных клеток периферической крови человека. В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни мРНК и/или белка IL1RN. В некоторых вариантах осуществления антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни мРНК и/или белка IL1RN. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению повышает уровни мРНК и/или белка IL1RN в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100 %, по меньшей мере 125%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 200% или на по меньшей мере 250%.

Экспрессия GPNMB

[0193] GPNMB (гликопротеин В неметастатической меланомы); представляет собой поверхностный гликопротеин, экспрессируемый во многих типах клеток, включая тканевые макрофаги и микроглию. Несколько генетических вариантов были связаны с риском развития болезни Паркинсона (БП). Уровни белка GPNMB повышены в черной субстанции пациентов с БП, а уровни GPNMB повышены после лизосомального стресса (Moloney et.al., 2018, Neurobio Dis. 120: 1-11). Кроме того, повышенная экспрессия GPNMB была связана с SNP rs199347, причем этот ассоциированный с риском SNP был расположен в гене GPNMB (Murthy et al, Neurogenetics, 2017, 18:121-133).

[0194] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению снижали уровни белка клеточной поверхности GPNMB в первичных макрофагах человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижает уровни белка GPNMB на клеточной поверхности в миелоидных клетках (например, макрофагах, макрофагах человека, микроглии) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или на по меньшей мере 50%. Поскольку повышенные уровни GPNMB ассоциированы с аллелями риска развития БП, снижение GPNMB после добавления антитела к MS4A4A может стать средством лечения БП.

А. Иллюстративные антитела и некоторые другие варианты осуществления антител

[0195] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из следующего: (а) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:94, 108, 116, 146, 147, 308, и 311, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 108, 116, 146, 147, 308 и 311; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, и 312, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, и 312; (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, и 313, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, и 313; (d) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314, и 317, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134,

135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314, и 317; (е) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 161, 315, и 318, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 161, 315, и 318; и (ф) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:107, 115, 144, 145, 163, 316, и 319, или аминокислотная кислота, гомологичная на по меньшей мере около 95 % аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:107, 115, 144, 145, 163, 316, и 319.

[0196] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из следующего: (а) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:94 и 308, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:94 и 308; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:96, 97, 98, 99, и 309, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, и 309; (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:100, 101, 102, и 310, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102, и 310; (d) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:103, 104, и 314, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, и 314; (е) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:105, 106, и 315, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105, 106, и 315; и (ф) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:107 и 316, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:107 и 316.

[0197] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из следующего: (а) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:108, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:110 и 111, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:110 и 111; (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 112; (d) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:113; (е) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 114; и (ф) HVR-L3, содержащая аминокислотную

последовательность SEQ ID NO:115, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:115.

[0198] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121 и 122, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, и 122; (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129; (d) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138; (e) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, и 143, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, и 143; и (f) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:144 и 145, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:144 и 145.

[0199] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и 147, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:146 и 147; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:149, 150, 151, 152, и 153, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, и 153; (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:154, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 154; (d) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:156, 157, и 158, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95 % аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156, 157 и 158; (e) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, 160, и 161, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 159, 160, и 161; и (f) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:163, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:163.

[illegible]

[0201] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие: (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:308; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:309; (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:310; (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:314; (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:315; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:316; или (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:312; (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:313; (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:317; (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:318; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:319.

[0202] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A,

[illegible]

[illegible]

[illegible]

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118; (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129; (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:134; (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118; (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129; (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:135; (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118; (c) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129; (d) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:136; (e) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:139; и (f) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144.

[illegible]

[0206] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR V_H, выбранные из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:308, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:308; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:309, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:309; и (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:310, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:310.

[0207] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR V_H, выбранные из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:311, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:311; (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:312, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:312; и (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:313, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:313.

[0208] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR V_L, выбранные из следующего: (а) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:103 и 104, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей

последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, и 122; и (с) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129.

[0218] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR V_L , выбранные из следующего: (а) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138; (b) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, и 143, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, и 143; и (с) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:144 и 145, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO:144 и 145.

[0219] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие (а) домен V_H , содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR V_H , выбранные из следующего: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности SEQ ID NO:116, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121 и 122, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121 и 122, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128 и 129, и (b) домен V_L , содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности HVR V_L , выбранные из следующего: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142 и 143, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142 и 143, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144 и 145, или аминокислотная последовательность, гомологичная на по меньшей мере около 95% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144 и 145.

[0220] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A,

[0223] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 304, и 306. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H , имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы состоящий из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 304, и 306, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 304, или 306. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 304, или 306. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 304, или 306, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_H содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (а) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 108, 116, 146, 147, и 308, и 311, (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, и 312, и (с) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, и 313.

[0224] В еще одном аспекте представлено антитело к MS4A4A, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 35, 36, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 305, и 307. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L , имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 35, 36, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 305, и 307, и содержит замены (например, консервативные замены), вставки, или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 35, 36, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 305, или 307. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 35, 36, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 305, или 307.

В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 35, 36, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 305, или 307, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_L содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (а) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314 и 317, (b) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 161, 315 и 318, и (с) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107, 115, 144, 145, 163, 316 и 319.

[0225] В некоторых вариантах осуществления представлено антитело к MS4A4A, причем указанное антитело содержит V_H , как в любом из вариантов осуществления, представленных выше, и V_L , как в любом из вариантов осуществления, представленных выше. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, причем антитело содержит V_H , как в любом из вариантов осуществления, представленных выше, и V_L , как в любом из вариантов осуществления, представленных выше. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO:5-15 и SEQ ID NO:17-22, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO:24-30 и SEQ ID NO:32-36, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO:40-53 и SEQ ID NO:55-74, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO:76-84 и SEQ ID NO:86-93, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO:304 и SEQ ID NO:305, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO:306 и SEQ ID NO:307, соответственно, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей.

[0226] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) и вариабельный домен легкой цепи (V_L), где V_H и V_L выбраны из группы, состоящей из следующего: V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5 and V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17; V_H , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, и V_L , содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18; V_H , содержащий аминокислотную последовательность

[illegible]

SEQ ID NO:62; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:48, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:69; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:50, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; и V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:67.

[0229] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены антитела к MS4A4A, содержащие варибельный домен тяжелой цепи (V_H) и варибельный домен легкой цепи (V_L), где V_H и V_L выбран из группы, состоящей из следующего: V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:86; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:80, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:81, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91; V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:83, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92; и V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93.

[0230] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит последовательность варибельного домена тяжелой цепи (V_H), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304 и 306. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304 и 306, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены, и/или удалены в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, или 306. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, или 306. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, или 306, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_H содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94 и 308, (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99 и 309, и (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102 и 310.

[0231] В еще одном аспекте представлено антитело к MS4A4A, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305 и 307. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305, и 307 и, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305 или 307. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305 или 307. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305, или 307, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_L содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, и 314, (b) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105, 106, и 315, и (c) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107 и 316.

[0232] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, и 30. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, и 30, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность

связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены, и/или удалены в SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, или 30, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_H содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 110 и 111, и (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112.

[0233] В еще одном аспекте представлено антитело к MS4A4A, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35 и 36. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L , имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, и 36, и, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, или 36. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, или 36. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, или 36, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_L содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, (b) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и (c) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115.

[0234] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, и 53. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H , имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, и 53, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены, и/или удалены в SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, или 53. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, или 53. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит

последовательность V_H SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, или 53, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_H содержит один, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121 и 122, и (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129.

[0235] В еще одном аспекте представлено антитело к MS4A4A, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (V_L), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, и 74. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, и 74, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, или 74. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, или 74. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Антитело к MS4A4A необязательно содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 или 74, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_L содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137 и 138, (b) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142 и 143, и (c) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144 и 145.

[0236] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи (V_H), имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 и 84. В определенных вариантах осуществления последовательность V_H, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, и 84, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 10 аминокислот были заменены, вставлены, и/или удалены в SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, или 84. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, или 84. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к

MS4A4A содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, или 84, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_H содержит одну, две или три HVR, выбранные из следующего: (a) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 и 147, (b) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, и 153, и (c) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

[0237] В еще одном аспекте представлено антитело к MS4A4A, где антитело содержит переменный домен легкой цепи (V_L), имеющий по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 и 93. В определенных вариантах осуществления последовательность V_L, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, и 93 и, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 или 93 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, или 93. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). Необязательно, антитело к MS4A4A содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, или 93, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления V_L содержит одну, две или три HVR, выбранных из следующего: (a) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156, 157, и 158, (b) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 160 и 161, и (c) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163.

[0238] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит полноразмерную аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 320-335 и 355-362. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 320-335 и 355-362, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в SEQ ID NO: 320-335 и 355-362 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 320-335 и 355-362. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR).

[0239] В еще одном аспекте антитело к MS4A4A содержит аминокислотную последовательность полноразмерной легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 363-365. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность полноразмерной тяжелой цепи, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 363-365, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело к MS4A4A, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с MS4A4A. В определенных вариантах осуществления в SEQ ID NO: 363-365 было заменено, вставлено и/или удалено в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности от 1 до 5 аминокислот были замещены, вставлены и/или удалены в SEQ ID NO: 363-365. В определенных вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами LVR (т.е. в FR).

[0240] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A содержит аминокислотную последовательность полноразмерной тяжелой цепи SEQ ID NO: 355-362 и аминокислотную последовательность полноразмерной легкой цепи SEQ ID NO: 365. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A содержит аминокислотную последовательность полноразмерной тяжелой цепи SEQ ID NO: 320-327 и аминокислотную последовательность полноразмерной легкой цепи SEQ ID NO: 363. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A содержит аминокислотную последовательность полноразмерной тяжелой цепи SEQ ID NO: 328-335 и аминокислотную последовательность полноразмерной легкой цепи SEQ ID NO: 364.

[0241] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-202, 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419, и 4A-450. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-18, 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, и 4A-331. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-21, 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, и 4A-381. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, 4A-390.

[0242] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению связывается с эпитопом MS4A4A человека, который является таким же или перекрывается с эпитопом MS4A4A, связанным по меньшей мере с одним эталонным антителом, выбранным из 4A-202, 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-18, 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, 4A-331, 4A-21, 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, 4A-381, 4A-25, 4A-382,

4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, 4A-390, 4A-419, и 4A-450. Подробное описание иллюстративных способов картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлено в Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

[0243] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-202, 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419, и 4A-450, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-18, 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, и 4A-331, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-21, 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, и 4A-381, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению конкурентно ингибирует связывание по меньшей мере одного эталонного антитела, выбранного из 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, или 4A-390, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A.

[0244] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению имеет такой же или перекрывающийся эпитоп на MS4A4A, что и по меньшей мере одно эталонное антитело, выбранное из 4A-202, 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419, и 4A-450, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению имеет такой же или перекрывающийся эпитоп на MS4A4A, что и по меньшей мере одно эталонное антитело, выбранное из 4A-18, 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, и 4A-331, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению имеет тот же или перекрывающийся эпитоп на MS4A4A, что и по меньшей мере одно эталонное антитело, выбранное из 4A-21, 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, и 4A-381, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению имеет такой же или перекрывающийся эпитоп на MS4A4A, что и по меньшей мере одно эталонное антитело, выбранное из 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, и 4A-390, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A.

[0245] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом 1 (ECL1) MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению связывается с одной или более аминокислотами в аминокислотной последовательности CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:177) SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах

осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом 2 (ECL2) MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению связывается с одной или более аминокислотами в аминокислотной последовательности SFHNPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) SEQ ID NO:1.

[0246] Любой подходящий конкурентный анализ или анализ связывания MS4A4A, известный в данной области техники, такой как анализ BIAcore, анализы на основе ИФА или проточная цитометрия, можно использовать для определения того, конкурирует ли антитело к MS4A4A (или конкурентно ингибирует связывание) с одним или более эталонными антителами, выбранными из 4A-202, 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-18, 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330, 4A-331, 4A-21, 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-361, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, 4A-381, 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, 4A-390, 4A-419, и 4A-450, и любой их комбинации, в отношении связывания с MS4A4A. В иллюстративном конкурентном анализе иммобилизованный MS4A4A или клетки, экспрессирующие MS4A4A на клеточной поверхности, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с MS4A4A (например, человека или отличного от человека примата), и второе немеченое антитело, которое исследуют в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с MS4A4A. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный MS4A4A или клетки, экспрессирующие MS4A4A, инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, допускающих связывание первого антитела с MS4A4A, избыток несвязавшегося антитела удаляют и измеряют количество метки, связанной с иммобилизованным MS4A4A или клетками, экспрессирующими MS4A4A. Если количество метки, связанной с иммобилизованным MS4A4A или клетками, экспрессирующими MS4A4A, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это указывает на то, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с MS4A4A. См., Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0247] Кроме того, в данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые конкурентно ингибируют связывание и/или конкурируют за связывание с антителом к MS4A4A, содержащие (а) домен V_H, содержащий (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:94 и 308, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, и 309, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102, и 310, и (b) домен V_L, содержащий (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, и 314, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105, 106, и 315, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107 и 316. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 5-15 и 304 и SEQ ID NO: 17-22 и 305, соответственно.

[0248] В данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые связываются с эпитопом MS4A4A

человека, который является таким же или перекрывается с эпитопом, связанным с антителом к MS4A4A, содержащим (а) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94 и 308, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99 и 309, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 101, 102 и 310, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, и 314, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105, 106, и 315, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 107 и 316. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 5-15 и 304 и SEQ ID NO: 17-22 и 305, соответственно. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MS4A4A человека представляет собой тот же эпитоп, который связан с антителом к MS4A4A.

[0249] Кроме того, в данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые конкурентно ингибируют связывание и/или конкурируют за связывание с антителом к MS4A4A, содержащие (а) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 110 и 111, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 24-30 и SEQ ID NO: 32-36, соответственно.

[0250] В данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые связываются с эпитопом MS4A4A человека, который является таким же или перекрывается с эпитопом, связанным с антителом к MS4A4A, содержащим (а) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 110 и 111, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 24-30 и SEQ ID NO: 32-36, соответственно. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MS4A4A человека представляет собой тот же эпитоп, который связан с антителом к MS4A4A.

[0251] Кроме того, в данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые конкурентно ингибируют связывание и/или конкурируют за связывание с антителом к MS4A4A, содержащим (а) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121 и 122, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142 и 143, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144 и 145. В некоторых

вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 40-53 и SEQ ID NO: 55-74, соответственно.

[0252] В данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые связываются с эпитопом MS4A4A человека, который является таким же или перекрывается с эпитопом, связанным с антителом к MS4A4A, содержащим (a) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121 и 122, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, и 129, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, и 138, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142 и 143, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 144 и 145. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 40-53 и SEQ ID NO: 55-74, соответственно. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MS4A4A человека представляет собой тот же эпитоп, который связан с антителом к MS4A4A.

[0253] Кроме того, в данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые конкурентно ингибируют связывание и/или конкурируют за связывание с антителом к MS4A4A, содержащим (a) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 и 147, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, и 153, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156, 157, и 158, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 160 и 161, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 76-84 и SEQ ID NO: 86-93, соответственно.

[0254] В данном документе представлены антитела к MS4A4A, которые связываются с эпитопом MS4A4A человека, который является таким же или перекрывается с эпитопом, связанным с антителом к MS4A4A, содержащим (a) домен V_H , содержащий следующее: (i) HVR-H1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 146 и 147, (ii) HVR-H2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, и 153, и (iii) HVR-H3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, и (b) домен V_L , содержащий следующее: (i) HVR-L1, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 156, 157 и 158, (ii) HVR-L2, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 160 и 161, и (iii) HVR-L3, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности V_H и V_L в SEQ ID NO: 76-84 и SEQ ID NO: 86-93, соответственно. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MS4A4A человека представляет собой тот же эпитоп, который связан с антителом к MS4A4A.

[0255] В определенных вариантах осуществления антитело к MS4A4A в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления представляет собой моноклональное антитело, включая

гуманизированное антитело и/или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или фрагмент F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A представляет собой по существу полноразмерное антитело, например, антитело IgG1, антитело IgG2a или антитело другого класса или изотипа, как определено в данном документе.

[0256] В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A в соответствии с любым из вышеперечисленных вариантов осуществления может включать любой из признаков, по отдельности или в комбинации, как описано в разделах 1-7 ниже:

(1) *Аффинность связывания антител к MS4A4A*

[0257] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител, антитело имеет константу диссоциации (K_d), равную < 1 мкМ, < 100 нМ, < 10 нМ, < 1 нМ, < 0,1 нМ, < 0,01 нМ, или < 0,001 нМ (например, 10⁻⁸ М или менее, например, от 10⁻⁸ М до 10⁻¹³ М, например, от 10⁻⁹ М до 10⁻¹³ М). Константы диссоциации могут быть определены с помощью любого аналитического метода, включая любой биохимический или биофизический метод, такой как ИФА, поверхностный плазмонный резонанс (ППР), биослойную интерферометрию (см., например, Octet System от ForteBio), изотермическую титрационную калориметрию (ИКТ), дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), круговой дихроизм (КД), анализ с остановленным потоком и колориметрические или флуоресцентные анализы плавления белков. В одном варианте осуществления K_d измеряют с помощью анализа связывания антигена, меченного радиоактивным изотопом (РИА). В некоторых вариантах осуществления РИА выполняют с Fab-версией представляющего интерес антитела и его антигена, например, как описано в Chen *et al. J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). В некоторых вариантах осуществления K_d измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE, например, анализа с использованием BIACORE -2000 или BIACORE -3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, штат Нью-Джерси) проводят при 25 °C с чипом иммобилизованных антигенов CM5 на ~ 10 единиц ответа (RU). В некоторых вариантах осуществления K_D определяют с использованием моновалентного антитела (например, Fab) или полноразмерного антитела. В некоторых вариантах осуществления K_D определяют с использованием полноразмерного антитела в моновалентной форме.

(2) *Фрагменты антител*

[0258] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, антитело представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител включают фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, и scFv, и другие фрагменты, описанные ниже. Обзор определенных фрагментов антител см. в Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Для обзора фрагментов scFv см., например, WO 93/16185; и патенты США №№ 5571894 и 5587458. Обсуждения фрагментов Fab и F(ab')₂, содержащих остатки эпитопа, связывающего рецептор реутилизации, и имеющих увеличенный период полужизни *in vivo*, приведены в патенте США № 5869046.

[0259] Диатела представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими. См., например, EP404097; WO 1993/01161; Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Триатела и тетраатела также описаны в Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, которые содержат весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи, или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В определенных вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (см., например, патент США № 6248516).

[0260] Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, без ограничений,

протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получение при помощи рекомбинантных клеток-хозяев (например, *E. coli* или фага), как описано в данном документе.

(3) *Химерные и гуманизированные антитела*

[0261] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, антитело представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567. В одном примере химерное антитело содержит нечеловеческую переменную область (например, переменную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или отличного от человека примата, такого как обезьяна) и константную область человека. В дополнительном примере, химерное антитело представляет собой антитело с «переключенным классом», в котором класс или подкласс был изменен по сравнению с исходным антителом. Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

[0262] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, антитело нечеловеческого происхождения гуманизируют с целью снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного антитела нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является по существу неиммуногенным для человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело имеет по существу такую же аффинность к мишени, что и антитело другого вида, из которого получено гуманизированное антитело. См., например, патенты США №№ 5530101, 5693761; 5693762; и 5585089. В определенных вариантах осуществления идентифицированы аминокислоты переменного домена антитела, которые можно модифицировать без уменьшения естественной аффинности антигенсвязывающего домена при одновременном снижении его иммуногенности. См., например, патенты США №№ 5766886 и 5869619. Как правило, гуманизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых HVR (или их части) получают из нечеловеческого антитела, а FR (или их части) получают из последовательностей человеческих антител. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть человеческой константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками нечеловеческого антитела (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0263] Гуманизированные антитела и способы их получения рассмотрены, например, в Almagro *et al. Front. Biosci.* 13:161 9-1633 (2008), и дополнительно описаны, например, в патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409. Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (см., например, Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител определенной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); and Presta *et al., J. Immunol.* 151:2623 (1993)); зрелые (содержащие соматические мутации) каркасные области человека или эмбриональные каркасные области человека (см., например, Almagro and Fransson *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (см., например, Vasa *et al. J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok *et al. J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

(4) *Антитела человека*

[0264] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, антитело представляет собой антитело человека. Антитела человека можно получить с использованием

различных методик, известных в данной области техники. Антитела человека, как правило, описаны в van Dijk *et al. Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) и Lonberg *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

[0265] Антитела человека можно получить путем введения иммуногена трансгенному животному, модифицированному с целью продукции интактных антител человека или интактных антител с человеческими переменными областями в ответ на антигенную стимуляцию. Можно конструировать линии мышей, дефицитные по выработке мышиных антител, с большими фрагментами локусов человеческого Ig в расчете на то, что такие мыши будут продуцировать антитела человека в отсутствие мышиных антител. Большие фрагменты человеческого Ig могут сохранять большое разнообразие переменных генов, а также надлежащую регуляцию продукции и экспрессии антител. С учетом использованного мышиного механизма для диверсификации и селекции антител и отсутствия иммунологической толерантности к белкам человека, репертуар репродуцированных антител человека в этих линиях мышей может давать высокоаффинные полностью человеческие антитела против любого представляющего интерес антигена, включая человеческие антигены. Используя гибридную технологию, можно получать и отбирать антигенспецифичные человеческие мкАт с желаемой специфичностью. Определенные иллюстративные способы описаны в патентах США №№ 5545807, EP 546073 и EP 546073. Также см., например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, в которых описана технология XENOMOUSE™; патент США № 5770429, в котором описана технология HUMAB®; патент США № 7041870, в котором описана технология K-M MOUSE®, и публикацию патентной заявки США № US 2007/0061900, в которой описана технология VELOCIMOUSE®. Человеческие переменные области из интактных антител, образованных такими животными, могут дополнительно модифицироваться, например, путем объединения с разными человеческими консервативными областями.

[0266] Антитела человека также можно получать при помощи способов на основе гибридом. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мышей и человека также были описаны как пригодные для получения человеческих моноклональных антител. (См., например, Kozbor *J. Immunol.* 133:3001 (1984) и Boerner *et al. J. Immunol.* 147:86 (1991)). Антитела человека, полученные с использованием технологии человеческой В-клеточной гибридомы, описаны в Li *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают способы, описанные, например, в патенте США № 7189826 (где описано получение моноклональных антител IgM человека из гибридных клеточных линий). Технология человеческих гибридом (технология Trioma) также описана в Vollmers *et al. Histology and Histopathology* 20(3):927-937 (2005) и Vollmers *et al. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(3):185-91 (2005). Человеческие антитела также можно получать путем выделения последовательностей переменного домена клона Fv из библиотек фагового дисплея человеческого происхождения. Такие последовательности переменного домена можно затем объединять с требуемым константным доменом человека. Методики отбора человеческих антител из библиотек антител описаны ниже.

[0267] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител, антитело представляет собой антитело человека, выделенное при помощи методов *in vitro* и/или путем скрининга комбинаторных библиотек на антитела с желаемой активностью или активностями. Подходящие примеры включают, но не ограничиваются ими, фаговый дисплей (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (ранее Proliferon), Affimed) рибосомный дисплей (CAT), дрожжевой дисплей (Adimab) и т.п. В некоторых методах фагового дисплея репертуары генов VH и VL отдельно клонируют при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) и повторно комбинируют случайным образом в фаговых библиотеках, которые затем можно подвергнуть скринингу на антигенсвязывающий фаг, как описано в Winter *et al. Ann. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994). Например, в данной области техники известно множество способов

получения библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек в отношении антител, обладающих необходимыми связывающими характеристиками. См. также Sidhu *et al. J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310, 2004; Lee *et al. J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093, 2004; Fellouse *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); и Lee *et al. J. Immunol. Methods* 284(-2):1 19-132 (2004). Фаг, как правило, представляет фрагменты антител, как одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), так и фрагменты Fab. Библиотеки из иммунизированных источников позволяют получить антитела с высокой аффинностью к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. В качестве альтернативы, можно клонировать наивный репертуар (например, от человека) для получения единого источника антител к широкому спектру чужеродных антигенов и аутоантигенов без иммунизации, как описано в статье Griffiths *et al. EMBO J.* 12: 725-734 (1993). И наконец, наивные библиотеки также можно создавать синтетически, путем клонирования неперестроенных V-генных сегментов из стволовых клеток и применения ПЦР-праймеров, содержащая случайную последовательность, для кодирования гипервариабельных областей HVR3 и для осуществления перестройки *in vitro*, как описано в статье Hoogenboom *et al. J. Mol. Biol.*, 227: 381-388, 1992. Патентные публикации, в которых описаны фаговые библиотеки антител человека, включают, например: патент США № 5750373 и публикации патентов США №№ 2007/0292936 и 2009/0002360. Антитела, выделенные из библиотек антител человека, считаются в данном документе антителами человека или фрагментами антител человека.

(5) *Константные области, включающие области Fc*

[0268] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, антитело содержит Fc. В некоторых вариантах осуществления Fc относится к изотипу человеческого IgG1, IgG2, IgG3 и/или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к классу IgG, классу IgM или классу IgA.

[0269] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител, указанное антитело имеет изотип IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG2 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG2 человека содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует одну или более активностей MS4A4A или независимо от связывания с рецептором Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах осуществления ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий рецептор Fc-гамма IIB (FcγIIB).

[0270] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител, указанное антитело имеет изотип IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG1 мыши. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG1 человека содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах осуществления ингибирующий рецептор Fc представляет собой ингибирующий рецептор Fc-гамма IIB (FcγIIB).

[0271] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител, указанное антитело имеет изотип IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область IgG4 человека содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с ингибирующим Fc-рецептором. В определенных вариантах осуществления ингибирующий Fc-рецептор представляет собой ингибирующий рецептор Fc-гамма IIB (FcγIIB).

[0272] В определенных вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител, указанное антитело имеет гибридный изотип IgG2/4. В некоторых вариантах осуществления антитело включает аминокислотную последовательность, включающую аминокислоты с 118 по 260 в соответствии с нумерацией EU IgG2 человека и аминокислоты 261-447 в соответствии с нумерацией EU IgG4 человека (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

[0273] В некоторых вариантах осуществления область Fc увеличивает кластеризацию без активации комплемента по сравнению с соответствующим антителом, содержащим область Fc, которая не содержит аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует одну или более активностей мишени, специфически связываемой антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с MS4A4A.

[0274] Также может быть желательно модифицировать антитело к MS4A4A по данному изобретению для модификации эффекторной функции и/или увеличения периода полужизни антитела в сыворотке. Например, сайт связывания Fc-рецептора в константной области может быть модифицирован или мутирован для удаления или уменьшения аффинности связывания с определенными Fc-рецепторами, такими как FcγRI, FcγRII, и/или FcγRIII для снижения антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция нарушается путем удаления N-гликозилирования области Fc (например, в домене CH2 IgG) антитела. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция нарушается путем модификации таких областей, как 233-236, 297 и/или 327-331 IgG человека, как описано в WO 99/58572 и Armour *et al. Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy *et al. J. Immunology* 164:1925-1933 (2000). В других вариантах осуществления также может быть желательно модифицировать антитело к MS4A4A по настоящему изобретению, чтобы изменить эффекторную функцию, чтобы повысить селективность обнаружения в отношении ITIM-содержащего FcγRIIb (CD32b) для увеличения кластеризации антител к MS4A4A на соседних клетках без активации гуморальных ответов, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность и антителозависимый клеточный фагоцитоз.

[0275] Для увеличения времени полужизни антитела в сыворотке можно включить в антитело (особенно во фрагмент антитела) связывающий рецептор реутилизации эпитоп, как описано, например, в патенте США 5739277. Используемый в данном документе термин «*эпитоп, связывающий рецептор реутилизации*» относится к эпитопу области Fc молекулы IgG (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, или IgG₄), который отвечает за увеличение *in vivo* времени полужизни в сыворотке молекула IgG. Другие модификации аминокислотной последовательности.

(6) *Полиспецифические антитела*

[0276] Полиспецифические антитела представляют собой антитела, имеющие специфичность связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами, в том числе эпитопами того же или другого полипептида (например, одного или более полипептидов MS4A4A по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может представлять собой триспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело может представлять собой тетраспецифическое антитело. Такие антитела могут быть получены из полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител F(ab')₂). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая связывается с первым сайтом на MS4A4A, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается со вторым сайтом на MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические антитела содержат

первую антигенсвязывающую область, которая связывается с MS4A4A, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается со вторым полипептидом.

[0277] В данном документе представлены полиспецифические антитела, содержащие первую антигенсвязывающую область, при этом первая антигенсвязывающая область содержит шесть HVR антитела, описанного в данном документе, которое связывается с MS4A4A, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается со вторым полипептидом. В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит V_H или V_L антитела, описанного в данном документе.

[0278] В некоторых вариантах осуществления полиспецифических антител второй полипептид представляет собой: а) антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер; (b) антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер, выбранный из рецептора трансферрина (TR), рецептора инсулина (HIR), рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, связанных с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептора дифтерийного токсина, CRM197, однодоменного антитела ламы, TMEM 30 (A), домена трансдукции белка, TAT, Syn-B, пенетратина, пептида полиаргинина, пептида Ангиопеп и ANG1005; (c) вызывающие заболевание белки, выбранный из бета-амилоида, олигомерного бета-амилоида, бета-амилоидных бляшек, белка-предшественника амилоида или его фрагментов, тау-белка, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), белка c9RAN, прионного белка, PrPSc, гентингина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, амилоида А сыворотки, медины, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета 2 микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, ассоциированных с повторами продуктов не-ATG-трансляции (RAN), пептидов с повторами дипептидов (DPR), пептидов с повторами глицин-аланин (GA), пептидов с повторами глицин-пролин (GP), пептидов с повторами глицин-аргинин (GR), пептидов с повторами пролин-аланин (PA), убиквитина и пептидов с повторами пролин-аргинин (PR); (d) лигандов и/или белков, экспрессируемых на иммунных клетках, где лиганды и/или белки выбраны из CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3, и фосфатидилсерина; и (e) белок, липид, полисахарид или гликолипид, экспрессируемые на одной или более опухолевых клетках, и любую их комбинацию.

[0279] В данной области техники известны многочисленные антигены, которые облегчают транспорт через гематоэнцефалический барьер, (см., например, Gabathuler R. *Neurobiol. Dis.* 37:48-57 (2010)). Такие вторые антигены включают, без ограничения, рецептор трансферрина (TR), рецептор инсулина (HIR), рецептор инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белки 1 и 2, связанные с рецептором липопротеинов низкой плотности, (LPR-1 и 2), рецептор дифтерийного токсина, включая CRM197 (нетоксичный мутант дифтерийного токсина), однодоменные антитела ламы, такие как TMEM 30(A) (флиппаза), домены белковой трансдукции, такие как TAT, Syn-B или пенетратин, полиаргининовые или преимущественно положительно заряженные пептиды, пептиды Ангиопеп, такие как ANG1005 (см., например, Gabathuler, 2010), и другие белки клеточной поверхности, которые обогащены эндотелиальными клетками гематоэнцефалического барьера (см., например, Daneman et al. *PLoS One* 5(10):e13741 (2010)).

[0280] Поливалентные антитела могут распознавать антиген MS4A4A, а также, без ограничения, дополнительные антигены пептида A β , антиген или антиген белка α -синуклеина, или антиген Тау-белка, или антиген белка TDP-43, или антиген прионного белка, или антиген белка гентингина, или RAN, антиген продуктов трансляции, включая дипептидные повторы, (пептиды DPR), состоящие из глицин-аланина (GA),

глицин-пролина (GP), глицин-аргинина (GR), пролин-аланина (PA) или пролин-аргинин (PR), рецептор инсулина, рецептор инсулиноподобного фактора роста. Рецептор трансферрина или любой другой антиген, облегчающий перенос антител через гематоэнцефалический барьер. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой Тау. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой Аβ. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой TREM2. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид представляет собой α-синуклеин.

[0281] Поливалентное антитело содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (и предпочтительно две полипептидные цепи), причем полипептидная цепь или цепи содержат два или более переменных домена. Например, полипептидная цепь или цепи могут содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где $VD1$ представляет собой первый переменный домен, $VD2$ представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь области Fc , $X1$ и $X2$ представляют собой аминокислоту или полипептид, а n равно 0 или 1. Подобным образом полипептидная цепь или цепи могут содержать V_H-C_H1 -гибкий линкер- V_H-C_H1 -цепь области Fc ; или $V_H-C_H1-V_H-C_H1$ -цепь области Fc . Поливалентное антитело в данном документе предпочтительно дополнительно содержит по меньшей мере два (и предпочтительно четыре) полипептида переменного домена легкой цепи. Поливалентное антитело по данному изобретению может, например, содержать от около двух до около восьми полипептидов переменного домена легкой цепи. Рассматриваемые в данном документе полипептиды переменного домена легкой цепи содержат переменный домен легкой цепи и, необязательно, дополнительно содержат домен CL .

[0282] Методики для получения полиспецифических антител включают, но не ограничиваются рекомбинантной коэкспрессией двух пар тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулинов, имеющих разную специфичность (см. Milstein and Cuello *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, и Traunecker *et al. EMBO J.* 10:3655 (1991)), и метод конструирования «выступ-во-впадину» (см., например, в патенте США № 5731168). См. также WO 2013/026833 (CrossMab). Полиспецифические антитела также могут быть получены путем конструирования с использованием эффектов электростатического взаимодействия для получения молекул Fc -гетеродимерных антител (WO 2009/089004A1); перекрестного сшивания двух или более антител (см., например, патент США № 4676980); использования лейцина; использования технологии «диагет» для получения фрагментов биспецифических антител (см., например, Hollinger *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)); и с использованием одноцепочечных Fv (scFv) димеров (см., например, Gruber *et al. J. Immunol.* 152:5368 (1994)); и получения триспецифических антител, как описано, например, в Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

[0283] Сконструированные антитела с тремя или более функциональными антигенсвязывающими сайтами, включая «антитела-осьминоги», также включены в данный документ (см., например, US 2006/0025576). Антитело в данном документе также включает «FAB двойного действия» или «DAF», содержащий антигенсвязывающий сайт, который связывается с несколькими MS4A4A (см., например, US 2008/0069820).

(7) *Варианты антител*

[0284] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител предполагаются варианты аминокислотной последовательности антител. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела.

(i) *Варианты замены, вставки и делеции*

[0285] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител предусмотрены варианты антител, имеющие одну или более аминокислотных замен. Варианты

аминокислотных последовательностей антитела можно получить путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела.

Таблица А: Аминокислотные замены

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

[0286] Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляют путем выбора замен, которые существенно отличаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (с) объема боковой цепи. Естественным образом встречающиеся в природе остатки возможно разделить на группы, основанные на общих свойствах боковой цепи:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0287] Например, неконсервативные замещения могут предусматривать замену члена одного из данных классов на член другого класса. Такие замещенные остатки могут быть введены, например, в области человеческого антитела, гомологичные с антителами, не являющимися человеческими, или в негомологичные

области молекулы.

[0288] При внесении изменений в полипептид или антитело, описанные в данном документе, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и характеристик изменения. Они представляют собой следующие: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

[0289] Важность индекса гидропатичности аминокислот в придании интерактивной биологической функции белку учитывается в данной области техники. Kyte *et al.* *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Известно, что некоторые аминокислоты могут быть замещены другими аминокислотами с подобным индексом гидропатичности или баллом и все еще сохраняют подобную биологическую активность. При внесении изменений, основанных на индексе гидропатичности, в некоторых вариантах осуществления включают замену аминокислот, индексы гидропатичности, которые находятся в пределах ± 2 . В определенных вариантах осуществления включаются те, которые находятся в пределах ± 1 , а в некоторых вариантах осуществления включаются те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$.

[0290] Также в данной области следует понимать, что замещение подобных аминокислот может эффективно осуществляться на основании гидрофильности, в частности, если биологически функциональный белок или пептид, созданный таким образом, предназначен для применения в иммунологических вариантах осуществления, как в данном случае. В некоторых вариантах осуществления наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т.е. с биологическим свойством белка.

[0291] Этим аминокислотным остаткам присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0 $\pm$ 1); аспартат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 $\pm$ 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При внесении изменений, основанных на сходных значениях гидрофильности, в некоторых вариантах осуществления включают замену аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 2 , в некоторых вариантах включают те, которые находятся в пределах ± 1 , а в некоторых вариантах осуществления включают те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$. Можно также идентифицировать эпитопы из первичных аминокислотных последовательностей на основе гидрофильности. Эти области также называют «эпитопными коровыми областями».

[0292] В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут совершаться внутри одной или более HVR при условии, что такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, консервативные изменения (*например*, консервативные замены, как предусмотрено в данном документе), которые существенно не снижают аффинность связывания, могут быть внесены в HVR. Такие изменения могут быть, например, за пределами остатков, контактирующих с антигеном, в HVR. В некоторых вариантах осуществления в вариантах последовательностей VH и VL, приведенных ранее, каждый HVR или не изменен, или содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

[0293] Вставки аминокислотной последовательности включают N- и/или C-концевые гибриды, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащая сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или более аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок

включают антитело с N-концевым остатком метионила. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (*например*, для терапии ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни в сыворотке крови.

[0294] Любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании надлежащей конформации антитела, также может быть замещен, как правило, серином, для улучшения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения аберрантного сшивания. И наоборот, цистеиновые связи могут быть добавлены к антителу для улучшения его стабильности (в частности, когда антитело является фрагментом антитела, таким как фрагмент Fv).

(ii) *Варианты гликозирования*

[0295] В некоторых вариантах осуществления любого из представленных в данном документе антител антитело изменено для увеличения или уменьшения степени гликозирования антитела. Добавление или удаление сайтов гликозирования в антителе легко осуществить путем изменения аминокислотной последовательности, приводящего к созданию или удалению одного или более сайтов гликозирования.

[0296] Гликозирование антител, как правило, является N-связанным или O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозирования. O-связанное гликозирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикамину, чаще всего серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксиллизин.

[0297] Добавление сайтов гликозирования к антителу обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозирования). Изменение может также быть выполнено путем добавления одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела или замещения ими (для сайтов O-связанного гликозирования).

[0298] Если антитело содержит область Fc можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, вырабатываемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный, биантеннальный олигосахарид, который в общем случае присоединен посредством N-линкера к Asn²⁹⁷ домена CH₂ области Fc согласно нумерации Kabat. Олигосахарид может включать в себя различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сialовую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стволе» биантеннальной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления могут быть сделаны модификации олигосахарида в антителе по изобретению для создания вариантов антител с определенными улучшенными свойствами.

[0299] В одном варианте осуществления предложены варианты антител, в которых углеводная структура, присоединенная (или непосредственно, или опосредованно) к области Fc, имеет сниженное содержание фукозы. *См., например*, публикации патента США №№ 2003/0157108 и 2004/0093621. Примеры публикаций, связанных с «дефукозилированными» или «фукозодефицитными» вариантами антитела, включают: US 2003/0157108; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Примеры клеточных линий, способных продуцировать дефукозилированные антитела,

включают клетки Led 3 CHO с недостатком фукозилирования белка (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108), и нокаутные линии клеток, такие как нокаутные клетки CHO по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, (см., например, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) и Kanda *et al. Biotechnol. Bioeng.* 94(4):680-688 (2006)).

(iii) Модифицированные константные области

[0300] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, Fc антитела имеет изоформы и/или модификации Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления изоформы и/или модификация Fc антитела способны связываться с Fc-гамма-рецептором.

[0301] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, модифицированный Fc антитела представляет собой модифицированный Fc IgG1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный IgG1 Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc IgG1 содержит одну или более аминокислотных замен (например, по отношению к области Fc дикого типа того же изоформы). В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен выбраны из N297A (Bolt S *et al. (1993) Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields *et al. (2001) R. J. Biol. Chem.* 276, 6591-6604), L234A, L235A (Hutchins *et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA*, 92:11980-11984; Alegre *et al., (1994) Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu *et al., (2000) Cell Immunol*, 200:16-26), G237A (Alegre *et al. (1994) Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu *et al. (2000) Cell Immunol*, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern *et al., (2007) Blood*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky *et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, и/или T256E, где положение аминокислот соответствует системе нумерации EU.

[0302] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутацию N297A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации D265A и N297A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутацию N297A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутацию K322A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутацию N297A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутацию P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации D270A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит мутации L234A и L235A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации L234A и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации L234A, L235A и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит одну или более (включая все) мутаций P238D, L328E, E233, G237D, H268D, P271G и A330R в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит одну или более мутаций S267E/L328F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации N325S и L328F в соответствии с нумерацией EU (N325S/L328F). В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc

IgG1, указанная Fc содержит мутации P238D, L328E, G237D, H268D, P271G и A330R в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации P238D, S267E, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации P238D, S267E, L328E, G237D, H268D, P271G и A330R в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации C226S, C229S, E233P, L234V, и L235A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации L234F, L235E, и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации S267E и L328F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит мутации S267E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, указанная Fc содержит замену константной области тяжелой цепи 1 (CH1) и шарнирной области IgG1 на CH1 и шарнирную область IgG2 (аминокислоты 118-230 IgG2 в соответствии с нумерацией EU) с легкой каппа-цепи.

[0303] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, Fc содержит две или более аминокислотных замен, которые увеличивают кластеризацию антител без активации комплемента по сравнению с соответствующим антителом, имеющим область Fc, которая не содержит две или более аминокислотных замен. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, модифицированная Fc IgG1 представляет собой антитело, содержащее область Fc, где антитело содержит аминокислотную замену в положении E430G и одну или более аминокислотных замен в области Fc по остатку положение выбрано из: L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S и любой их комбинации в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G, L234A, L235A и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях L234A, L235A и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G и K322A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G, A330S и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, A330S и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A и A330S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированная Fc IgG1 содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A и P331S в соответствии с нумерацией EU.

[0304] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, модифицированную Fc IgG1, которая дополнительно описана в данном документе, можно комбинировать с мутацией A330L (Lazar *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 103:4005-4010 (2006)), или одной или более мутаций L234F, L235E и/или P331S (Sazinsky *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 105:20167-20172 (2008)), в соответствии с системой нумерации EU, для устранения активации комплемента. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1, модифицированная Fc IgG1 может дополнительно содержать один или более из A330L, A330S, L234F, L235E и/или P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой

модифицированной Fc IgG1, модифицированная IgG1 Fc может дополнительно содержать одну или более мутаций для увеличения периода полужизни антитела в сыворотке человека (например, одну или более (включая все) мутаций M252Y, S254T и T256E в соответствии с системой нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления любая из модифицированных Fc IgG1, модифицированная Fc IgG1 может дополнительно содержать одну или более из E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, и/или S440W в соответствии с нумерацией EU.

[0305] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителам, имеющим модифицированные константные области (т.е. области Fc). Антитело, зависящее от связывания с рецептором FcγR для активации рецепторов-мишеней, может потерять свою агонистическую активность, если сконструировано для устранения связывания FcγR (см., например, Wilson *et al. Cancer Cell* 19:101-113 (2011); Armour *et al. Immunology* 40:585-593 (2003); и White *et al. Cancer Cell* 27:138-148 (2015)). Таким образом, считается, что антитело к MS4A4A по настоящему изобретению с правильной эпитопной специфичностью может активировать антиген-мишень с минимальными побочными эффектами, когда антитело имеет домен Fc изотипа IgG2 человека (CH1 и шарнирная область) или домен Fc другого типа, который способен преимущественно связываться с ингибирующими рецепторами FcγRIIB, или их вариацию.

[0306] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, модифицированный Fc антитела представляет собой модифицированный Fc IgG2. В некоторых вариантах осуществления модифицированный IgG2 Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc IgG2 содержит одну или более аминокислотных замен (например, по отношению к области Fc дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2 одна или более аминокислотных замен выбраны из V234A (Alegre *et al. Transplantation* 57:1537-1543 (1994); Xu *et al. Cell Immunol*, 200:16-26 (2000)); G237A (Cole *et al. Transplantation*, 68:563-571 (1999)); H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour *et al. Eur J Immunol* 29: 2613-2624 (1999); Armour *et al. The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27 (2000); Armour *et al. The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27 (2000)), C219S, и/или C220S (White *et al. Cancer Cell* 27, 138-148 (2015)); S267E, L328F (Chu *et al. Mol Immunol*, 45:3926-3933 (2008)); и M252Y, S254T, и/или T256E в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях V234A и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях C219S и C220S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях A330S и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях S267E и L328F в соответствии с нумерацией EU.

[0307] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену C127S в соответствии с системой нумерации EU (White *et al.*, (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle *et al. Protein Sci.* 19:753-762 (2010); and WO 2008/079246). В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом легкой каппа-цепи, который содержит аминокислотную замену C214S в соответствии с системой нумерации EU (White *et al. Cancer Cell* 27:138-148 (2015); Lightle *et al. Protein Sci.* 19:753-762 (2010); и WO 2008/079246).

[0308] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену C220S в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах

осуществления любой модифицированной Fc IgG2, антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом легкой каппа-цепи, который содержит аминокислотную замену C214S в соответствии с системой нумерации EU.

[0309] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену C219S в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, антитело имеет изотип IgG2 с константным доменом легкой каппа-цепи, который содержит аминокислотную замену C214S в соответствии с системой нумерации EU.

[0310] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc включает константный домен 1 тяжелой цепи (CH1) и шарнирную область изотипа IgG2 (White *et al.* *Cancer Cell* 27:138-148 (2015)). В определенных вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, CH1 и шарнирная область изотипа IgG2 содержат аминокислотную последовательность 118-230 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, область Fc антитела содержит аминокислотную замену S267E, аминокислотную замену L328F или обе, и/или аминокислотную замену N297A или N297Q в соответствии с системой нумерации EU.

[0311] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен в положениях E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, Fc может дополнительно содержать одну или более мутаций для увеличения периода полужизни антитела в сыворотке человека (например, одну или более (включая все) мутаций M252Y, S254T и T256E в соответствии с системой нумерации EU). В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc может дополнительно содержать A330S и P331S.

[0312] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc представляет собой гибридный Fc IgG2/4. В некоторых вариантах осуществления гибридный Fc IgG2/4 содержит ак 118–260 IgG2 и ак 261–447 IgG4. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG2, указанная Fc содержит одну или более аминокислотных замен в положениях H268Q, V309L, A330S и P331S в соответствии с нумерацией EU.

[0313] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2 Fc содержит одну или более дополнительных аминокислотных замен, выбранных из A330L, L234F, L235E или P331S согласно нумерации EU; и любой их комбинации.

[0314] В определенных вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, Fc содержит одну или более аминокислотных замен в положении остатка, выбранном из C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y и любой их комбинации в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, L243A, L235A и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G и K322A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, A330S и P331S в соответствии с нумерацией EU. В

некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, A330S и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, и A330S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, K322A, и P331S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положениях S267E и L328F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2, указанная Fc содержит аминокислотную замену в положении C127S в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG1 и/или IgG2 содержит аминокислотную замену в положениях E345R, E430G и S440Y в соответствии с нумерацией EU.

[0315] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, представленных в данном документе, модифицированный Fc антитела представляет собой модифицированный Fc IgG4. В некоторых вариантах осуществления модифицированный IgG4 Fc содержит одну или более модификаций. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный Fc IgG4 содержит одну или более аминокислотных замен (например, по отношению к области Fc дикого типа того же изотипа). В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4 одна или более аминокислотных замен выбраны из L235A, G237A, S229P, L236E (Reddy *et al. J Immunol* 164:1925-1933(2000)), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, и/или T256E в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная Fc может дополнительно содержать L235A, G237A и E318A в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная Fc может дополнительно содержать S228P и L235E в соответствии с системой нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, модифицированный Fc IgG4 может дополнительно содержать S267E и L328F в соответствии с системой нумерации EU.

[0316] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная модифицированная Fc IgG4 можно комбинировать с мутацией S228P в соответствии с системой нумерации EU (Angal *et al. Mol Immunol.* 30:105-108 (1993)) и/или с одной или более мутациями, описанными в (Peters *et al. J Biol Chem.* 287(29):24525-33 (2012)) для усиления стабилизации антител.

[0317] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, модифицированная IgG4 Fc может дополнительно содержать одну или более мутаций для увеличения периода полужизни антитела в сыворотке человека (например, одну или более (включая все) мутаций M252Y, S254T и T256E в соответствии с системой нумерации EU).

[0318] В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная Fc содержит L235E в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная Fc содержит мутацию S228P в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная Fc содержит мутации S267E и L328F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, указанная Fc содержит одну или более аминокислотных замен в положении остатка, выбранном из C127S, F234A, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, E345R, E430G, S440Y и любой их комбинации, согласно нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления любой модифицированной Fc IgG4, Fc содержит аминокислотную замену в положениях E430G, L243A, L235A и P331S в соответствии с нумерацией EU. В

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 332. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 333. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 334. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 335.

[0323] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 321. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 322. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 323. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 325. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 326. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 327.

(8) Другие модификации антител

[0324] В некоторых вариантах осуществления любого антитела, указанное антитело представляет собой производное. Термин «производное» относится к молекуле, которая включает химическую модификацию, отличную от вставки, делеции или замещения аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления производные содержат ковалентные модификации, в том числе без ограничения химическое связывание с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированный антигенсвязывающий белок может иметь больший период полужизни из кровотока, чем антигенсвязывающий белок, который химически не модифицирован. В некоторых вариантах осуществления химически модифицированный антигенсвязывающий белок может обладать улучшенной способностью нацеливания на желаемые клетки, ткани и/или органы. В некоторых вариантах осуществления производный антигенсвязывающий белок ковалентно модифицирован для включения в себя одного или более растворимых в воде полимерных средств прикрепления, в том числе без ограничения полиэтиленгликоль, полиоксипропиленгликоль или полипропиленгликоль. См., например, патенты США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337. В некоторых вариантах осуществления производное антигенсвязывающего белка содержит один или более полимеров, включая, но не ограничиваясь ими, монометоксиполиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, поли-1, 3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксида/окиси этилена, полиоксипропиленгликолевые полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси таких полимеров.

[0325] В определенных вариантах осуществления производное ковалентно модифицировано субъединицами полиэтиленгликоля (ПЭГ). В определенных вариантах осуществления один или более водорастворимых полимеров связаны в одном или более определенных положениях, например, на амино-конце производного. В определенных вариантах осуществления один или более водорастворимых полимеров случайным образом присоединены к одной или более боковым цепям производного. В определенных вариантах осуществления ПЭГ используется для улучшения терапевтического потенциала антигенсвязывающего белка. В определенных

вариантах осуществления ПЭГ используют для улучшения терапевтического потенциала гуманизированного антитела. Некоторые такие способы обсуждаются, например, в патенте США № 6133426, который включен в данный документ посредством ссылки для любых целей.

[0326] Пептидные аналоги широко применяются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными лекарственным средствам с пептидом матрицы. Данные типы непептидного соединения называются «пептидные миметики» или «пептидомиметики». Fauchere, *J. Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); и Evans *et al. J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987), которая включена в данный документ посредством ссылки для любых целей. Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютерного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, структурно сходные с терапевтически полезными пептидами, могут быть использованы для получения аналогичного терапевтического или профилактического эффекта. Как правило, пептидомиметики структурно аналогичны эталонному полипептиду (т. е. полипептиду, обладающему биохимическими свойствами или фармакологической активностью), такому как человеческое антитело, но имеют одну или более пептидных связей, необязательно замененных связью, выбранной из: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (цис и транс), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, and $-\text{CH}_2\text{SO}-$, при помощи способов, хорошо известных в данной области техники. Систематическую замену одной или более аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой того же типа (например, D-лизин вместо L-лизина) можно использовать для создания более стабильных пептидов. Кроме того, ограниченные пептиды, содержащие консенсусную последовательность или по существу идентичную вариацию консенсусной последовательности, могут быть получены способами, известными в данной области техники (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.*, 61:387 (1992), включенный в данный документ посредством ссылки для любых целей); например, путем добавления внутренних остатков цистеина, способных образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют пептид.

[0327] Конъюгация лекарственного средства включает связывание биологически активной цитотоксической (противоопухолевой) нагрузки или лекарственного средства с антителом, которое специфически нацелено на определенный опухолевый маркер (например, полипептид, который в идеале должен быть обнаружен только в опухолевых клетках или на них). Антитела отслеживают эти белки в организме и прикрепляются к поверхности раковых клеток. Биохимическая реакция между антителом и целевым белком (антигеном) запускает сигнал в опухолевой клетке, которая затем поглощает или интернализует антитело вместе с цитотоксином. После того, как ADC усваивается, цитотоксическое лекарственное средство высвобождается и уничтожает рак. Благодаря такому нацеливанию лекарственное средство в идеале имеет меньшие побочные эффекты и дает более широкое терапевтическое окно, чем другие химиотерапевтические агенты. Описанные способы конъюгирования антител известны в данной области техники (см., например, Jane de Lartigue *OncLive* July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; и Ducry *et al. Bioconjugate Chemistry* 21 (1):5-13 (2010).

III. Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

[0328] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению могут быть получены с использованием рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567. В некоторых вариантах осуществления представлены выделенные нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, кодирующую любое из антител к MS4A4A по настоящему изобретению. Такие нуклеиновые кислоты могут кодировать аминокислотную последовательность, содержащую V_L , и/или аминокислотную последовательность, содержащую V_H антитела к MS4A4A (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В некоторых вариантах осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащие такие нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления также

предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансдуцирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую V_L антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую V_H антитела, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую V_L антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую V_H антитела. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). Клетки-хозяева по настоящему изобретению также включают, без ограничения, выделенные клетки, клетки, культивируемые *in vitro*, и клетки, культивируемые *ex vivo*.

[0329] Предложены способы получения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина согласно настоящему изобретению, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к MS4A4A, в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

[0330] Для рекомбинантного получения антитела к MS4A4A по настоящему изобретению нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к MS4A4A, выделяют и вставляют в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, которые кодируют тяжелые и легкие цепи антитела).

[0331] Подходящие векторы, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител к MS4A4A по настоящему изобретению, или их экспрессируемые на клеточной поверхности фрагменты или полипептиды (включая антитела), описанные в данном документе, включают, без ограничения, векторы клонирования и векторы экспрессии. Подходящие векторы для клонирования могут быть сконструированы в соответствии со стандартными методами или могут быть выбраны из большого числа векторов клонирования, доступных в данной области техники. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, которую предполагается использовать, полезные векторы клонирования, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут иметь единственную мишень для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фага и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen.

[0332] Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитело, включают прокариотические или эукариотические клетки. Например, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению могут продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях (см., например, патенты США № 5648237, 5789199, и 5840523. После экспрессии антитело можно выделять из бактериальной биомассы в растворимую фракцию, а затем можно подвергать дальнейшей очистке.

[0333] В дополнение к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или

дрожжи, также являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии для векторов, кодирующих антитела, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к продукции антител с частичным или полностью человеческим профилем гликозилирования (*например*, Gerngross *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); и Li *et al. Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

[0334] Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии гликозилированного антитела, также можно получать из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в сочетании с клетками насекомых, особенно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Культуры растительных клеток также можно использовать в качестве хозяев (*например*, патенты США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429, в которых описана технология PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

[0335] В качестве хозяев также можно использовать клетки позвоночных. *Например*, можно использовать линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами подходящих клеточных линий клеток млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная при помощи SV40 (COS-7); линия эмбриональных клеток почки человека (293 или клетки 293, как описано, *например*, в Graham *et al. J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (клетки TM4, описанные, *например*, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, *например*, в Mather *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие подходящие линии клеток млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., *например*, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

IV. Фармацевтические композиции/составы

[0336] В данном документе предложены фармацевтические композиции и/или фармацевтические составы, содержащие антитела к MS4A4A по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0337] В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый носитель предпочтительно нетоксичен для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Описанные в данном документе антитела могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах. Примеры таких составов включают, без ограничения, таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, суппозитории, инъекции, ингаляторы, гели, микросферы и аэрозоли. Фармацевтические приемлемые носители могут включать, в зависимости от желаемого состава, фармацевтически приемлемые нетоксичные носители разбавителей, которые представляют собой носители, как правило, используемые для приготовления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы состава для модификации, поддержания или сохранения, *например*, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиций.

[0338] В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные препараты; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, натрий сульфит или натрий гидросульфит); буферы (такие как борат, бикарбонат, трис-HCl, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты); наполнители (такие как маннит или глицин), хелатирующие агенты (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)); комплексообразующие агенты (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); красители; ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); полипептиды с низкой молекулярной массой; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенэтиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбитол); суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты (такие как плуроники, ПЭГ, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат-20, полисорбат-80, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); агенты, повышающие стабильность (такие как сахароза или сорбитол); агенты, повышающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); средство доставки; разбавители; эксципиенты и/или фармацевтические адъюванты. Дополнительные примеры составов, подходящих для различных типов введения, можно найти в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Pharmaceutical Press 22nd ed. (2013). Для краткого обзора способов доставки лекарственных средств см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990).

[0339] Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты.

[0340] Составы могут быть оптимизированы для удержания и стабилизации в головном мозге или центральной нервной системе. Когда агент вводят в полость черепа, желательно, чтобы агент удерживался в полости, а не диффундировал или иным образом не пересекал гематоэнцефалический барьер. Методы стабилизации включают сшивание, мултимеризацию или связывание с такими группами, как полиэтиленгликоль, полиакриламид, нейтральные белковые носители и т.д., для достижения увеличения молекулярной массы.

[0341] Другие стратегии увеличения удерживания включают захват антитела, такого как антитело к MS4A4A по настоящему изобретению, в биоразрушаемый или биоразлагаемый имплантат. Скорость высвобождения терапевтически активного агента контролируется скоростью транспорта через полимерную матрицу и биоразложением имплантата. Имплантаты могут быть частицами, листами, пластырями, бляшками, волокнами, микрокапсулами и т.п. и могут иметь любой размер или форму, совместимую с выбранным местом введения. Биоразлагаемые полимерные композиции, которые могут быть использованы, могут быть органическими сложными или простыми эфирами, которые при разложении приводят к физиологически приемлемым продуктам разложения, включая мономеры. Ангидриды, амиды, сложные ортоэфиры и т.п. сами по себе или в комбинации с другими мономерами могут найти применение. Полимеры будут полимерами

конденсации. Полимеры могут быть сшитыми или несшитыми. Особый интерес представляют полимеры гидроксиалифатических карбоновых кислот, либо гомо-, либо сополимеры и полисахариды. В число представляющих интерес сложных полиэфиров входят полимеры D-молочной кислоты, L-молочной кислоты, рацемической молочной кислоты, гликолевой кислоты, поликапролактона и их комбинации. Среди представляющих интерес полисахаридов альгинат кальция и функционализированные целлюлозы, особенно сложные эфиры карбоксиметилцеллюлозы, характеризующиеся тем, что они нерастворимы в воде, с молекулярной массой от около 5 кДа до 500 кДа и т.д. Биоразлагаемые гидрогели также могут быть использованы в имплантатах по данному изобретению. Гидрогели обычно представляют собой сополимерный материал, характеризующийся способностью впитывать жидкость.

V. Применение в терапевтических целях

[0342] Как раскрывается в данном документе, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению можно использовать для предотвращения, снижения риска или лечения заболеваний и расстройств. В некоторых вариантах осуществления антитело к MS4A4A по настоящему изобретению эффективно для профилактики, снижения риска или лечения болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом и когнитивных нарушений.

MS4A4A как ассоциированная с заболеванием мишень

[0343] Полногеномный поиск ассоциаций выявил, что различные члены семейства MS4A связаны с болезнью Альцгеймера. Это MS4A2, MS4A3, MS4A4A, MS4A4E, MS4A6A и MS4A6E. Ассоциированные SNP обнаружены в 3'-UTR MS4A6A (rs610932) и в межгенной области между MS4A4E и MS4A6A (rs670139). В кластере генов MS4A есть три SNP, которые связаны с повышенным риском болезни Альцгеймера с поздним началом. К ним относятся rs4938933 в MS4A4A, rs670139 в MS4A4E и rs610932 в MS4A6A (Hollingworth *et al*, 2011, Nat Genetics, 43:429-435; Naj *et al*, 2011, Nature Genetics, 43:436-441; Antunez *et al*, 2011, Genome Medicine, 3, article 33). Кроме того, SNP локуса MS4A4A (rs2304933 и rs2304935) ассоциированы с более высокими уровнями MS4A4A и повышенным риском болезни Альцгеймера, включая болезнь Альцгеймера с поздним началом (LOAD) (Allen *et al*, 2012, Neurology, 79:221-228).

[0344] Представленные в данном документе способы находят применение для профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего нейродегенеративное заболевание, нарушение или патологическое состояние. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего нейродегенеративное заболевание, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A.

[0345] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего болезнь Альцгеймера, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A.

[0346] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего болезнь Альцгеймера с поздним началом, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A.

[0347] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего умеренное когнитивное нарушение, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A.

[0348] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или патологическое состояние, связанное со сверхэкспрессией или повышенной активностью MS4A4A, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A.

[0349] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего обусловленное дефицитом CSF1R заболевание или расстройство, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A. В некоторых вариантах осуществления обусловленное дефицитом CSF1R заболевание или расстройство представляет собой лейкоэнцефалопатию взрослых с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP) или наследственную диффузную лейкоэнцефалопатию со сфероидными (HDLS).

[0350] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способу профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, легких когнитивных нарушений, сосудистой деменции, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, черепно-мозговой травмы, травмы спинного мозга, длительной депрессии, атеросклеротических заболеваний сосудов, нежелательных симптомов нормального старения, деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Гентингтона, таупатии, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, малярии, эссенциального тремора, красной волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, остеохондроза, синдрома Шай-Дрейгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикальной базально-ганглиозной дегенерации, острого диссеминированного энцефаломиелимита, гранулематозных заболеваний, саркоидоза, болезней старения, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, воспалительных заболеваний, артрита, рассеянного склероза, нарушения обмена веществ, ожирения, резистентности к инсулину, диабета 2 типа, повреждения тканей или сосудов, травмы, воспалительного клеточного дебриса или белковых агрегатов, аномальных циркулирующих миелиноидных клеток, нездорового старения, возрастных когнитивных нарушений, возрастной атрофии головного мозга, возрастных признаков, включая, помимо прочего, воспаление, потерю нейронов и когнитивные нарушения, такие как когнитивные нарушения при отсутствии известного заболевания головного мозга, включая когнитивные нарушения лобной коры головного мозга у пожилых людей и, один или более нежелательных симптомов нормального старения, причем способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A по любому из предыдущих вариантов осуществления. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителу к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, черепно-мозговой травмы, травмы спинного мозга, длительной депрессии, атеросклеротических заболеваний сосудов, нежелательных симптомов нормального старения, деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Гентингтона, таупатии, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, болезни Крона,

воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, малярии, эссенциального тремора, красной волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, остеохондроза, синдрома Шай-Дрейгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикальной базально-ганглиозной дегенерации, острого диссеминированного энцефаломиелита, гранулематозных заболеваний, саркоидоза, болезней старения, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, воспалительных заболеваний, артрита, рассеянного склероза, нарушения обмена веществ, ожирения, резистентности к инсулину, диабета 2 типа, повреждения тканей или сосудов, травмы, воспалительного клеточного дебриса или белковых агрегатов, аномальных циркулирующих миелоидных клеток, нездорового старения, возрастных когнитивных нарушений, возрастной атрофии головного мозга, возрастных признаков, включая, помимо прочего, воспаление, потерю нейронов и когнитивные нарушения, такие как когнитивные нарушения при отсутствии известного заболевания головного мозга, включая когнитивные нарушения лобной коры головного мозга у пожилых людей и один или более нежелательных симптомов нормального старения. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителу к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления для применения в предотвращении или уменьшении метастазирования. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителу к MS4A4A в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для применения в предотвращении, снижении риска или лечения индивидуума, имеющего злокачественное новообразование.

[0351] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к применению антитела к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления в производстве лекарственного препарата для профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом, легких когнитивных нарушений, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, черепно-мозговой травмы, травмы спинного мозга, длительной депрессии, атеросклеротических заболеваний сосудов, нежелательных симптомов нормального старения, деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Гентингтона, таупатии, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, малярии, эссенциального тремора, красной волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, остеохондроза, синдрома Шай-Дрейгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикальной базально-ганглиозной дегенерации, острого диссеминированного энцефаломиелита, гранулематозных заболеваний, саркоидоза, болезней старения, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, воспалительных заболеваний, артрита, рассеянного склероза, нарушения обмена веществ, ожирения, резистентности к инсулину, диабета 2 типа, повреждения тканей или сосудов, травмы, воспалительного клеточного дебриса или белковых агрегатов, аномальных циркулирующих миелоидных клеток, нездорового старения, возрастных когнитивных нарушений, возрастной атрофии головного мозга, возрастных признаков, включая, помимо прочего, воспаление, потерю нейронов и когнитивные нарушения, такие как когнитивные нарушения при отсутствии известного заболевания головного мозга, включая когнитивные нарушения лобной коры головного мозга у пожилых людей и один или более нежелательных симптомов нормального старения. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способу профилактики, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или

повреждение, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом, легких когнитивных нарушений, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, бокового амиотрофического склероза, черепно-мозговой травмы, повреждения спинного мозга, деменции, инсульта, болезни Паркинсона, острого диссеминированного энцефаломиелита, дегенерации сетчатки, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, рассеянного склероза, септического шока, бактериальной инфекции, артрита и остеоартрита, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к антителу к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления для применения в предотвращении, снижении риска или лечении индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом, легких когнитивных нарушений, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, бокового амиотрофического склероза, черепно-мозговой травмы, повреждения спинного мозга, деменции, инсульта, болезни Паркинсона, острого диссеминированного энцефаломиелита, дегенерации сетчатки, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, рассеянного склероза, септического шока, бактериальной инфекции, артрита и остеоартрита. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к применению антитела к MS4A4A по любому из предшествующих вариантов осуществления в производстве лекарственного препарата для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из группы, состоящей из лобно-височной деменции, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, бокового амиотрофического склероза, черепно-мозговой травмы, повреждения спинного мозга, деменции, инсульта, болезни Паркинсона, острого диссеминированного энцефаломиелита, дегенерации сетчатки, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, рассеянного склероза, септического шока, бактериальной инфекции, артрита и остеоартрита.

[0352] В некоторых вариантах осуществления субъект или индивидуум представляет собой млекопитающее. Млекопитающие включают, без ограничения, домашних животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и отличных от человека приматов, таких как обезьяны), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В некоторых вариантах осуществления субъект или индивидуум представляет собой человека.

[0353] Предусмотренное в данном документе антитело (и любой дополнительный терапевтический агент) можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральный, внутрилегочный, интраназальный, внутриочаговый, интрацереброспинальный, внутрочерепной, внутриспинальный, интрасиновиальный, интратекальный, пероральный, местный или ингаляционный пути. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное введение в виде болюса или непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутриартериальное, внутрисуставное, внутрибрюшинное или подкожное введение. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой внутривенное введение. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется подкожно. Введение дозы может осуществляться любым подходящим путем, *например*, инъекциями, такими как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение краткосрочным или хроническим. В данном документе предусмотрены различные схемы введения дозы, включая, помимо прочего, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и пульсовую инфузию.

[0354] Предоставленные в данном документе антитела могут быть составлены, дозированы и введены в

соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в этом контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Антитело необязательно должно быть, но может быть составлено с одним или более агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Они, как правило, используются в тех же дозировках и с путями введения, как описано в данном документе, или приблизительно от 1 до 99% дозировок, описанных в данном документе, или в любой дозировке и любым путем, который эмпирически/клинически определен как подходящий.

[0355] Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза антитела по изобретению (при использовании отдельно или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, типа антитела, степени тяжести и течения заболевания, того, вводится ли антитело в профилактической или терапевтической целью, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, а также предписания лечащего врача. Антитело легко вводить пациенту однократно или в течение серии курсов лечения.

[0356] В зависимости от типа и степени тяжести заболевания от около 1 мкг/кг до 100 мг/кг антитела может быть начальной предполагаемой дозой для введения пациенту, независимо от того, например, одним или более отдельными введениями или непрерывной инфузией. Одна типичная суточная доза может находиться в диапазоне от около 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от вышеуказанных факторов. В случае повторных введений в течение нескольких суток или более, в зависимости от состояния, лечение, как правило, проводят до достижения желаемой степени подавления симптомов заболевания. Одна типичная доза антитела может находиться в диапазоне от около 0,05 мг/кг до около 150 мг/кг, которую можно вводить пациенту с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, так, чтобы пациент получал от около двух до около двадцати или, например, около шести доз антитела). В определенных вариантах осуществления частота дозирования составляет три раза в сутки, два раза в сутки, один раз в сутки, один раз каждые двое суток, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель, один раз в девять недель, один раз в десять недель или один раз в месяц, один раз в два месяца, один раз в три месяца или дольше. Может быть введена начальная более высокая нагрузочная доза, за которой следует одна или несколько более низких доз. Однако могут быть полезны другие схемы применения. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью обычных методов и тестов.

VI. Диагностическое применение

[0357] В некоторых вариантах осуществления любого из антител, любое из представленных в данном документе антител к MS4A4A полезно для обнаружения присутствия MS4A4A в образце или у индивидуума. В контексте данного документа термин «обнаружение» включает количественное или качественное обнаружение. В данном документе предложены способы применения антител по настоящему изобретению для диагностических целей, таких как обнаружение MS4A4A у индивидуума или в образцах тканей, полученных от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека.

[0358] Метод обнаружения может включать количественную оценку антиген-связанного антитела. Обнаружение антител в биологических образцах может происходить любым методом, известным в данной области техники, включая иммунофлуоресцентную микроскопию, иммуноцитохимию, иммуногистохимию,

ИФА, анализ FACS, иммунопреципитацию или микропозитронно-эмиссионную томографию. В определенных вариантах осуществления антитело мечено радиоактивным изотопом, например, ^{18}F , а затем обнаружено с использованием анализа микропозитронной эмиссионной томографии. Связывание антител также может быть количественно определено у пациента с помощью неинвазивных методов, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), рентгеновская компьютерная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), компьютерная томография (КТ) и компьютерная аксиальная томография (КОТ).

VII. Промышленные изделия

[0359] В данном документе представлены промышленные изделия (например, набор), содержащие описанное в данном документе антитело к MS4A4A. Промышленное изделие может содержать один или более контейнеров, содержащих описанное в данном документе антитело. Контейнеры могут представлять собой любую подходящую упаковку, включая, помимо прочего, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Контейнеры могут быть стандартными дозами, упаковками со множеством доз (например, многодозовыми упаковками) или частичными дозами.

[0360] В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно содержать второй агент. В некоторых вариантах осуществления второй агент представляет собой фармацевтически приемлемый буфер или разбавляющий агент, включая, но не ограничиваясь ими, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. В некоторых вариантах осуществления второй агент представляет собой фармацевтически активный агент.

[0361] В некоторых вариантах осуществления любого из промышленных изделий, промышленное изделие дополнительно содержит инструкции по применению в соответствии со способами по данному изобретению. Инструкции, как правило, включают информацию о дозировке, схеме применения препарата и способе введения для предполагаемого лечения. В некоторых вариантах осуществления эти инструкции содержат описание применения выделенного антитела по настоящему изобретению (например, антитела к MS4A4A, описанного в данном документе) для предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или повреждение, выбранное из лобно-височной деменции, болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом, снижения когнитивных функций или когнитивного нарушения, легких когнитивных нарушений, сосудистой деменции, сосудистой деменции, судорог, дистрофии сетчатки, черепно-мозговой травмы, травмы спинного мозга, длительной депрессии, атеросклеротических заболеваний сосудов, нежелательных симптомов нормального старения, деменции, смешанной деменции, болезни Крейтцфельда-Якоба, нормотензивной гидроцефалии, бокового амиотрофического склероза, болезни Гентингтона, таупатии, инсульта, острой травмы, хронической травмы, волчанки, острого и хронического колита, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, малярии, эссенциального тремора, красной волчанки центральной нервной системы, болезни Бехчета, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, остеохондроза, синдрома Шай-Дрейгера, прогрессирующего надъядерного паралича, кортикальной базально-ганглиозной дегенерации, острого диссеминированного энцефаломиелимита, гранулематозных заболеваний, саркоидоза, болезней старения, возрастной макулярной дегенерации, глаукомы, пигментного ретинита, дегенерации сетчатки, инфекции дыхательных путей, сепсиса, глазной инфекции, системной инфекции, воспалительных заболеваний, артрита, рассеянного склероза, нарушения обмена веществ, ожирения, резистентности к инсулину, диабета 2 типа, повреждения тканей или сосудов, травмы, воспалительного клеточного дебриса или белковых агрегатов, аномальных циркулирующих миелоидных клеток, нездорового старения, возрастных когнитивных нарушений, возрастной атрофии головного мозга, возрастных признаков, включая, помимо прочего, воспаление, потерю

нейронов и когнитивные нарушения, такие как когнитивные нарушения при отсутствии известного заболевания головного мозга, включая когнитивные нарушения лобной коры головного мозга у пожилых людей и, один или более нежелательных симптомов нормального старения, который включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела к MS4A4A по любому из предыдущих вариантов осуществления.

[0362] В некоторых вариантах осуществления инструкции включают инструкции по применению антитела к MS4A4A и второго агента (например, второго фармацевтически активного агента).

[0363] Данное изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения. Все цитаты во всем описании включены в данный документ в качестве ссылки.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1: Гуманизация мышиных антител к MS4A4A

[0364] Цель этого примера заключалась в создании гуманизованных вариантов некоторых исходных мышиных антител к MS4A4A, описанных в международной патентной заявке с серийным номером PCT/US2019/016156.

[0365] Исходное мышиное антитело к MS4A4A 4A-202 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVKRPGQGLEWIGATHPGHGDTRYTQKFKGKATLSADKSSSTAYMQLSNLASEDSAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDVWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:164), и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGVFSFMNWFQKPGQPPKLLIYGASNQSGVPAFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:165).

[0366] Исходное мышиное антитело к MS4A4A 4A-18 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKRPGQGLEWIGNINPTNGGTNYNERFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARAYYYGSSLFAYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:166), и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWSQQKPGQSPKLLIYSASYRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNMQSEDLADYFCQQYSTYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:167).

[0367] Исходное мышиное антитело к MS4A4A 4A-21 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTSYGLSWVKQTPGKGLKWMGWINTYSGVPTYANDFKGRFAFSLETSASTTYLRINNLKNDTATYFCARSLVDYWGGQTPLTVSS (SEQ ID NO:168), и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: DVVMTQTPFTLSVTIGQSASISCKSSQSLLYSDGKTYLSWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:169).

[0368] Исходное мышиное антитело к MS4A4A 4A-25 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: QVTLKESGPILQPSQTLTLTCSFGFSLRTSDMGVGVWRQPSGEGLEWLADIWDDNKYYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRANYGNLFDYWGGGTAVTVSS (SEQ ID NO:170), и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

DIVMTQSLKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRSAAVWYQQKPGQSPKVLIIYWASNRHTGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:171).

[0369] Одним из способов гуманизации нечеловеческих антител является трансплантация CDR нечеловеческого (например, мышинового) антитела на акцепторный каркас антитела человека. Такая трансплантация CDR может привести к ослаблению или полной потере аффинности гуманизированного антитела к его мишени из-за нарушения его каркаса. В результате может потребоваться замена некоторых аминокислотных остатков в каркасе человеческого антитела аминокислотными остатками из соответствующих положений каркаса мышинового антитела (обратные мутации) для восстановления ослабленной или утраченной аффинности. Таким образом, аминокислотные остатки, подлежащие замене в контексте выбранного акцепторного каркаса зародышевой линии антитела человека, должны быть определены таким образом, чтобы гуманизированное антитело по существу сохраняло функции и паратопы. Кроме того, сохранение или улучшение термической стабильности и растворимости желательны для хорошей технологичности и дальнейшей разработки.

[0370] Соответственно, структурное моделирование антител было применено в процессе гуманизации мышинных моноклональных антител MS4A4A 4A-202, 4A-18, 4A-21 и 4A-25 с использованием модуля BioMOE MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Монреаль, Канада). Вкратце, аминокислотные последовательности VH и VL мышинных моноклональных антител, подлежащих гуманизации, сравнивали с функциональными аминокислотными последовательностями зародышевой линии человека VL, VH, LJ, HJ, взятыми из IMGT (<http://www.imgt.org/>). Псевдогены и OPC были исключены из анализа. На одно мышинное моноклональное антитело (искомое) были отобраны пять наиболее сходных аминокислотных последовательностей зародышевой линии VL и пять наиболее сходных VH, которые были объединены с наиболее сходными генами VJ и HJ, что дало 25 гуманизированных аминокислотных последовательностей. CDR для трансплантации в человеческий каркас определяли в соответствии с определением AbM (<http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrdef>).

[0371] Искомую последовательность и 25 гуманизированных аминокислотных последовательностей использовали для создания моделей гомологии Fv с использованием модуля BioMOE или модуля Antibody Modeler MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Монреаль, Канада). Анализ силовых полей AMBER10:ENT использовали для минимизации энергии в течение всего процесса моделирования гомологии антител. На основе полученных моделей гомологии Fv были рассчитаны, проанализированы и отсортированы молекулярные дескрипторы, такие как энергия взаимодействия между VL и VH, изoeлектрическая точка на основе координат (3D pI), гидрофобное пятно и площадь заряженной поверхности, и отсортированы с помощью показателей оценки, предоставленных MOE. Эти молекулярные дескрипторы использовались для определения приоритетности гуманизированных моноклональных антител для последующих экспериментальных процедур, включая экспрессию белков, очистку, исследования аффинности связывания и функциональные анализы.

[0372] Модуль BioMOE MOE предоставляет инструмент «Свойства сайта мутации» для визуализации и классификации потенциальных остатков для обратной мутации. В этом контексте обратная мутация определяется как аминокислотная замена, которая возвращается к исходной искомой аминокислотной последовательности путем замены гуманизированной аминокислотной последовательности. С помощью этого инструмента исходный запрос (эталон) сравнивали по отдельности с выбранными гуманизированными вариантами как по первичной аминокислотной последовательности, так и по 3D структуре 3D модели гомологии Fv.

[0373] Изменения между эталонным (т. е. исходным) антителом и гуманизированным вариантом классифицировали на основе различий в типах аминокислот, потенциала взаимодействия с остатками CDR, потенциала воздействия для спаривания VL/VH и потенциального изменения гидрофобной и заряженной площади поверхности в области CDR и вблизи нее.

[0374] Мутации рядом с CDR или поверхности взаимодействия VL/VH, имеющие значительную разницу в заряде или имеющие сильные взаимодействия на основе водородных связей, оценивали по отдельности, и мутации со значительным нарушением возвращали к исходным искомым остаткам. В результате гуманизированные аминокислотные последовательности могут содержать до пяти обратных мутаций. Аминокислотные последовательности для вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи искомым мышинных моноклональных антител (мышинное антитело к MS4A4A 4A-202, мышинное антитело к MS4A4A 4A-18, мышинное антитело к MS4A4A 4A-21 и мышинное антитело к MS4A4A 4A-25) и гуманизированных моноклональных антител с обратными мутациями или без них представлены в **таблицах 1-4** ниже. В **таблицах 1-4**, последовательности CDR (Kabat) подчеркнуты.

ТАБЛИЦА 1

Антитело	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-202	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCK ASGYTFTNYWMQWVKRPGQG LEWIGATHPGHGDTRYTQKFKGK ATLSADKSSSTAYMQLSNLASED SAVYYCAREEVYYGFRSYWYFD YWGRGTLTVSS	4	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS ESVDNYGVSEFMNWFQKPGQPPKL LIYGASNQSGVGPARGSGSGGTDF SLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPP TFGGGTKLEIK	16
4A-301	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFKQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY FDVWGRGTLTVSS	5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SESVDNYGVSEFMNWFQKPGQPP KLLIYGASNQSGVGPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEV PPTFGGGTKVEIK	17
4A-302	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFKQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY FDVWGRGTLTVSS	5	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS ESVDNYGVSEFMNWFQKPGQAPR LLIYGASNQSGIPARGSGSGGTDF TLTISLEPEDFAVYYCQQSKEVPPT FGGGTKVEIK	18
4A-303	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYTFTNYWMQWVRQMPGKG LEWMGATHPGHGDTRYSPSFQG QVTISADKSISTAYLQWSSSLKASD	6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SESVDNYGVSEFMNWFQKPGQPP KLLIYGASNQSGVGPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQQSKEV	17

Антител о	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
	<u>TAMYYCAREEVYYGFRSYWYFD</u> <u>VWGRGTLTVSS</u>		<u>PPTFGGGTKVEIK</u>	
4A-304	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ <u>GRVTMTRDSTSTVYMELSSLRS</u> EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS <u>ESVDNYGVSEFMNWYQQKPGQAPR</u> LLIYGASNQSGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	19
4A-305	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK VSGYTFTNYWMQWVQQAPGKG LEWMGATHPGHGDTRYAEKFQG RVTITADTSTDATYMESSLRSED TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFD <u>VWGRGTLTVSS</u>	7	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SESVDNYGVSEFMNWYQQKPGQPP</u> KLLIYGASNQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEV</u> <u>PPTFGGGTKVEIK</u>	17
4A-306	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ <u>GRVTMTRDSTSTVYMELSSLRS</u> EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS <u>ESVDNYGVSEFMNWYQQKPGKAPK</u> LLIYGASNQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQSKEVPP</u> <u>TFGGGTKVEIK</u>	20
4A-307	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ <u>GRVTMTADKSTSTVYMELSSLRS</u> EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SESVDNYGVSEFMNWYQQKPGQPP</u> KLLIYGASNQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEV</u> <u>PPTFGGGTKVEIK</u>	17
4A-308	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ <u>GRVTMTADKSTSTAYMELSSLRS</u> EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA <u>SESVDNYGVSEFMNWYQQKPGQPP</u> KLLIYGASNQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEV</u> <u>PPTFGGGTKVEIK</u>	17

Антите- л о	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-309	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ GRVTLTADKSISTAYMELSLRSD DTVVYYCAREEVYYGFRSYWYF DYWGRGTLTVSS	10	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS ESVDNYGVSEFMNWWYQQKPGQAPR LLIYGASNQSGGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPPT FGGGTKVEIK	18
4A-310	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYTFTNYWMQWVRQMPGKG LEWMGATHPGHGDTRYSPSFQ QVTISADKSSSTAYLQWSSLKAS DTAMYYCAREEVYYGFRSYWYF DYWGRGTLTVSS	11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SESVDNYGVSEFMNWWYQQKPGQPP KLLIYGASNQSGGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEV PPTFGGGTKVEIK	17
4A-311	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK VSGYTFTNYWMQWVQQAPGKG LEWMGATHPGHGDTRYAEKFQ RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFD YWGRGTLTVSS	12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRA SESVDNYGVSEFMNWWYQQKPGQPP KLLIYGASNQSGGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEV PPTFGGGTKVEIK	17
4A-312	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREEVDYGFRSYWY FDYWGRGTLTVSS	13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS ESVDNYGVSEFMNWWYQQKPGQAPR LLIYGASNQSGGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPPT FGGGTKVEIK	21
4A-313	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY FDLWGRGTLTVSS	14	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS ESVDNYGVSRMNWWYQQKPGQAPR LLIYGASNQSGGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPPT FGGGTKVEIK	22
4A-314	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYWMQWVRQAPGQ GLEWMGTTLPGHGDTRYAQKFQ GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS	15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS ESVDNYGVSRMNWWYQQKPGQAPR LLIYGASNQSGGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPPT	22

Антител о	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
	EDTAVYYCAREEVYYGFRSYWY FDVWGRGTLTVSS		FGGGTKVEIK	

ТАБЛИЦА 2

Антитело	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-18	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCK ASGYTFTSYWIHWVKQRPQGGL WIGNINPTNNGGTNYNERFKSKAT LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV YYCARAYYYGSSLFAYWGQGT LTVSS	23	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITC KASQNVGTAVAWSQQKPGQSPK LLIYSASYRHTGVPDRFTGSGSGT DFTLTITNMQSEDLADYFCQQYS TYPWTFGGGKLEIK	31
4A-315	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNNGGTNYAQKFQG RVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARAYYYGSSLFAYWG QGT LTVSS	24	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGKVEIK	32
4A-316	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNNGGTNYAQKFQG RVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARAYYYGSSLFAYWG QGT LTVSS	25	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGKVEIKR	33
4A-317	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNNGGTNYAQKFQG RVTMTVDKSTSTVYMELSSLRSE DTAVYYCARAYYYGSSLFAYWG QGT LTVSS	25	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGKVEIK	32

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-318	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	26	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIKR	33
4A-319	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	26	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIK	32
4A-320	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTSTRDTSISTAYMELSRLRSDD TVVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	27	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIK	32
4A-321	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTSTRDTSISTAYMELSRLRSDD TVVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	27	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPEKAPKS LIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYSTY PWTFGGGTKVEIK	34
4A-322	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTSTVDKSISTAYMELSRLRSDD TVVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	28	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIKR	33

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-323	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTSTVDKSISTAYMELSRLSDD TVVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	28	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICK <u>ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK</u> LLIY <u>SASyrHT</u> GVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYST</u> <u>YPWTFGGG</u> TKVEIK	32
4A-324	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTSTVDKSISTAYMELSRLSDD TVVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICK <u>ASQNVGTAVAWYQQKPEKAPKS</u> LIY <u>SASyrHT</u> GVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSTY</u> <u>PWTFGGG</u> TKVEIK	35
4A-325	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQG LEWMGNINPTNGGTNYAQKFQG RVTSTVDKSISTAYMELSRLSDD TVVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	28	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITICK <u>ASQNVGTAVAWYQQKPEKAPKS</u> LIY <u>SASyrHT</u> GVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSTY</u> <u>PWTFGGG</u> TKVEIK	34
4A-326	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQRL EWMGNINPTNGGTNYSQKFQGR VTITRDTSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ TLVTVSS	29	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITICK <u>ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK</u> LLIY <u>SASyrHT</u> GVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYST</u> <u>YPWTFGGG</u> TKVEIK	32
4A-327	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQRL EWMGNINPTNGGTNYSQKFQGR VTITRDTSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAYWGQ TLVTVSS	29	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICK <u>ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK</u> LLIY <u>SASyrHT</u> GVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYST</u> <u>YPWTFGGG</u> TKVEIK	36

Антитело	Вариабельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Вариабельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-328	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQRL EWMGNINPTNNGGTNYSQKFQGR VTITVDKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAYWGQG TLVTVSS	30	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIK	37
4A-329	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQRL EWMGNINPTNNGGTNYSQKFQGR VTITVDKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAYWGQG TLVTVSS	30	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIK	32
4A-330	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQRL EWMGNINPTNNGGTNYSQKFQGR VTITVDKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAYWGQG TLVTVSS	30	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIK	38
4A-331	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYWIHWVRQAPGQRL EWMGNINPTNNGGTNYSQKFQGR VTITVDKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAYWGQG TLVTVSS	30	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQYST YPWTFGGGTKVEIK	36

ТАБЛИЦА 3

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-21	QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYIFTSYGLSWVKQTPGK GLKWMGWINTYSGVPTYAND FKGRFAFSLETSASTTYLRINN LKNDDTATYFCARSLVDYW QGTPPLTVSS	39	DVVMQTPTPFTLSVTIGQSASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWLLQRPQG SPKRLIYL VSKLDS GVDPDRFTGSG SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCW QGIDFHQTFGGGKLEIK	54
4A-332	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSLVDYW GQGTPLTVSS	40	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL VSKLDS GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGKVEIK	55
4A-333	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTTYLQIS SLKAEDTAVYYCARSLVDYW GQGTPLTVSS	41	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL VSKLDS GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGKVEIK	55
4A-334	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSLVDYW GQGTPLTVSS	40	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWLQQRPGQ PPRLLIYL VSKLDS GVDPDRFSGSG AGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGKVEIK	56
4A-335	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSLVDYW GQGTPLTVSS	40	DVVMTQTPLSSPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWLQQRPGQ PPRLLIYL VSKLDS GVDPDRFSGSG AGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGKVEIK	57
4A-336	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSLVDYW GQGTPLTVSS	40	DVVMTQTPLSSPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWLQQRPGQ PPRRLIYL VSKLDS GVDPDRFSGSG AGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGKVEIK	58

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-337	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTTYLQIS SLKAEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> W GQGTLVTVSS	41	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWLQQRPGQ</u> PPRLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDRFSGSG</u> AGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQTFGGG</u> TKVEIK	56
4A-338	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTTYLQIS SLKAEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> W GQGTLVTVSS	41	DVVMQTQTPLSSPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWLQQRPGQ</u> PPRLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDRFSGSG</u> AGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQTFGGG</u> TKVEIK	57
4A-339	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTTYLQIS SLKAEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> W GQGTLVTVSS	41	DVVMQTQTPLSSPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWLQQRPGQ</u> PPRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDRFSGSG</u> AGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQTFGGG</u> TKVEIK	58
4A-340	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAP GQRLEWMG <u>WINTYSGVPTYS</u> <u>QKFQGR</u> VTITLDTASTTYME LSSLRSEDVAVYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGTLVTVSS	42	DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDRFSGSG</u> SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQTFGGG</u> TKVEIK	59
4A-341	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAP GQRLEWMG <u>WINTYSGVPTYS</u> <u>QKFQGR</u> VTITRDTASTAYME LSSLRSEDVAVYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGTLVTVSS	43	DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDRFSGSG</u> SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQTFGGG</u> TKVEIK	59
4A-342	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>KFQGR</u> VTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDVAVYYCAR <u>SLVDY</u> W GQGTLVTVSS	44	DVVMQTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDRFSGSG</u> SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQTFGGG</u> TKVEIK	60

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-343	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMGW <u>WINTYSGVPTYA</u> <u>KFQGR</u> VTMTLDTSTSTTYMEL SSLRSEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> W GQGTLVTVSS	45	DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDR</u> FSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	60
4A-344	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAP GQGLEWMGW <u>WINTYSGVPTYA</u> <u>QKFQGR</u> VTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR <u>SLVD</u> <u>YWGQ</u> GLTVTVSS	46	DVVMQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDR</u> FSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	60
4A-345	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAP GQRLEWMGW <u>WINTYSGVPTYS</u> <u>QKFQGR</u> VTITRDTASTAYME LSSLRSEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGLTVTVSS	43	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDR</u> FSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	61
4A-346	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAP GQGLEWMGW <u>WINTYSGVPTYA</u> <u>QKFQGR</u> VTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCAR <u>SLVD</u> <u>YWGQ</u> GLTVTVSS	46	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDR</u> FSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	61
4A-347	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAP GQRLEWMGW <u>WINTYSGVPTYS</u> <u>QKFQGR</u> VTITLDTASTTYME LSSLRSEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGLTVTVSS	42	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDR</u> FSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	61
4A-348	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMGW <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>KFQGR</u> VTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDTAVYYCAR <u>SLVDY</u> W GQGTLVTVSS	44	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWYLQKPGQ</u> PPQLLIY <u>L</u> VSKLD <u>SGVPDR</u> FSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	61

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-349	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ KFQGRVTMTLDTSTSTTYMEL SSLRSEDТАVYYCARS�VDYW GQGTЛVTVSS	45	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWYЛQKPGQ PPQLLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	61
4A-350	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDТАVYYCARTLADYW GQGTЛVTVSS	47	DVVMТQSPLSLPVTЛGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	55
4A-351	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDТАVYYCARTLADYW GQGTЛVTVSS	47	DVVMТQSPLSLPVTЛGQPASISCK SSRSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	62
4A-352	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDТАVYYCARTLADYW GQGTЛVTVSS	47	DVVMТQSPLSLPVTЛGQPASISCK SSRSLLYSGGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	63
4A-353	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDТАVYYCARTLADYW GQGTЛVTVSS	47	DVVMТQSPLSLPVTЛGQPASISCK SSRSLLYSEGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	64
4A-354	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDТАVYYCARTLADYW GQGTЛVTVSS	47	DVVMТQSPLSLPVTЛGQPASISCK SSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	65

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-355	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLADYW GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSSGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	66
4A-356	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLADYW GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSQGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	67
4A-357	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLADYW GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYE V SKLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	68
4A-358	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLADYW GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIRFHQTFGGGTKVEIK	69
4A-359	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLADYW GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK ASQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLD S GVDPDRFSGSG SGADFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	70
4A-360	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLADYW GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SGQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SRLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	71

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-361	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCART <u>LADY</u> W GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ</u> SPRRLIY <u>L</u> SKLESGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	72
4A-362	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCART <u>LADY</u> W GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ</u> SPRRLIY <u>L</u> VSRLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	73
4A-363	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFT <u>SYGL</u> SWVRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCART <u>LADY</u> W GQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ</u> SPRRLIY <u>L</u> SKLSSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	74
4A-364	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFT <u>SYGL</u> SWIRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCART <u>MVDY</u> W GQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK <u>ASQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ</u> SPRRLIY <u>L</u> SKLDSGVPDRFSGSG SGADFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	70
4A-365	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFT <u>SYGL</u> SWIRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCART <u>MVDY</u> W GQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ</u> SPRRLIY <u>L</u> SKLSSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	74
4A-366	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFT <u>SYGL</u> SWIRQAPG QGLEWMG <u>WINTYSGVPTYAQ</u> <u>GFTGRFV</u> SLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCART <u>MVDY</u> W GQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK <u>SSRSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ</u> SPRRLIY <u>L</u> SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC <u>W</u> <u>QGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	62

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-367	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYGLSWIRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTMVDYW GQGTLLTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	55
4A-368	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYGLSWIRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTMVDYW GQGTLLTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLES G VPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	72
4A-369	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTSYGLSWIRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTMVDYW GQGTLLTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIRFHQTFGGGTKVEIK	69
4A-370	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLGDYW GQGTLLTVSS	49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SGQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SRLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	71
4A-371	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLGDYW GQGTLLTVSS	49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	55
4A-372	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLGDYW GQGTLLTVSS	49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSQSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SRLD S GVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	73

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-373	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLV DY W GQGT L VTVSS	50	DVVM T QSPLSLPVTLGQPASISCK SS RSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW Q G IDFHQTFGGG T KVEIK	62
4A-374	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ G F AGR F VFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARTLV DY W GQGT L VTVSS	51	DVVM T QSPLSLPVTLGQPASISCK SS RSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW Q G IDFHQTFGGG T KVEIK	62
4A-375	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSLAD Y W GQGT L VTVSS	52	DVVM T QSPLSLPVTLGQPASISCK SS RSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW Q G IDFHQTFGGG T KVEIK	62
4A-376	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSMAD Y W GQGT L VTVSS	53	DVVM T QSPLSLPVTLGQPASISCK SS RSLLYSDGKTYLSWFQQRPGQ SPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW Q G IDFHQTFGGG T KVEIK	62
4A-377	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSMAD Y W GQGT L VTVSS	53	DVVM T QSPLSLPVTLGQPASISCK SS RSLLYSGGKTYLSWFQQRPGQ SPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW Q G IDFHQTFGGG T KVEIK	63
4A-378	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSMAD Y W GQGT L VTVSS	53	DVVM T QSPLSLPVTLGQPASISCK SS RSLLYSEGKTYLSWFQQRPGQ SPRR L IYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW Q G IDFHQTFGGG T KVEIK	64

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-379	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSMADYW GQGTLLTVSS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	65
4A-380	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSMADYW GQGTLLTVSS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSSGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	66
4A-381	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYIFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTYSGVPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARSMADYW GQGTLLTVSS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSQGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYL V SKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	67

ТАБЛИЦА 4

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-25	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFS GFSLRTSDMGVGVWRQPSGEGLE WLADIWDDNKYYNP S LKSRLTI SKDTSSNQVFLKITSVD T ADTATY YCARR A NYGNLFDYWGQGTAVT VSS	75	DIVMTQSLKFMSTSVGDRVSIT CKASQNVRS A VAWYQQKPGQ SPKVLIYWASNRHTGVPDRFT GSGSGTDFTLTISNVQSEDLAD YFCLQHWN Y LTFGSGTKLEIK	85
4A-382	QVTLKESGPALVQPTQTLTLCTF SGFSLRTSDMGVSWIRQPPGEALE WLALIWDDNKYYSTSLKTRLTI SKDTSSNQVLTMTNMDPVDTA TYYCARR A NYGNLFDYWGQGT VTVSS	76	DIVLTQSPSSLSASVGDRVITC RASQNVRSALAWYQQKPGQA PKVLIYWASNRHSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQ Q HWN Y LTFGGGTKVEIK	86

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-383	QVTLKESGPTLVQPTQTLTLTCTF SGFSLRTSDMGVGVIRQPPGKAL EWLALIWWDNKKYYSPSLKSRLT ISKDTSSNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARRANYGNLFDYWGQGT LTVTVSS	77	DIVLTQSPSSLSASVGDRVITC <u>RASQNVRSALAWYQKPGQA</u> PKLLIYWASNRHSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	87
4A-384	QVTLRESGPALVQPTQTLTLTCTF SGFSLRTSDMGVSWIRQPPGEALE WLALIWWDNKKYYSTSLKTRLTI SKDTSSNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARRANYGNLFDYWGQGT LTVTVSS	78	DIVMTQSPSSMSASVGDRVIT <u>CQASQNVRSALAWYQKPGK</u> APKLLIYWASNRHTGVPSRFS GSGSGTDFTFTISLQPEDATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	88
4A-385	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTF SGFSLRTSDMGVGVIRQPPGKAL EWLALIWWDNKKYYSPSLKSRLT ITKDTSSNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARRANYGNLFDYWGQGT LTVTVSS	79	DIVMTQSPSSLSTSVGDRVIT <u>CRASQNVRSALAWYQKPEK</u> APKSLIYWASNRHSGVPSRFS GSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	89
4A-386	QVTLKESGPGLVQPTETLTLTCTF SGFSLRTSDMGVSWIRQPPGKAL EWLAHIWWDDNKSYSSTSLKSRLT ISKDTSSNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARRANYGNLFDYWGQGT LTVTVSS	80	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT <u>CRASQNVRSALAWYQKPEQ</u> APKSLIYWASNRHSGVPSRFS GSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	90
4A-387	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTF SGFSLRTSDMGVSWIRQPSGKAL EWLAHIWWDDNKSYSSTSLKSRLT ISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARRANYGNLFDYWGQGT LTVTVSS	81	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT <u>CQASQNVRSALNWKYQKPGK</u> APKLLIYWASNRHTGVPSRFS GSGSGTDFTFTISLQSEDIATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	91
4A-388	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTF SGFSLRTSDMGVSWIRQPSGEGLE WLAHIWWDDNKSYSSTSLKSRLTI SKDTSKNQVVLMTNMDPVDTA TYYCARRANYGNLFDYWGQGT LTVTVSS	82	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT <u>CQASQNVRSALNWKYQKPGK</u> APKLLIYWASNRHTGVPSRFS GSGSGTDFTFTISLQSEDIATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	91

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-389	QVTLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGFSLRTSDMGVGWIRQPPGEGL EWIGSIWWDDNKYYNPSLKSRVT ISKDTSKNQVSLKLSSVDAADTA VYYCARRANYGNLFDYWGQGTL VTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQNVRSALAWYQKPEQ APKSLIYWASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISNRHPEDFATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	92
4A-390	QVQLQESGPGLVQPSETLSLTCAV SGFSLRTSDMGVGWIRQPPGKGL EWIGSIWYDDNKYYNPSLKSRVTI SKDTSSNQFSLKLSSVTAADTAV YYCARRANYGNLFDYWGQGTLV TVSS	84	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVITIT CQASQNVRSALNHWYQKPGK APKLLIYWASNRHTGVPSRFS GSGSGTDFTFTISSLQSEDIATY YCQQHWNLYLTFGGGTKVEIK	93

[0375] Последовательности CDR по Kabat для антител к MS4A4A по настоящему изобретению представлены ниже в таблицах 5-8.

ТАБЛИЦА 5

Анти- тело	CDR -H1	S E Q ID N O:	CDR-H2	S E Q ID N O:	CDR-H3	S E Q ID N O:	CDR-L1	S E Q ID N O:	CDR- L2	S E Q ID N O:	CDR- L3	S E Q ID N O:
4A- 202	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYTQKFQK	95	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVFSMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 301	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVFSMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 302	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVFSMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 303	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYSPSFQG	97	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVFSMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 304	NY WM	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVFSMN	10 3	GAS NQG	10 5	QQSK EVPPT	10 7

Анти телю	CDR -H1	S E Q ID N O:	CDR-H2	S E Q ID N O:	CDR-H3	S E Q ID N O:	CDR-L1	S E Q ID N O:	CDR- L2	S E Q ID N O:	CDR- L3	S E Q ID N O:
	Q								S			
4A- 305	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAEKFQG	98	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 306	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 307	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 308	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 309	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 310	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYSPSFQG	97	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 311	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAEKFQG	98	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 312	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVDYGFR SYWYFDV	10 1	RASESVDN YGVSFMN	10 3	GAS NQQ S	10 6	QQSK EVPPT	10 7
4A- 313	NY WM Q	94	ATHPGHGDT RYAQKFQG	96	EEVYYGFR SYWYFDL	10 2	RASESVDN YGVSRMN	10 4	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7
4A- 314	NY WM Q	94	TTLPGHGDT RYAQKFQG	99	EEVYYGFR SYWYFDV	10 0	RASESVDN YGVSRMN	10 4	GAS NQG S	10 5	QQSK EVPPT	10 7

ТАБЛИЦА 6

Антиг ло	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR-H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A-18	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YNERFKS	10 9	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 315	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 316	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 317	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 318	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 319	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 320	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 321	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 322	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 323	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 324	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 325	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YAQKFQG	11 0	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5

Анти- ло	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR-H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A- 326	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YSQKFQG	11 1	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 327	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YSQKFQG	11 1	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 328	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YSQKFQG	11 1	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 329	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YSQKFQG	11 1	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 330	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YSQKFQG	11 1	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5
4A- 331	SY WIH	10 8	NINPTNGGTN YSQKFQG	11 1	AYYYGS SLFAY	11 2	KASQNV GTAVA	11 3	SASY RHT	11 4	QQYST YPWT	11 5

ТАБЛИЦА 7

Анти- телю	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR- H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A-21	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY ANDFKG	11 7	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 332	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 333	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 334	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4

Анти телю	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR -H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A- 335	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 336	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 337	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 338	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 339	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 340	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY SQKFQG	11 9	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 341	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY SQKFQG	11 9	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 342	SYG LS	11 6	INTYSGVPTYA QKFQG	12 0	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 343	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQKFQG	12 1	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 344	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQKFQG	12 1	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 345	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY SQKFQG	11 9	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 346	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQKFQG	12 1	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4

Анти телю	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR -H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A- 347	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY SQKFQG	11 9	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 348	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQKFQG	12 1	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 349	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQKFQG	12 1	SLV DY	12 3	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 350	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 351	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSRSLLYSD GKTYLS	13 1	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 352	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSRSLLYSG GKTYLS	13 2	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 353	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSRSLLYSE GKTYLS	13 3	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 354	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSRSLLYSA GKTYLS	13 4	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 355	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSRSLLYSS GKTYLS	13 5	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 356	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSRSLLYSQ GKTYLS	13 6	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 357	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	EVS LDS	14 0	WQGID FHQT	14 4
4A- 358	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGIR FHQT	14 5

Анти телю	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR -H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A- 359	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KASQSLLYSD GKTYLS	13 7	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 360	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSGQSLLYSD GKTYLS	13 8	LVS LDS	14 1	WQGID FHQT	14 4
4A- 361	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LES	14 2	WQGID FHQT	14 4
4A- 362	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	14 1	WQGID FHQT	14 4
4A- 363	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLA DY	12 4	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LSS	14 3	WQGID FHQT	14 4
4A- 364	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TMV DY	12 5	KASQSLLYSD GKTYLS	13 7	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 365	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TMV DY	12 5	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LSS	14 3	WQGID FHQT	14 4
4A- 366	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TMV DY	12 5	KSSRSLLYSD GKTYLS	13 1	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 367	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TMV DY	12 5	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 368	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TMV DY	12 5	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LES	14 2	WQGID FHQT	14 4
4A- 369	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TMV DY	12 5	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGIR FHQT	14 5
4A- 370	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLG DY	12 6	KSGQSLLYSD GKTYLS	13 8	LVS LDS	14 1	WQGID FHQT	14 4

Анти телю	CD R- H1	SE Q ID N O:	CDR-H2	SE Q ID N O:	CDR -H3	SE Q ID N O:	CDR-L1	SE Q ID N O:	CDR- L2	SE Q ID N O:	CDR-L3	SE Q ID N O:
4A- 371	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLG DY	12 6	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 372	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLG DY	12 6	KSSQSLLYSD GKTYLS	13 0	LVS LDS	14 1	WQGID FHQT	14 4
4A- 373	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	TLV DY	12 7	KSSRSLLYSD GKTYLS	13 1	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 374	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFAG	12 2	TLV DY	12 7	KSSRSLLYSD GKTYLS	13 1	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 375	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SLA DY	12 8	KSSRSLLYSD GKTYLS	13 1	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 376	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SMA DY	12 9	KSSRSLLYSD GKTYLS	13 1	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 377	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SMA DY	12 9	KSSRSLLYSG GKTYLS	13 2	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 378	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SMA DY	12 9	KSSRSLLYSE GKTYLS	13 3	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 379	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SMA DY	12 9	KSSRSLLYSA GKTYLS	13 4	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 380	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SMA DY	12 9	KSSRSLLYSS GKTYLS	13 5	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4
4A- 381	SYG LS	11 6	WINTYSGVPTY AQGFTG	11 8	SMA DY	12 9	KSSRSLLYSQ GKTYLS	13 6	LVS LDS	13 9	WQGID FHQT	14 4

ТАБЛИЦА 8

Анти	CDR-	SE	CDR-H2	SE	CDR-H3	SE	CDR-L1	SE	CDR-	SE	CDR-	SE
------	------	----	--------	----	--------	----	--------	----	------	----	------	----

телю	H1	Q ID N O:		Q ID N O:		Q ID N O:		Q ID N O:	L2	Q ID N O:	L3	Q ID N O:
4A-25	TSDM GVG	14 6	DIWWDDNKY YNPSLKS	14 8	RANYG NLFDY	15 4	KASQNV RSAVA	15 5	WASN RHT	15 9	QHWN YLT	16 2
4A-382	TSDM GVS	14 7	LIWWDDNKY YSTSLKT	14 9	RANYG NLFDY	15 4	RASQNV RSALA	15 6	WASN RHS	16 0	QQHW NYLT	16 3
4A-383	TSDM GVG	14 6	LIWWDDNKY YSPSLKS	15 0	RANYG NLFDY	15 4	RASQNV RSALA	15 6	WASN RHS	16 0	QQHW NYLT	16 3
4A-384	TSDM GVS	14 7	LIWWDDNKY YSTSLKT	14 9	RANYG NLFDY	15 4	QASQNV RSAVA	15 7	WASN RHT	15 9	QQHW NYLT	16 3
4A-385	TSDM GVG	14 6	LIWWDDNKY YSPSLKS	15 0	RANYG NLFDY	15 4	RASQNV RSALA	15 6	WASN RHS	16 0	QQHW NYLT	16 3
4A-386	TSDM GVS	14 7	HIWWDDNKS YSTSLKS	15 1	RANYG NLFDY	15 4	RASQNV RSALA	15 6	WASN RHS	16 0	QQHW NYLT	16 3
4A-387	TSDM GVS	14 7	HIWWDDNKS YSTSLKS	15 1	RANYG NLFDY	15 4	QASQNV RSALN	15 8	WASN RHT	15 9	QQHW NYLT	16 3
4A-388	TSDM GVS	14 7	HIWWDDNKS YSTSLKS	15 1	RANYG NLFDY	15 4	QASQNV RSALN	15 8	WASN RHT	15 9	QQHW NYLT	16 3
4A-389	TSDM GVG	14 6	SIWWDDNKY YNPSLKS	15 2	RANYG NLFDY	15 4	RASQNV RSALA	15 6	WASS LQS	16 1	QQHW NYLT	16 3
4A-390	TSDM GVG	14 6	SIWYDDNKY YNPSLKS	15 3	RANYG NLFDY	15 4	QASQNV RSALN	15 8	WASN RHT	15 9	QQHW NYLT	16 3

ПРИМЕР 2: Получение рекомбинантных растворимых полипептидов MS4A4A

[0376] Первичную аминокислотную последовательность MS4A4A человека (SEQ ID NO:1) анализировали для получения информации о ее вторичной и третичной структуре. Белок MS4A4A человека имеет четыре трансмембранных домена (TMD), и каждый TMD состоит из 21 аминокислоты. Предсказанный на основе аминокислотного состава, количества остатков и толщины липидного бислоя, MS4A4A содержит четырехспиральный пучок (4HB) с двумя внеклеточными петлями (ECL), соединяющими TMD1 и TMD2, а также TMD3 и TMD4 из N-конца к C-концу, соответственно (см. **Фиг. 1**). На **Фиг. 1** показана первичная аминокислотная последовательность MS4A4A человека; внутриклеточные домены выделены курсивом,

трансмембранные домены подчеркнуты, а две внеклеточные петли выделены жирным курсивом.

[0377] С помощью банка данных белковых структур RCSB ([http://www\(dot\)rscsb\(dot\)org/](http://www(dot)rscsb(dot)org/)) были идентифицированы две шаблонные структуры растворимых каркасных белков 4НВ (которые, по прогнозам, имитируют геометрию и конфигурацию MS4A4A). PDB_ID этих белковых каркасов представляют собой 1P68 и 1M6T. На **Фиг. 2А**, **Фиг. 2В** и **Фиг. 2С** показаны структура и первичная аминокислотная последовательность двух растворимых каркасов четырехспирального пучка (PDB_ID:1P68 и PDB_ID:1M6T). На **Фиг. 2А** трансмембранные домены представлены в виде спиралей в структуре; на **Фиг. 2В** и **Фиг. 2С** трансмембранные домены подчеркнуты в соответствующих аминокислотных последовательностях 1P68 и 1M6T.

[0378] Аминокислотные последовательности двух ECL MS4A4A человека были рекомбинантно внесены в 1P68, что привело к образованию полипептида JS1 и полипептида JS4 (отрицательный контроль для полипептида JS1), и в 1M6T, что привело к образованию полипептида JS5, полипептида JS6; и полипептид JS10 (которые служат в качестве отрицательного контроля для полипептида JS5 и полипептида JS6). (См. **Фиг. 3**.) На **Фиг. 3А** показаны аминокислотные последовательности полипептида JS1, полипептида JS5 и полипептида JS6. На **Фиг. 3В** показаны аминокислотные последовательности полипептида отрицательного контроля JS4 и полипептида отрицательного контроля JS10. Нуклеиновую кислоту, кодирующую эти белковые/полипептидные каркасы, встраивали в вектор экспрессии pcDNA3.4 с 3' His-меткой и Avi-меткой, соответственно. Полученные клоны экспрессировали в клетках Expi293 и очищали с помощью агарозы Ni-NTA (QIAGEN, кат. № 30230) с использованием протокола производителя. Эти рекомбинантные растворимые полипептиды MS4A4A (также называемые антигенами с привитыми петлями) были получены для получения растворимых белков, которые имитируют структуру и функцию двух ECL MS4A4A, для применения в качестве растворимых реагентов для определения характеристик связывания антител.

ПРИМЕР 3: Определение эпитопа антител к MS4A4A путем связывания пептида

[0379] Характеристики связывания эпитопа антитела к MS4A4A 4A-21 определяли следующим образом. Панель перекрывающихся пептидов, полученных из внеклеточных петель (ECL) MS4A4A человека (SEQ ID NO:1), синтезировали с помощью пептидов JPT (Берлин, Германия). Эти пептиды имели длину 15 аминокислот, каждая из которых была смещена на 2 аминокислоты. Пептиды были биотинилированы на N-конце. Пептиды с 4A.1 по 4A.4 были получены из MS4A4A ECL1 человека и окружающих областей. Пептиды с 4A.5 по 4A.12 были получены из MS4A4A ECL2 человека и окружающих областей.

[0380] Библиотеку пептидов печатали на покрытый стрептавидином чип (Xantec SAD50M, Дюссельдорф, Германия) с использованием устройства Continuous Flow Microspotter (CFM). Сначала чип активировали 100 mM MES, pH 5,5, 100 мкл EDC (конечная концентрация 133 mM), 100 мкл S-NHS (конечная концентрация 33,3 mM). Библиотеку пептидов иммобилизовали на чипе в концентрации 250 nM на пептид, разведенной в HBS-EP+ буфере (Teknova, кат. № H8022) с 1 мг/мл BSA и 1 мкг/мл конъюгированного с биотином мышинового IgG. После иммобилизации поверхность чипа дезактивировали 1M этаноламином при pH 8,5 в течение 10 минут. Супернатанты гибридом и очищенные антитела к MS4A4A разводили в HBS-EP+ буфере с 1 мг/мл BSA и вводили в чип. Для обеспечения воспроизводимости были проведены повторные измерения для каждого антитела к MS4A4A. Характеристики связывания были определены для каждой комбинации пептид-антитело, что позволило картировать область линейного пептида, с которой взаимодействует каждое антитело.

[0381] Антитело к MS4A4A 4A-21 и коммерчески доступное антитело к MS4A4A 5C12 продемонстрировали надежное связывание с пептидами, которые соответствуют областям в ECL2 MS4A4A человека, как указано жирным шрифтом в **таблице 9** ниже. Антитело к MS4A4A 4A-21 связывает пептиды с 4A.5 по 4A.9,

охватывающие аминокислотные остатки 155-177 MS4A4A человека. Антитело к MS4A4A 5C12 связывает пептиды с 4A.6 по 4A.9, охватывающие аминокислотные остатки 157-177 MS4A4A человека. Связывающие области этих двух антител перекрываются, но не идентичны, что указывает на то, что они взаимодействуют с разными остатками в пределах ECL2 MS4A4A человека. Ни одно из этих двух антител не показало связывания с MS4A4A ECL1 человека при использовании методики, описанной выше.

ТАБЛИЦА 9

Пептид	Последовательность	4A-21	5C12
4A.1	ITMMCMASNTYGSNP (SEQ ID NO:292)	-11,16	-1,49
4A.2	MMCMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:293)	-11,53	-0,19
4A.3	CMASTYGSNPISVY (SEQ ID NO:294)	-10,55	-1,54
4A.4	ASTYGSNPISVYIG (SEQ ID NO:295)	-7,90	-0,46
4A.5	LAFYSFHHPYCNYYG (SEQ ID NO:296)	382,80	1,60
4A.6	FYSFHHPYCNYYGNS (SEQ ID NO:297)	485,67	44,38
4A.7	SFHHPYCNYYGNSNN (SEQ ID NO:298)	446,10	17,75
4A.8	HHPYCNYYGNSNNCH (SEQ ID NO:299)	308,63	22,30
4A.9	PYCNYYGNSNNCHGT (SEQ ID NO:300)	225,21	30,86
4A.10	CNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:301)	-4,50	1,13
4A.11	YYGNSNNCHGTMSIL (SEQ ID NO:302)	-6,50	-2,73
4A.12	GNSNNCHGTMSILMG (SEQ ID NO:303)	-5,20	-4,08

ПРИМЕР 4: Антитело к MS4A4A, связывающееся с пептидами, которые соответствуют внеклеточным доменам MS4A4A человека

[0382] Супернатанты гибридомы к MS4A4A (чистые) или очищенные mIgG (5 мкг/мл) тестировали на связывание с пептидами MS4A4A человека, соответствующими ECL1 (аминокислотные остатки 86-98 MS4A4A человека с последовательностью SEQ ID NO:1) и ECL2 (аминокислотные остатки 159-179 MS4A4A человека с последовательностью SEQ ID NO:1) с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Вкратце, 96-луночные полистироловые планшеты покрывали 2 или 10 мкг/мл синтетических свободных или конъюгированных с BSA пептидов в покрывающем буфере (0,05 М карбонатный буфер, pH 9,6, Millipore Sigma, кат. № C3041) в течение ночи при 4°C. Затем покрытые планшеты блокировали разбавителем для ИФА (PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20) в течение 1 часа, промывали 3x300 мкл в PBST

(PBS + 0,05% Tween20, Thermo, кат. № 28352), а затем в планшет добавляли антитела (50 мкл/лунка). После 30-минутной инкубации (комнатная температура, при встряхивании) планшеты промывали 3×300 мкл в PBST. Конъюгированное с HRP вторичное антитело к IgG мыши (Jackson ImmunoResearch, кат. №115-035-003) добавляли в разведении 1:1000 в разбавителе для ИФА (50 мкл/лунку) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании. После последней серии промывок (3×300 мкл в PBST) добавляли 50 мкл субстрата TMB (BioFx, кат. № TMBW-1000-01), а затем через 5–10 минут реакцию гасили добавлением 50 мкл стоп-раствора (BioFx, кат. № BSTP-1000-01). Поглощенные реакционные лунки определяли по оптической плотности при 650 нм с помощью устройства для считывания микропланшетов BioTek Synergy с использованием программного обеспечения GEN5 2.04.

[0383] Были протестированы очищенные мышинные антитела к MS4A4A и 3 коммерчески доступных мышинных антитела к MS4A4A (5C12, 3F2 и 4H2). Мышинные антитела к MS4A4A (4A-21, 4A-25, 4A-202 и 4A-214) продемонстрировали сильное связывание со свободным пептидом huMS4A4A-ELC2 по сравнению с таковым, наблюдаемым для мышинового DAP12 BSA, нерелевантного пептида отрицательного контроля. Три коммерчески доступных антитела к MS4A4A не проявляли связывания с пептидами ECL1 и ECL2 MS4A4A человека.

ПРИМЕР 5: Определение эпитопа антител к MS4A4A

[0384] Первичная аминокислотная последовательность MS4A4A предоставляет важную информацию о его вторичной и третичной структуре. Белок MS4A4A имеет четыре трансмембранных домена (TMD), и каждый TMD состоит из 21 аминокислоты. Типичный TMD состоит из двойного слоя фосфодиэфирных липидов толщиной примерно 40 Å. Фосфатная головная группа создает гидрофильный слой, который взаимодействует с гидрофильной средой либо во внеклеточном, либо в цитозольном пространстве, а липидный хвост создает внутренний липидный бислой, который взаимодействует с липофильными остатками TMD. Толщина липидного бислоя TMD составляет примерно от 32 до 34 Å. Предсказанный на основе аминокислотного состава, количества остатков и толщины липидного бислоя, MS4A4A содержит четырехспиральный пучок (4HB) с двумя внеклеточными петлями (ECL), соединяющими TMD1 и TMD2, а также TMD3 и TMD4 из N-конца к C-концу, соответственно. 4-спиральный пучок стабилизирует MS4A4A в мембране за счет значительного увеличения энтальпии, полученного за счет взаимодействий спираль-липидный бислой и взаимодействий спираль-спираль.

[0385] Первичная аминокислотная последовательность и состав ECL MS4A4A указывают на важные особенности, связанные с эпитопами и динамическими свойствами. ECL1 состоит из 13 аминокислот, включая один цистеин, один метионин, один аланин, три серина, один треонин, два аспарагина, один тирозин, один пролин, один изолейцин и только один остаток (остатки) глицина. ECL2 состоит из 21 аминокислоты, включая два остатка цистеина, которые разделены 8 аминокислотами, три серина, один треонин, один фенилаланин, три гистидина, один пролин, три тирозина, четыре аспарагина, один метионин и только два остатка глицина. Очень мало остатков глицина, но несколько крупных аминокислотных остатков с бета-разветвленной боковой цепью и остаток пролина обнаружены в ECL1 и ECL2. Более того, ECL2 содержит два остатка цистеина, которые, по прогнозам, создают дисульфидную связь внутри петли, что дополнительно снижает конформационную энтропию. В результате ECL1 и ECL2 имеют тенденцию использовать значительно меньшее число конформационных изомеров, взаимодействующих друг с другом во внутренних движениях типа «жесткое тело».

[0386] Плазмида экспрессии, кодирующая MS4A4A человека (NM_024021), содержащая C-концевую метку GFP, была приобретена у Origene (кат. № RG223557) и использовалась в качестве матрицы для создания

одиночных мутаций при помощи аланинового сканирования в кодирующей области внеклеточной петли 1 (ECL1) MS4A4A человека (4A.Ala1-Ala13 в **таблице 10** ниже; C67-S79 SEQ ID NO:1, соответствующей ECL1; CMASNTYGSNPIS; в кодирующей области внеклеточной петли 2 (ECL2) MS4A4A человека (4A.Ala14-Ala34 в **таблице 10** ниже; S140-S160 SEQ ID NO:1, соответствующие ECL2; SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS; и мутации по типу делеции ECL2 (4A.Ala35 (делеция аминокислотных остатков 150–152 SEQ ID NO:1 в ECL2) и 4A.Ala36 (делеция аминокислотных остатков 148-152 SEQ ID NO:1 в ECL2) в **таблице 11** ниже). Мутации вносили с использованием методик полимеразной цепной реакции с перекрывающимися праймерами, стандартных в данной области техники. Каждый фрагмент полинуклеиновой кислоты полимеразной цепной реакции очищали и субклонировали обратно в вектор экспрессии с использованием сайтов рестрикции MluI и AsiSI.

[0387] Перед выполнением определения эпитопа с использованием методов аланинового сканирования относительные значения EC50 антител к MS4A4A определяли следующим образом с использованием транзистентных трансфекций описанных выше конструкций экспрессии в клетки HEK293T. Клетки HEK293T высевали в 6-луночные планшеты и выращивали в течение ночи. На следующий день клетки трансфицировали Fugene HD (Promega) или Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) с соотношением Fugene к ДНК 4:1 или соотношением Lipofectamine к ДНК 3:1 в соответствии с протоколами производителя. Приблизительно через 24 часа после трансфекции клетки собирали с использованием трипсина-ЭДТА и обрабатывали для окрашивания для проточной цитометрии.

[0388] Для окрашивания для проточной цитометрии в каждую лунку 96-луночных планшетов добавляли по 150000 клеток, добавляли титры антител к MS4A4A в буфере для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS) и инкубировали на льду в течение 60 минут. Планшеты центрифугировали (1400 об/мин, 3 минуты), супернатант декантировали, и клетки трижды промывали 200 мкл буфера для проточной цитометрии, за каждым из которых следовали стадии центрифугирования и декантации. Антитела тестировали в виде химер mIgG1 или huIgG1 и либо конъюгированное с PE козье антитело к IgG1 человека (Southern Biotech, кат. № 2040-09, 1:200), либо козье конъюгированное с APC антитело к IgG1 мыши (BD Biosciences, кат. № 550826, 1:100) добавляли в буфер для проточной цитометрии на льду в течение 30 минут. Затем клетки 2 раза промывали 200 мкл буфера для проточной цитометрии и визуализировали на цитометре iQue. Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) измеряли в GFP-положительной популяции, представляющей клетки, экспрессирующие MS4A4A.

[0389] Шесть из первоначально протестированных антител к MS4A4A связываются с клетками HEK293T, экспрессирующими MS4A4A-GFP дикого типа (WT): они включали антитела к MS4A4A 4A-18, 4A-21, 4A-202, а также опубликованные мышинные моноклональные антитела к MS4A4A 4H2 (Kerafast), 5C12 (Biolegend), 3F2 (Millipore). Кривые титрования для каждого антитела были определены для установления оптимальных концентраций антител к MS4A4A для последующих исследований картирования эпитопов.

[0390] Для экспериментов по картированию эпитопов клетки HEK293T трансфицировали различными конструкциями экспрессии MS4A4A человека (как описано выше; см. **таблицу 10** ниже), и связывание антител определяли с использованием шести различных антител к MS4A4A: 4A-21, 4A-18, 4A-202, 4H2, 5C12, и 3F5. Связывание антитела к MS4A4A рассчитывали как % СИФ от связывания с клетками, трансфицированными конструкцией экспрессии человеческого MS4A4A дикого типа. Если аминокислотная мутация в полипептиде MS4A4A приводила к снижению связывания антитела до уровня ниже 20% от связывания с MS4A4A дикого типа, мутированная аминокислота считалась критической аминокислотой, необходимой для связывания антитела к MS4A4A с белком MS4A4A. Некоторые аминокислотные мутации в

белке MS4A4A приводили к снижению связывания антител к MS4A4A до по меньшей мере 51%, но выше 20% (по сравнению со связыванием с MS4A4A дикого типа); такие аминокислоты были определены как аминокислоты, способствующие связыванию антитела к MS4A4A с белком MS4A4A.

[0391] Некоторые аминокислоты в MS4A4A влияли на связывание всех протестированных антител, например, два цистеина, C165 и C174, которые, как считается, образуют цистеиновый мостик в белках типа MS4. Такие аминокислоты считались структурными аминокислотами.

[0392] Результаты этих экспериментов представлены в **таблице 10** ниже. Как указано выше, Ala.1-Ala.13 относятся к мутациям MS4A4A в ECL1; Ala.14-Ala.36 относятся к мутациям MS4A4A в ECL2. Данные представлены в виде % связывания антител к MS4A4A с различными полученными в результате аланинового сканирования мутациями по сравнению со связыванием антител к MS4A4A с белком MS4A4A дикого типа. Эксперименты по картированию независимо повторяли дважды с очень похожими результатами. Одно отличие заключалось в том, что антитела к MS4A4A 4A-21 и 4A-18 тестировали один раз как huIgG1, а второй раз как msIgG1 в двух концентрациях. В **таблице 11** ниже показаны результаты теста msIgG1 на эти антитела. Для всех других антител в **таблице 10** показано среднее значение связывания антител в обоих экспериментах. Значения, демонстрирующие, что антитело к MS4A4A связывается с белком MS4A4A ниже 20% от значения, измеренного для связывания с MS4A4A дикого типа, выделены жирным шрифтом в **таблице 10** ниже.

[0393] Все мутации продемонстрировали эквивалентную эффективность трансфекции приблизительно в пределах 22-33% (данные не показаны). Никакой корреляции между средним связыванием антител и уровнями GFP в клетках не наблюдалось, что позволяет предположить, что уровни GFP нельзя использовать в качестве предиктора экспрессии MS4A4A на клеточной поверхности.

ТАБЛИЦА 10

Конструкция	Последовательность пептида	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
ECL1 WT	CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:289)	100					
4A.Ala.1	<u>S</u> MASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:255)	84,1	96,6	86,99	72,80	82,36	79,58
4A.Ala.2	C <u>A</u> ASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:256)	12,5	19,1	9,93	7,42	11,04	7,33
4A.Ala.3	CM <u>S</u> SNTYGSNPIS (SEQ ID NO:257)	90,7	116,6	99,12	87,76	94,47	87,46
4A.Ala.4	CMA <u>A</u> NTYGSNPIS (SEQ ID NO:258)	91,2	85,8	92,48	77,90	88,62	82,49
4A.Ala.5	CMAS <u>A</u> TYGSNPIS (SEQ ID NO:259)	93,1	65,6	81,64	75,95	80,92	83,89
4A.Ala.6	CMASNA <u>A</u> YGSNPIS (SEQ ID NO:260)	100,4	87,5	83,22	77,29	78,57	78,38
4A.Ala.7	CMASNT <u>A</u> GSNPIS (SEQ ID NO:261)	114,5	15,8	98,41	93,36	94,96	92,91
4A.Ala.8	CMASNTY <u>A</u> SNPIS (SEQ ID NO:262)	94,6	70,4	83,82	74,41	17,39	84,41

Конструкция	Последовательность пептида	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
4A.Ala.9	CMASNTYGA <u>N</u> PIS (SEQ ID NO:263)	99,6	106,0	102,06	85,83	89,83	94,67
4A.Ala.10	CMASNTYGS <u>A</u> PIS (SEQ ID NO:264)	102,3	103,2	124,27	91,27	93,95	89,57
4A.Ala.11	CMASNTYGSN <u>A</u> IS (SEQ ID NO:265)	28,7	14,8	35,06	20,53	32,79	25,29
4A.Ala.12	CMASNTYGSNP <u>A</u> S (SEQ ID NO:266)	66,4	91,4	57,21	48,93	56,33	49,19
4A.Ala.13	CMASNTYGSNP <u>I</u> A (SEQ ID NO:267)	38,4	41,8	32,34	27,38	36,36	28,92
WT ECL2	SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:290)	100					
4A.Ala.14	<u>A</u> FHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:268)	94,3	87,8	78,14	83,99	81,28	85,27
4A.Ala.15	S <u>A</u> HHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:269)	118,7	116,9	111,77	84,71	98,51	87,20
4A.Ala.16	SF <u>A</u> HHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:270)	71,0	48,1	76,87	58,00	71,46	64,58
4A.Ala.17	SFH <u>A</u> PYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:271)	102,8	99,4	125,37	77,01	82,95	85,21
4A.Ala.18	SFHHA <u>Y</u> CNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:)	101,4	103,7	89,39	36,92	46,13	42,33
4A.Ala.19	SFHHP <u>A</u> CNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:272)	83,8	16,3	26,68	1,66	42,27	1,08
4A.Ala.20	SFHHPY <u>S</u> NYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:273)	5,0	2,8	8,66	1,94	1,74	1,60
4A.Ala.21	SFHHPYC <u>A</u> YYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:274)	1,8	73,3	93,33	70,08	73,76	80,30
4A.Ala.22	SFHHPYCN <u>A</u> YGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:275)	1,8	3,0	31,23	1,10	0,99	0,88
4A.Ala.23	SFHHPYCN <u>Y</u> AGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:276)	1,4	2,7	50,05	1,19	0,96	0,95
4A.Ala.24	SFHHPYCNYY <u>A</u> NSNNCHGTMS (SEQ ID NO:277)	57,5	63,0	75,76	27,67	18,20	33,76
4A.Ala.25	SFHHPYCNYYG <u>A</u> SNNCHGTMS (SEQ ID NO:278)	69,2	40,0	100,54	37,09	25,55	45,60
4A.Ala.26	SFHHPYCNYYGN <u>A</u> NNCHGTMS (SEQ ID NO:279)	89,3	96,5	90,84	68,48	81,73	68,38
4A.Ala.27	SFHHPYCNYYGNS <u>A</u> NCHGTMS	98,3	118,6	98,39	99,46	91,60	94,25

Конструкция	Последовательность петли	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
	(SEQ ID NO:)						
4A.Ala.28	SFHHPYCNYYGNSN <u>A</u> CHGTMS (SEQ ID NO:280)	87,3	116,4	98,61	86,22	85,94	83,37
4A.Ala.29	SFHHPYCNYYGNSNN <u>S</u> HGTMS (SEQ ID NO:281)	8,4	2,7	4,54	1,09	1,01	0,91
4A.Ala.30	SFHHPYCNYYGNSNNC <u>A</u> GTMS (SEQ ID NO:282)	87,5	62,6	92,83	72,87	80,56	82,45
4A.Ala.31	SFHHPYCNYYGNSNNCH <u>A</u> TMS (SEQ ID NO:283)	147,8	158,6	142,81	123,13	124,19	135,58
4A.Ala.32	SFHHPYCNYYGNSNNCHG <u>A</u> MS (SEQ ID NO:284)	61,6	42,9	63,28	44,61	56,19	45,14
4A.Ala.33	SFHHPYCNYYGNSNNCHGT <u>A</u> S (SEQ ID NO:285)	81,8	36,1	73,09	62,83	59,85	60,45
4A.Ala.34	SFHHPYCNYYGNSNNCHGT <u>M</u> A (SEQ ID NO:286)	113,4	91,0	117,02	102,44	99,15	103,80
4A.Ala.35	SFHHPYCNYY---NNCHGTMS (SEQ ID NO:287)	107,3	2,7	73,14	1,08	1,00	0,88
4A.Ala.36	SFHHPYCN-----NNCHGTMS (SEQ ID NO:288)	1,3	2,6	0,07	0,99	0,93	0,83

*антитело тестировали как химеру huIgG1

[0394] Результаты, показанные выше, позволяют предположить, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению распознают различные линейные и/или трехмерные структурные эпитопы в MS4A4A.

[0395] На основании данных о связывании антител к MS4A4A, полученных в этих экспериментах, следующие аминокислотные остатки петли в человеческом MS4A4A считались структурными аминокислотами в белке MS4A4A, поскольку мутация каждого из них влияла на связывание протестированных антител к MS4A4A: M87, C165, Y167, Y168, C174 (на основе белка MS4A4A человека; SEQ ID NO:1). Предполагается, что аминокислотные остатки C165 и C174 образуют цистеиновый мостик, образующий петлю в ECL2. В отсутствие этого цистеинового мостика антитела к MS4A4A не связывали белок MS4A4A, что позволяет предположить, что петлевая структура в ECL2 MS4A4A важна для связывания антител. Дополнительные доказательства важности петлевой структуры получены из двух мутантов с делецией петли (Ala.35 и Ala.36), которые также сильно влияют на связывание антител.

[0396] Результаты также продемонстрировали, что аминокислотные остатки Y167 и Y168 сильно влияют на связывание антител к MS4A4A 4A-21, 4A-18, 4H2, 5C12 и 3F2. Эти аминокислотные остатки также в меньшей степени влияли на связывание антитела к MS4A4A 4A-202. Кроме того, аминокислотные остатки P96, I97 и S98 в ECL1 в некоторой степени уменьшали связывание всех протестированных антител к MS4A4A. Эти результаты свидетельствуют либо о том, что мутации в любом из этих пяти аминокислотных остатков изменили структуру внеклеточных доменов, важных для распознавания и связывания антител, либо о том, что эти аминокислотные остатки важны для взаимодействия и связывания каждого из шести перечисленных антител к MS4A4A. Пролин является самым ограниченным аминокислотным остатком, который имеет

решающее значение для вторичной и третичной структуры полипептида. Например, пролин действует как разрушитель в середине обычных элементов вторичной структуры, включая альфа-спирали и бета-листы; однако пролин, как правило, встречается в виде первого аминокислотного остатка альфа-спирали и в краевых складках бета-листов. Остатки тирозина, изолейцина и серина обеспечивают множество взаимодействий антиген-антитело, включая, например, взаимодействие(-я) Ван-дер-Ваальса, взаимодействия π - π -стэкинга и π -водородных связей и/или водородные связи. Соответственно, остатки тирозина, пролина, изолейцина или серина могут создавать четко определенные структурные эпитопы. Любые незначительные изменения в этих четырех аминокислотных остатках могут значительно нарушить аффинность связывания антител.

[0397] Мутация аминокислотного остатка M87A в MS4A4A значительно снижала или устраняла связывание всех протестированных антител к MS4A4A. Основываясь на прогнозе, что в ECL1 и ECL2 используются четко определенные структуры жесткого тела и они могут взаимодействовать друг с другом, приведенный результат для связывания M87A указывает на то, что аминокислотный остаток M87, по прогнозам, является одним из наиболее важных остатков в поддержании жесткой петлевой структуры MS4A4A, поскольку боковая цепь M87 может взаимодействовать с одной или более аминокислотами с бета-разветвленной боковой цепью в ECL1 и/или ECL2 посредством ван-де-ваальсовых контактов и водородных связей посредством взаимодействий остов-боковая цепь и/или остов-остов.

[0398] В приведенной ниже Таблице 11 перечислены уникальные связывающие аминокислотные остатки для антител к MS4A4A, описанных в данном документе. Для антитела к MS4A4A 4A-21 необходим N166 в ECL2 для связывания с MS4A4A человека. Данные продемонстрировали, что антитела к MS4A4A 4A-18 и 5C12 связывают ECL1, а также ECL2 MS4A4A человека. Антитело к MS4A4A 4A-202 имело некоторый вклад в связывание со стороны аминокислотного остатка Y164.

[0399] Все три коммерческих антитела к MS4A4A связывают P163, тогда как ни одно из антител к MS4A4A, описанных в данном документе и протестированных в этом исследовании, не связывается. Этот пролин P163 MS4A4A человека заменен на аргинин в белке MS4A4A яванского макака. Такое наблюдение позволяет предположить, что эта замена пролина на аргинин важна для определения перекрестной реактивности в отношении яванского макака или ее отсутствия, как показывают характеристики связывания коммерческих антител к MS4A4A. Пролин является самым структурно ограниченным аминокислотным остатком, а аргинин (у яванского макака MS4A4A) является положительно заряженной аминокислотой при физиологических значениях pH. Разница между пролином и аргинином у MS4A4A человека и яванского макака может сильно повлиять на конформацию белка MS4A4A, тем самым препятствуя связыванию коммерческих антител к MS4A4A. Антитела к MS4A4A 4A-18, 4A-21 и 4A-202, по-видимому, не зависят от этой аминокислоты в отношении связывания, и, таким образом, их связывание с белком яванского макака не изменялось.

[0400] Таким образом, антитела к MS4A4A 4A-21, 4A-18 и 4A-202 связывались с эпитопами на MS4A4A, которые отличаются от эпитопов коммерчески доступных антител к MS4A4A (таблица 11 ниже). Коммерческие антитела к MS4A4A 4H2 и 3F2 имеют идентичные эпитопы, которые значительно перекрываются с эпитопами антитела к MS4A4A 5C12. Напротив, антитела к MS4A4A 4A-18, 4A-21 и 4A-202 демонстрировали уникальные характеристики связывания эпитопа, отличные друг от друга и отличающиеся от таковых у коммерческих антител к MS4A4A. Эти различия в связывающих свойствах показаны в таблице 10. Кроме того, результаты показали, что никакие два протестированных антитела к MS4A4A не связывались с идентичными эпитопами в MS4A4A человека; тем не менее, некоторые или все антитела имеют общие аминокислотные остатки (например, аминокислотные остатки Y167 и Y168, Y164, N170, T177).

ТАБЛИЦА 11

Антитело	Остатки ECL1	Остатки ECL2
4A-21		N166 (критический)
4A-18	Y92 (критический)	Y164 (критический) H161, N170, T177, M178 (имеющие вклад)
4A-202		Y164 (имеющий вклад)
4H2		Y164 (критический) P163, G169, N170, T177 (имеющие вклад)
5C12	G93 (критический)	G169 (критический) P163, Y164, N170 (имеющие вклад)
3F2		Y164 (критический) P163, G169, N170, T177 (имеющие вклад)

ПРИМЕР 6: Связывание антител к MS4A4A с рекомбинантными растворимыми полипептидами MS4A4A

[0401] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению тестировали на их способность связываться с различными рекомбинантными растворимыми полипептидами MS4A4A, как описано в Примере 2, следующим образом. Нуклеиновую кислоту, кодирующую домены VH и VL гуманизированных антител к MS4A4A по настоящему изобретению, клонировали в вектор pcDNA3.4, который содержит либо константный домен тяжелой цепи IgG1 человека, либо константный домен каппа-цепи человека. Гуманизированные антитела к MS4A4A экспрессировали в клетках Expi293 и очищали с помощью смолы для очистки антител Mab select (GE Healthcare Life Science, кат. № 17519902) в соответствии с протоколом производителя. ИФА проводили для измерения связывания антител к MS4A4A по настоящему изобретению с рекомбинантными растворимыми полипептидами MS4A4A. Биотинилированные антигены в концентрации 1 мкг/мл предварительно инкубировали на покрытых стрептавидином планшетах для ИФА (Thermo Scientific, кат. № PI15120) в течение 1 часа. Планшеты промывали 3 раза с последующим добавлением антител (1 мкг/мл, 0,33 мкг/мл и 0,11 мкг/мл антител. Планшеты инкубировали при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 часа, промывали 3 раза, затем добавляли конъюгированные с HRP козы антигены против человеческой каппа-цепи в разведении 1/2500 (Sigma Aldrich кат. A7164-IML).

[0402] На **Фиг. 4** показаны результаты связывания методом ИФА для некоторых гуманизированных антител к MS4A4A, связывающихся с рекомбинантными растворимыми полипептидами MS4A4A JS1, JS4, JS5, JS6 и JS10. Как показано на **Фиг. 4**, некоторые антитела к MS4A4A (4A-18.hFc, 4A-21.hFc, 4A-202.hFc, 4A-220.mFc, 4A-214.mFc, 4A-204.mFc' hFc относятся к Fc человека; mFc относится к мышинному Fc)) продемонстрировали связывание с помощью ИФА с рекомбинантными растворимыми полипептидами MS4A4A JS1, JS5 и JS6, которые содержат два ECL MS4A4A человека. Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению не связывались с рекомбинантными растворимыми полипептидами JS4 и JS10, которые представляют собой полипептиды отрицательного контроля и не содержат последовательности области ECL MS4A4A. Два коммерчески доступных антитела к MS4A4A, 5C12 и 4H2, не продемонстрировали связывания ни с одним из рекомбинантных растворимых полипептидов MS4A4A (см. **Фиг. 4**). На **Фиг. 4**, антитело к MS4A4A 4A-214 ранее было описано в международной патентной заявке № PCT/US2019/016156 и имеет аминокислотную последовательность

вариабельной области тяжелой цепи

EVKLEESGGGLVQPGRSMKLSCVASGFTFSNYWMNVVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGR
FTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCSSMIIVDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:179) и аминокислотную
последовательность варибельной области легкой цепи
DIVLTQSPASLTIVSLGQRATISCRASQSVSSSTYSYLHWYQQRPGQPPKLLIKYASNLESQVPAFSGSGSGT
VFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPLTFGAGTKLEMK (SEQ ID NO:180).

[0403] Результаты, представленные на **Фиг. 4** были получены из данных, приведенных ниже в **таблице 12**:

ТАБЛИЦА 12

	4A-18.hFc	4A-21.hFc	4A-202.hFc	4A-220.mFc	4A-214.mFc	4A-204.mFc	4A-25.mFc	5C12.mFc	4H2.mFc
JS1.His	0.146	2.019	1.157	0.123	1.737	0.29	1.381	0.129	0.285
JS4.His	0.098	0.138	0.111	0.087	0.11	0.08	0.091	0.076	0.077
JS5.His	0.099	1.731	1.219	0.091	1.624	0.188	1.117	0.068	0.072
JS6.His	0.105	1.668	1.225	0.1	1.706	0.229	1.26	0.066	0.069
JS10.His	0.092	0.112	0.084	0.064	0.086	0.058	0.063	0.061	0.064

[0404] На **Фиг. 5** показаны результаты связывания методом ИФА гуманизированных вариантов мышиного антитела к MS4A4A 4A-21 с рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS1. Антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл. Как показано на **Фиг. 5**, многие из гуманизированных вариантов антител к MS4A4A 4A-21 сохранили свою способность связываться с этим рекомбинантным полипептидом. Некоторые гуманизированные варианты антител к MS4A4A 4A-21 показали пониженное связывание с рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS1.

[0405] Результаты, представленные на **Фиг. 5**, были получены из данных, приведенных ниже в **таблице 13**:

ТАБЛИЦА 13

Антитело	OD450
4A-21	1.958
4A-332	1.91
4A-333	1.79
4A-334	1.531
4A-337	1.326
4A-335	1.659
4A-338	1.647
4A-336	1.703
4A-339	1.757
4A-340	0.146
4A-341	0.162
4A-342	1.086
4A-343	1.368
4A-344	0.719
4A-345	0.132
4A-346	0.148
4A-347	0.141
4A-348	0.131
4A-349	0.331
Изотип	0.113

[0406] На **Фиг. 6** показаны результаты связывания методом ИФА гуманизированных вариантов мышиного антитела к MS4A4A 4A-202 с рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS1. Антитела

использовали в концентрации 1 мкг/мл. Как показано на **Фиг. 6**, гуманизированные варианты антитела к MS4A4A 4A-202 были способны связываться с этим рекомбинантным полипептидом.

[0407] Результаты, представленные на **Фиг. 6** были получены из данных, приведенных ниже в **таблице 14**:

ТАБЛИЦА 14

Антитело	OD450
4A-202	0.141
4A-301	0.116
4A-302	0.127
4A-303	0.121
4A-304	0.11
4A-305	0.116
4A-306	0.12
4A-307	0.126
4A-308	0.12
4A-309	0.115
4A-310	0.118
4A-311	0.122
Изотип	0.113

[0408] Различные гуманизированные варианты мышиного антитела к MS4A4A 4A-202 и мышиного антитела к MS4A4A 4A-21 дополнительно тестировали на их способность связываться с рекомбинантными растворимыми полипептидами MS4A4A. Гуманизированное антитело к MS4A4A 4A-332 и гуманизированное антитело к MS4A4A 4A-302 продемонстрировали достаточное связывание и были выбраны для дальнейшего улучшения аффинности следующим образом. Случайные мутации в 6 CDR антитела к MS4A4A 4A-322 и антитела к MS4A4A 4A-302 вводили с использованием методик ПЦР с перекрывающимися праймерами. Биотинилированный рекомбинантный растворимый полипептид MS4A4A JS5 использовали для пэннинга этих вариантов антител с использованием фагового дисплея. После 3 раундов пэннинга было отобрано приблизительно 190 мутантных вариантов антитела к MS4A4A, которые экспрессировались в клетках TG1, лизаты которых подвергали скринингу с помощью ИФА. Двадцать два варианта гуманизированного антитела к MS4A4A 4A-21 и пятнадцать вариантов гуманизированного антитела к MS4A4A 4A-202 были отобраны, рекомбинантно преобразованы в полноценный человеческий IgG и экспрессированы в клетках Expi293. Антитела к MS4A4A очищали с помощью смолы для очистки антител MabSelect (GE Healthcare Life Science, кат. № 17519902), как указано в протоколе производителя. Впоследствии эксперименты ИФА и проточной цитометрии повторяли.

[0409] Гуманизированные антитела к MS4A4A с созревшей аффинностью 4A-312, 4A-313 и 4A-314 продемонстрировали связывание с рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS5 с помощью ИФА (см. **Фиг. 7**) при различных концентрациях антител (1 мкг/мл, 0,33 мкг/мл и 0,11 мкг/мл) и были отобраны для дальнейшего функционального анализа.

[0410] Результаты, представленные на **Фиг. 7** были получены из данных, приведенных ниже в **таблице 15**:

ТАБЛИЦА 15

Антитело	1 мкг/мл	0,33 мкг/мл	0,11 мкг/мл
4А-312	0.184	0.11	0.097
4А-313	1.262	1.05	0.741
4А-314	1.142	0.682	0.399
4А-302	0.128	0.103	0.091
4А-202	0.188	0.111	0.079

[0411] Гуманизированные антитела с созревшей аффинностью к MS4A4A 4А-351 и 4А-376 (0,4 мкг/мл) показали хорошее связывание с рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS5 с помощью ИФА (см. **Фиг. 8**). Затем эти антитела к MS4A4A были выбраны для применения в качестве матриц, для которых были сделаны аминокислотные замены аминокислоты D28 в CDR-L1; такие аминокислотные замены включали D28G, D28E, D28S, D28A и D28Q.

[0412] Результаты, представленные на **Фиг. 8** были получены из данных, приведенных ниже в **таблице 16**:

ТАБЛИЦА 16

Антитело	OD450
4А-350	0,939
4А-351	0,99
4А-357	0,892
4А-358	0,901
4А-359	0,892
4А-360	0,797
4А-361	0,79
4А-362	0,908
4А-363	0,833
4А-364	0,959
4А-365	0,845
4А-366	0,875
4А-367	0,961
4А-368	0,901
4А-369	0,852
4А-370	0,822
4А-371	0,955
4А-372	0,873
4А-373	0,907
4А-374	0,833
4А-375	0,996
4А-376	0,977
4А-332	0,821
4А-21	0,925

[0413] Эти дополнительные антитела к MS4A4A включали антитела к MS4A4A 4А-352, 4А-353, 4А-354, 4А-355, 4А-356, 4А-377, 4А-378, 4А-379, 4А-380, и 4А-381, и тестировали с помощью ИФА на связывание с

рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS5 при трех различных концентрациях антитела (1 мкг/мл, 0,33 мкг/мл и 0,11 мкг/мл). Результаты этих исследований представлены на **Фиг. 9**. Как показано на **Фиг. 9**, эти дополнительные антитела к MS4A4A продемонстрировали связывание с рекомбинантным растворимым полипептидом MS4A4A JS5.

[0414] Результаты, представленные на **Фиг. 9**, были получены из данных, приведенных ниже в **таблице 17**:

ТАБЛИЦА 17

Антитело	1 мкг/мл	0,33 мкг/мл	0,11 мкг/мл
4A-21	1.027	1.063	0.927
4A-332	0.997	0.851	0.677
4A-351	0.953	0.898	0.816
4A-352	0.985	0.885	0.655
4A-353	0.996	0.85	0.63
4A-354	0.98	0.874	0.701
4A-355	0.961	0.878	0.721
4A-356	0.927	0.85	0.746
4A-21	1.114	1.121	0.865
4A-376	1.037	1.031	0.83
4A-377	0.928	0.873	0.577
4A-378	0.944	0.848	0.636
4A-379	0.893	0.812	0.543
4A-380	0.981	0.916	0.654
4A-381	1.002	0.94	0.685

ПРИМЕР 7: Связывание гуманизированных антител к MS4A4A с созревшей аффинностью с клетками U937, сверхэкспрессирующими MS4A4A человека

[0415] Гуманизированные варианты антител к MS4A4A с созревшей аффинностью по настоящему изобретению оценивали на их связывание с клетками U937, экспрессирующими MS4A4A человека, следующим образом.

[0416] Тестируемые антитела к MS4A4A представляли собой либо IgG мыши, очищенные из супернатанта гибридомы, либо химеры Fc IgG1 человека, рекомбинантно полученные в клетках Expi293. Аффинное связывание с клетками определяли следующим образом. Вкратце, клетки собирали, промывали и метили Aqua Live/Dead для определения жизнеспособности. После промывки PBS аликвоты 2×10^4 клеток на лунку помещали в 96-луночные планшеты с U-образным дном и инкубировали с 50 мкл очищенного антитела к MS4A4A в различных концентрациях (3-кратные разведения, начиная с 10 мкг/мл) в буфере для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS + 1 mM ЭДТА). После этой первичной инкубации супернатант удаляли при помощи центрифугирования, 2 раза промывали 150 мкл охлажденного льдом буфера для проточной цитометрии и инкубировали с соответствующим вторичным антителом на льду в течение 15 минут. После инкубации со вторичным антителом клетки снова 2 раза промывали ледяным буфером для проточной цитометрии и ресуспендировали в конечном объеме 200 мкл буфера для проточной цитометрии. Анализ методом проточной цитометрии выполняли на системе FACSCanto (BD Biosciences). Данные связывания выражали в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

[0417] Результаты этих экспериментов по связыванию показаны в **таблице 18** и **таблице 19** ниже. В **таблице 18** показано связывание некоторых антител к MS4A4A по настоящему изобретению с клетками U937, сверхэкспрессирующими рекомбинантный MS4A4A человека. Эти эксперименты проводили с

использованием антител к MS4A4A в концентрации 5 мкг/мл и анализировали связывание клеток с помощью проточной цитометрии.

ТАБЛИЦА 18

Антитело	СИФ
4A-18	382
4A-202	216
4A-21	670
4A-25	648
4A-301	89,7
4A-302	113
4A-303	94,7
4A-304	112
4A-305	69,6
4A-306	71,3
4A-307	68,8
4A-308	97,2
4A-309	131
4A-310	75,4
4A-311	68,8
4A-332	324
4A-333	350
4A-334	296
4A-335	286
4A-336	309
4A-337	218
4A-338	222
4A-339	284
4A-340	41,8
4A-341	65,3
4A-342	538
4A-343	513
4A-344	427
4A-345	54,4
4A-346	56,1
4A-347	50,2
4A-348	47,8
4A-349	142
Изотипический контроль	33,4

[0418] В таблице 19 показано связывание некоторых антител к MS4A4A по настоящему изобретению с

клетками U937, сверхэкспрессирующими рекомбинантный MS4A4A человека. Эти эксперименты проводили с использованием антител к MS4A4A в концентрации 5 мкг/мл и анализировали связывание клеток с помощью проточной цитометрии. В этом анализе значение СИФ клеток, окрашенных одним вторичным антителом, составляло около 200.

ТАБЛИЦА 19

Антитело	СИФ
4A-21	18779
4A-332	8821
4A-350	11581
4A-351	12175
4A-358	12107
4A-360	10277
4A-362	10023
4A-369	10079
4A-373	11874
4A-376	16664
4A-352	10955
4A-353	10363
4A-354	13682
4A-355	13418
4A-356	11974
4A-377	12243
4A-378	9913
4A-379	10567
4A-380	11809
4A-381	12588
4A-202	31745
4A-302	24450
4A-312	17715
4A-313	41794
4A-314	15289

ПРИМЕР 8: Антитела к MS4A4A модулируют белок TREM2 в первичных миелоидных клетках человека

[0419] Сообщалось, что SNP в локусе MS4A влияют на уровни растворимого TREM2 (sTREM2) у людей, путь TREM2 в целом и предрасположенность к болезни Альцгеймера. Аллели MS4A4A, защищающие от болезни Альцгеймера, связаны с повышенным уровнем sTREM2 в спинномозговой жидкости. Вместе эти пути могут играть роль в профилактике болезни Альцгеймера или других нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, обработка макрофагов человека в культуре коммерчески доступными антителами к MS4A4A снижала уровни sTREM2 (Piccio et.al. Acta Neuropathol 2016, 131:925-933). Для изучения влияния антител к MS4A4A по настоящему изобретению на модуляцию уровней sTREM2 и TREM2 плазматической

мембраны/клеточной поверхности (mTREM2) в макрофагах были проведены следующие исследования.

[0420] Первичные макрофаги человека высевали в 96-луночные планшеты и обрабатывали панелью антител к MS4A4A (10 мкг/мл) в полной RPMI. После 48 часов инкубации супернатанты собирали и определяли уровни sTREM2 с помощью Meso Scale Discovery (MSD). Вкратце, лунки планшета MSD (кат. № L15XA-3) инкубировали с захватывающим антителом в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи на орбитальном шейкере при 500 об/мин при 4°C. Лунки промывали, а затем блокировали буфером для связывания (1% термоинактивированный BSA высокой степени чистоты) в PBS) в течение часа на орбитальном шейкере при 500 об/мин при 20°C. Стандарты (Fc к рекомбинантному человеческому Trem2 1828-T2 (R&D Systems)) и неизвестные образцы в соответствующих концентрациях готовили в буфере для связывания, добавляли в лунки, затем инкубировали в течение 1 часа на орбитальном шейкере при 500 об/мин при 20°C. Лунки промывали и затем инкубировали с вторичным антителом (биотинилированным козьим антителом к TREM2 человека (R&D Systems, кат. № BAF1828)) в концентрации 100 нг/мл в течение 1 часа на орбитальном шейкере при 500 об/мин при 20°C. Лунки промывали, а затем инкубировали с реагентом для обнаружения (меченный SULFO-TAG стрептавидин; MSD, кат. № R32AD) в концентрации 0,2 мкг/мл в буфере для связывания. Затем лунки промывали, в каждую лунку добавляли 150 мкл буфера для считывания (1x, MSD) и планшеты считывали на Sector Imager.

[0421] Отдельно собирали клетки, обработанные антителом к MS4A4A (см. выше), и подвергали проточной цитометрии для определения уровней mTREM2 с использованием антитела к TREM2 (Alector), конъюгированного с аллофикоцианином или подобными флуорофорами.

[0422] Как показано в **таблице 20**, антитела к MS4A4A повышали уровень sTREM2 в супернатантах культивируемых первичных макрофагов человека, полученных от различных доноров. Результаты, описанные в данном документе, показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают или повышает уровни sTREM2 в супернатантах первичных макрофагов человека. Числа, представленные в **таблице 20**, относятся к числам, полученным с использованием антитела изотипического контроля, которое было установлено на уровне 100.

ТАБЛИЦА 20

Антитело	Донор		
	686	687	688
4A-202	249,7	208,9	431,2
4A-214	142,8	168,3	137,7
4A-18	151,2	152,4	181,0
4A-21	340,0	230,4	489,7
huIgG1	100	100	100

[0423] Как показано ниже в **таблице 21**, антитела к MS4A4A повышали уровень TREM2 плазматической мембраны/клеточной поверхности (mTREM2) на культивируемых первичных макрофагах человека, полученных от различных доноров. Эти результаты согласуются с соответствующим увеличением sTREM2, наблюдаемым в супернатантах этих клеток, как показано выше в **таблице 20**. Числа, представленные в **таблице 21**, относятся к числам, полученным с использованием антитела изотипического контроля, которое было установлено на уровне 100.

ТАБЛИЦА 21

Антитело	Донор		
	695	696	697
4A-202	319,2	374,5	373,2
4A-214	178,3	124,6	65,7
4A-18	273,0	286,1	313,6
4A-21	209,1	356,4	546,1
hIgG1	100,0	100,0	100,0

[0424] Эти данные продемонстрировали, что обработка первичных макрофагов человека антителами к MS4A4A по настоящему изобретению повышала уровни как sTREM2, так и mTREM2 в этих клетках миелоидного происхождения. Эти результаты контрастируют с предыдущим сообщением, демонстрирующим, что коммерчески доступное антитело к MS4A4A 5C12 снижает уровни sTREM2 в супернатантах культивируемых макрофагов человека (Deming et al., см. выше).

[0425] Описанные выше эксперименты по изучению влияния антител к MS4A4A на растворимый и мембранный TREM2 повторяли с использованием антител к MS4A4A, приготовленных с низким уровнем эндотоксина. Уровни sTREM2, измеренные в культуральных супернатантах, показаны в **таблице 22** ниже. Большинство антител к MS4A4A по настоящему изобретению, будучи высокоочищенными и по существу свободными от эндотоксина, индуцировали повышенные уровни sTREM2 в различной степени. Коммерчески доступные антитела к MS4A4A 3F2, 4H2 и 5C12 также повышали уровни sTREM2, но в меньшей степени. Эти результаты противоречат ранее опубликованным данным, которые показали, что эти коммерчески доступные антитела к MS4A4A снижают уровни sTREM2 в культуре; это, вероятно, связано с загрязнением эндотоксином, примесями и агрегатами, присутствующими в коммерческих препаратах. Данные в **таблице 22** демонстрируют уровни sTREM2, выраженные в нг/мл, и нормализованы к уровням, наблюдаемым с антителом изотипического контроля.

[0426] Наблюдаемое увеличение sTREM2 происходило параллельно увеличению уровней связанного с мембраной TREM2 (mTREM2) после обработки антителом к MS4A4A (**таблица 23** ниже). Несмотря на различия в реакции доноров, большинство антител к MS4A4A повышали уровень mTREM2 у 2 или 3 из трех протестированных доноров. По сравнению с коммерчески доступными антителами к MS4A4A (3F2, 4H2 и 5C12) ряд антител в настоящем изобретении проявляют эквивалентную или превосходящую активность. Уровни, приведенные в **таблице 23** ниже, выражены в виде средней интенсивности флуоресценции, определенной с помощью проточной цитометрии, и нормализованы по результатам, наблюдаемым с использованием антитела изотипического контроля.

ТАБЛИЦА 22

Антитело	Донор		
	753	754	755
4A-202	50,5	15,1	16,1
4A-18	54,9	-2,4	-0,3
4A-21	108,3	36,5	65,5
4A-25	21,5	12,0	33,8
4A-214	43,9	15,1	28,5
3F2	14,1	5,0	17,4

	Донор		
Антитело	753	754	755
4H2	-1,0	7,5	-5,1
5C12	-0,4	5,5	35,2

ТАБЛИЦА 23

	СИФ TREM2, дельта относительно контроля		
Антитело	Донор 753	Донор 754	Донор 755
4A-202	5258	1171	6591
4A-18	3531	-76	4289
4A-21	5585	2097	6334
4A-25	687	888	2528
4A-214	6017	1774	6009
3F2	2176	103	2423
4H2	1625	207	2444
5C12	926	499	1803

[0427] Поскольку генетические исследования связывают аллель MS4A4A, защищающий от болезни Альцгеймера, с повышенным уровнем sTREM2 у пациентов с болезнью Альцгеймера, эти результаты свидетельствуют о том, что антитела к MS4A4A являются эффективным средством лечения болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных расстройств путем модулирования (т.е. повышения) активности и функции TREM2.

[0428] Также определяли влияние гуманизированных антител к MS4A4A по настоящему изобретению на sTREM2 и связанный с мембраной TREM2 (mTREM2). Чтобы проверить это, первичные макрофаги человека от двух доноров обрабатывали антителами к MS4A4A по настоящему изобретению в течение 48 часов. Собирали супернатанты культур и анализировали уровни растворимого TREM2 с использованием анализов Mesoscale Discovery. TREM2 на клеточной поверхности измерялась в отдельно обработанных клетках с помощью проточной цитометрии после окрашивания антителами к TREM2, конъюгированными с флуорофорами. Растворимый TREM2 измеряли в культуральном супернатанте макрофагов с использованием системы Mesoscale Discovery (MSD, Роквилл, штат Мэриленд, США).

[0429] В приведенной ниже таблице 24 показаны результаты воздействия антител к MS4A4A на изменения уровней растворимого TREM2. В таблице 24 уровни растворимого TREM2 указаны как нг/мл. Как показано в таблице 24, большинство антител к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни растворимого TREM2 в первичных макрофагах человека. Коммерчески доступные антитела к MS4A4A 5C12, 4H2 и 3F2 не показали увеличения уровней растворимого TREM2 в какой-либо значительной степени по сравнению с наблюдаемым для многих антител к MS4A4A по настоящему изобретению, а эффекты 5C12, 4H2, и 3F2 были сопоставимы с изотипическим контролем.

ТАБЛИЦА 24

Антитело	Донор 888	Донор 904
Изотип hIgG1	24,1	25,0

4A-202	46,5	38,4
4A-21	47,2	39,7
4A-25	41,3	41,2
4A-302	49,3	41,3
4A-312	41,4	36,2
4A-313	53,7	40,4
4A-314	47,9	37,2
4A-332	44,6	37,3
4A-350	51,4	44,0
4A-351	45,4	42,2
4A-352	41,2	41,0
4A-353	32,3	34,7
4A-354	41,4	38,0
4A-355	35,5	23,2
4A-356	40,4	38,0
4A-358	55,0	45,8
4A-360	45,3	38,4
4A-362	56,0	45,7
4A-369	54,4	41,6
4A-373	54,2	44,5
4A-376	54,2	51,1
4A-377	34,4	37,0
4A-378	32,7	35,1
4A-379	31,9	31,2
4A-380	38,1	33,0
4A-381	33,7	33,1
4A-382	26,9	31,3
4A-383	29,0	30,5
4A-384	23,2	24,1
4A-385	27,4	27,2
4A-386	25,4	28,3
4A-387	26,0	30,6
4A-388	28,7	31,1
4A-390	26,8	31,5
Изотип mIgG1	25,9	28,8
5C12	29,7	30,0
4H2	28,9	30,6
3F2	29,4	28,8

[0430] В таблице 25 ниже показаны результаты влияния антител к MS4A4A на изменения уровней TREM2 на клеточной поверхности (например, мембране). В таблице 25 уровни TREM2 на клеточной поверхности

показаны в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ), по данным проточной цитометрии. Как показано в **таблице 25**, большинство антител к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни TREM2 на поверхности первичных макрофагов человека. Коммерчески доступные антитела к MS4A4A 5C12, 4H2 и 3F2 не показали увеличения уровней TREM2 на поверхности клетки в какой-либо значительной степени по сравнению с наблюдаемым для многих антител к MS4A4A по настоящему изобретению, а эффекты 5C12, 4H2, и 3F2 были сопоставимы с изотипическим контролем.

ТАБЛИЦА 25

Антитело	Донор 888	Донор 904
Изотип hIgG1	2566,5	2637,5
4A-202	4045,5	4100
4A-21	3329	3325
4A-25	2967,5	3191
4A-302	5336	4741,5
4A-312	5492	4672
4A-313	3645,5	3345,5
4A-314	4335	4070
4A-332	3257	3061
4A-350	3552	3192,5
4A-351	3464	3235,5
4A-352	3247,5	3227,5
4A-353	2835	3133
4A-354	2940	3092,5
4A-355	3319	3891,5
4A-356	2971,5	3328,5
4A-358	3659	3273,5
4A-360	3421,5	3154,5
4A-362	3759,5	3240
4A-369	3558,5	3256
4A-373	3430	3313
4A-376	3521	3398,5
4A-377	3376,5	3553,5
4A-378	3920,5	3804,5
4A-379	3847,5	3745
4A-380	4070	3754
4A-381	4070,5	3952,5
4A-382	2618,5	2621,5
4A-383	2611,5	2812,5
4A-384	2524,5	2601
4A-385	2576,5	2560,5
4A-386	2546	2614
4A-387	2534	2601

4A-388	2589,5	2624,5
4A-390	2561	2639,5
Изотип mIgG1	2459,5	2690,5
5C12	2596	2683,5
4H2	2611,5	2780
3F2	2629	2629,5

[0431] Как показано в **таблице 24** и **таблице 25**, как уровни мембранного TREM2, так и уровни растворимого TREM2 повышались при лечении антителами к MS4A4A по настоящему изобретению. Коммерчески доступные антитела к MS4A4A 5C12, 4H2 и 3F2 не индуцировали экспрессию TREM2 в какой-либо значительной степени.

ПРИМЕР: 9: Влияние антител к MS4A4A на маркеры клеточной поверхности макрофагов

[0432] Влияние антител к MS4A4A на различные маркеры клеточной поверхности макрофагов M1 и M2 исследовали следующим образом. Первичные макрофаги человека обрабатывали различными антителами к MS4A4A (10 мкг/мл) в полной RPMI1640 в течение 48 часов. Затем клетки собирали и подвергали проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к маркерам M1 (CD16, МНС класса II, CD86), маркерам M2 (CD200R, дектин-1, CD163) и панмакрофагальному маркеру CD14.

[0433] Результаты этих исследований показаны в **таблице 26** ниже. Уровни экспрессии маркеров клеточной поверхности анализировали с помощью проточной цитометрии и нормализовали к уровням, полученным в клетках, обработанных антителом изотипического контроля, которые принимали за 100%. Экспрессия некоторых маркеров M1 на клеточной поверхности, включая CD86 и МНС-II, не изменялась или подвергалась лишь незначительному влиянию при обработке антителами к MS4A4A. Напротив, экспрессия некоторых маркеров M2, включая CD200R, CD163 и дектин-1, на клеточной поверхности была значительно снижена при обработке антителом к MS4A4A.

ТАБЛИЦА 26

Антитело	CD200R (M2)	CD14 (Пан)	Дектин-1 (M2)	CD16 (M1)	CD163 (M2)	МНС-II (M1)	CD86 (M1)
huIgG1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4A-202	35,2	60,2	47,3	171,0	39,1	73,6	121,8
4A-214	89,5	98,1	108,3	106,5	112,8	144,2	131,6
4A-18	29,0	56,6	46,6	239,3	33,6	45,6	112,3
4A-21	67,9	39,4	22,9	75,5	65,0	81,3	177,0

[0434] В совокупности эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению влияют на поляризацию макрофагов, воздействуя на клетки, отличающиеся от фенотипа M2. Эти результаты свидетельствуют о том, что в ЦНС лечение антителами к MS4A4A может обеспечить полезное усиление активности микроглии за счет потенцирования, увеличения или восстановления их нейропротекторной функции в контексте нейродегенеративных заболеваний и расстройств. Поскольку гомеостатическая микроглия в нормальных условиях экспрессирует больше маркеров M2, таких как CD200R, CD163 и CD115, эти результаты позволяют предположить, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны

в изменении физиологического состояния микроглии до более защитного фенотипа, включая в более провоспалительное или активированное состояние. Поскольку ассоциированная с заболеванием микроглиа (DAM) в мышинных моделях болезни Альцгеймера и при болезни Альцгеймера человека находится в провоспалительном или активированном состоянии, что считается полезным при болезни Альцгеймера, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению применимы для лечения болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных расстройств.

ПРИМЕР 10: Антитела к MS4A4A повышают экспрессию остеоопонтина и гельзолина

[0435] Были идентифицированы ассоциированные с болезнью Альцгеймера генетические варианты (SNP), связанные с кластером генов MS4A. Одним из этих вариантных аллелей является rs1582763, который связан с повышенными уровнями sTREM2 в СМЖ, а также со сниженным риском болезни Альцгеймера и отсроченным возрастом начала заболевания. (Deming *et al*, 2018, bioRxiv, doi: dx doi org / 10.1101/352179). Аллель rs1582763 снижает уровень мРНК MS4A4A в крови. Эти данные свидетельствуют о том, что аллель rs1582763 выполняет защитную роль, снижая уровни MS4A4A, потенциально снижая риск или степень тяжести болезни Альцгеймера.

[0436] Профиль экспрессии РНК, демонстрирующий влияние этого защитного аллеля на макрофаги человека, был получен на основе опубликованных данных об экспрессии РНК. мРНК для SPP1 (остеоопонтин) и GSN (гельзолин) продемонстрировала наиболее значительное увеличение экспрессии, на что указывают кратность изменения («FC») и р-значения (см. столбцы под «rs1582763» в **таблице 27** и продублированные в **таблице 28** ниже), по сравнению с другими маркерами, демонстрирующими повышенную экспрессию (не показано). Данные показали, что SPP1 и GSN являются фармакодинамическими маркерами для защитной биологической активности, связанной с аллелем rs158273.

[0437] Исходные антитела к MS4A4A тестировали на их способность фенотипировать защитный аллель. Макрофаги, полученные из МКПК человека, обрабатывали антителами к MS4A4A, как указано в **таблице 27** и **таблице 28**, в течение 24 часов (до трех повторов). РНК экстрагировали, и библиотеки РНК готовили и секвенировали с последующим картированием генома и количественным определением. Результаты продемонстрировали, что все указанные исходные антитела к MS4A4A, кроме одного (4A-220), фенотипируют защитный аллель rs1582763 в отношении увеличения экспрессии SPP1 и GSN (**таблица 27** и **таблица 28**). Эти результаты свидетельствуют о том, что антитела MS4A4A по настоящему изобретению, которые эффективны в повышении экспрессии SPP1 и GSN, являются биологически активными в снижении риска и/или степени тяжести болезни Альцгеймера, подобно защитному аллелю.

ТАБЛИЦА 27

	rs1582763		4A-18		4A-18+4A-21		4A-25		4A-214	
Ген	FC	p	FC	p	FC	p	FC	p	FC	p
SPP1	0,82	4.E-06	0,73	1.E-08	0,25	4.E-02	0,37	3.E-03	0,29	1.E-02
GSN	0,34	6.E-06	1,28	1.E-17	0,85	2.E-09	0,65	3.E-06	0,56	8.E-06

ТАБЛИЦА 28

	rs1582763		4A-220		4A-21		4A-202	
Ген	FC	p	FC	p	FC	p	FC	p
SPP1	0,82	4.E-06	-0,13	3.E-01	0,56	7.E-06	0,49	2.E-03
GSN	0,34	6.E-06	-0,11	4.E-01	0,94	5.E-11	0,82	2.E-06

ПРИМЕР 11: Получение и стимуляция микроглиальных клеток, полученных из иПСК, антителами к MS4A4A

[0438] Взрослые клетки любого тканевого происхождения могут быть преобразованы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) путем введения смеси транскрипционных факторов, связанных со стволовыми клетками (подробно рассмотрено в [https://www\(dot\)cell\(dot\)com/iPSC](https://www(dot)cell(dot)com/iPSC)). иПСК можно поддерживать неопределенно долго, и при введении соответствующих факторов роста их можно заставить дифференцироваться в различные типы зрелых клеток. Способы получения нейронов из иПСК давно разработаны (Salimi et.al., Mol. Bio. Rep. 2014; 41: 1717-1721; Engle et.al., Neuron 2018; 100: 783-797). Совсем недавно иПСК использовали для получения астроцитов (Julia et.al., Stem Cell Report 2017; 9:600-614) и микроглии (обзор Pockock and Piers, Nat. Rev. Neurosci. 2018; 19: 445-452). Эти системы культивирования позволяют исследовать биологию и функции этих клеток в контролируемой среде, что иначе было бы невозможно. Кроме того, иПСК можно подвергать генетическим манипуляциям с помощью различных способов, таких как редактирование генов CRISPR, чтобы обеспечить дальнейшее изучение функциональной значимости представляющих интерес генов в этих типах клеток.

[0439] После получения из иПСК микроглию культивируют отдельно *in vitro*, где они подвергаются стимуляции антителами к MS4A4A в настоящем изобретении. После стимуляции жизнеспособность клеток оценивают путем количественного определения уровней внутриклеточного АТФ. Влияние на изменения экспрессии TREM2 на клеточной поверхности или на изменения уровней растворимого TREM2 измеряют, как описано выше. Супернатанты этих культур анализируют на изменения экспрессии или уровней различных цитокинов и хемокинов в результате обработки антителами к MS4A4A с использованием таких способов, как ИФА, анализы Mesoscale Discovery (MSD, Роквилл, штат Мэриленд, США), Legendplex (BioLegend, Сан-Диего, штат Калифорния, США) или CBA (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния, США). Изменения способности к фагоцитозу, скорости аутофагии, экспрессии поверхностных маркеров и профиля экспрессии генов в этих иПСК-микроглиях, полученных в результате лечения антителами к MS4A4A, измеряют и сравнивают с таковыми, полученными из макрофагов, полученных из моноцитов, обработанных антителами к MS4A4A, с использованием различных способов, включая проточную цитометрию, вестерн-блоттинг, визуализацию в фиксированном и реальном времени и анализ методом РНК-секвенирования.

ПРИМЕР 12: Влияние антител к MS4A4A на маркеры клеточной поверхности макрофагов

[0440] Миелоидные клетки как в ЦНС, так и в периферических органах пластичны по своему фенотипу и функциям. Это можно смоделировать с помощью макрофагов *in vitro*, которые можно разделить на макрофаги типа M1 и M2, демонстрирующие различные фагоцитарные и воспалительные потенциалы, фенотипы и активности. В периферических органах макрофаги, связанные с фенотипом M1, считаются более провоспалительными и антимикробными, в то время как M2-подобные макрофаги являются более гомеостатическими и противовоспалительными. В ЦНС микроглия в гомеостатических условиях также экспрессирует маркеры M2, такие как CD200R, CD163, что указывает на регуляторные функции этого типа клеток. Экспрессия MS4A4A повышена в макрофагах M2 *in vitro*.

[0441] Влияние антител к MS4A4A на различные маркеры клеточной поверхности макрофагов M1 и M2 исследовали следующим образом. Первичные макрофаги человека обрабатывали различными антителами к MS4A4A (например, 10 мкг/мл) в полной RPMI1640 в течение 48 часов. Затем клетки собирают и подвергают проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к маркерам M1 (таким как CD16, MHC класса II, CD86), маркерам M2 (таким как CD200R, дектин-1, CD163) и панмакрофагальному маркеру,

включая CD14 и другие.

ПРИМЕР 13: Определение кинетических характеристик антител к MS4A4A

[0442] Определение кинетических характеристик связывания очищенных антител с пептидами ECL1 и ECL2 MS4A4A выполняют при помощи Carterra (Южный Сан-Франциско, штат Калифорния) с использованием запатентованного прибора Surface Plasmon Resonance (SPR) (MX-96) следующим образом. Антитела печатали на чип CMD500D (Xantec, № SPMX CMD500D, партия № SC CMD500D0117.a Exp. 31.12.18) с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM). Сначала чип активируется 100 mM MES pH 5,5, 100 мкл EDC (конечная концентрация 133 mM), 100 мкл S-NHS (конечная концентрация 33,3 mM) в течение 7 минут. Слой антимышиного IgG-Fc (Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-005-071) вводят в течение 15 минут для установления поверхностной плотности 10000-12000 RU, после чего поверхность чипа дезактивируют 1M этаноламином при pH 8,5 в течение 10 минут. Рассматриваемые антитела к MS4A4A разбавляют 2:1 HBS-EP+ буфером (Teknova, кат. № H8022) и затем печатали в двух повторностях в течение 20 минут и 5 минут из одного и того же раствора образца. Контрольные антитела разводят до 20 мкг/мл для печати.

[0443] Для проведения кинетического анализа рассматриваемые пептиды готовят в HBS-EP+ буфере с 1 мг/мл BSA при конечных концентрациях анализа 2000 nM, 400 nM, 80 nM, 16 nM и 3,2 nM. Затем их вводят в чип в течение пяти минут, после чего следует семиминутный период диссоциации со скоростью 8 мкл в секунду в нерегенеративной кинетической серии. Для обеспечения воспроизводимости были проведены повторные измерения для каждого антитела к MS4A4A.

ПРИМЕР 14: Измерение аффинности антител К MS4A4A к транзитно и нативно экспрессирующим линиям клеток

[0444] Очищенные антитела к MS4A4A оценивают на их аффинность связывания с различными линиями клеток, экспрессирующими MS4A4A. Они включают трансфицированные клетки, как описано выше в Примере 8, а также линии миелоидных клеток и первичные клетки, которые эндогенно экспрессируют MS4A4A. Тестируемые антитела к MS4A4A представляют собой либо IgG мыши, очищенные из супернатанта гибридомы, либо химеры Fc IgG1 человека, полученные рекомбинантно в клетках Expi293. Аффинность связывания с клетками определяют следующим образом. Вкратце, клетки собирают, промывают и метят Aqua Live/Dead для определения жизнеспособности. После промывки PBS аликвоты 2×10^5 клеток на лунку помещают в 96-луночные планшеты с U-образным дном и инкубировали с 50 мкл очищенного антитела к MS4A4A в различных концентрациях (3-кратные разведения, начиная с 10 мкг/мл) в буфере для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS + 1 mM ЭДТА). После первичной инкубации супернатант удаляли при помощи центрифугирования, 2 раза промывали 150 мкл охлажденного льдом буфера для проточной цитометрии и инкубировали с соответствующим вторичным антителом на льду в течение 30 минут. После инкубации со вторичным антителом клетки снова 2 раза промывали ледяным буфером для проточной цитометрии и ресуспендировали в конечном объеме 200 мкл буфера для проточной цитометрии. Анализ методом проточной цитометрии выполняли на системе FACSCanto (BD Biosciences). Данные связывания анализировали с использованием средней интенсивности флуоресценции, и кривые аппроксимировали в Prism (нелинейная регрессия: логарифм ингибитора в зависимости от дозозависимого ответа с четырьмя параметрами) для определения значений EC50.

ПРИМЕР 15: Снижение уровня белка MS4A4A

[0445] Оценивают способность антител к MS4A4A снижать уровни белка MS4A4A на клеточной поверхности и общего клеточного белка MS4A4A в различных линиях клеток и первичных клетках. Снижение

уровня белка MS4A4A в любом компартменте указывает на снижение активности MS4A4A в клетках.

[0446] Клетки инкубируют с антителами к MS4A4A по настоящему изобретению в течение различных периодов времени, а затем определяют уровни белка MS4A4A, оставшегося связанным с клетками, либо с помощью проточной цитометрии (поверхность клеток), либо с помощью вестерн-блоттинга (уровень общего белка в клетке). Для анализов методом проточной цитометрии обнаружение оставшихся MS4A4A осуществляется с помощью непосредственно конъюгированных с аллофикоцианином (APC) неконкурирующих антител. Для обнаружения вестерн-блоттинга клетки лизируют добавлением 50 мкл буфера для лизиса (буфер для лизиса RIPA (ThermoFischerScientific, кат. № 89900) + смесь ингибиторов протеазы HALT 1:100 (ThermoFischerScientific, кат. № 87786) и очищают от нерастворимого дебриса центрифугированием при 14000xg в течение 15 минут. Растворимую фракцию анализируют с помощью реагента для количественного определения белка с помощью бицинхониновой кислоты (BCA). Равные количества белков из каждого образца наносят на 4-12% полиакриламидный гель Bis-Tris Plus (ThermoFisher Scientific NW04120) и подвергают разделению при помощи электрофореза, после чего белки в геле переносят на поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану с помощью iBlot2 (ThermoFisher Scientific IM21001) и Transfer Stacks (ThermoFisher Scientific IB24002). Мембрана блокируется либо 1% бычьим сывороточным альбумином, либо 5% обезжиренным молоком для предотвращения неспецифического связывания. Затем его инкубируют с собственными или коммерческими антителами для обнаружения, промывают и инкубируют с конъюгированным с ПХ вторичным антителом (кролик, Abcam № 205718; мышь, Abcam № 205719). Связывание визуализируют путем проявления на хемилюминесцентном субстрате SuperSignal West Pico Plus (ThermoFisher Scientific №34577) и регистрируют в цифровом виде с помощью iBright FL1000 (ThermoFisher Scientific A32752) или других совместимых систем.

[0447] Снижение уровней белка MS4A4A также может быть достигнуто путем снижения экспрессии или уровней нуклеиновой кислоты MS4A4A, например, с использованием методик на основе антисмысловых олигонуклеотидов, генной терапии и т. д. с использованием методов, известных и доступных специалисту в данной области техники.

ПРИМЕР 16: Определение характеристик активности антител к MS4A4A с использованием животных моделей старения, судорог, повреждения спинного мозга, дистрофии сетчатки, лобно-височной деменции и болезни Альцгеймера

[0448] Терапевтическая полезность антител к MS4A4A также может быть проверена на животных моделях старения, судорог, повреждения спинного мозга, дистрофии сетчатки, лобно-височной деменции и болезни Альцгеймера, как описано ранее (*например*, Beattie, MS *et al.*, (2002) *Neuron* 36, 375-386; Volosin, M *et al.*, (2006) *J. Neurosci.* 26, 7756-7766; Nykjaer, A *et al.*, (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49-57; Jansen, P *et al.*, (2007) *Nat. Neurosci.* 10, 1449-1457; Volosin, M *et al.*, (2008) *J. Neurosci.* 28, 9870-9879; Fahnstock, M *et al.*, (2001) *Mol. Cell Neurosci.* 18, 210-220; Nakamura, K *et al.*, (2007) *Cell Death. Differ.* 14, 1552-1554; Yune, T *et al.*, (2007) *Brain Res.* 1183, 32-42; Wei, Y *et al.*, (2007) *Neurosci. Lett.* 429, 169-174; Provenzano, MJ *et al.*, (2008) *Laryngoscope* 118, 87-93; Nykjaer, A *et al.*, (2004) *Nature* 427, 843-848; Harrington, AW *et al.*, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6226-6230; Teng, HK *et al.*, (2005) *J. Neurosci.* 25, 5455-5463; Jansen, P *et al.*, (2007) *Nat. Neurosci.* 10, 1449-1457; Volosin, M *et al.*, (2008) *J. Neurosci.* 28, 9870-9879; Fan, YJ *et al.*, (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2380-2390; Al-Shawi, R *et al.*, (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2103-2114; and Yano, H *et al.*, (2009) *J. Neurosci.* 29, 14790-14802).

ПРИМЕР 17: Определение характеристик эффектов антител к MS4A4A с использованием животных

моделей в отношении онкологии

[0449] Миелоидные клетки представляют собой основную часть иммунных клеток, присутствующих в большинстве солидных опухолей. Их роль в биологии опухоли зависит от контекста - хотя такие клетки могут играть ключевую роль в ликвидации опухолей, они чаще всего используются опухолью-хозяином для обеспечения проопухолевого фенотипа. Это достигается в основном за счет поляризации миелоидных клеток в сторону фенотипа M2, который, как правило, является иммуносупрессивным и, таким образом, блокирует уничтожение опухоли иммунной системой. Антитела к MS4A4A посредством реполяризации миелоидных клеток могут обратить вспять этот иммуносупрессивный фенотип и способствовать противоопухолевому иммунному ответу.

[0450] Существуют многочисленные животные модели опухолей. Примеры соответствующих животных моделей включают модели гуманизированных мышей, у которых иммунная система мыши генетически удалена, как это характерно для мышей NSG (Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн). Эти мыши выступают в качестве восприимчивых хозяев для иммунных клеток человека, что приводит к приживлению адаптивных и врожденных иммунных клеток человека. Этим животным затем инокулируют опухолевые клетки, как правило, под кожу на боках. Размер опухоли с течением времени представляет собой баланс между ростом опухолевых клеток и их уничтожением иммунной системой хозяина. В течение всего времени животных лечили антителами к MS4A4A, что модифицировало прогрессирование опухоли по сравнению с животными, получавшими лечение изотипом. В конце периода лечения опухоли извлекают и подвергают различным анализам для определения действия антител к MS4A4A на опухолевые клетки и инфильтрирующие иммунные клетки. Из опухолей можно делать срезы, помещать их на предметные стекла и анализировать под микроскопом на наличие гистологических изменений. мРНК можно анализировать с помощью ОТ-ПЦР, РНК-секвенирования или микроматричный анализ для определения изменений в экспрессии генов. Можно приготовить суспензию одиночных клеток опухолевых и инфильтрирующих иммунных клеток, окрасить их антителами против различных маркеров клеточной поверхности и проанализировать с помощью проточной цитометрии, чтобы определить изменения фенотипа клеточной поверхности, особенно в иммунных клетках, таких как макрофаги и Т-клетки. Изменения, наблюдаемые в результате лечения антителом к MS4A4A в любом из этих анализов, будут указывать на иммуномодулирующую функцию этих антител.

ПРИМЕР 18: Влияние антител к MS4A4A на транскрипцию TREM2 и мРНК

[0451] Влияние антител к MS4A4A на уровень транскрипции и мРНК TREM2 оценивают следующим образом. Культивируемые клетки обрабатывают антителом к MS4A4A по настоящему изобретению в различных концентрациях в течение различных периодов времени. Затем определяют изменения уровней мРНК TREM2 в клетках с использованием стандартных методик измерения и/или количественного определения уровней мРНК, известных специалистам в данной области техники.

ПРИМЕР 19: Влияние антител к MS4A4A на рециркуляцию и деградацию TREM2

[0452] Чтобы лучше понять влияние антител к MS4A4A на повышенные уровни sTREM2 и mTREM2, были проведены следующие исследования по изучению рециркуляции и/или деградации TREM2. В этих исследованиях использовали обработку клеток циклогексимидом, чтобы предотвратить дальнейший новый синтез TREM2 в комбинации с обработкой антителом к MS4A4A. Доступны различные способы, известные в данной области техники, для исследования рециркуляции и деградации TREM2 в контрольных клетках по сравнению с клетками, обработанными антителами к MS4A4A.

ПРИМЕР 20: Дополнительные антитела к MS4A4A

[0453] Два дополнительных антитела к MS4A4A были гуманизированы, а аффинность исходного антитела 4A-21 достигла созревания, как описано выше в Примере 1, в результате чего были получены антитела к MS4A4A 4A-450 и антитела к MS4A4A 4A-419. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи каждого из этих антител показаны ниже в **таблице 29** с подчеркнутыми соответствующими CDR (по Kabat). Последовательности CDR тяжелой цепи показаны в **таблице 30**; последовательности CDR легкой цепи показаны в **таблице 31**.

ТАБЛИЦА 29

Антитело	Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Варибельная область легкой цепи	SEQ ID NO:
4A-450	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYAFTSYGLSWVRQAP GQGLEWMGWINTYSGVPTYA QGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARTMADY WGQGLTVTVSS	304	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	305
4A-419	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYRFTSYGLSWVRQAP GQGLEWMGWINTYSGVPTYA QGFKGRFVFSLDTSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCARTMADY WGQGLTVTVSS	306	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCK SSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQ SPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGIDFHQTFGGGTKVEIK	307

ТАБЛИЦА 30

Антитело	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:
4A-450	SYGLS	308	WINTYSGVPT YAQGFTG	309	TMADY	310
4A-419	SYGLS	311	WINTYSGVPT YAQGFKG	312	TMADY	313

ТАБЛИЦА 31

Антитело	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-450	KSSRSLLYS AGKTYLS	314	LVSKLDS	315	WQGIDFHQT	316
4A-419	KSSRSLLYS AGKTYLS	317	LVSKLDS	318	WQGIDFHQT	319

ПРИМЕР 21: Влияние антител к MS4A4A на уровни sTREM *in vivo*

[0454] Для изучения влияния антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни sTREM в сыворотке

и спинномозговой жидкости (СМЖ) *in vivo* были проведены следующие исследования.

[0455] Яванским макакам вводили антитело к MS4A4A 4A-202 или изотипический контроль (huIgG1) в однократной дозе 80 мг/мл путем внутривенной инфузии. Образцы сыворотки собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 4, 10, 24, 48, 96, 192, 312, 480 и 648 часов после введения антитела; образцы СМЖ собирали у животных до введения дозы, и через 48, 96, 192 и 336 часов после введения антитела.

[0456] Уровни sTREM в сыворотке и СМЖ измеряли следующим образом. Одноточечные планшеты Meso Scale Discovery (MSD) (Роквилл, штат Мэриленд) покрывали захватывающим антителом в PBS при 4°C в течение ночи. Образцы сыворотки обезьяны и СМЖ (а также стандарты TREM2-Fc обезьяны) разводили в буфере для связывания и добавляли в лунки на 1 час при комнатной температуре. Биотинилированное козьё поликлональное антитело к TREM2 человека (R&D Systems) добавляли в разведении 1:2000 в буфере для связывания и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим определением с помощью меченного SULFO-TAG стрептавидина (MSD). В планшеты добавляли 150 мкл 1х буфера для считывания, после чего планшеты анализировали на приборе Sector Imager (MSD).

[0457] В сыворотке уровни sTREM2 увеличились примерно в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем (увеличение примерно на 50% по сравнению с исходным уровнем) после введения антитела к MS4A4A 4A-202 (Фиг. 10А-10В). Уровни sTREM2 в сыворотке оставались повышенными (выше исходных уровней) в течение по меньшей мере 480 часов (20 дней) после однократного введения антитела к MS4A4A 4A-202 яванским макакам.

[0458] В СМЖ уровни sTREM2 повышались приблизительно в 2-4 раза по сравнению с исходным уровнем (приблизительно 300%-ное увеличение по сравнению с исходным уровнем) после введения антитела к MS4A4A 4A-202 (Фиг. 11А-11В). Уровни sTREM2 в СМЖ оставались повышенными (выше исходных уровней) в течение по меньшей мере 96 часов (4 дней) после однократного введения антитела к MS4A4A 4A-202 яванским макакам.

[0459] Эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в повышении уровней sTREM2 в сыворотке и в СМЖ *in vivo*.

ПРИМЕР 22:Связывание антител к MS4A4A с клетками U937, сверхэкспрессирующими рекомбинантный MS4A4A

[0460] Антитела к MS4A4A по настоящему изобретению оценивали на их аффинность связывания с человеческими рекомбинантными клетками U937, экспрессирующими MS4A4A (получение этих клеток описано выше). Аффинность связывания антител к MS4A4A с клетками определяли следующим образом. Вкратце, клетки U937, экспрессирующие рекомбинантный человеческий MS4A4A, собирали, промывали и метили Aqua Live/Dead для определения жизнеспособности. После промывания клеток PBS аликвоты 2×10^4 клеток делили на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном и инкубировали с 50 мкл очищенного антитела к MS4A4A в различных концентрациях в буфере для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS + 1 mM ЭДТА). После этой первичной инкубации супернатант удаляли при помощи центрифугирования, клетки 2 раза промывали 150 мкл охлажденного льдом буфера для проточной цитометрии и затем инкубировали с соответствующим вторичным антителом на льду в течение 15 минут. После инкубации со вторичным антителом клетки снова 2 раза промывали ледяным буфером для проточной цитометрии и ресуспендировали в конечном объеме 200 мкл буфера для проточной цитометрии. Затем проводили анализ методом проточной цитометрии с использованием системы FACSCanto (BD Biosciences). Данные связывания выражали в виде средней интенсивности флуоресценции (СИФ). Значения СИФ, измеренные проточным цитометром, были проанализированы с помощью программного обеспечения Prism (Graphpad) с использованием следующего

уравнения (или можно использовать аналогичную 4-параметрическую аппроксимацию) на основе Kuek, et al, 2016, Immunology and Cell Biology. 94:11-23:

$$Y = ((F_{\max} - B) / (n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6)))) * [((aptKD + X + n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6))) - \sqrt{((aptKD + X + n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6)))^2 - 4 * (n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6)) * X)}) / 2] + B)$$

[0461] В этих анализах следующие значения были ограничены в соответствии с экспериментальными условиями: C = количество клеток на лунку (20000); V = общий объем окрашивания в микролитрах; n = количество рецепторов на клеточной поверхности, по оценкам, 100000 рецепторов на клетку. Результаты этих исследований связывания показаны на **Фиг. 12**.

[0462] Как показано на **Фиг. 12**, антитело к MS4A4A 4A-313 WT huIgG1 продемонстрировало аффинность связывания с рекомбинантным MS4A4A человека, экспрессированным на клетках U937, приблизительно $2,8e-10$, в то время как антитело к MS4A4A 4A-450 WT huIgG1 показало аффинность связывания $3,8e-09$ в этом анализе.

ПРИМЕР 23: Создание линии клеток со сверхэкспрессией MS4A4A

[0463] Учитывая трудности создания стабильно трансфицированных линий клеток HEK293, экспрессирующих рекомбинантный человеческий MS4A4A, были исследованы другие ДНК-векторы и линии клеток, чтобы определить, будут ли они более совместимыми для экспрессии рекомбинантного человеческого MS4A4A. Для стабильной трансфекции кодирующую последовательность MS4A4A вводили в векторы экспрессии pD2533-G418 или pD3539-puro (Atum, Ньюарк, штат Калифорния, США).

[0464] MS4A4A изначально экспрессируется в миелоидных клетках *in vivo*. Таким образом, чтобы преодолеть токсичность, наблюдаемую при использовании клеток, описанных выше, несколько линий клеток миелоидного происхождения тестировали на их способность экспрессировать рекомбинантный человеческий MS4A4A с минимальной наблюдаемой токсичностью или без нее. Панель миелоидных линий клеток, используемых в этих исследованиях, которая включала клетки THP-1 (ATCC TIB202), клетки U937 (ATCC CRL-1593.2), клетки K562 (ATCC CCL243), клетки HL60 (ATCC CCL240) и клетки Kasumi-1 (ATCC CRL-2724), клетки 300.19 (Tufts University T000710), линию пре-B-клеток мыши, также были протестированы, поскольку эти клетки, как правило, используются для экспрессии рекомбинантных белков. Каждую из этих линий клеток подвергали скринингу на чувствительность к антибиотикам, чтобы определить подходящую дозу G418 или пурамицина для селекции и эффективности трансфекции. Было обнаружено, что трансфектанты из клеток U937, клеток K562 и клеток 300.19 являются жизнеспособными после трансфекции плазмидой экспрессии, которая кодирует рекомбинантный человеческий MS4A4A, и селекции с помощью антибиотиков. После клонирования этих клеток с помощью предельного разведения были созданы отдельные клоны, которые впоследствии были подвергнуты скринингу на предмет экспрессии человеческого белка MS4A4A на клеточной поверхности с использованием проточной цитометрии.

ПРИМЕР 24: Гуманизированные антитела к MS4A4A с созревшей аффинностью модулируют белок TREM2 в первичных миелоидных клетках человека

[0465] Данные исследований генетики человека выявили связь между MS4A4A, сигнальным путем TREM2 и предрасположенностью к болезни Альцгеймера (БА) (Piccio et al., 2016, Acta Neuropathol, 131:925-933; doi: <https://dx.doi.org/10.1101/352179>). Например, аллели MS4A4A, защищающие от БА, связаны с повышенным уровнем sTREM2 в спинномозговой жидкости. Чтобы получить представление об этих защитных путях, были проведены следующие исследования. Первичные макрофаги человека обрабатывали различными концентрациями антител к MS4A4A по настоящему изобретению в течение 48 часов. В этих исследованиях

были протестированы следующие антитела к MS4A4A: 4A-450 с Fc huIgG1 дикого типа (WT), 4A-450 с N325S и L328F Fc huIgG1 (NSLF), 4A-450 с K322A Fc huIgG1, 4A-313 WT huIgG1, 4A-313 NSLF huIgG1, и 4A-313 K322A huIgG1. Экспрессию TREM2 на клеточной поверхности (связанной с мембраной) затем измеряли с помощью проточной цитометрии после того, как клетки последовательно окрашивали конъюгированным с флуорофорами антителом к TREM2. Уровни растворимого TREM2 измеряли в супернатанте культуры клеток с использованием системы Mesoscale Discovery (MSD, Роквилл, штат Мэриленд, США).

[0466] Как показано на **Фиг. 13 и 14**, уровни мембранного TREM2 повышались в первичных макрофагах человека после добавления к клеткам антител к MS4A4A дозозависимым образом. Антитела к MS4A4A на различных последовательностях Fc huIgG1 — huIgG1 дикого типа, замены аминокислот N325S/L328F в huIgG1 и замены аминокислот K322A в huIgG1 — все были способны повышать уровни экспрессии мембранного TREM2. В приведенных ниже **таблицах 32 и 33** представлены числовые значения для отношения СИФ, наблюдаемого в клетках, обработанных анти-MS4A4A, в отношении изменений уровней связанного с мембраной TREM2 по сравнению с таковыми, наблюдаемыми для необработанных контрольных клетках, приведенных на **Фиг. 13 и 14**, соответственно.

[0467] На **Фиг. 15 и 16** показано, что антитела к MS4A4A 4A-450 и 4A-313 на основе остова Fc huIgG1 дикого типа (соответственно) повышали уровни растворимого TREM2 в супернатантах первичных макрофагов человека дозозависимым образом. В приведенных ниже **таблицах 34 и 35** представлены числовые значения кратного увеличения растворимого TREM2, наблюдаемого в клетках, обработанных анти-MS4A4A, по сравнению с измеренным исходным уровнем на планшетах, показанным на **Фиг. 15 и 16**, соответственно.

ТАБЛИЦА 32

Антитело (μмкг/мл)	4A-450 WT			NSLF 4A-450			4A-450 K322A		
2,5	1,184	1,174	1,205	1,297	1,176	1,418	1,176	1,180	1,327
0,4	1,236	1,063	1,028	1,276	1,270	1,168	1,163	1,173	1,163
0,064	1,043	1,033	0,897	1,169	1,026	1,093	1,002	1,178	1,023

ТАБЛИЦА 33

Антитело (μмкг/мл)	4A-313 WT			NSLF 4A-313			4A-313 K322A		
1	1,431	1,242	1,475	1,570	1,380	1,542	1,348	1,240	1,405
0,16	1,388	1,210	1,235	1,392	1,262	1,274	1,290	1,155	1,170
0,0256	1,194	1,056	0,978	1,106	1,103	0,974	1,163	1,161	1,068

ТАБЛИЦА 34

4A-450 WT IgG1 (μмкг/мл)	sTREM2 (кратность относительно фона)
0,0256	0,250851509
0,064	0,337610359
0,16	0,453324666
0,4	0,60750507

4A-450 WT IgG1 (μмкг/мл)	sTREM2 (кратность относительно фона)
1	0,838142928
2,5	1,452549482

ТАБЛИЦА 35

4A-313 WT IgG1 (μмкг/мл)	sTREM2 (кратность относительно фона)
0,0256	0,690304672
0,064	0,942481014
0,16	1,64173901
0,4	1,690748748
1	1,687668894
2,5	1,52381547

[0468] Эти результаты продемонстрировали, что антитело к MS4A4A 4A-450 WT huIgG1 (2,5 μмкг/мл) повышало уровни sTREM в первичных макрофагах человека примерно в 1,4 раза по сравнению с необработанными клетками. Эти результаты также продемонстрировали, что антитело к MS4A4A 4A-313 WT huIgG1 повышало уровни sTREM в первичных макрофагах человека примерно в 1,5-1,7 раза по сравнению с необработанными клетками. Эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в отношении повышения уровней sTREM *in vitro* и, таким образом, могут обеспечить эффективное средство повышения уровней sTREM в плазме и СМЖ *in vivo*, имитируя эффект аллелей MS4A4A, которые защищают от развития болезни Альцгеймера.

ПРИМЕР 25: Влияние антител к MS4A4A на уровни клеточного АТФ

[0469] Моноциты человека выделяли из цельной крови с использованием коктейля для обогащения моноцитов человека RosetteSep (Stemcell technologies) и центрифугирования в градиенте фикола в соответствии с протоколами производителя. После лизиса эритроцитов лизирующим буфером АСК моноциты ресуспендировали в полных средах (RPMI, 10% FBS, Pen/Strep, L-глутамин, HEPES, заменимая аминокислота, пируват натрия). Для получения макрофагов из этих выделенных моноцитов к клеткам добавляли 100 нг/мл M-CSF человека и 8% об./об. сыворотки человека на 5-7 дней. Затем клетки высевали по 50000 клеток/лунку в полный RPMI-1640 и культивировали в течение 2 дней в присутствии или в отсутствие различных концентраций антител к MS4A4A (4A-313 NSLF, 4A-313 PS, 4A-450 NSLF, and 4A-450 PS) или антитела изотипического контроля в различных концентрациях в растворе в течение 48 часов. Затем содержание АТФ в клетках определяли количественно с использованием набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo Luminescent (Promega, кат. № G7571) в соответствии с протоколом производителя.

[0470] Как показано на Фиг. 17, антитела к MS4A4A 4A-313 NSLF huIgG1, 4A-313 PS huIgG1, 4A-450 NSLF huIgG1, и 4A-450 PS huIgG1 увеличивали уровни АТФ в первичных макрофагах человека дозозависимым образом. Антитела к MS4A4A, имеющие Fc huIgG1, содержащие аминокислотные замены N325S/L328F, которые устраняют связывание FcγRIIIa (Journal of Biological Chemistry 2014, 289: 15309-15318), или имеющие Fc huIgG1, содержащие аминокислотные замены P331S, которые устраняют связывание C1q (Journal of

Immunology 2000, 164: 4178-4184), были эффективны в повышении уровня АТФ в макрофагах человека. Увеличение уровня АТФ указывает на повышенную жизнеспособность макрофагов человека.

[0471] В таблице 36 ниже представлены числовые значения уровней АТФ, определенные в этих исследованиях (связанные с Фиг. 17), которые были нормализованы к уровням, наблюдаемым в необработанных макрофагах. Эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению были эффективны в отношении повышения уровней АТФ в макрофагах человека дозозависимым образом. С использованием антитела к MS4A4A 4A-450 уровни АТФ увеличились в примерно 1,2 раза (с 0,016 мкг/мл антитела к MS4A4A) – примерно 1,4 раза (с 1,0 мкг/мл антитела к MS4A4A) относительно уровней, наблюдаемых для необработанных клеток. С использованием антитела к MS4A4A 4A-313 уровни АТФ увеличились в примерно 1,3 раза (с 0,008 мкг/мл антитела к MS4A4A) – примерно 1,7 раза (с 1,0 мкг/мл антитела к MS4A4A) относительно уровней, наблюдаемых для необработанных клеток.

ТАБЛИЦА 36

Антителю (мкг/мл)	4A-450.NSLF	4A-450.PS	4A-313.NSLF	4A-313.PS
1,000	1,431	1,378	1,669	1,739
0,500	1,362	1,355	1,620	1,685
0,250	1,332	1,325	1,670	1,667
0,125	1,298	1,303	1,661	1,711
0,063	1,308	1,317	1,762	1,715
0,031	1,247	1,296	1,704	1,720
0,016	1,258	1,182	1,698	1,652
0,008	1,058	1,000	1,308	1,266
0,004	0,952	0,957	1,079	1,096

ПРИМЕР 26: Влияние антител к MS4A4A на маркеры клеточной поверхности макрофагов

[0472] Миелоидные клетки как в ЦНС, так и в периферических органах пластичны по своему фенотипу и функциям. В периферических органах макрофаги с M1-подобным фенотипом более провоспалительные и антимикробные, тогда как макрофаги с M2-подобным фенотипом являются более гомеостатическими и противовоспалительными. В ЦНС микроглия в гомеостатических условиях также экспрессирует M2-подобные маркеры, такие как, например, CD200R и CD163. Экспрессия MS4A4A повышена в M2-подобных макрофагах *in vitro*, и было высказано предположение, что MS4A4A является новым маркером клеточной поверхности для M2-подобных макрофагов (Immunology and Cell Biology 2017, 95: 611-619).

[0473] Влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на различные маркеры клеточной поверхности макрофагов исследовали следующим образом. Первичные макрофаги человека обрабатывали различными концентрациями (10 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 0,1 мкг/мл) антител к MS4A4A 4A-313 NSLF huIgG1 или 4A-419 huIgG1 дикого типа (WT) в полной RPMI1640 в течение 48 часов. Затем клетки собирали и подвергали проточной цитометрии с использованием антител, специфичных к M1-подобным маркерам (например, CD16, MHC класса II, CD86), M2-подобным маркерам (например, CD200R, дектина-1, CD163) и панмакрофагальному маркеру CD14.

[0474] Как показано на Фиг. 18А, 18В и 18С, добавление антител к MS4A4A к первичным макрофагам человека приводило к снижению маркеров клеточной поверхности CD14 и CD163 дозозависимым образом по

сравнению с таковым, наблюдаемым в необработанных клетках (антитело к MS4A4A 4A-313 NSLF huIgG1 Fc (столбики справа в каждой паре), антитело к MS4A4A 4A-419 huIgG1 Fc дикого типа (WT) (столбики слева в каждой паре). Добавление антитела к MS4A4A 4A-313 NSLF к первичным макрофагам человека приводило к уровням маркера клеточной поверхности CD200R, которые были ниже наблюдаемых в необработанных клетках. Напротив, добавление антитела к MS4A4A 4A-419 к первичным макрофагам человека приводило к увеличению маркера клеточной поверхности CD200R по сравнению с таковым, наблюдаемым в необработанных клетках. Этот результат считается аномалией для данного конкретного эксперимента с учетом результатов, полученных для антитела к MS4A4A 4A-313 NSLF, приведенных выше, и с учетом результатов, полученных для других антител к MS4A4A по настоящему изобретению, которые уменьшали M2-подобные маркеры клеточной поверхности, такие как CD200R (см. Пример 9 и таблицу 26 выше). В приведенной ниже **таблице 37** представлены числовые значения кратности изменения (выше необработанных клеток) в продуцентах клеточной поверхности, полученные из графиков на **Фиг. 18А, 18В и 18С**. Данные усреднены по трем лункам от двух доноров.

ТАБЛИЦА 37

Антитело (μкг/мл)	4A-419.WT	4A-313.NSLF
	CD14	
10	0,40	0,41
1	0,54	0,34
0,1	0,86	0,36
Без обработки	1,00	1,08
	CD163	
10	0,25	0,28
1	0,32	0,30
0,1	0,70	0,36
Без обработки	0,63	0,75
	CD200R	
10	1,17	0,75
1	1,20	0,56
0,1	1,24	0,41
Без обработки	0,80	0,96

[0475] Эти результаты демонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в снижении количества M2-подобных макрофагов, образующих клеточную поверхность.

ПРИМЕР 27: Варианты Fc IgG1 человека в анализе комплементзависимой цитотоксичности (CDC)

[0476] Домен Fc человеческого антитела IgG1 влияет на эффекторные функции за счет его взаимодействия с несколькими нижележащими эффекторными молекулами, такими как, например, C1q, Fc-гамма-рецепторы

и неонатальные Fc-рецепторы. Способность антител к MS4A4A по настоящему изобретению, имеющих варианты областей Fc huIgG1, влиять на отложение компонентов комплемента, измеряли с использованием анализа отложения C3b/гибели клеток следующим образом.

[0477] Клетки U937, сверхэкспрессирующие рекомбинантный человеческий MS4A4A, полученный, как описано выше, использовали в качестве клеток-мишеней в этих исследованиях. Клетки собирали, промывали 1х в PBS и разбавляли до 2×10^6 клеток/мл в среде RPMI 1640. Аликвоты по 50 мкл клеток-мишеней на лунку (1×10^5 клеток на лунку) помещали в круглодонные 96-луночные планшеты (Falcon №351177). К этим клеткам добавляли 25 мкл антител к MS4A4A, приготовленных в той же среде, в четырехкратной заранее определенной концентрации. Смесь клеток и антител инкубировали при 37°C в течение 15 минут, затем добавляли по 25 мкл сложного комплемента сыворотки человека (Innovative Research, IPLA-CSER) в каждую лунку в качестве источника комплемента, и планшеты инкубировали еще 2 часа при 37°C. После этого клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS + 1 mM ЭДТА) и добавляли по 100 мкл разбавленного 1:50 антитела к C3b-APC (Biolegend 846106) на лунку и инкубировали на льду в течение 30 минут. Клетки 2 раза промывали буфером для проточной цитометрии и ресуспендировали в 80 мкл буфера для проточной цитометрии + 0,25 мкл/лунку пропидий йодида (Fischer Scientific, BD 556463) перед анализом на проточном цитометре iQue (IntelliCyt). Активность системы комплемента измеряли двумя способами: либо по проценту клеток с высоким уровнем PI, чтобы определить степень CDC-опосредованного уничтожения клеток, либо по СИФ клеток в канале APC для измерения отложения C3b.

[0478] На **Фиг. 19** показан процент поглощения PI (йодида пропидия) клетками U937, экспрессирующими рекомбинантный человеческий MS4A4A, которые были обработаны антителом к MS4A4A 4A-313 с различными вариантами Fc huIgG1. Как показано на **Фиг. 19**, антитело к MS4A4A 4A-313 с huIgG1 дикого типа обладает высокой способностью стимулировать отложение комплемента и уничтожение клеток, экспрессирующих мишень, что наблюдается в виде увеличения поглощения PI клетками. Этот эффект зависел от дозы. Антитело к MS4A4A 4A-313 с аминокислотными заменами huIgG1 N325S/L328F в области Fc (что значительно снижает связывание C1q), CDC почти полностью устраняется в этом анализе. Кроме того, антитело к MS4A4A 4A-313 с аминокислотной заменой huIgG1 K322A в области Fc имело аналогичный эффект в виде отсутствия активности CDC в этом анализе.

[0479] В таблице 38 ниже показаны числовые значения, связанные с графиками, приведенными на **Фиг. 19**.

ТАБЛИЦА 38

Антитело (нг/мл)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	IgG1 изотипического контроля
20 000,0	6,35	4,42	90,93	8,51
6 666,7	9,27	5,96	90,53	8,08
2 222,2	13,48	9,82	92,19	4,38
740,7	24,70	18,79	88,78	5,36
246,9	13,64	16,27	46,49	6,15
82,3	7,39	5,43	11,95	5,08
27,4	7,15	4,72	4,72	7,14
9,1	9,04	3,89	4,38	9,01

Антитело (нг/мл)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	IgG1 изотипического контроля
3,0	8,96	4,95	3,63	9,13
0,0	7,58	5,49	7,09	9,29

[0480] Эти результаты показали, что антитела к MS4A4A, имеющие область Fc человеческого IgG1 дикого типа, эффективны в отношении комплемент-зависимой цитотоксичности, в то время как антитела к MS4A4A, имеющие вариант Fc IgG1 человека либо с аминокислотными заменами N325S/L328F, либо с аминокислотными заменами K322A, неэффективны в отношении комплемент-зависимой цитотоксичности.

ПРИМЕР 28: Варианты Fc IgG1 человека при антителозависимом клеточном фагоцитозе (ADCP)

[0481] Способность антител к MS4A4A по настоящему изобретению опосредовать антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) оценивали с использованием системы ADCH Reporter Bioassay (Promega, № G9901). В этой системе используется сконструированная линия Т-клеток Jurkat, стабильно экспрессирующая рецептор FcγRIIa (вариант H131), и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Активность в этом анализе коррелирует с активностью ADCP эффекторных клеток (в данном случае миелоидных клеток). Используемые в данном документе клетки-мишени представляли собой либо клетки U937, сверхэкспрессирующие рекомбинантный MS4A4A человека, либо первичные макрофаги человека, полученные из моноцитов и поляризованные с помощью hIL-4 (20 нг/мл) и дексаметазона (20 нМ).

[0482] Клетки разводили в буфере для анализа (RPMI + 4% сыворотки с низким содержанием IgG) в концентрации $1,2 \times 10^6$ на мл, и 25 мкл клеток (30000 на лунку) разделяли на аликвоты и вносили во внутренние лунки 96-луночного белого планшета для анализа (Costar 3922). Внешние лунки планшета были заполнены 75 мкл буфера для анализа без клеток или антител. В лунки, содержащие клетки, добавляли 25 мкл антитела к MS4A4A в концентрации, в 3 раза превышающей желаемую конечную концентрацию, также разведенные в буфере для анализа. После добавления антитела к клеткам-мишеням эффекторные клетки, представленные в системе для анализа (замороженные в концентрации 2×10^7 на мл), оттаивали при 37°C, 630 мкл добавляли к 3,6 мл предварительно подогретого (37°C) буфера для анализа и осторожно перемешивали. Двадцать пять мкл эффекторных клеток (75000 на лунку, при соотношении Е:Т, равном 2,5) немедленно добавляли в лунки, содержащие клетки-мишени и антитело. Затем планшет инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение шести часов, чтобы обеспечить активацию рецепторных клеток и экспрессию люциферазы. После этой инкубации планшет уравнивали до комнатной температуры (15 мин), после чего в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента для анализа люциферазы. Затем планшет инкубировали в течение 20 минут на шейкере для планшетов и измеряли люминесценцию на планшет-ридере BioTek.

[0483] Как показано на **Фиг. 20**, huIgG1 дикого типа (IgG1 изотипического контроля) был устойчивым в управлении активностью люциферазы в этом анализе, что указывает на активацию FcγRIIa-H131. Антитело к MS4A4A 4A-313, имеющее Fc huIgG1 с аминокислотными заменами N325S/L328F, продемонстрировало существенную потерю активации FcγRIIa-H131 по сравнению с таковой, наблюдаемой для IgG1 изотипического контроля; антитело к MS4A4A 4A-313, имеющее Fc huIgG1 с аминокислотной заменой K322A, оказывало аналогичный эффект в этом анализе.

[0484] В **таблице 39** ниже представлены числовые значения, связанные с графиками, представленными на **Фиг. 20**.

ТАБЛИЦА 39

Антитело (нг/мл)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	IgG1 изотипического контроля
20 000	250	154	455	83
6 666,667	227	242	403	49
2 222,222	55	67	128	57
740,7407	61	54	85	60
246,9136	51	60	98	54
82,30453	58	66	64	41
27,43484	39	44	80	42
9,144947	45	46	54	52
3,048316	42	51	48	45
0	50	50	49	64

[0485] Эти результаты показали, что антитела к MS4A4A, имеющие область Fc человеческого IgG1 дикого типа, эффективны при антителозависимом клеточном фагоцитозе. Кроме того, эти результаты показали, что антитела к MS4A4A, имеющие вариант Fc IgG1 человека либо с аминокислотными заменами N325S/L328F, либо с аминокислотными заменами K322A, также эффективны при антителозависимом клеточном фагоцитозе, хотя и в меньшей степени.

ПРИМЕР 29: Варианты Fc IgG1 человека при антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC)

[0486] Антитела, связанные со своими клетками-мишенями, могут опосредовать ADCC, активность, которая, как считается, в первую очередь обусловлена активацией FcγRIIIa на натуральных клетках-киллерах. Способность антител к MS4A4A по настоящему изобретению вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) оценивали с использованием системы ADCC Reporter Bioassay (Promega, №G7010). В этой системе для анализа используется сконструированная линия Т-клеток Jurkat, стабильно экспрессирующая рецептор FcγRIIIa (вариант V158), и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Используемые в данном документе клетки-мишени представляли собой либо клетки U937, сверхэкспрессирующие рекомбинантный MS4A4A человека, либо первичные макрофаги человека, полученные из моноцитов и поляризованные с помощью hIL-4 (20 нг/мл) и дексаметазона (20 нМ). Целевые клетки разводили в буфере для анализа (RPMI + 4% сыворотки с низким содержанием IgG) в концентрации $1,2 \times 10^6$ на мл и 25 мкл клеток (30000 на лунку) разделяли на аликвоты и вносили во внутренние лунки 96-луночного белого планшета для анализа (Costar 3922). Внешние лунки планшета были заполнены 75 мкл буфера для анализа без клеток или антител. В лунки, содержащие клетки, добавляли 25 мкл антитела в концентрации, в 3 раза превышающей желаемую конечную концентрацию, также разведенные в буфере для анализа. После добавления антител к клеткам-мишеням предоставленные эффекторные клетки (замороженные в концентрации 2×10^7 на мл) размораживали при 37°C, 630 мкл добавляли к 3,6 мл подогретого (37°C) буфера для анализа, осторожно перемешивали и 25 мкл эффекторных клеток (75000 на лунку, при соотношении Е:Т 2,5) немедленно добавляли в лунки, содержащие целевые клетки и антитела. Затем планшет инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение шести часов, чтобы обеспечить активацию рецепторных клеток и экспрессию люциферазы. После этой инкубации планшет уравнивали до

комнатной температуры (15 мин), после чего в каждую лунку добавляли 75 мкл реагента для анализа люциферазы. Затем планшеты инкубировали в течение 20 минут на шейкере для планшетов и измеряли люминесценцию на планшет-ридере BioTek.

[0487] Как показано на **Фиг. 21**, huIgG1 дикого типа (IgG1 изотипического контроля) был устойчивым в управлении активностью люциферазы в этом анализе, что указывает на активацию FcγRIIIa-V158. Антитело к MS4A4A 4A-313, имеющее Fc huIgG1 с аминокислотными заменами N325S/L328F, продемонстрировало существенную потерю активации FcγRIIIa-H131 по сравнению с таковой, наблюдаемой для IgG1 изотипического контроля; антитело к MS4A4A 4A-313, имеющее Fc huIgG1 с аминокислотной заменой K322A, оказывало аналогичный эффект в этом анализе.

[0488] В таблице 40 ниже представлены числовые значения, связанные с графиками, представленными на **Фиг. 21**.

ТАБЛИЦА 40

Антитело (нг/мл)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	IgG1 изотипического контроля
20 000	442	1222	4397	399
6 666,667	415	1182	4891	431
2 222,222	431	1017	5133	373
740,7407	363	623	4346	379
246,9136	332	508	2063	381
82,30453	360	426	839	377
27,43484	347	341	473	340
9,144947	356	338	367	329
3,048316	324	338	346	314
0	328	343	348	368

[0489] Эти результаты показали, что антитела к MS4A4A, имеющие область Fc huIgG1 дикого типа, эффективны при антителозависимой клеточной цитотоксичности, в то время как антитела к MS4A4A, имеющие вариант Fc IgG1 человека либо с аминокислотными заменами N325S/L328F, либо с аминокислотными заменами K322A, неэффективны в отношении антителозависимой клеточной цитотоксичности.

ПРИМЕР 30: Влияние нокаута MS4A4A на уровни мембран и растворимого TREM2 в первичных макрофагах человека

[0490] Влияние нокаута MS4A4A на уровни мембран и растворимого TREM2 в макрофагах исследовали следующим образом. Технологию CRISPR использовали для нокаута экспрессии MS4A4A в первичных макрофагах человека. Вкратце, макрофаги с нокаутом получали путем электропорации белком Cas9 (IDT), который образовывал комплексы с ненацеленными (NT) или MS4A4A-специфическими гРНК, состоящими из локус-специфических сгРНК (IDT; NT1, отрицательная контрольная сгРНК IDT №1 и №2; NT2, GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC (SEQ ID NO:345) и AACCCCTGATTGTATCCGCA (SEQ ID NO:346); MS4A4A №1, AATTGTGTACCCGATATACA (SEQ ID NO:347); MS4A4A №2, AACCATGCAAGGAATGGAAC (SEQ ID NO:348); MS4A4A №3, TATTCATTCTAGACTACCT (SEQ ID

NO:349); MS4A4A №4, GCTCTGTACTGGCTGCATCA (SEQ ID NO:350)), отождествленных с tracrPHK (IDT). Эффективность нокаута MS4A4A была оценена с помощью анализа методом проточной цитометрии и составила более 90% (данные не показаны).

[0491] На **Фиг. 22A и 22B** показано влияние нокаута MS4A4A на уровни мембранного TREM2 (mTREM2) и уровни растворимого TREM2 (sTREM2). На **Фиг. 22A и 22B** NT1 и NT2 представляют собой ненацеленные контроли CRISPR; нPHK 2+3 и нPHK 1+4 относятся к разным направляющим PHK, используемым для нокаута MS4A4A.

[0492] Как показано на **Фиг. 22A и 22B**, нокаут MS4A4A в первичных макрофагах человека приводил к увеличению уровней mTREM2 и sTREM2. Повышенные уровни mTREM2 и sTREM2, наблюдаемые при нокауте MS4A4A, были сравнимы с увеличением уровней mTREM2 и sTREM2 при добавлении антитела к MS4A4A 4A-313 к контрольным клеткам NT1 и NT2. При обработке антителом к MS4A4A первичных макрофагов человека с нокаутом MS4A4A не наблюдалось дальнейшего увеличения уровней mTREM2 или sTREM2, что позволяет предположить, что повышение уровней mTREM2 и sTREM2, наблюдаемое при добавлении антитела к MS4A4A по настоящему изобретению к макрофагам человека, возникает в результате связывания антитела к MS4A4A с MS4A4A на клетках.

ПРИМЕР 31: Кинетика модуляции мембраны и растворимого TREM2 антителами к MS4A4A

[0493] Экспрессия белка TREM2 на клеточной поверхности регулируется эндоцитозом/экзоцитозом TREM2 в плазматическую мембрану и из нее, а также регулируемым расщеплением TREM2 мембраносвязанными протеазами (Thornton et al., 2017, EMBO Mol. Med. 9: 1366-1378; doi: 10.15252/emmm.201707673). Как описано выше в примерах, обработка макрофагов человека антителами к MS4A4A по настоящему изобретению повышала уровни как мембранного, так и растворимого TREM2. Следующие исследования были проведены для дальнейшего понимания кинетики изменений уровней мембранного и растворимого TREM2.

[0494] Для оценки изменений уровней растворимого TREM2 (sTREM2) первичные макрофаги человека высевали либо в 24-луночные, либо в 96-луночные планшеты с последующим добавлением антител к MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-450.NSLF или антитела изотипического контроля (все в концентрации 1 мкг/мл). Через 0,5, 1, 4, 24 и 48 часов культивирования клеток в присутствии антител собирали супернатанты и определяли уровни sTREM2 с помощью Meso Scale Discovery.

[0495] Кинетику увеличения уровней мембранного TREM2 (mTREM2) в первичных макрофагах человека после добавления антител к MS4A4A по настоящему изобретению оценивали следующим образом. Первичные макрофаги человека высевали по 100000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном за 3 дня до анализа (Т минус 72 часа). В различные моменты времени (Т минус 48 часов, Т минус 24 часа, Т минус 4 часа, Т минус 1 час) к посеянным клеткам добавляли антитела, которые включали антитело изотипического контроля (IsoControl.NSLF) и антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF. Через 72 часа после посева уровни экспрессии TREM2 на клеточной поверхности (связанной с мембраной) измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания клеток конъюгированным с флуорофором антителом к TREM2.

[0496] Как показано на **Фиг. 23A**, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению быстро повышали уровни sTREM2 в супернатантах культивируемых первичных макрофагов человека, полученных от различных доноров. Антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF увеличивало уровни sTREM2 приблизительно в 0,5 раза по сравнению с уровнем, наблюдаемым для клеток, обработанных антителом изотипического контроля (увеличение примерно на 50%). Антитело к MS4A4A 4A-450.NSLF увеличивало уровни sTREM2 приблизительно в 2,5 раза по сравнению с уровнем, наблюдаемым для клеток, обработанных антителом изотипического контроля (увеличение примерно на 250%).

[0497] Как показано на **Фиг. 23В**, через 1 час и 4 часа после добавления антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF к первичным человеческим макрофагам уровни TREM2 в мембране снизились по сравнению с наблюдаемым после добавления антитела изотипического контроля. На **Фиг. 23В**, пунктирная линия представляет уровень mTREM2 в клетках, обработанных антителом изотипического контроля. Через 24 и 48 часов после добавления антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF уровни mTREM2 повышались выше уровня, наблюдаемого в клетках, обработанных антителом изотипического контроля. Ранее снижение мембранного TREM2 согласуется с увеличением выделения TREM2 во все исследованные моменты времени, как показано на **Фиг. 23А**.

[0498] Поскольку антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни белка TREM2 в первичных макрофагах человека, были проведены следующие эксперименты для изучения влияния на уровни мРНК TREM2 после добавления антитела к MS4A4A. Первичные макрофаги человека высевали либо в 24-луночные, либо в 96-луночные планшеты и обрабатывали антителом к MS4A4A 4A-313.NSLF и изотипом (1 мкг/мл) в полной RPMI. Через 0,5, 1, 4, 24 и 48 часов инкубации собирали клеточный осадок и определяли уровни мРНК TREM2 с использованием анализа методом количественного ПЦР (кПЦР). Вкратце, РНК экстрагировали с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen), кДНК получали из тотальной РНК с использованием набора QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen). Уровни экспрессии генов анализировали с помощью ПЦР в реальном времени с использованием анализов TaqMan для TREM2 (Hs00219132_m1) и GAPDH (Hs027886624_g1). Значения CT для каждого образца были нормализованы к значениям CT для конститутивного гена GAPDH.

[0499] Как показано на **Фиг. 23С**, антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF не влияло на уровни мРНК TREM2 в культивируемых первичных макрофагах человека, полученных от различных доноров; наблюдались некоторые незначительные колебания уровней мРНК (менее чем в 0,5 раза выше, чем для изотипического контроля). Эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни белка TREM2, не влияя на уровни мРНК TREM2 в культивируемых первичных макрофагах человека.

ПРИМЕР 32: Антитела к MS4A4A повышают секрецию SPP1 и IL1RN в первичных макрофагах человека

[0500] Влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на секретируемые уровни остеоноптина (SSP1) и антагониста рецептора интерлейкина-1 (IL1RN) в первичных макрофагах человека исследовали и сравнивали с эффектом, наблюдаемым в первичных макрофагах человека, генетически модифицированных для нокаута экспрессии MS4A4A следующим образом.

[0501] Генетический нокаут MS4A4A в первичных макрофагах человека был получен путем электропорации белком Cas9, который образовал комплекс с направляющими РНК (нРНК) в виде либо одиночных молекул нРНК, либо дуплексов нРНК, состоящих из crРНК, отождествленных с tracrРНК: ненацеленную NT1 (отрицательная контрольная РНК IDT №1 и №2); NT2 (GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC [SEQ ID NO:345] и AACCCCTGATTGTATCCGCA [SEQ ID NO:346]); MS4A4A №1 (AATTGTGTACCCGATATACA [SEQ ID NO:347]); MS4A4A №2 (AACCATGCAAGGAATGGAAC [SEQ ID NO:348]); MS4A4A №3 (TATTCATTCCTAGACTACCT [SEQ ID NO:349]); MS4A4A №4, GCTCTGTACTGGCTGCATCA [SEQ ID NO:350]) (все из IDT, Коралвилль, штат Айова, США) с использованием стандартных процедур. Затем клетки высевали по 50000 клеток/лунку в полный RPMI-1640 и культивировали в течение 48 часов в присутствии антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF (0,1 мкг/мл), антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF (0,1 мкг/мл) или антитела изотипического контроля. Собирали супернатанты клеток и анализировали уровни IL1RN и SPP1 с использованием наборов R&D DuoSet ELISA (IL1RN, кат. № DY280, SPP1, кат. № DY1433).

[0502] Обработка контрольных клеток NT либо антителом к MS4A4A 4A-313.NSLF, либо 4A-450.NSLF приводила к повышению уровня секретируемого SPP1. Генетический нокаут MS4A4A в этих клетках также приводил к увеличению уровней секретируемого SPP1, сравнимым с таковым, наблюдаемым при лечении антителами к MS4A4A. Уровни SPP1 в этих исследованиях были следующими: приблизительно 100 нг/мл после добавления антитела изотипического контроля в контрольные клетки NT; приблизительно 200 нг/мл после добавления антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF в контрольные клетки NT; приблизительно 275 нг/мл после добавления антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF в контрольные клетки NT; и приблизительно 225 нг/мл в нокаутные по MS4A4A клетки. Увеличение уровней секретируемого SPP1 после добавления любого антитела к MS4A4A по настоящему изобретению было сравнимо с наблюдаемыми уровнями в клетках, в которых экспрессия MS4A4A была генетически нокаутирована.

[0503] Обработка контрольных клеток NT либо антителом к MS4A4A 4A-313.NSLF, либо 4A-450.NSLF приводила к повышению уровня секретируемого IL1RN. Генетический нокаут MS4A4A в этих клетках также приводил к увеличению уровней секретируемого IL1RN, сравнимому с таковым, наблюдаемым при лечении антителами к MS4A4A. Уровни IL1RN в этих исследованиях были следующими: приблизительно 8 нг/мл после добавления антитела изотипического контроля в контрольные клетки NT; приблизительно 12 нг/мл после добавления антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF в контрольные клетки NT; приблизительно 16 нг/мл после добавления антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF в контрольные клетки NT; и приблизительно 14 нг/мл в нокаутные по MS4A4A клетки. Увеличение уровней секретируемого IL1RN после добавления любого антитела к MS4A4A по настоящему изобретению было сравнимо с наблюдаемыми уровнями для клеток, в которых экспрессия MS4A4A была генетически нокаутирована.

[0504] В совокупности эти результаты указывают на то, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в отношении повышения уровней секретируемых SPP1 и IL1RN в первичных макрофагах человека. Кроме того, эти результаты показали, что эффект антител к MS4A4A по настоящему изобретению на повышение уровня секретируемых SPP1 и IL1RN был аналогичен эффекту, наблюдаемому при генетическом нокауте экспрессии MS4A4A, что позволяет предположить, что антитело к MS4A4A по настоящему изобретению снижало или блокировало активность MS4A4A в этих клетках, что приводило к наблюдаемому увеличению уровней SPP1 и IL1RN.

ПРИМЕР 33: Жизнеспособность макрофагов человека, индуцированная антителами к MS4A4A, не зависит от TREM2

[0505] Как показано выше, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению были эффективны в повышении жизнеспособности первичных макрофагов человека (измеряемой по увеличению общего клеточного АТФ) после добавления антитела к MS4A4A. Кроме того, как показано выше, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни мембранного TREM2 в клетках. Поскольку антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни мембранного TREM2, а антитела к MS4A4A повышали жизнеспособность клеток, была проведена серия экспериментов для изучения того, является ли увеличение жизнеспособности клеток, наблюдаемое в ответ на добавление антител к MS4A4A, по меньшей мере частично, зависимым от TREM2 образом. Чтобы исследовать это, TREM2 был генетически нокаутирован в первичных макрофагах человека с использованием технологии CRISPR для изучения эффектов антител к MS4A4A по настоящему изобретению на жизнеспособность клеток в первичных макрофагах человека, генетически лишенных экспрессии TREM2.

[0506] Макрофаги с нокаутом TREM2 были получены путем электропорации белком Cas9, который был в комплексе с направляющими РНК (нРНК) в виде либо одиночных молекул нРНК, либо дуплексов нРНК,

состоящих из crPHK, отождествленных с tracrPHK: ненацеленные 1 (NT1) (отрицательная контрольная crPHK IDT №1 и №2); NT2 (GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC [SEQ ID NO:345] и AACCCCTGATTGTATCCGCA [SEQ ID NO:346]); TREM2 №1 (GCCATCACAGACGATACCCT [SEQ ID NO:351]); TREM2 №2 (ATAGGGGCAAGACACCTGCA [SEQ ID NO:352]); TREM2 №3 (CAGCATCCCGGTGATCCAGG [SEQ ID NO:353]); TREM2 №4, TGGAGATCTCTGGTTCCCCG [SEQ ID NO:354]) (все из IDT, Коралвилль, штат Айова, США).

[0507] Затем клетки высевали в количестве 50000 клеток/лунку в полной RPMI-1640 и культивировали в присутствии антител к MS4A4A (4A-313 NSLF, 4A-450 NSLF) или антитела изотипического контроля (все в концентрации 0,1 мкг/мл). в растворе 48 часов. Затем содержание АТФ в клетках определяли количественно с использованием набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo Luminescent (Promega, кат. № G7571) в соответствии с протоколом производителя.

[0508] Добавление антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF или антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF увеличивало уровни АТФ в контрольных клетках NT примерно на 20% по сравнению с тем, что наблюдалось при использовании антитела изотипического контроля. Кроме того, добавление антитела к MS4A4A к нокаутным клеткам TREM2 приводило к повышению уровня АТФ примерно на 15-20% по сравнению с наблюдаемым с антителом изотипического антитела. Взятые вместе, эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышают уровни клеточного АТФ (и, таким образом, жизнеспособность клеток), по меньшей мере частично, независимым от TREM2 образом.

ПРИМЕР 34: Нокадаун MS4A4A с помощью киPHK увеличивает уровни мембранного и растворимого TREM2 в первичных макрофагах человека

[0509] Как показано выше, генетическая абляция экспрессии MS4A4A с использованием технологии CRISPR привело к увеличению уровней мембранного и растворимого TREM2 в макрофагах человека. Чтобы дополнительно подтвердить эти результаты, влияние потери экспрессии MS4A4A на уровни TREM2 оценивали с использованием независимого экспериментального подхода. В этих исследованиях был проведен нокадаун киPHK MS4A4A в первичных макрофагах человека и измерено его влияние на уровни мембранного и растворимого TREM2.

[0510] Макрофаги с нокадауном MS4A4A были созданы путем трансфекции контрольных (Millipore Sigma, SIC001) и нацеленных на MS4A4A киPHK (Millipore Sigma, SASI_Hs01_00150955), с использованием N-TER Nanoparticle siRNA Transfection System (Millipore Sigma). Эффективность нокаута MS4A4A оценивали с помощью анализа методом проточной цитометрии (данные не показаны). Экспрессию TREM2 на клеточной поверхности (связанной с мембраной) измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания клеток конъюгированным с флуорофором антителом к TREM2.

[0511] Как показано на **Фиг. 24А** и **Фиг. 24В**, нокадаун экспрессии MS4A4A с помощью киPHK приводил к увеличению уровней мембранного TREM2 и уровней растворимого TREM2, соответственно. На **Фиг. 24А** и **Фиг. 24В**, каждый набор соединенных точек представляет средний результат от одного отдельного донора (всего для 6 доноров) с нокадауном киPHK и без него. Эти данные согласуются с аналогичными результатами, демонстрирующими повышенные уровни mTREM2 и sTREM2 в генетически сконструированных нокаутных по MS4A4A клетках, описанных выше. Взятые вместе, эти результаты показали, что потеря экспрессии или активности MS4A4A повышала как уровни растворимого TREM2, так и уровни мембранного TREM2 в первичных макрофагах человека.

ПРИМЕР 35: Активность антитела к MS4A4A при повышении уровней mTREM2, sTREM2 и АТФ in

vitro

[0512] Эффект антител к MS4A4A по настоящему изобретению на повышение уровней mTREM2, sTREM2 и АТФ (как описано выше в Примерах 24 и 25) дополнительно исследовали на первичных макрофагах человека, полученных от трех отдельных доноров. Первичные макрофаги человека обрабатывали различными концентрациями антител к MS4A4A 4A-313.NSLF и 4A-450.NSLF в течение 48 часов. Затем измеряли изменения уровней mTREM2, sTREM2 и АТФ.

[0513] Как показано на **Фиг. 25А**, **Фиг. 25В**, и **Фиг. 25С**, антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF и антитело к MS4A4A 4A-450.NSLF увеличивали уровни mTREM2 дозозависимым образом в первичных макрофагах человека, полученных от трех разных доноров, соответственно. Данные на **Фиг. 25А**, **Фиг. 25В**, и **Фиг. 25С** представлены в виде кратности увеличения уровней mTREM2 по сравнению с наблюдаемым при использовании антитела изотипического контроля (на оси x указана концентрация антител (мкг/мл), а на оси y указана кратность увеличения относительно контроля, который был установлен на 1,0). Данные этих графиков анализировали для определения значений EC50 и максимального ответа; эти результаты приведены ниже в **Таблице 41** (показаны как среднее +/- СОС).

ТАБЛИЦА 41

Антитело	EC50 (мкг/мл)	Максимальный ответ mTREM2 (кратность увеличения относительно изотипического контроля)
4A-313.NSLF	0,028 +/- 0,013	2,45 +/- 0,23
4A-450.NSLF	0,039 +/- 0,014	2,36 +/- 0,27

[0514] Как показано на **Фиг. 26А**, **Фиг. 26В** и **Фиг. 26С**, антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF и антитело к MS4A4A 4A-450.NSLF увеличивали уровни sTREM2 дозозависимым образом в первичных макрофагах человека, полученных от трех разных доноров, соответственно. Данные на **Фиг. 26А**, **Фиг. 26В**, и **Фиг. 26С** представлены в виде кратности увеличения уровней sTREM2 по сравнению с наблюдаемым при использовании антитела изотипического контроля (на оси x указана концентрация антител (мкг/мл), а на оси y указана кратность увеличения относительно контроля, который был установлен на 1,0). Данные этих графиков анализировали для определения значений EC50 и максимального ответа; эти результаты приведены ниже в **Таблице 42** (показаны как среднее +/- СОС).

ТАБЛИЦА 42

Антитело	EC50 (мкг/мл)	Максимальный ответ sTREM2 (кратность увеличения относительно изотипического контроля)
4A-313.NSLF	0,025 +/- 0,007	6,17 +/- 1,90
4A-450.NSLF	0,069 +/- 0,006	5,74 +/- 1,65

[0515] Как показано на **Фиг. 27А**, **Фиг. 27В** и **фиг. 27С**, антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF и антитело к MS4A4A 4A-450.NSLF увеличивали уровни клеточного АТФ дозозависимым образом в первичных макрофагах человека, полученных от трех разных доноров, соответственно. Данные на **Фиг. 27А**, **Фиг. 27В**, и **Фиг. 27С** представлены в виде кратности увеличения уровней клеточного АТФ по сравнению с

наблюдаемым при использовании антитела изотипического контроля (на оси x указана концентрация антител (мкг/мл), а на оси y указана кратность увеличения относительно контроля, который был установлен на 1,0). Данные этих графиков анализировали для определения значений EC50 и максимального ответа; эти результаты приведены ниже в **Таблице 43** (показаны как среднее +/- СОС).

ТАБЛИЦА 43

Антитело	EC50 (мкг/мл)	Максимальный ответ клеточного АТФ (кратность увеличения относительно изотипического контроля)
4A-313.NSLF	0,010 +/- 0,001	1,76 +/- 0,10
4A-450.NSLF	0,021 +/- 0,006	1,43 +/- 0,10

[0516] В совокупности эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению индуцировали функциональные изменения в первичных макрофагах человека, о чем свидетельствует повышенный уровень mTREM2, sTREM2 и клеточного АТФ после добавления антитела.

ПРИМЕР 36: Антитела к MS4A4A предотвращают гибель клеток, индуцированную ингибированием CSF1R

[0517] Чтобы оценить способность MS4A4A поддерживать выживаемость макрофагов человека после ингибирования CSF1R, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению исследовали на их способность повышать выживаемость клеток в присутствии ингибитора CSF1R PLX3397 (см. DeNardo et al., Cancer Discov (2011) 1(1):54-67. 22039576); Peng, et al., J. of Exp Canc Res (2019) 38(1):372. PMID: 31438996).

[0518] Моноциты человека выделяли из цельной крови с использованием протокола для коктейля для обогащения моноцитов человека RosetteSep (Stem Cell Technologies). Для получения макрофагов, происходящих из моноцитов человека, моноциты подсчитывали и высевали в полную среду RPMI (RPMI с добавлением Glutamax, пенициллина/стрептомицина, заменимых аминокислот, пирувата натрия и 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки) и 50 нг/мл MCSF (Peprotech). Через 6 дней собирали дифференцированные моноциты (макрофаги) и высевали на 96-луночные планшеты с плотностью $0,1 \times 10^6$ клеток/луноку в полную среду RPMI с 50 нг/мл M-CSF. Макрофаги оставляли для восстановления в течение ночи. На 7-й день к культивируемым макрофагам с PLX3397 и без него (1 мкМ) добавляли антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF и 4A-450.NSLF. Все антитела добавляли в конечной концентрации 1 мкг/мл. Жизнеспособность клеток определяли с использованием реагента Cytotox red, красителя ДНК, который метит гибнущие клетки (Essen Bioscience). Уровень реагента Cytotox red определяли путем измерения сигнала флуоресценции в течение нескольких дней с использованием системы визуализации IncuCyte Live Cell (Essen Bioscience).

[0519] Как показано на **Фиг. 28А**, для макрофагов человека, обработанных PLX3397 и антителом к MS4A4A 4A-313.NSLF, показано снижение количества клеток, окрашенных Cytotox red, по сравнению с таковым, наблюдаемым для клеток, обработанных PLX3397 с антителом изотипического контроля. Данные на **Фиг. 28А** представлены в виде среднего $\pm$ СОС; N = 3 от трех доноров-людей.

[0520] Как показано на **Фиг. 28В**, для макрофагов человека, обработанных PLX3397 и антителом к MS4A4A 4A-450.NSLF, показано снижение количества клеток, окрашенных Cytotox red, по сравнению с таковым, наблюдаемым для клеток, обработанных PLX3397 с антителом изотипического контроля. Данные на **Фиг.**

28В представлены в виде среднего $\pm$ СОС; N = 3 от трех доноров-людей.

[0521] В совокупности эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению уменьшали гибель клеток и поддерживали выживаемость макрофагов человека после ингибирования CSF1R. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, антитела к MS4A4A по настоящему изобретению применимы для лечения индивидуума с обусловленным дефицитом CSF1R заболеванием или расстройством, таким как ALSP или HDLS.

ПРИМЕР 37: Фармакокинетика антител к MS4A4A в сыворотке яванского макака

[0522] Для изучения фармакокинетики (ФК) антител к MS4A4A по настоящему изобретению в сыворотке *in vivo* были проведены следующие исследования.

[0523] Яванским макакам (супо) вводили антитела к MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT или изотипический контроль (huIgG1) в дозах 80 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе животных вводили всего пять доз; первая и вторая дозы разделены интервалом в 28 дней, а остальные четыре дозы разделены интервалом в 7 дней между каждой дозой.

[0524] Образцы сыворотки собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 4, 6, 10, 12, 24, 48, 96, 168, 192, 264, 312, 336, 480, 504, 648, 672, 672,5, 684, 720, 840, 840,5, 852, 888, 1008, 1008,5, 1014, 1020, 1032, 1056, 1104, 1176, 1188, и 1224 часа после введения антитела.

[0525] Уровни антител к MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT и 4A-18.WT в сыворотке яванского макака измеряли с использованием специального анализа Gyrolab, основанного на ступенчатом сэндвич-формате с меченым биотином козьим антителом к IgG человека (кат. № NBP1-74983; Novus Biologicals) в качестве захватывающего реагента и меченым Alexa fluor® 647 антителом к IgG человека (кат. № 2049-31; Southern Biotech) в качестве реагента для обнаружения. Стандарты, контроли качества и образцы разводили в буфере Rextip HN (кат. № P0004996, Gyrolab). Антитела к MS4A4A, присутствующие в образцах, были захвачены биотинилированным антителом к IgG человека, связанным с покрытой стрептавидином аффинной колонкой Gyrolab Bioaffy 200 CD. Захваченные антитела к MS4A4A обнаруживали с помощью флуоресцентно меченного антитела к IgG человека. Интенсивность продуцируемых флуоресцентных сигналов была пропорциональна количеству антител к MS4A4A, присутствующих в образце. Данные анализировали с помощью Gyrolab xP и Excel.

[0526] После введения животным дозы 80 мг/кг концентрации антител к MS4A4A в сыворотке неуклонно снижались после достижения средней максимальной наблюдаемой концентрации ($C_{\max}$) со средним значением периода полужизни ($t_{1/2}$) (среднее $\pm$ станд. откл.) $140 \pm 54,5$ часа для антитела к MS4A4A 4A-21.WT, 269 ± 114 часов для антитела к MS4A4A 4A-25.WT и $193 \pm 26,8$ часа для антитела к MS4A4A 4A-18.WT после дня 1 введения (день первой дозы). Клиренс (CL) был обратно пропорционален $t_{1/2}$ со средним CL (среднее $\pm$ станд. откл.) $0,625 \pm 0,107$ мл/ч/кг для антитела 4A-21.WT, $0,124 \pm 0,025$ мл/ч/кг для антитела 4A-25.WT, и $0,402 \pm 0,09$ мл/ч/кг для антитела 4A-18.WT в 1-й день. Объем распределения в равновесном состоянии (V_{ss}) в 1-й день варьировался от 30,8 до 51,4 мл/кг, от 22,6 до 41,7 мл/кг и от 24,9 до 41,3 мл/кг для групп антител 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT, соответственно.

[0527] Воздействие оценивали по $C_{\max}$ и площади под кривой «концентрация-время» от 0 до 168 часов после введения дозы (AUC_{0-168}). В 1-й день антитело 4A-25.WT имело самое высокое среднее значение $C_{\max}$ ($6,26 \times 10^6$ нг/мл), за ним следует антитело 4A-18.WT ($4,81 \times 10^6$ нг/мл). Антитело к MS4A4A 4A-21.WT ($3,53 \times 10^6$ нг/мл) имело самую низкую $C_{\max}$ среди тестируемых препаратов.

[0528] Антитела к MS4A4A 4A-25.WT и 4A-18.WT имели сходную AUC_{0-168} ($3,47 \times 10^8$ нг*ч/мл и $3,35 \times 10^8$

нг*ч/мл, соответственно), которая была значительно выше, чем у антитела 4A-21 ($1,15 \times 10^8$ нг*ч/мл).

ПРИМЕР 38: Антитела к MS4A4A повышают уровни sTREM2 в сыворотке и СМЖ *in vivo*

[0529] Для изучения влияния антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни sTREM2 в сыворотке и спинномозговой жидкости (СМЖ) *in vivo* были проведены следующие исследования.

[0530] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT или изотипический контроль (huIgG1) в дозах 80 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего пять доз; первая и вторая дозы разделены интервалом в 28 дней, а остальные четыре дозы разделены интервалом в 7 дней между каждой дозой.

[0531] Образцы сыворотки собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 4, 6, 10, 12, 24, 48, 96, 168, 192, 264, 312, 336, 480, 504, 648, 672, 672,5, 684, 720, 840, 840,5, 852, 888, 1008, 1008,5, 1014, 1020, 1032, 1056, 1104, 1176, 1188, и 1224 часа после введения антитела. Образцы СМЖ также собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 4, 6, 10, 12, 24, 48, 96, 168, 192, 264, 312, 336, 480, 504, 648, 672, 672,5, 684, 720, 840, 840,5, 852, 888, 1008, 1008,5, 1014, 1020, 1032, 1056, 1104, 1176, 1188, и 1224 часа после введения антитела.

[0532] В сыворотке после введения антител к MS4A4A 4A-25.WT, 4A-18.WT и 4A-21.WT уровни sTREM2 увеличились более чем в 2 раза по сравнению с исходным уровнем, с пиковыми уровнями 232%, 261%, и 287%, соответственно, от их исходных уровней до введения дозы, и через 48-96 часов после введения первой дозы антитела. Кроме того, уровни sTREM2 в сыворотке оставались повышенными при повторном еженедельном введении антител к MS4A4A на 29, 36, 43 и 50 дни со средними уровнями sTREM2 примерно в 2 раза (214%, 4A-25.WT; 226%, 4A-18.WT; 199%, 4A-21.WT) выше, чем наблюдалось при исходных уровнях до введения дозы. Изотипический контроль оставался близким к уровням до введения дозы (107% от исходного уровня) на протяжении всего периода дозирования.

[0533] В спинномозговой жидкости уровни sTREM2 значительно увеличились через 24 и 96 часов после введения антител к MS4A4A 4A-21.WT ($p=0,0008$, двухфакторный дисперсионный анализ) и 4A-25.WT ($p=0,004$, двухфакторный анализ дисперсионный анализ), соответственно, по сравнению с таковым, наблюдаемым у животных, получавших изотипический контроль. Уровни sTREM2 в группе, получавшей 4A-18.WT, оставались такими же, как и в группе изотипического контроля.

[0534] В совокупности эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в повышении уровней sTREM2 как в сыворотке, так и в СМЖ *in vivo*.

ПРИМЕР 39: Антитела к MS4A4A повышают уровни остеопонтинина в СМЖ *in vivo*

[0535] Для изучения влияния антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни остеопонтинина в СМЖ *in vivo* были проведены следующие исследования.

[0536] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT или изотипический контроль (huIgG1) в дозах 80 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего пять доз; первая и вторая дозы разделены интервалом в 28 дней, а остальные четыре дозы разделены интервалом в 7 дней между каждой дозой. Образцы СМЖ собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 4, 6, 10, 12, 24, 48, 96, 168, 192, 264, 312, 336, 480, 504, 648, 672, 672,5, 684, 720, 840, 840,5, 852, 888, 1008, 1008,5, 1014, 1020, 1032, 1056, 1104, 1176, 1188, и 1224 часа после введения антитела.

[0537] Антитела к MS4A4A 4A-25.WT, 4A-18.WT и 4A-21.WT значительно повышали уровни остеопонтинина в СМЖ по сравнению с таковыми, наблюдаемыми для антитела изотипического контроля.

Повторное введение антител к MS4A4A 4A-21.WT приводило к значительному повышению уровня

остеопонтина в СМЖ, который достиг пика через 12 часов после первой дозы приблизительно до 280 нг/мл ($p < 0,0001$, двухфакторный дисперсионный анализ) по сравнению с изотипическим контролем и продолжало демонстрировать пиковые уровни через 12-24 часа после последующих доз. Повторное введение антитела к MS4A4A 4A-25.WT и антитела 4A-18.WT показало тенденцию к увеличению уровней остеопонтина в СМЖ через 12–24 часа (до уровней примерно 50–80 нг/мл) после каждой дозы по сравнению с изотипическим контролем.

[0538] Эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны для повышения уровней остеопонтина в СМЖ *in vivo*.

ПРИМЕР 40: Антитела к MS4A4A повышают уровень остеопонтина в различных областях мозга *in vivo*

[0539] Для изучения влияния антитела к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни остеопонтина в лобной коре и гиппокампе яванских макаков *in vivo* были проведены следующие исследования.

[0540] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT или изотипический контроль (huIgG1) в дозах 80 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего пять доз; первая и вторая дозы были разделены интервалом в 28 дней между каждой дозой, а оставшиеся четыре дозы были разделены интервалом в 7 дней между каждой дозой. Через 48 часов после введения пятой дозы животных подвергали эвтаназии, лобную кору и гиппокамп извлекали и замораживали.

[0541] Уровни остеопонтина в ткани головного мозга измеряли следующим образом. Образцы замороженного мозга лизировали с помощью реагента для экстракции нейронального белка N-Per (кат. № 87792, Thermo Scientific) и ингибитора протеазы Halt (кат. № 1861278) на льду в течение 20 минут в соответствии с инструкциями производителя. Образцы центрифугировали, а супернатанты переносили в новую пробирку и хранили при -80°C до дальнейшего анализа. Концентрацию общего белка в каждом образце измеряли с помощью набора для анализа белков с помощью BCA (кат. № 23225, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Значения концентрации белка использовали для нормализации концентраций аналита, измеренных в тканях головного мозга.

[0542] Уровни остеопонтина в ткани головного мозга яванских макаков повышались после лечения антителом к MS4A4A 4A-21.WT. Повторное введение антитела к MS4A4A 4A-21.WT яванским макакам приводило к значительному увеличению ($p < 0,035$ и $p = 0,0003$, соответственно; однофакторный дисперсионный анализ) уровней остеопонтина в лобной коре яванских макаков по сравнению с наблюдаемыми уровнями для антитела изотипического контроля. В частности, средние уровни остеопонтина, измеренные в лобной коре после введения антитела, были следующими: приблизительно 0,6 нг/мг (антитело изотипического контроля); приблизительно 1,2 нг/мг (4A-21.WT); примерно 0,7 нг/мг (4A-25.WT и 4A-18.WT). При повторном введении антител против MS4A4A наблюдали тенденцию к увеличению уровней остеопонтина в гиппокампе яванских макаков по сравнению с наблюдаемыми уровнями для антитела изотипического контроля. В частности, средние уровни остеопонтина, измеренные в гиппокампе после введения антитела, были следующими: приблизительно 1,3 нг/мг (антитело изотипического контроля); приблизительно 1,8 нг/мг (4A-21.WT и 4A-18.WT); и приблизительно 2,4 нг/мг (4A-25.WT). Эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в повышении уровней остеопонтина в лобной коре и гиппокампе у отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 41: Влияние антител к MS4A4A на белковые биомаркеры спинномозговой жидкости

[0543] Спинномозговую жидкость, полученную от яванских макаков, которым вводили периферическую инъекцию антитела к MS4A4A 4A-21.WT (80 мг/кг), дополнительно анализировали на изменения в

экспрессии белковых биомаркеров *in vivo*. В этих исследованиях изменения уровней экспрессии белка в СМЖ измеряли с помощью анализа Somalogic Somascan 1.3k на образцах спинномозговой жидкости, полученных от животных через 24 часа после инъекции антитела.

[0544] Белковые изменения в спинномозговой жидкости наблюдали после введения антитела к MS4A4A 4A-21.WT яванским макакам. На **Фиг. 29** представлена вулканная диаграмма, на которой представлены эффекты на весь протеом трех образцов спинномозговой жидкости, взятых у яванских макаков после периферической инъекции антитела к MS4A4A 4A-21.WT (80 мг/кг). Каждая точка на вулканной диаграмме вулкана представляет 1 белок. Для каждого измеренного белка значения по оси абсцисс представляют собой кратное изменение разницы уровней белка в СМЖ между животными, получавшими антитело, и контрольными животными; значения на оси у представляют значимость этих наблюдаемых различий, выраженную как минус log10 p-значения для дифференциальной экспрессии, которую оценивали с помощью дисперсионного анализа. Обозначения белков на **Фиг. 29** представлены для белков, дифференциально экспрессируемых у животных, получавших антитело, по сравнению с контрольными животными с p-значением <1E-3.

[0545] Как показано на **Фиг. 29**, у животных, которым вводили антитело к MS4A4A, наблюдали повышение уровней остеопонтина (SSP1) и IL1RN (2 микроглиальных маркера) в СМЖ. В совокупности эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению повышали уровни белка IL1RN и остеопонтина как в СМЖ, так и в сыворотке отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 42: Антитела к MS4A4A повышают уровень sTREM2 в сыворотке *in vivo*

[0546] Влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни sTREM2 в сыворотке и спинномозговой жидкости (СМЖ) *in vivo* дополнительно исследовали в другой серии экспериментов, проведенных на отличных от человека приматах.

[0547] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT и 4A-450.NSLF в дозах 80 мг/мл; антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF в дозах 250 мг/мл или носитель в качестве контроля путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего четыре дозы; первая и вторая дозы разделены интервалом в 7 дней, вторая и третья дозы разделены интервалом в 14 дней, а третья и четвертая дозы разделены интервалом в 28 дней.

[0548] Образцы сыворотки собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 2, 6, 10, 24, 34, 48, 72, 96, 168, 168,5, 170, 174, 178, 192, 216, 240, 264, 336, 408, 504, 504,5, 506, 510, 514, 528, 552, 576, 600, 672, 744, 840, 912, 1008, 1176, 1186, 1200, и 1224 часа после введения антитела; образцы СМЖ также собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 2, 6, 10, 24, 34, 48, 72, 96, 168, 168,5, 170, 174, 178, 192, 216, 240, 264, 336, 408, 504, 504,5, 506, 510, 514, 528, 552, 576, 600, 672, 744, 840, 912, 1008, 1176, 1186, 1200, и 1224 часа после введения антитела.

[0549] Уровни sTREM в сыворотке измеряли следующим образом. Одноточечные планшеты Meso Scale Discovery (MSD) (Поквилл, штат Мэриленд) покрывали захватывающим антителом в PBS при 4°C в течение ночи. Образцы сыворотки обезьяны (а также стандарты TREM2-Fc обезьяны) разводили в буфере для связывания и добавляли в лунки на 1 час при комнатной температуре. Биотинилированное козье поликлональное антитело к TREM2 человека (R&D Systems) добавляли в разведении 1:2000 в буфере для связывания и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим определением с помощью меченного SULFO-TAG стрептавидина (MSD). В планшеты добавляли 150 мкл 1х буфера для считывания, после чего планшеты анализировали.

[0550] Результаты этих исследований представлены на **Фиг. 30**. В сыворотке уровни sTREM2 увеличились примерно в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем (~150% исходных уровней до введения дозы) после

введения антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF в дозе 80 мг/кг через 24 часа после введения дозы. Уровни sTREM2 продолжали увеличиваться с течением времени, достигая максимальных уровней, в 3 раза превышающих исходные уровни (~ 300% от исходных уровней до введения дозы) после нескольких доз 80 мг/кг.

[0551] При дозах 250 мг/кг антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF уровни sTREM2 в сыворотке повышались примерно в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем через 24 часа после введения дозы и продолжали увеличиваться с течением времени, достигнув максимального уровня в 4,8 раза по сравнению с исходным уровнем после нескольких доз 250 мг/кг.

[0552] После введения антитела к MS4A4A 4A-313.WT в дозе 80 мг/кг уровни sTREM2 в сыворотке увеличились примерно в 1,5 раза по сравнению с наблюдаемым исходным уровнем через 24 часа после введения дозы. При повторном введении 4A-313.WT в дозе 80 мг/кг уровни sTREM2 в сыворотке повышались максимум в 3 раза по сравнению с исходным уровнем.

[0553] После введения антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF в дозе 80 мг/кг уровни sTREM2 в сыворотке увеличились примерно в 2 раза по сравнению с исходным уровнем через 24 часа после введения дозы и продолжали увеличиваться с течением времени, достигнув максимального уровня в 3 раза по сравнению с исходным уровнем после нескольких доз 4A-450.NSLF в 80 мг/кг.

[0554] В совокупности эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению были эффективны в отношении повышения уровней sTREM2 в сыворотке у отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 43: Антитела к MS4A4A повышают уровни остеопонтинина в СМЖ *in vivo*

[0555] Для изучения влияния антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни остеопонтинина в спинномозговой жидкости (СМЖ) *in vivo* были проведены следующие исследования.

[0556] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, 4A-450.NSLF в дозах 80 мг/мл, 4A-313.NSLF в дозах 250 мг/мл или носитель в качестве контроля путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего четыре дозы; первая и вторая дозы разделены интервалом в 7 дней, вторая и третья дозы разделены интервалом в 14 дней, а третья и четвертая дозы разделены интервалом в 28 дней.

[0557] Образцы СМЖ собирали у животных до введения дозы, и через 0,5, 2, 6, 10, 24, 34, 48, 72, 96, 168, 168,5, 170, 174, 178, 192, 216, 240, 264, 336, 408, 504, 504,5, 506, 510, 514, 528, 552, 576, 600, 672, 744, 840, 912, 1008, 1176, 1186, 1200, и 1224 часа после введения антитела.

[0558] Уровни остеопонтинина в СМЖ измеряли следующим образом. Одноточечные планшеты Meso Scale Discovery (MSD) (Роквилл, штат Мэриленд) покрывали захватывающим антителом в PBS при 4°C в течение ночи. Образцы СМЖ обезьян разводили буфером для связывания и добавляли в лунки на 1 час при комнатной температуре. Биотинилированное козье поликлональное антитело к остеопонтину человека (R&D Systems) добавляли в разведении 1:2000 в буфере для связывания и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим определением с помощью меченого SULFO-TAG стрептавидина (MSD). В планшеты добавляли 150 мкл 1х буфера для считывания, после чего планшеты анализировали на Sector Imager (MSD).

[0559] Уровни остеопонтинина в СМЖ яванских макак повышались после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению. После введения антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF в дозах 80 мг/кг и 250 мг/кг уровни остеопонтинина в СМЖ достигли пика в среднем примерно в 13 раз и 6 раз относительно исходного уровня, соответственно, через 24 часа после введения первой дозы с последующим снижением до 1,5 раз

относительно исходного уровня (**Фиг. 31А и 31В**). При многократном введении антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF в дозе 80 мг/кг уровни остеопонтина в СМЖ достигали максимума через 10–24 часа после каждой дозы, достигая пиковых уровней в 3–5 раз по сравнению с исходными уровнями (**Фиг. 31А**). При повторном введении 250 мг/кг антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF уровни остеопонтина в СМЖ повышались и достигали пиковых уровней в 14 раз по сравнению с исходными уровнями через 168 часов после введения второй дозы (**Фиг. 31В**) и пиковых уровней в 4–5 раз по сравнению с исходным уровнем через 24–48 часов после введения последующих доз (**Фиг. 31В**).

[0560] После введения антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF в дозе 80 мг/кг уровни остеопонтина в СМЖ достигали максимума примерно в 13 раз по сравнению с исходным уровнем через 24 часа после первой дозы с последующим снижением до исходного уровня (**Фиг. 31С и 31D**). При повторном введении 4A-450.NSLF в дозе 80 мг/кг уровни остеопонтина в спинномозговой жидкости достигали максимума через 24 часа после каждой дозы, достигая пиковых уровней в 6–9 раз по сравнению с исходными уровнями (**Фиг. 31С**).

[0561] После повторного введения антитела к MS4A4A 4A-313.WT в дозе 80 мг/кг уровни остеопонтина в спинномозговой жидкости достигали максимума примерно в 1,5 раза по сравнению с исходным уровнем через 24 часа после каждой дозы с последующим снижением до исходного уровня (**Фиг. 31D**).

[0562] В совокупности эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны для повышения уровней остеопонтина в спинномозговой жидкости у отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 44: Антитела к MS4A4A повышают уровень остеопонтина в различных областях мозга *in vivo*

[0563] Чтобы изучить влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни остеопонтина в лобной коре и гиппокампе *in vivo*, были проведены следующие исследования.

[0564] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT и 4A-450.NSLF в дозах 80 мг/кг, и антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF в дозах 250 мг/мл или носитель в качестве контроля путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего четыре дозы; первая и вторая дозы разделены интервалом в 7 дней, вторая и третья дозы разделены интервалом в 14 дней, а третья и четвертая дозы разделены интервалом в 28 дней. Через 48 часов после введения четвертой дозы животных подвергали эвтаназии, лобную кору и гиппокамп извлекали и замораживали.

[0565] Уровни остеопонтина в ткани головного мозга измеряли следующим образом. Образцы замороженного мозга лизировали с помощью реагента для экстракции нейронального белка N-Per (кат. № 87792, Thermo Scientific) и ингибитора протеазы Halt (кат. № 1861278) на льду в течение 20 минут в соответствии с инструкциями производителя. Образцы центрифугировали, а супернатанты переносили в новую пробирку и хранили при -80°C до дальнейшего анализа. Концентрацию общего белка в каждом образце измеряли с помощью набора для анализа белков с помощью BCA (кат. № 23225, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Значения концентрации белка использовали для нормализации концентраций аналита, измеренных в тканях головного мозга.

[0566] Уровни остеопонтина в ткани головного мозга яванских макак повышались после введения антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF. Повторное введение антитела 4A-450.NSLF в дозе 80 мг/кг приводило к значительному повышению ($p = 0,027$, t-критерий) уровней остеопонтина в лобной коре яванских макак по сравнению с наблюдаемыми уровнями у контрольных животных (**Фиг. 32А**). Точно так же повторное введение антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF в дозе 80 мг/кг приводило к значительному повышению ($p = 0,027$, t-критерий) уровней остеопонтина в гиппокампе яванских макак по сравнению с наблюдаемыми уровнями у получавших контроль животных (**Фиг. 32В**).

[0567] В совокупности эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективно действуют на повышение уровней остеоопонтина в ткани головного мозга (например, в лобной коре и гиппокампе) у отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 45: Антитела к MS4A4A повышают уровень CSF1R в различных областях мозга *in vivo*

[0568] Чтобы изучить влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R) в лобной коре и гиппокампе *in vivo*, были проведены следующие исследования.

[0569] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT и 4A-450.NSLF в дозах 80 мг/кг, антитело к MS4A4A 4A-313.NSLF в дозах 250 мг/мл или носитель в качестве контроля путем инфузии. Каждой группе вводили всего четыре дозы; первая и вторая дозы разделены интервалом в 7 дней, вторая и третья дозы разделены интервалом в 14 дней, а третья и четвертая дозы разделены интервалом в 28 дней. Через 48 часов после введения четвертой дозы животных подвергали эвтаназии, лобную кору и гиппокамп извлекали и замораживали.

[0570] Уровни CSF1R в ткани головного мозга измеряли следующим образом. Образцы замороженного мозга лизировали с помощью реагента для экстракции нейронального белка N-Pex (кат. № 87792, Thermo Scientific) и ингибитора протеазы Halt (кат. № 1861278) на льду в течение 20 минут в соответствии с инструкциями производителя. Образцы центрифугировали, а супернатанты переносили в новую пробирку и хранили при -80°C до дальнейшего анализа. Концентрацию общего белка в каждом образце измеряли с помощью набора для анализа белков с помощью BCA (кат. № 23225, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Значения концентрации белка использовали для нормализации концентраций аналита, измеренных в тканях головного мозга.

[0571] Уровни CSF1R в ткани головного мозга яванских макак повышались после введения антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF. Повторное введение антитела 4A-313.NSLF в дозе 250 мг/кг приводило к значительному повышению ($p = 0,046$, t-критерий) уровней CSF1R в лобной коре яванских макак по сравнению с наблюдаемыми уровнями у получавших контроль животных (Фиг. 33A). Точно так же повторное введение антитела к MS4A4A 4A-450.NSLF в дозе 80 мг/кг приводило к значительному повышению ($p = 0,013$, t-критерий) уровней CSF1R в гиппокампе яванских макак по сравнению с наблюдаемыми уровнями у контрольных животных (Фиг. 33B).

[0572] В совокупности эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективно действуют на повышение уровней CSF1R в ткани головного мозга (например, в лобной коре и гиппокампе) у отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 46: Антитела к MS4A4A повышают уровень общего TREM2 в различных областях мозга *in vivo*

[0573] Чтобы изучить влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на уровни растворимого TREM2 и мембранного TREM2 (общий TREM2) в лобной коре и гиппокампе *in vivo*, были проведены следующие исследования.

[0574] Яванским макакам вводили антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, 4A-450.NSLF в дозах 80 мг/мл, 4A-313.NSLF в дозах 250 мг/мл или носитель в качестве контроля путем внутривенной болюсной инъекции. Каждой группе вводили всего четыре дозы; первая и вторая дозы разделены интервалом в 7 дней, вторая и третья дозы разделены интервалом в 14 дней, а третья и четвертая дозы разделены интервалом в 28 дней. Через 48 часов после введения четвертой дозы животных подвергали эвтаназии, лобную кору и

гиппокамп извлекали и замораживали. В этих областях мозга измеряли общие уровни TREM2.

[0575] Общие уровни TREM2 в ткани головного мозга яванских макаков увеличивались после обработки антителами к MS4A4A, 4A-313.NSLF, 4A-313.WT и 4A-450.NSLF. Повторное введение антитела 4A-313.NSLF в дозе 250 мг/кг приводило к статистически значимому увеличению ($p=0,014$, однофакторный дисперсионный анализ) общего уровня TREM2 в гиппокампе яванского макака по сравнению с таковым, наблюдаемым у получавших контроль животных (**Фиг. 34А**). При повторном введении антитела 4A-313.NSLF в дозе 250 мг/кг и антитела 4A-313.WT в дозе 80 мг/кг наблюдали тенденцию к увеличению уровня TREM2 в лобной коре яванского макака по сравнению с наблюдаемым уровнями у получавших контроль животных (**Фиг. 34В**).

[0576] В совокупности эти результаты показали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективно действуют на повышение уровней TREM2 в ткани головного мозга (например, в лобной коре и гиппокампе) у отличных от человека приматов.

ПРИМЕР 47: Влияние антител к MS4A4A на профиль экспрессии генов в микроглии *in vivo*

[0577] Изменения в экспрессии генов, измеренные с помощью анализа методом РНК-секвенирования микроглии после введения антител к MS4A4A по настоящему изобретению яванским макакам, как описано выше, проводили следующим образом. Антитела к MS4A4A включали антитела 4A-313.WT (80 мг/кг), 4A-313.NSLF (80 мг/кг и 250 мг/кг) и 4A-450.NSLF (80 мг/кг). После умерщвления животных образцы лобной коры были диссоциированы с использованием щадящего ручного протокола диссоциации с последующим разделением в градиенте Перколл для удаления дебриса. Осадок клеток окрашивали антителами Cd11b в течение 20 минут, промывали, метили DAPI и обрабатывали для выделения микроглии методом проточной цитометрии. DAPI⁺Cd11b⁺ клетки сортировали непосредственно в 350 мкл или буфере RLT plus (Qiagen) и клетки немедленно обрабатывали для выделения РНК. Качество РНК определяли с помощью автоматической системы электрофореза Tape station, а библиотеки были созданы с использованием протокола для образцов с низким содержанием РНК для Lexogen QuantSeq с небольшими модификациями. Библиотеки количественно определяли с помощью автоматической системы электрофореза Tape station и секвенировали с помощью Next Seq. Данные секвенирования были демультимплексированы с использованием инструмента коррекции множественных ошибок Lexogen и проанализированы.

[0578] Как показано на **Фиг. 35А, 35В, и 35С**, периферическая инъекция антител к MS4A4A по настоящему изобретению яванским макакам приводила к изменениям экспрессии генов в микроглии, что измерялось с помощью анализа методом РНК-секвенирования сортированной при помощи проточной цитометрии микроглии, выделенной из лобной коры этих отличных от человека приматов. Среди генов, проявляющих сильную индукцию при лечении антителами к MS4A4A в микроглии, есть маркеры активации микроглии (член А семейства 7 лектиновых доменов С-типа, CLEC7A), миграции микроглии (рецептор 2 инозитол-1,4,5-трифосфата, ITPR2) и пролиферации микроглии (антиген KI-67 (MKI67)) (**Фиг. 35А**). Также наблюдались изменения в дополнительных маркерах активации микроглии, включая маркеры активации микроглии IL1RN, SPP1 и 1-фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатфосфодиэстеразу гамма-2 (PLCG2), как показано на **Фиг. 35В, 35С**. Влияние антител к MS4A4A по настоящему изобретению на два гомеостатических маркера микроглии (пуринергический рецептор P2RY12 и рецептор 1 CX3C-хемокина (CX3CR1)) показано на **Фиг. 35С**, где уровни экспрессии этих двух продуцентов гомеостатической микроглии снижались после обработки антителом к MS4A4A. Данные на **Фиг. 35А, 35В, и 35С** представлены как средние значения по шкале log2, планки погрешностей представлены СОС, и N=5 на экспериментальную группу и на момент времени.

[0579] В совокупности данные результаты демонстрируют, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны при активации микроглии *in vivo*, о чем свидетельствует увеличение различных

уровней мРНК белков, связанных с активацией, миграцией и пролиферацией микроглии; и снижением различных уровней мРНК белков, ассоциированных с гомеостазом микроглии.

ПРИМЕР 48: Антитела к MS4A4A снижают поверхностную экспрессию меченого HA-Snorkel MS4A4A на клетках U937

[0580] Клетки U937 (ATCC CRL-1593.2) трансфицировали плазмидой экспрессии, кодирующей MS4A4A человека, меченного меткой Snorkel (трансмембранный домен, за которым следует HA-метка, был присоединен к цитоплазматическому C-концу MS4A4A человека). Таким образом, метка отображается внеклеточно, но структурно отделена от мембранного белка. Трансфецированные клетки U937 были жизнеспособны после плазмидной трансфекции и селекции с помощью антибиотиков. Затем клетки подвергали скринингу на экспрессию человеческого белка MS4A4A на клеточной поверхности с использованием проточной цитометрии, и только 5% наиболее положительных клеток собирали для использования в следующих исследованиях.

[0581] Клетки U937, сверхэкспрессирующие рекомбинантный человеческий MS4A4A-snorkel, полученный, как описано выше, использовали в качестве клеток-мишеней в этих исследованиях. Клетки предварительно обрабатывали в течение 24 часов PMA (25 нг/мл), затем собирали и высевали по 100000 клеток/лунку в круглодонные 96-луночные планшеты, в полную среду RPMI 1640, с PMA и антителами к MS4A4A и антителом изотипического контроля при конечных концентрациях 0,01, 0,1 и 1 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 48 часов. Клетки промывали холодным буфером для проточной цитометрии (PBS + 2% FBS) и добавляли по 50 мкл разбавленного 1:200 моноклонального антитела к метке HA (ThermoFisher, A-21287) на лунку и инкубировали на льду в течение 30 минут, клетки также помечены знаком Aqua Live/Dead для определения жизнеспособности. Клетки 2 раза промывали холодным буфером для проточной цитометрии и ресуспендировали в 200 мкл буфера для проточной цитометрии. Анализ методом проточной цитометрии выполняли на системе FACSCanto (BD Biosciences). Данные связывания анализировали с использованием средней интенсивности флуоресценции.

[0582] Как показано на **Фиг. 36**, антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF и d4A-450.NSLF снижали уровень MS4A4A плазматической мембраны в клетках U937, экспрессирующих человеческий белок MS4A4A, меченный Snorkel, дозозависимым образом. При самой высокой концентрации антитела к MS4A4A 1 мкг/мл антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF и 4A-450.NSLF снижали уровни поверхностного MS4A4A примерно на 50% по сравнению с тем, что наблюдалось в клетках, обработанных антителом изотипического контроля. Эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению снижали или подавляли уровни MS4A4A на клеточной поверхности в клетках U937, экспрессирующих рекомбинантный человеческий MS4A4A-snorkel.

ПРИМЕР 49: Антитела к MS4A4A модулируют уровни гликопротеина B нематастатической меланомы (GPNMB) в первичных миелоидных клетках человека

[0583] GPNMB представляет собой поверхностный гликопротеин, экспрессируемый во многих типах клеток, включая тканевые макрофаги и микроглию. Несколько генетических вариантов были связаны с риском развития болезни Паркинсона (БП). Уровни белка GPNMB повышены в черной субстанции пациентов с БП, а уровни GPNMB повышены после лизосомального стресса (Moloney et.al., 2018, Neurobio Dis. 120: 1–11). Кроме того, повышенная экспрессия GPNMB была связана с SNP rs199347, причем этот ассоциированный с риском SNP был расположен в гене GPNMB (Murthy et al, 2017, 18:121-133). Чтобы определить, может ли MS4A4A модулировать уровни экспрессии GPNMB, первичные макрофаги человека от двух доноров (доноры

№ 1117 и № 1118) обрабатывали различными концентрациями антитела к MS4A4A 4A-313.NSLF в течение 48 часов. GPNMB клеточной поверхности (связанный с мембраной) измеряли с помощью проточной цитометрии после окрашивания клеток конъюгированным с флуорофорами антителом к GPNMB.

[0584] Как показано на **Фиг. 37**, уровни мембранного GPNMB снижались в первичных макрофагах человека после добавления к клеткам антитела к MS4A4A 4A.313.NSLF. Снижение уровней GPNMB в ответ на обработку антителом к MS4A4A носило дозозависимый характер. Эти результаты продемонстрировали, что антитела к MS4A4A по настоящему изобретению эффективны в снижении уровней экспрессии GPNMB на клеточной поверхности в миелоидных клетках, например, макрофагах.

[0585] *Примеры аминокислотных последовательностей тяжелой цепи антитела к MS4A4A, содержащих huIgG1 дикого типа или варианты Fc huIgG1 дикого типа:*

4A-450 (тяжелая цепь huIgG1) (SEQ ID NO:320)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-450 (тяжелая цепь huIgG1 без C-концевого K) (SEQ ID NO:321)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 (тяжелая цепь hIgG1; P331S) (SEQ ID NO:322)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-450 (тяжелая цепь hIgG1 с P331S без C-концевого K) (SEQ ID NO:323)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK

VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 (тяжелая цепь hIgG1 с N325S/L328F) (SEQ ID NO:324)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-450 (тяжелая цепь hIgG1 с N325S/L328F без C-концевого K) (SEQ ID NO:325)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 (тяжелая цепь hIgG1 с K322A) (SEQ ID NO:326)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-450 (тяжелая цепь hIgG1 с K322A без C-концевого K) (SEQ ID NO:327)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-419 (тяжелая цепь huIgG1) (SEQ ID NO:328)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (тяжелая цепь huIgG1 без C-концевого K) (SEQ ID NO:329)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-419 (тяжелая цепь hIgG1 с P331S) (SEQ ID NO:330)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (тяжелая цепь hIgG1 с P331S без C-концевого K) (SEQ ID NO:331)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-419 (тяжелая цепь huIgG1 с N325S/L328F) (SEQ ID NO:332)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (тяжелая цепь hIgG1 с N325S/L328F без C-концевого K) (SEQ ID NO:333)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-419 (тяжелая цепь hIgG1 с K322A) (SEQ ID NO:334)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (тяжелая цепь hIgG1 с K322A без C-концевого K) (SEQ ID NO:335)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (константная область тяжелой цепи hIgG1) (SEQ ID NO:336)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (константная область тяжелой цепи hIgG1 без C-концевого K) (SEQ ID NO:337)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (константная область тяжелой цепи huIgG1 с P331S) (SEQ ID NO:338)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (константная область тяжелой цепи huIgG1 с P331S без C-концевого K) (SEQ ID NO:339)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (константная область тяжелой цепи huIgG1 с N325S/L328F) (SEQ ID NO:340)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (константная область тяжелой цепи hIgG1 с N325S/L328F без C-концевого K) (SEQ ID NO:341)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (константная область тяжелой цепи huIgG1 с K322A) (SEQ ID NO:342)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (константная область тяжелой цепи huIgG1 с K322A без C-концевого K) (SEQ ID NO:343)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Константная область легкой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO:344)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

4A-313 (тяжелая цепь hIgG1) (SEQ ID NO:355)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (тяжелая цепь hIgG1 без C-концевого K) (SEQ ID NO:356)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (тяжелая цепь hIgG1 с P331S) (SEQ ID NO:357)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (тяжелая цепь hIgG1 с P331S без C-концевого K) (SEQ ID NO:358)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG

RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED~~TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDL~~WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (тяжелая цепь huIgG1 с N325S/L328F) (SEQ ID NO:359)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT~~NYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG~~
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED~~TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDL~~WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (тяжелая цепь hIgG1 с N325S/L328F без C-концевого K) (SEQ ID NO:360)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT~~NYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG~~
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED~~TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDL~~WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-313 (тяжелая цепь huIgG1 с K322A) (SEQ ID NO:361)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT~~NYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG~~
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED~~TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDL~~WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-313 (тяжелая цепь huIgG1 с K322A без C-концевого K) (SEQ ID NO:362)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT~~NYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQG~~
RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED~~TAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDL~~WGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 – полноразмерная легкая цепь (SEQ ID NO:363)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

4A-419 – полноразмерная легкая цепь (SEQ ID NO:364)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

4A-313 – полноразмерная легкая цепь (SEQ ID NO:365)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESDNYGVSRMNWYQKPGQAPRLLIYGASNQGSGIPARFSGSGSG
TDFTLTISLEPEDFAVYYCQQSKEVPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

Формула изобретения

1. Выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:94, 108, 116, 146, 147, 308 и 311; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309 и 312; и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:102, 100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310 и 313; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:104, 103, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314 и 317; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 159, 160, 161, 315 и 318; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:107, 115, 144, 145, 163, 316 и 319.
2. Антитело по п. 1, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:96–99; и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:102, 100 и 101; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:104 и 103; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:105–106; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:107.
3. Антитело по п. 1, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:108; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:110–111; и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:113; HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114; и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115.
4. Антитело по п. 1, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116; HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:118–122; и HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:123–129; и переменная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащую аминокислотную

- [illegible]

9. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 из антитела 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419 или 4A-450.
10. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419 или 4A-450.
11. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, при этом антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-301, 4A-302, 4A-303, 4A-304, 4A-305, 4A-306, 4A-307, 4A-308, 4A-309, 4A-310, 4A-311, 4A-312, 4A-313, 4A-314, 4A-419 или 4A-450.
12. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330 или 4A-331.
13. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330 или 4A-331.
14. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, при этом антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-315, 4A-316, 4A-317, 4A-318, 4A-319, 4A-320, 4A-321, 4A-322, 4A-323, 4A-324, 4A-325, 4A-326, 4A-327, 4A-328, 4A-329, 4A-330 или 4A-331.
15. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-362, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380 или 4A-381.
16. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи

- содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-362, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380 или 4A-381.
17. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, при этом антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-332, 4A-333, 4A-334, 4A-335, 4A-336, 4A-337, 4A-338, 4A-339, 4A-340, 4A-341, 4A-342, 4A-343, 4A-344, 4A-345, 4A-346, 4A-347, 4A-348, 4A-349, 4A-350, 4A-351, 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-357, 4A-358, 4A-359, 4A-360, 4A-361, 4A-362, 4A-363, 4A-364, 4A-365, 4A-366, 4A-367, 4A-368, 4A-369, 4A-370, 4A-371, 4A-372, 4A-373, 4A-374, 4A-375, 4A-376, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380 или 4A-381.
18. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3 антитела 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389 или 4A-390.
19. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область легкой цепи содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389 или 4A-390.
20. Антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, и переменную область легкой цепи, содержащую HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, при этом антитело содержит HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3 антитела 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389 или 4A-390.
21. Антитело по п. 1 или п. 9, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-15, 304 и 306.
22. Антитело по п. 1 или п. 12, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24-30.
23. Антитело по п. 1 или п. 15, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-53.

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86–93.

33. Антитело по любому из пп. 1, 2, 4, 6–11, 21, 25 и 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 320–343.
34. Антитело по любому из пп. 1, 2, 6, 9–11, 21, 25, 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 336–343, а легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, причем необязательно легкая цепь дополнительно содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344.
35. Антитело по любому из пп. 1, 7, 9–11, 21, 25 и 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 320–327, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 305, при этом легкая цепь дополнительно содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344.
36. Антитело по любому из пп. 1, 8–11, 21, 25 и 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328–335, и легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 307, при этом легкая цепь дополнительно содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344.
37. Антитело по любому из пп. 1, 2, 6, 9–11, 21, 25 и 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 355–362, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 365.
38. Антитело по любому из пп. 1, 7, 9–11, 21, 25 и 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 320–327, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 363.
39. Антитело по любому из пп. 1, 8–11, 21, 25 и 29, причем антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 328–335, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 364.

40. Антитело по п. 2, причем антитело содержит:
- вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит: HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 94, HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и при этом вариабельная область легкой цепи содержит: HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104, HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105, и HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107;
 - вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22; или
 - тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 359 или 360, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 365.
41. Антитело по п. 7, причем антитело содержит:
- вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:304, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:305; или
 - тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 324 или 325, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:363.
42. Антитело по п. 8, причем антитело содержит:
- вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:306, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:307; или
 - тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 332 или 333, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:364.
43. Выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело конкурентно ингибирует связывание MS4A4A с одним или более антителами по любому из пп. 1–42.
44. Выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело связывается по существу с тем же или перекрывающимся эпитопом на MS4A4A, что и антитело по любому из пп. 1–42.

45. Антитело по п. 44, причем антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками в пределах аминокислотной последовательности SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO: 178) SEQ ID NO: 1, при этом антитело не связывает аминокислотный остаток пролина 163 из SEQ ID NO:1.
46. Антитело по любому из пп. 1–42, причем антитело связывается с внеклеточным доменом 1 MS4A4A человека.
47. Антитело по любому из пп. 1–42, причем антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками в пределах аминокислотной последовательности CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:177) SEQ ID NO:1.
48. Антитело по любому из пп. 1–42, причем антитело связывается с внеклеточным доменом 2 MS4A4A человека.
49. Антитело по любому из пп. 1–42, причем антитело связывается с одним или более аминокислотными остатками в пределах аминокислотной последовательности SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) SEQ ID NO:1.
50. Антитело по любому из пп. 1–49, причем антитело является человеческим или гуманизированным.
51. Антитело по любому из пп. 1–50, причем антитело снижает уровни MS4A4A на клеточной поверхности или снижает внутриклеточные уровни MS4A4A.
52. Антитело по любому из пп. 1–51, причем антитело увеличивает уровни растворимого TREM2, увеличивает уровни мембранного TREM2 или увеличивает уровни растворимого TREM2 и увеличивает уровни мембранного TREM2 в миелоидных клетках.
53. Антитело по любому из пп. 1–52, причем антитело снижает экспрессию маркеров поверхности клеток M2 на миелоидных клетках.
54. Антитело по п. 53, причем антитело снижает экспрессию CD200R, дектина-1 или CD163 на миелоидных клетках.
55. Антитело по любому из пп. 1–50, причем антитело увеличивает экспрессию мРНК и/или белка гельзолина и/или остеопонтина на миелоидных клетках.
56. Выделенное антитело, которое связывается с белком MS4A4A, причем антитело увеличивает экспрессию мРНК и/или белка гельзолина и/или остеопонтина на миелоидных клетках.
57. Антитело по п. 56, причем миелоидные клетки представляют собой макрофаги человека.

58. Антитело по п. 56 или п. 57, причем антитело является человеческим или гуманизированным.
59. Антитело по любому из пп. 56–58, причем антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из 4A-18, 4A-25, 4A-214, 4A-21 и 4A-202.
60. Антитело по любому из пп. 56–59, причем антитело снижает экспрессию маркеров M2 на миелоидных клетках.
61. Антитело по п. 60, причем миелоидные клетки представляют собой макрофаги человека.
62. Антитело по п. 61, причем маркеры M2 представляют собой CD200R, дектин-1 и/или CD163.
63. Антитело по любому из пп. 56–62, причем антитело увеличивает уровень мембранного TREM2 на макрофагах человека по меньшей мере на 50%, 90%, 100%, 150%, 200% или 250%.
64. Антитело по любому из пп. 56–63, причем антитело увеличивает уровень растворимого TREM2 в супернатанте макрофагов человека по меньшей мере на 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60% или 70%.
65. Антитело по любому из пп. 1–64, причем антитело представляет собой моноклональное антитело.
66. Антитело по любому из пп. 1–65, причем антитело связывается с MS4A4A человека с последовательностью SEQ ID NO:1.
67. Антитело по п. 66, причем антитело дополнительно связывается с MS4A4A яванского макака с последовательностью SEQ ID NO:3.
68. Антитело по любому из пп. 1–67, причем антитело относится к классу IgG и имеет изотип IgG1, IgG2 или IgG4.
69. Антитело по п. 68, причем антитело имеет изотип IgG1.
70. Антитело по п. 69, причем антитело содержит модифицированную Fc, содержащую мутации N325S и L328F в соответствии с нумерацией EU.
71. Антитело по любому из пп. 1–70, причем антитело представляет собой фрагмент антитела.
72. Антитело по п. 71, причем фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv или scFv.
73. Антитело по любому из пп. 1–72, причем антитело представляет собой биспецифическое антитело, распознающее первый антиген и второй антиген.

74. Антитело по п. 73, причем первый антиген представляет собой MS4A4A, а второй антиген представляет собой:
- (a) антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер;
 - (b) антиген, облегчающий транспорт через гематоэнцефалический барьер, выбранный из группы, состоящей из рецептора трансферрина (TR), рецептора инсулина (HIR), рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGFR), белков 1 и 2, связанных с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LPR-1 и 2), рецептора дифтерийного токсина, CRM197, однодоменного антитела ламы, TMEM 30(A), домена трансдукции белка, TAT, Syn-B, пенетратина, полиаргининового пептида, ангиопептида и ANG1005;
 - (c) вызывающий заболевание агент, выбранный из группы, состоящей из вызывающих заболевание пептидов или белков, или вызывающих заболевание нуклеиновых кислот, причем вызывающие заболевание нуклеиновые кислоты представляют собой антисмысловую РНК с экспансией повтора GGCCCC (G2C4), белки, вызывающие заболевание, выбраны из группы, состоящей из бета-амилоида, олигомерного бета-амилоида, бета-амилоидных бляшек, белка-предшественника амилоида или его фрагментов, тау-белка, IAPP, альфа-синуклеина, TDP-43, белка FUS, C9orf72 (открытая рамка считывания 72 хромосомы 9), белка с9RAN, прионного белка, PrPSc, гентингина, кальцитонина, супероксиддисмутазы, атаксина, атаксина 1, атаксина 2, атаксина 3, атаксина 7, атаксина 8, атаксина 10, телец Леви, предсердного натрийуретического фактора, островкового амилоидного полипептида, инсулина, аполипопротеина AI, амилоида А сыворотки, медины, пролактина, транстиретина, лизоцима, бета 2 микроглобулина, гельзолина, кератоэпителина, цистатина, легкой цепи иммуноглобулина AL, белка S-IBM, связанных с повторами продуктов трансляции, не относящихся к ATG (RAN), пептидов с дипептидными повторами (DPR), пептидов с повторами глицин-аланин (GA), пептидов с повторами глицин-пролин (GP), пептидов с повторами глицин-аргинин (GR), пептидов с повторами пролин-аланин (PA), убиквитина и пептидов с повторами пролин-аргинин (PR);
 - (d) лиганды и/или белки, экспрессируемые на иммунных клетках, при этом лиганды и/или белки выбраны из группы, состоящей из CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA-4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, GAL9, TIM3, A2AR, LAG-3 и фосфатидилсерина; или
 - (e) белок, липид, полисахарид или гликолипид, экспрессируемые на одной или более опухолевых клетках.
75. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по любому из предшествующих пунктов.
76. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 75.
77. Выделенная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 75 или вектор по п. 76.
78. Способ получения антитела, которое связывается с MS4A4A человека, включающий культивирование клетки по п. 77 таким образом, чтобы продуцировалось антитело.

79. Способ по п. 78, дополнительно включающий выделение антитела, продуцируемого клеткой.
80. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–74 и фармацевтически приемлемый носитель.
81. Способ предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство или поражение, выбранного из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Альцгеймера с поздним началом и когнитивного нарушения, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1–74.
82. Способ предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего заболевание, расстройство, патологическое состояние или поражение, вызванное или ассоциированное со сверхэкспрессией или повышенной активностью MS4A4A, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1–74.
83. Способ предотвращения, снижения риска или лечения индивидуума, имеющего обусловленное дефицитом CSF1R заболевание или расстройство, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1–74.
84. Способ по п. 83, причем обусловленное дефицитом CSF1R заболевание или расстройство представляет собой лейкоэнцефалопатию взрослых с аксональными сфероидными и пигментированной глией (ALSP - англ.: adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia) или наследственную диффузную лейкоэнцефалопатию (HDLS - англ.: hereditary diffuse leukoencephalopathy).
85. Способ по любому из пп. 81–84, дополнительно включающий определение уровней остеопонтина, гельзолина, мембранного TREM2 и/или растворимого TREM2 до и/или после введения антитела.

Фиг. 1

*MHQ*TYSRHCRPEESTFSAAMITMQGMEQAMPGAGPGVPQLGNMAVIHSHLWKGLQEKFLKGEP
KVLGVVQILTALMSLSMGITMMCMA*SNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIISGSL*IAAGIRTTKG
*LVRGSLGMNTSSVLAASGILINTFSLAFY.SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMSILMGLDGMVLLL
SVLEFCIAVSLSAFGCKVLCCTPGGVVLILPSHSHMAETASPTPLNEV*

ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

1P68 (SEQ ID NO:181)

MYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKNWHGGKDNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQGGGSGGKLQE
MMKEFQQVLDELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR

ФИГ. 2С

1M6T (SEQ ID NO:182)

ADLEDNWETLNDNLKVIEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDSPPEMKD
FRHGFDILVGQIDDALKLANEGKVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQKYL

ФИГ. 3А

JS1 (SEQ ID NO:172)

MGWSCIIFLVATATGVHSMYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKNCMASNTYGSNPISKDNLHD
VDNHLQNVIEDIHDFMQGGSGGKLQEMMKEFQQVLDELNNHSFHHPYCNYYGNSNNCH
GTMSHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHRHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

JS5 (SEQ ID NO:173)

MGWSCIIFLVATATGVHSADLEDNWETLNDNLKVIECMASNTYGSNPISAAQVKDALTKM
RAAALDAQKATPPKLEDKSPDSPMKDFRHGFDILVGQIDDALKLANSFHHPYCNYYGNSN
NCHGTMSVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQKYLHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

JS6 (SEQ ID NO:174)

MGWSCIIFLVATATGVHSADLEDNWETLNDNLKVIEGPCMASNTYGSNPISAAQVKDALT
KMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDSPMKDFRHGFDILVGQIDDALKLANSFHHPYCNYYG
NSNNCHGTMSVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQKYLHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

ФИГ. 3В

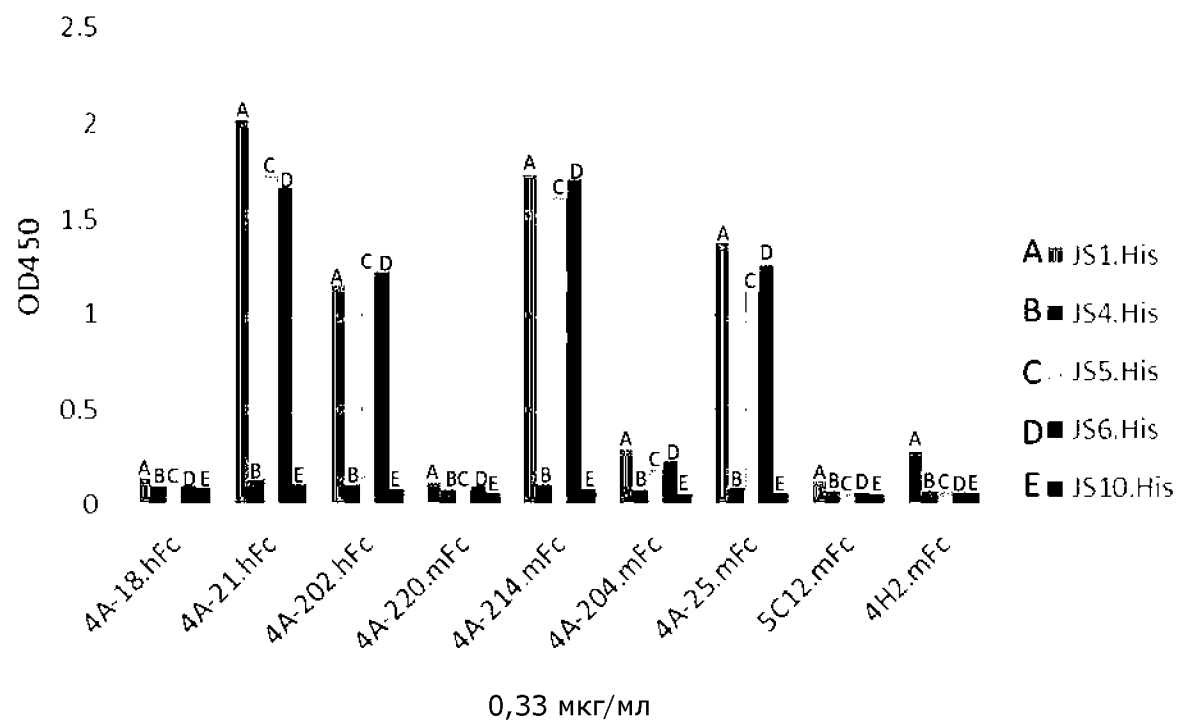
JS4 (SEQ ID NO:175)

MGWSCIIFLVATATGVHSMYGKLNDLLEDLQEVLKNLHKNWHGGKDNLHDVDNHLQNV
IEDIHDFMQGGSGGKLQEMMKEFQQVLDELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR
HHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

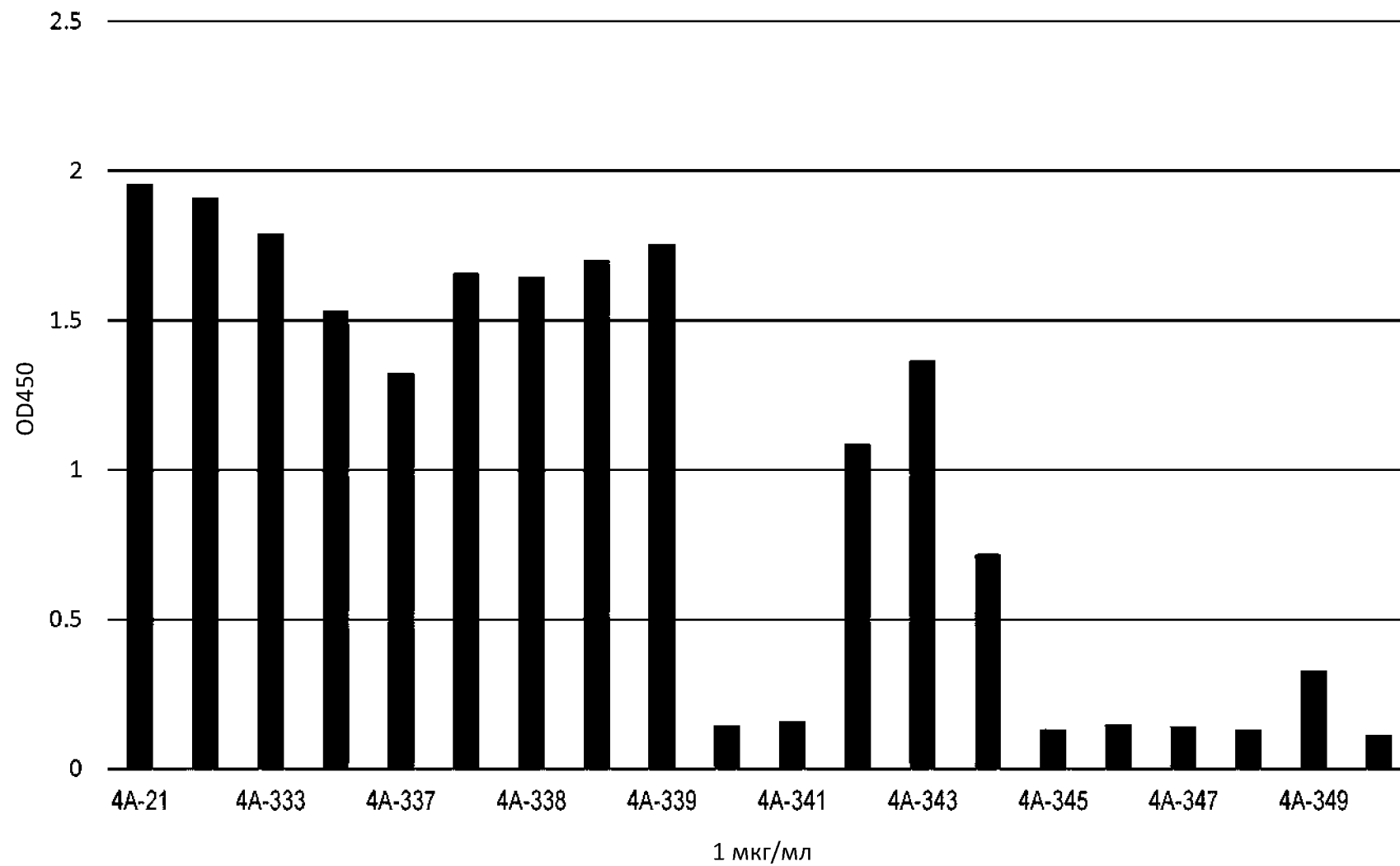
JS10 (SEQ ID NO:176)

MGWSCIIFLVATATGVHSADLEDNWETLNDNLKVIEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQ
KATPPKLEDKSPDSPMKDFRHGFDILVGQIDDALKLANEGKVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQ
KYLHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

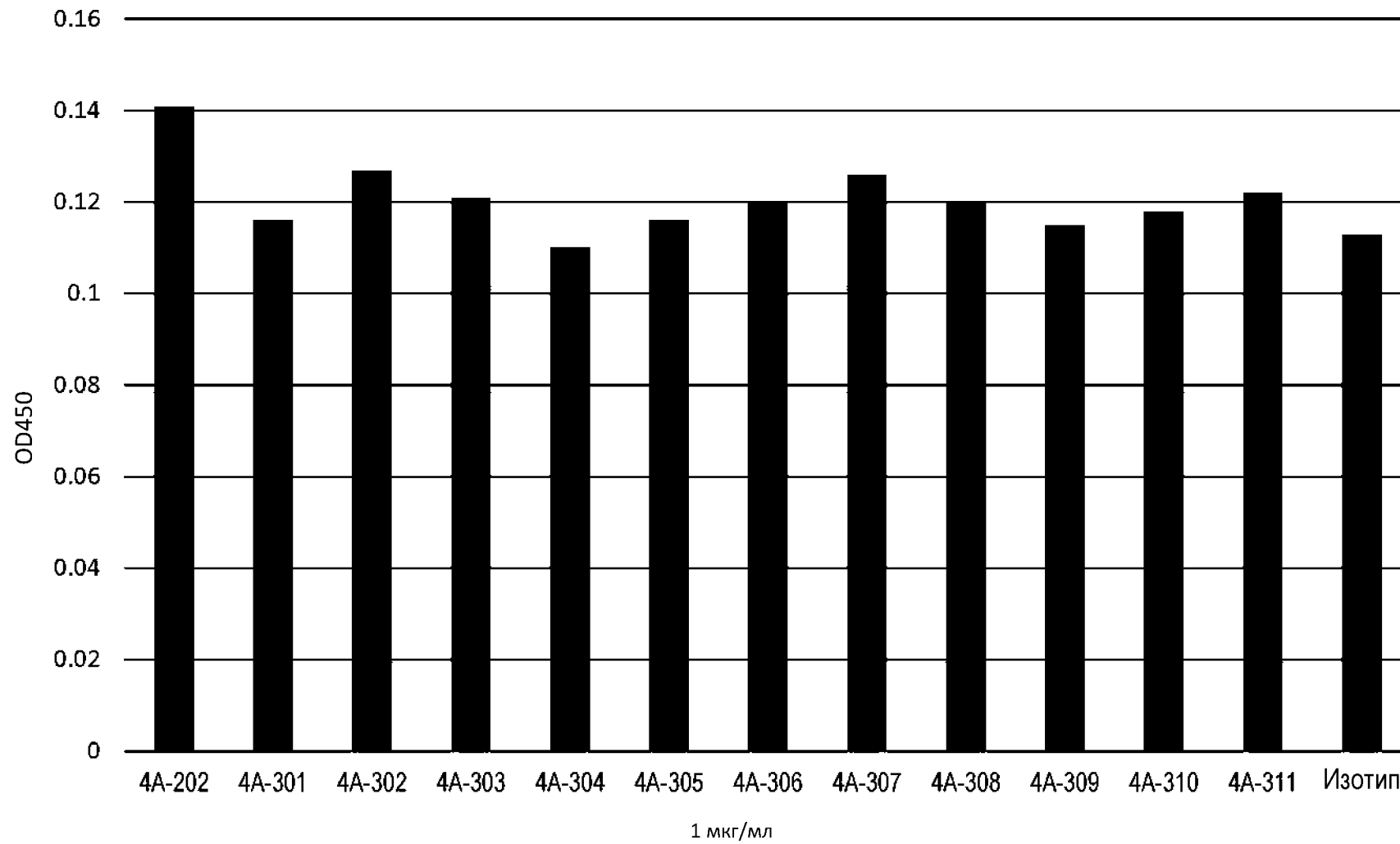
ФИГ. 4



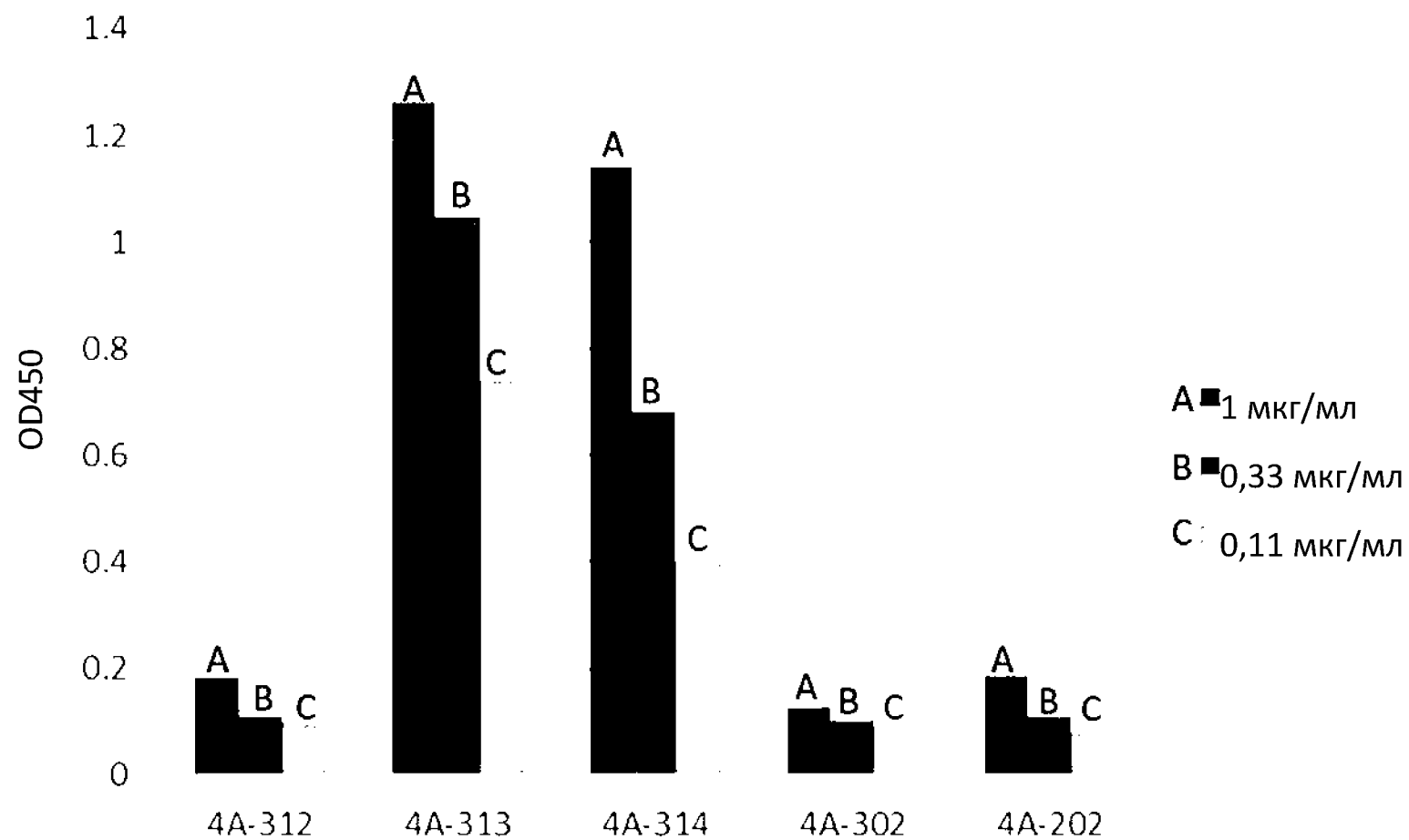
ФИГ. 5



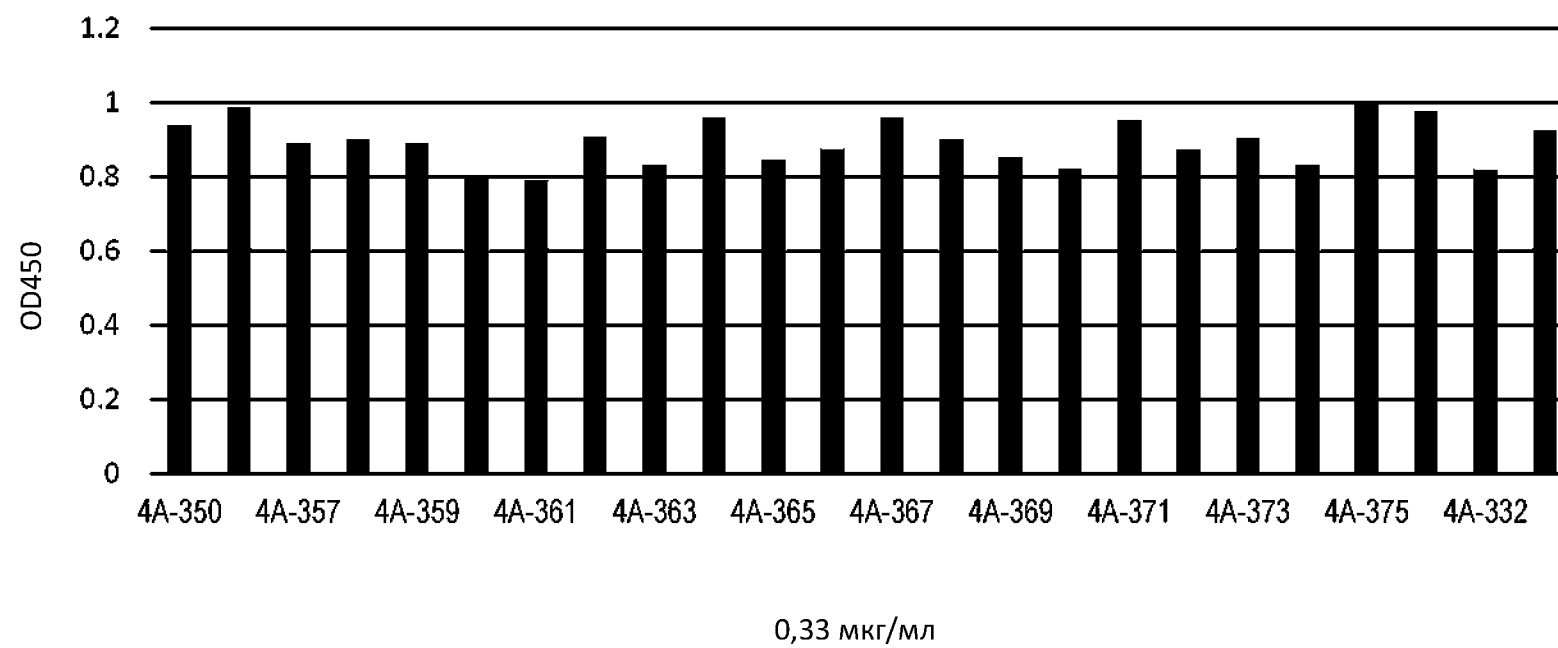
ФИГ. 6



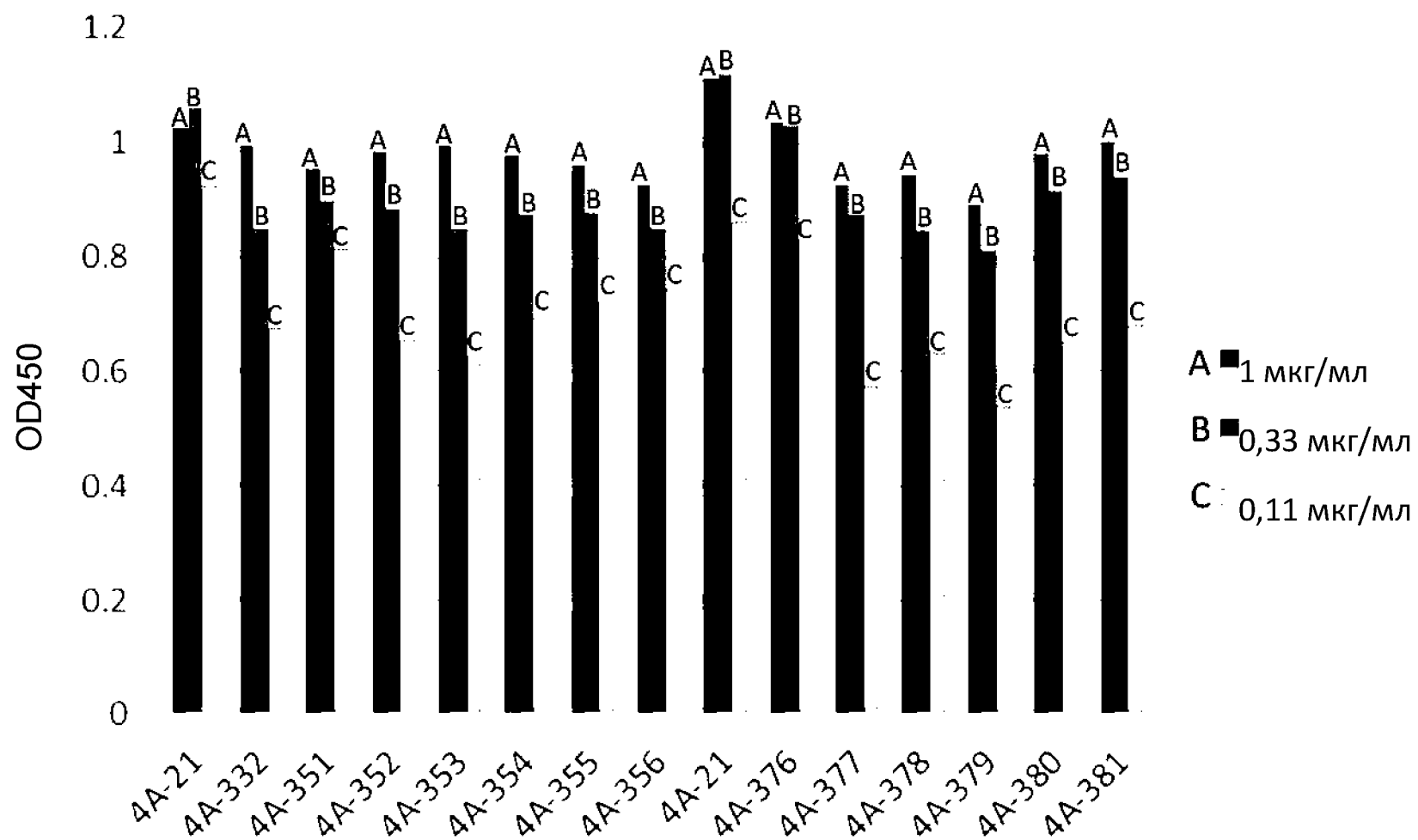
ФИГ. 7



ФИГ. 8

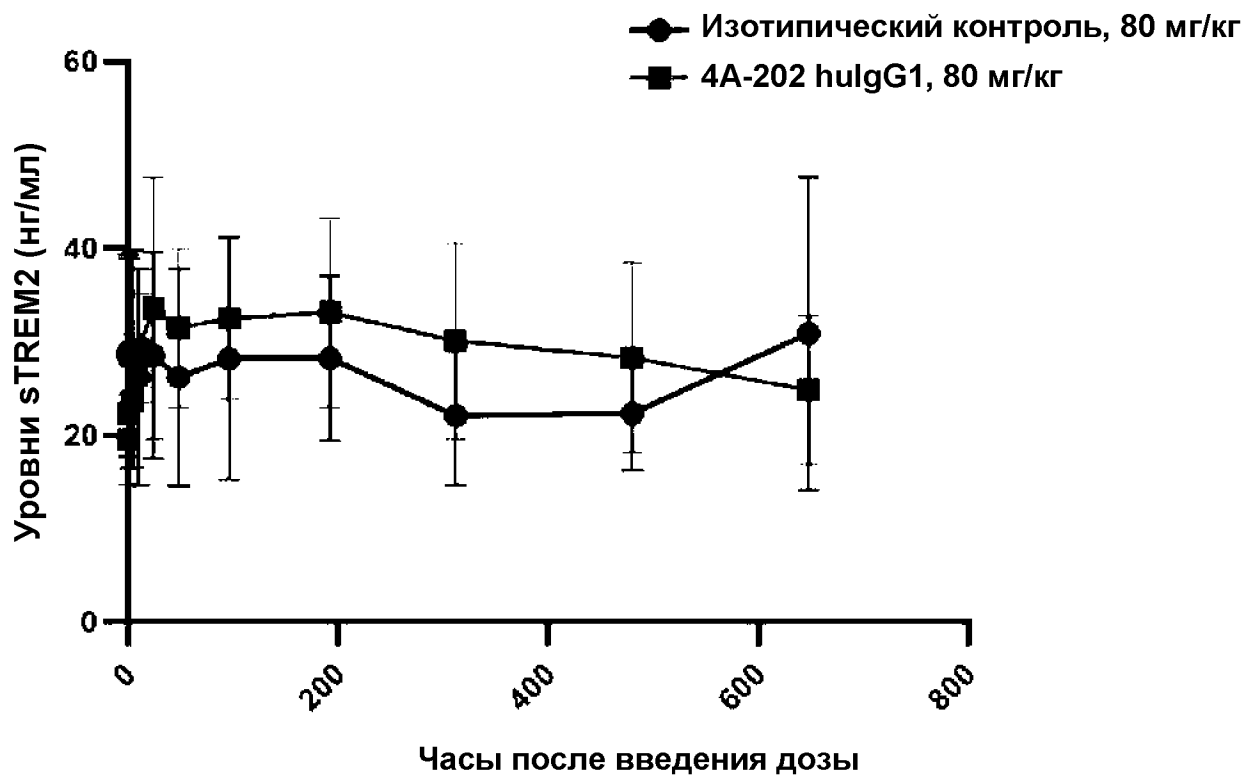


ФИГ. 9

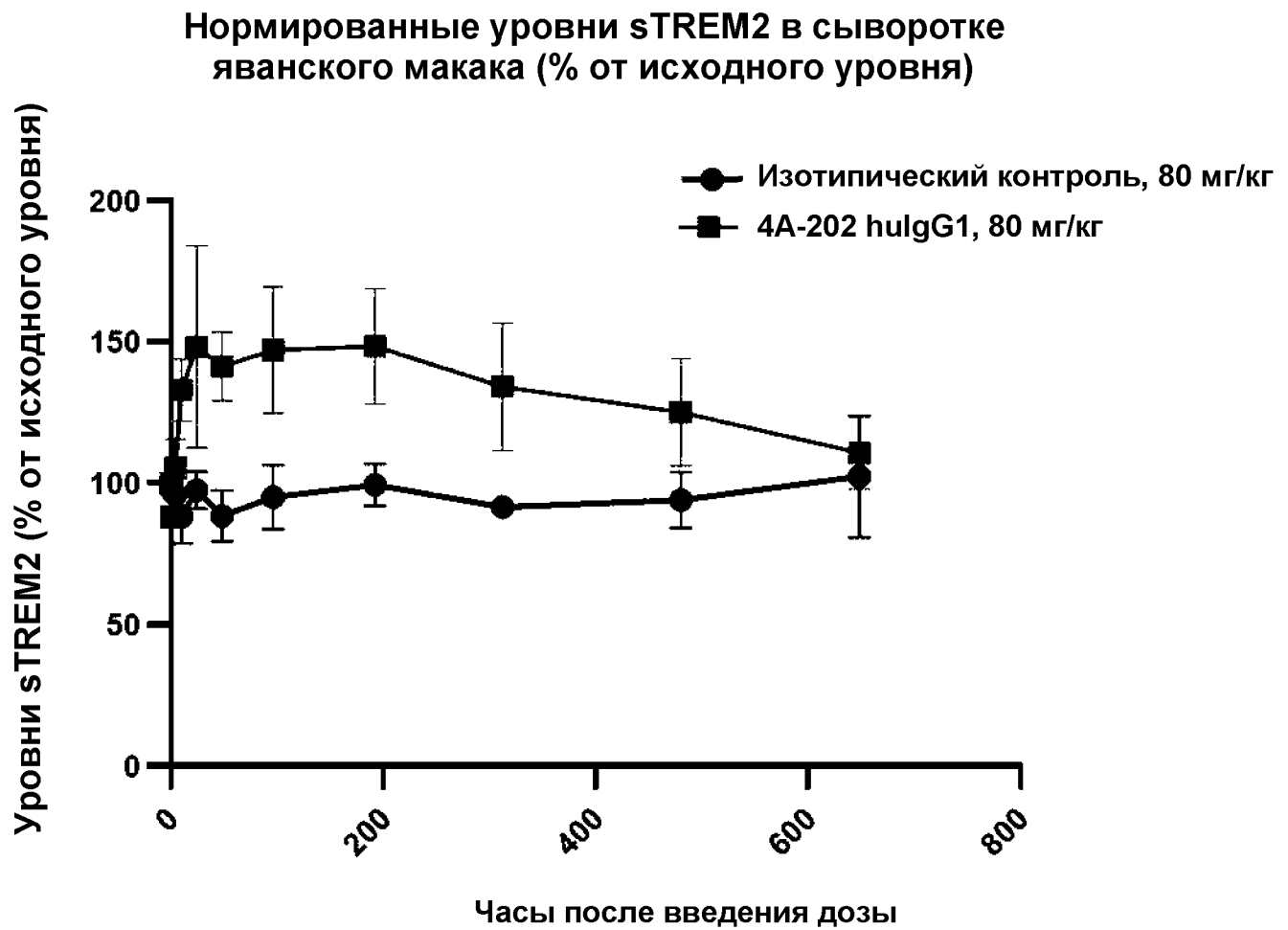


ФИГ. 10А

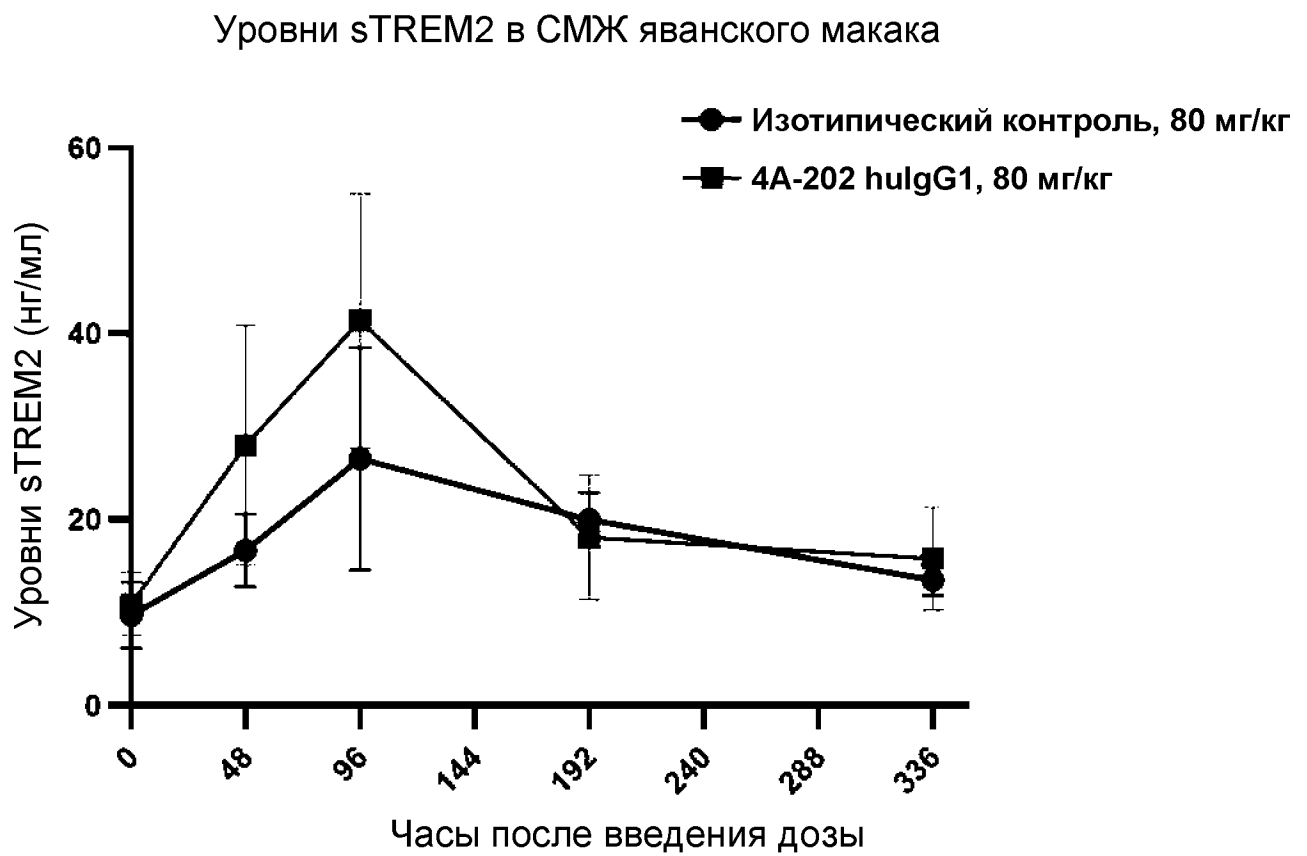
Уровни sTREM2 в сыворотке яванского макака



ФИГ. 10В



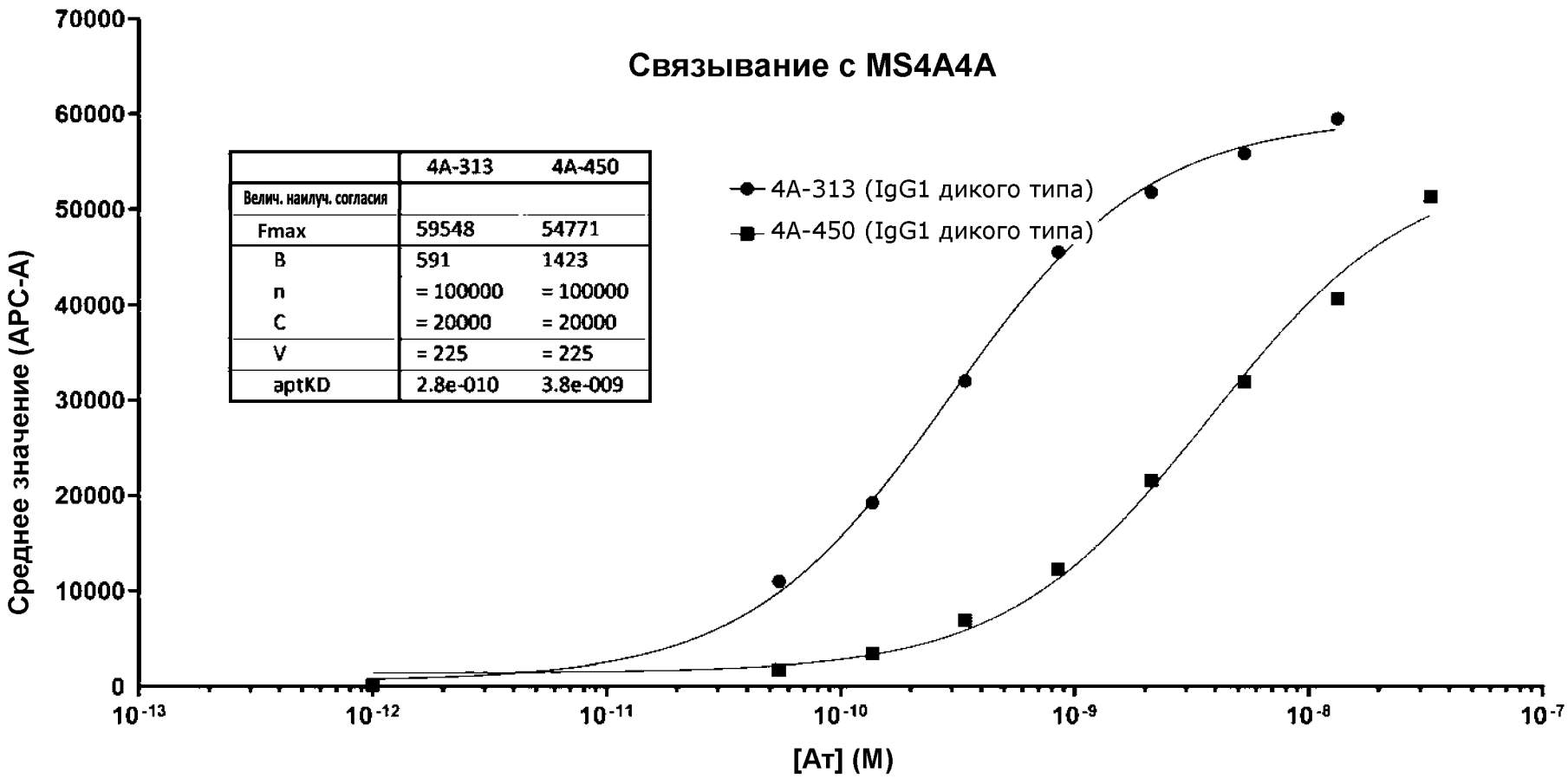
ФИГ. 11А



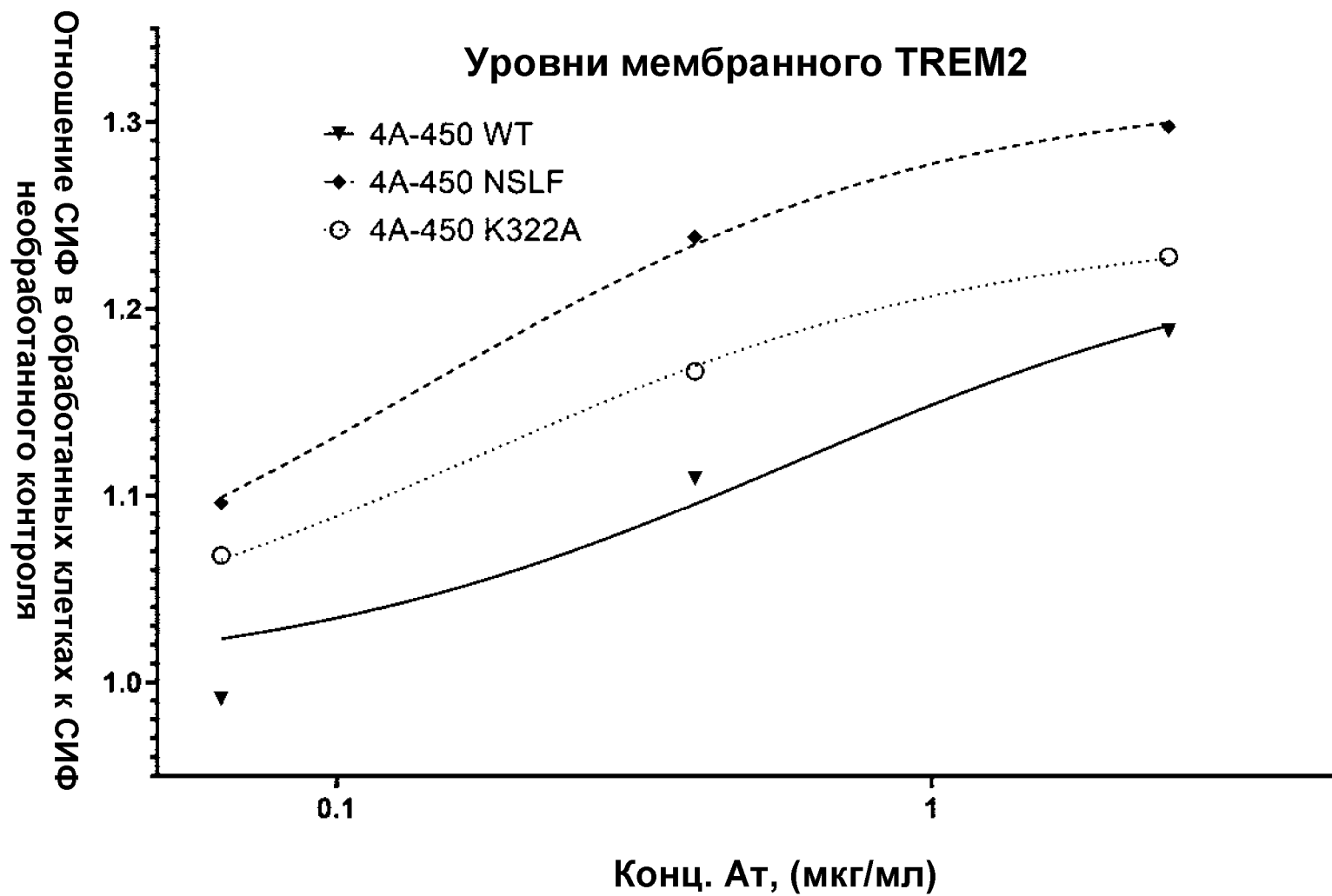
ФИГ. 11В



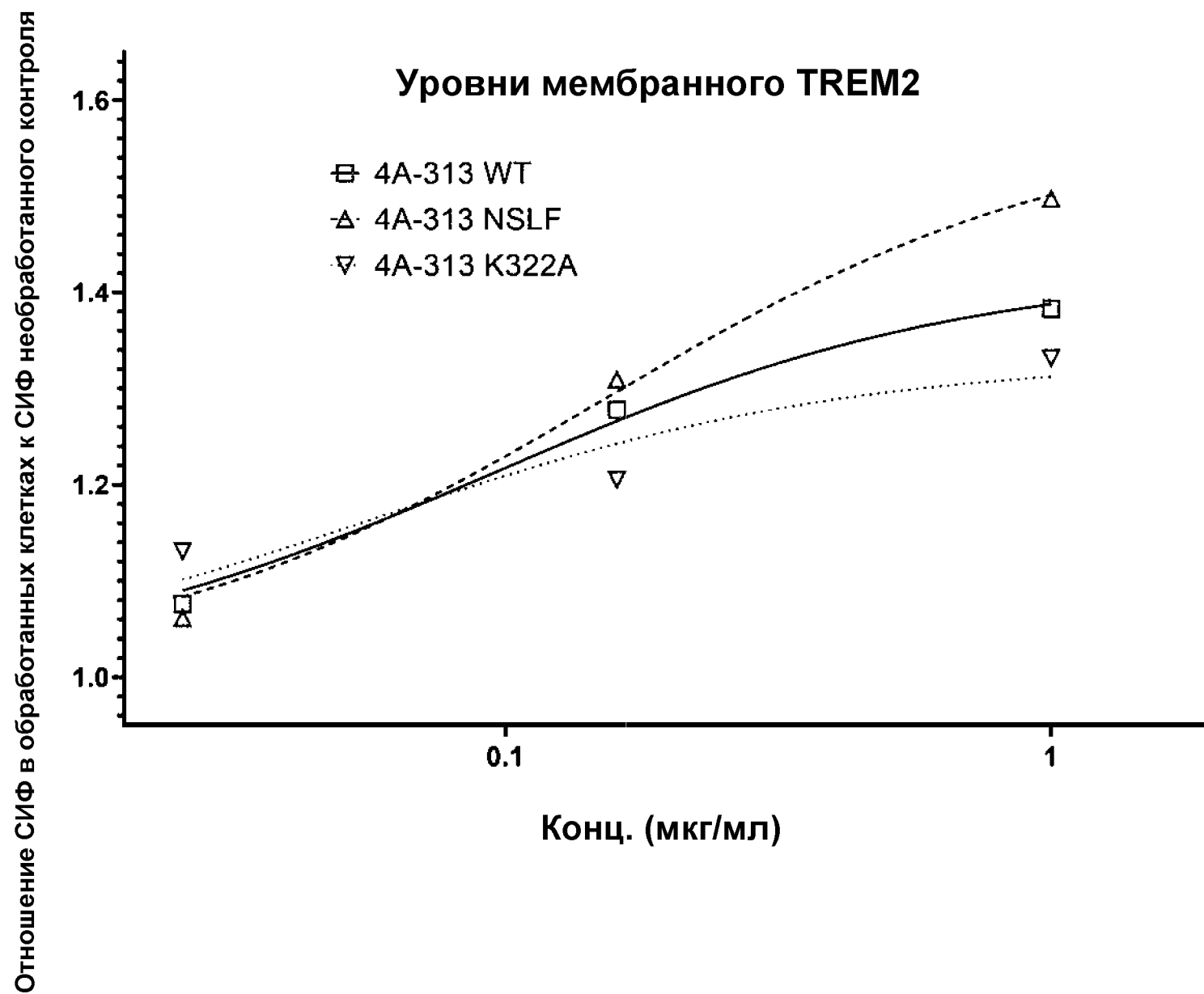
ФИГ. 12



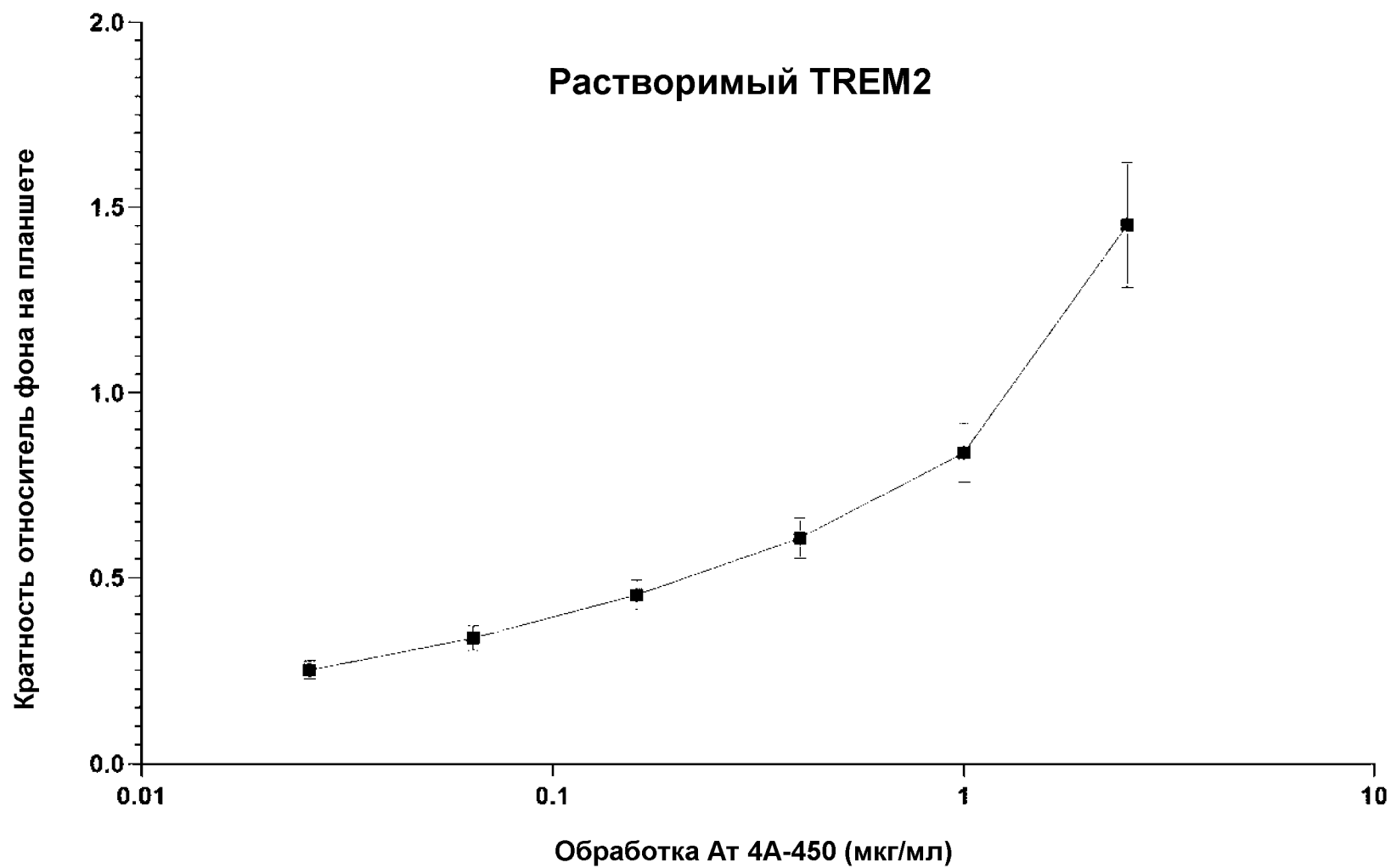
ФИГ. 13



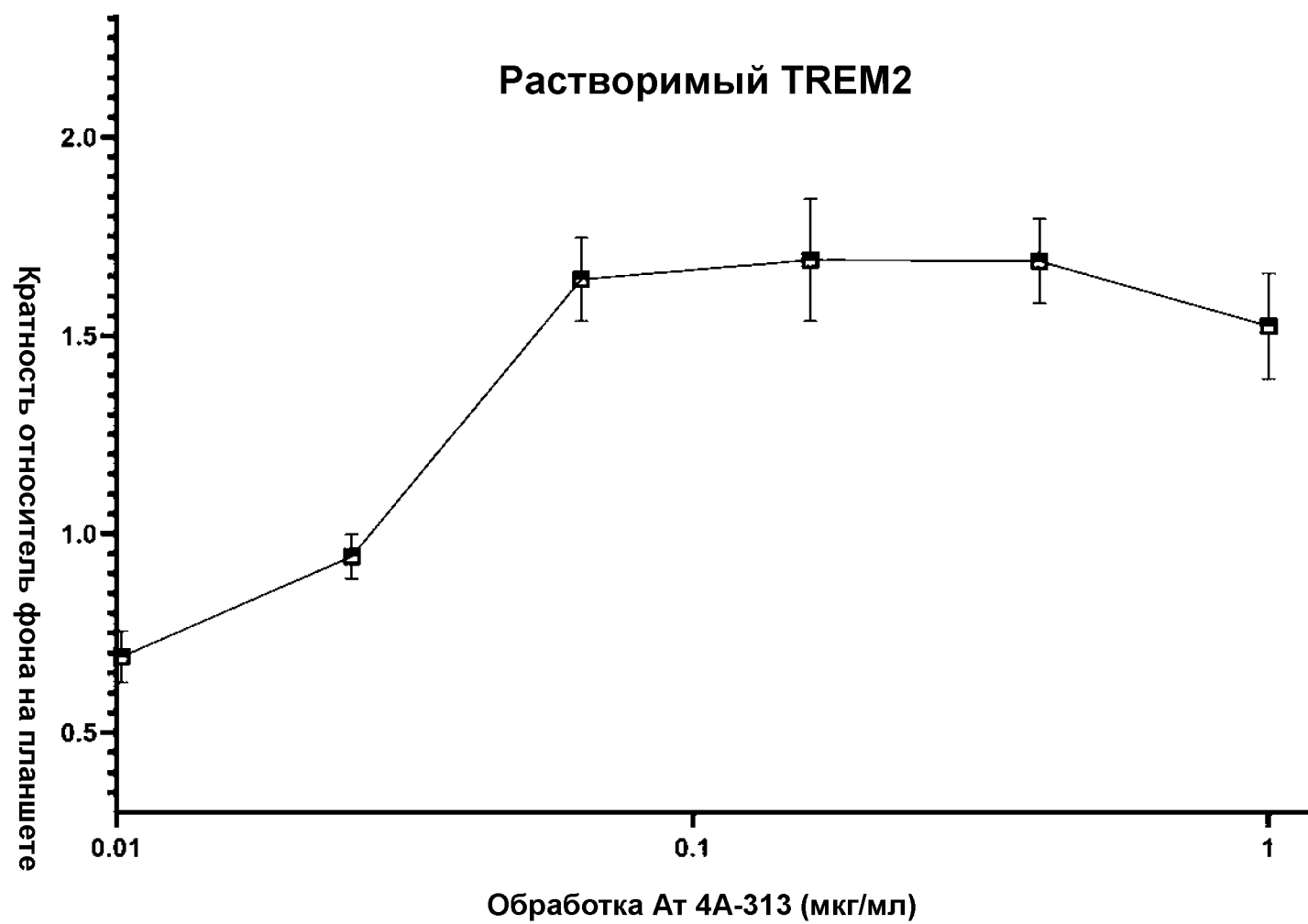
ФИГ. 14



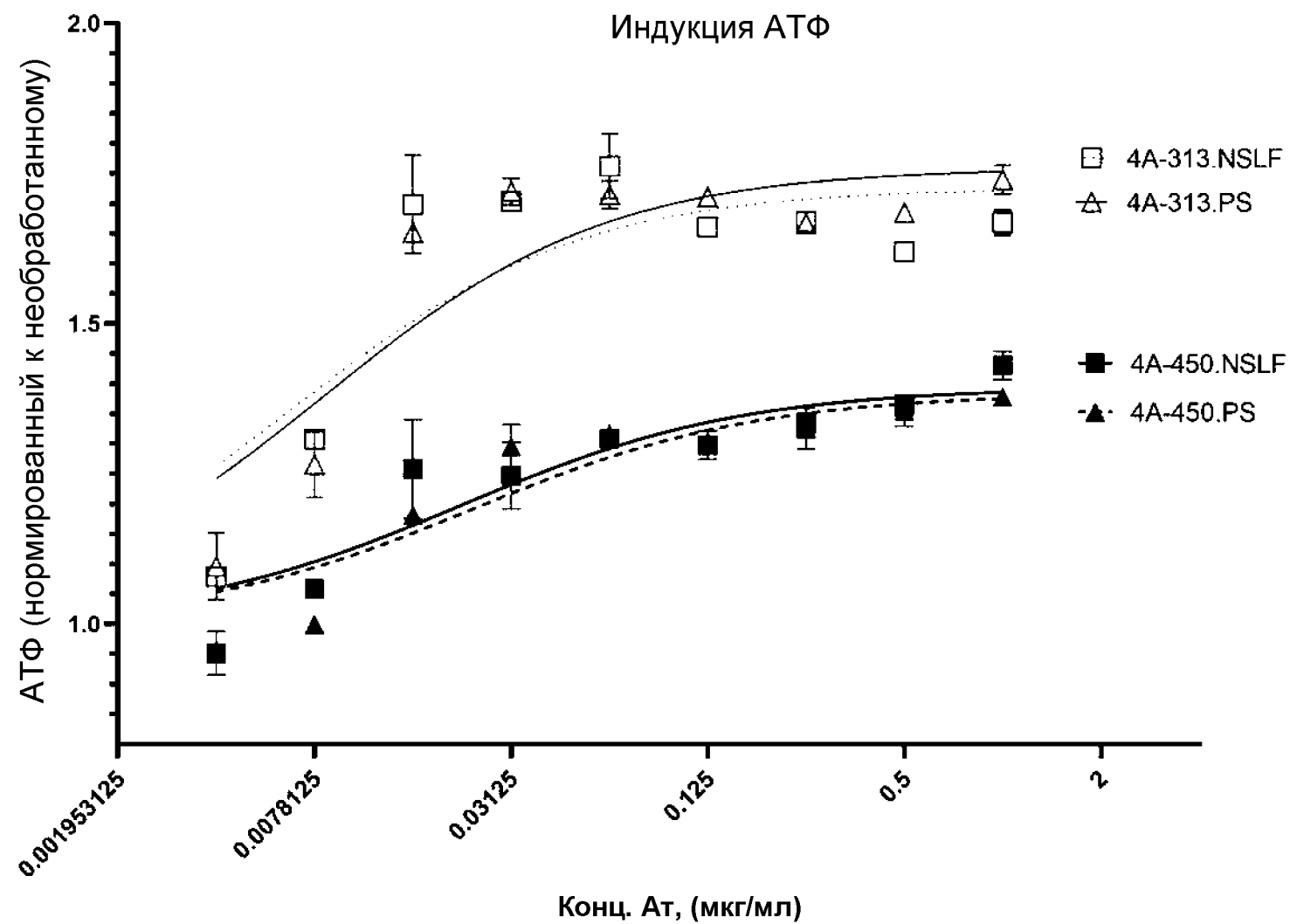
ФИГ. 15

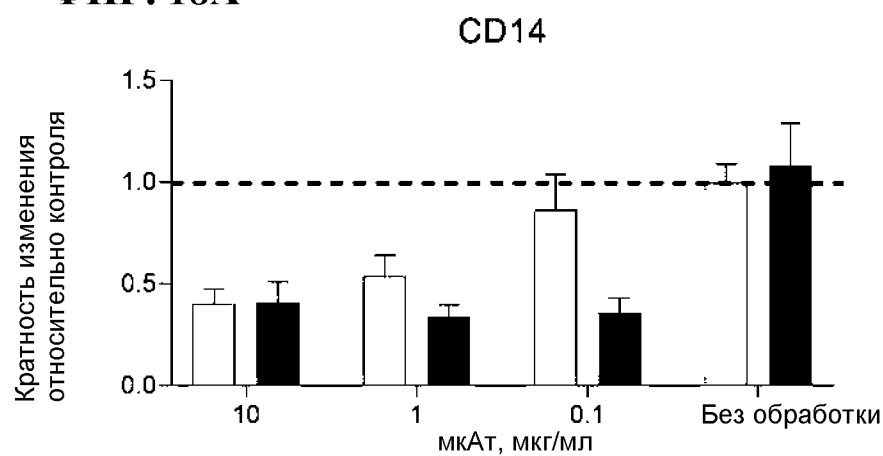
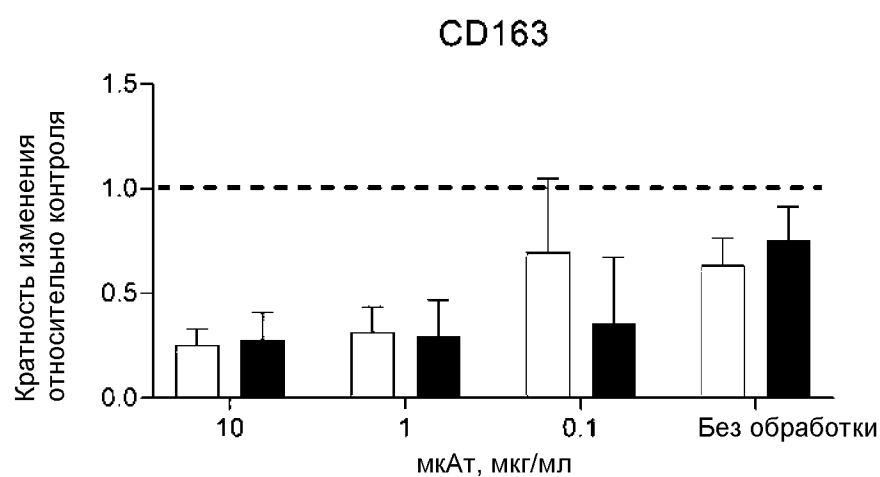
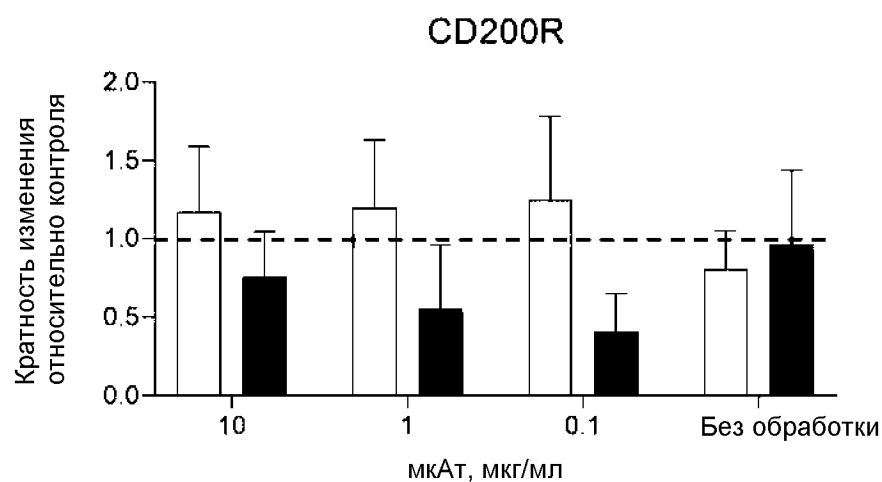


ФИГ. 16

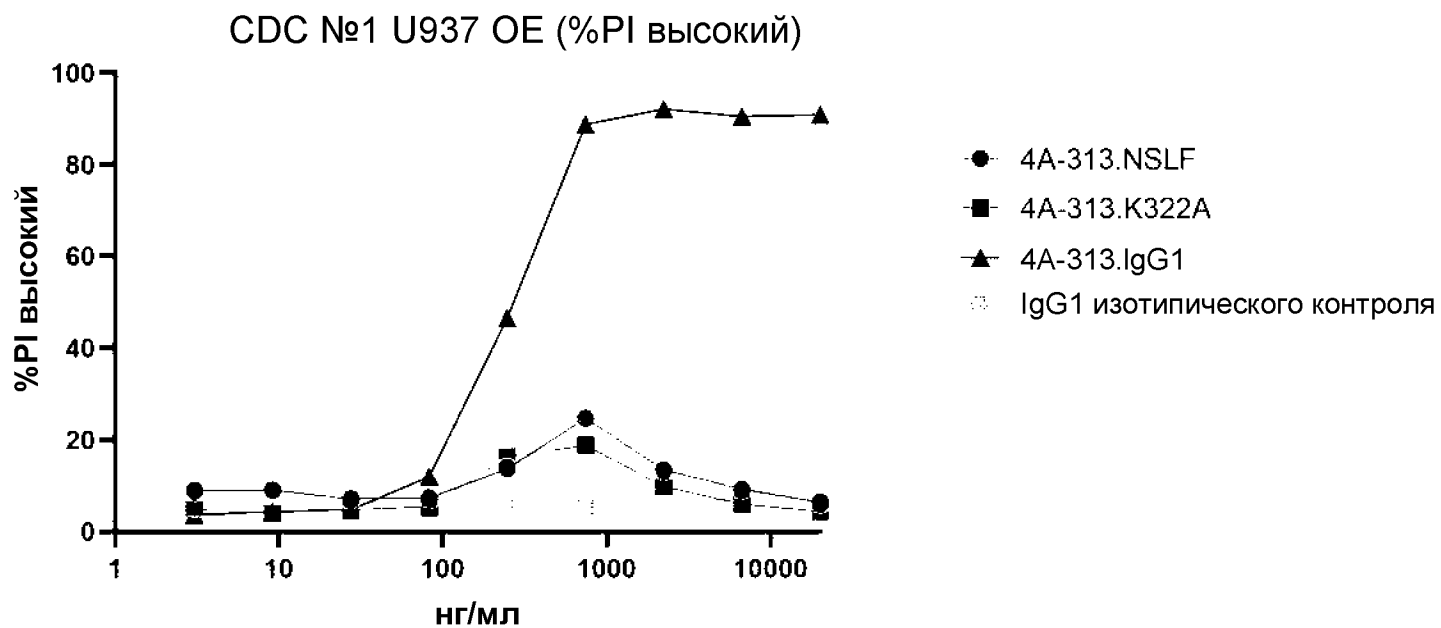


ФИГ. 17

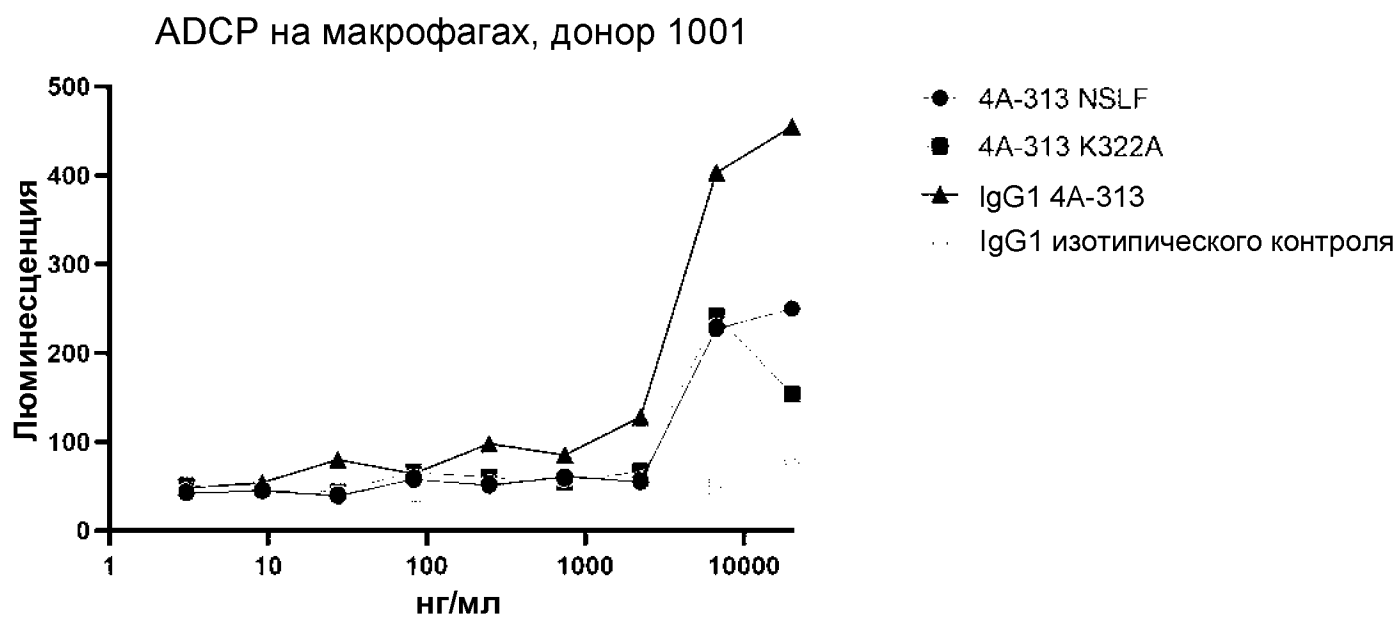


ФИГ. 18А**ФИГ. 18В****ФИГ. 18С**

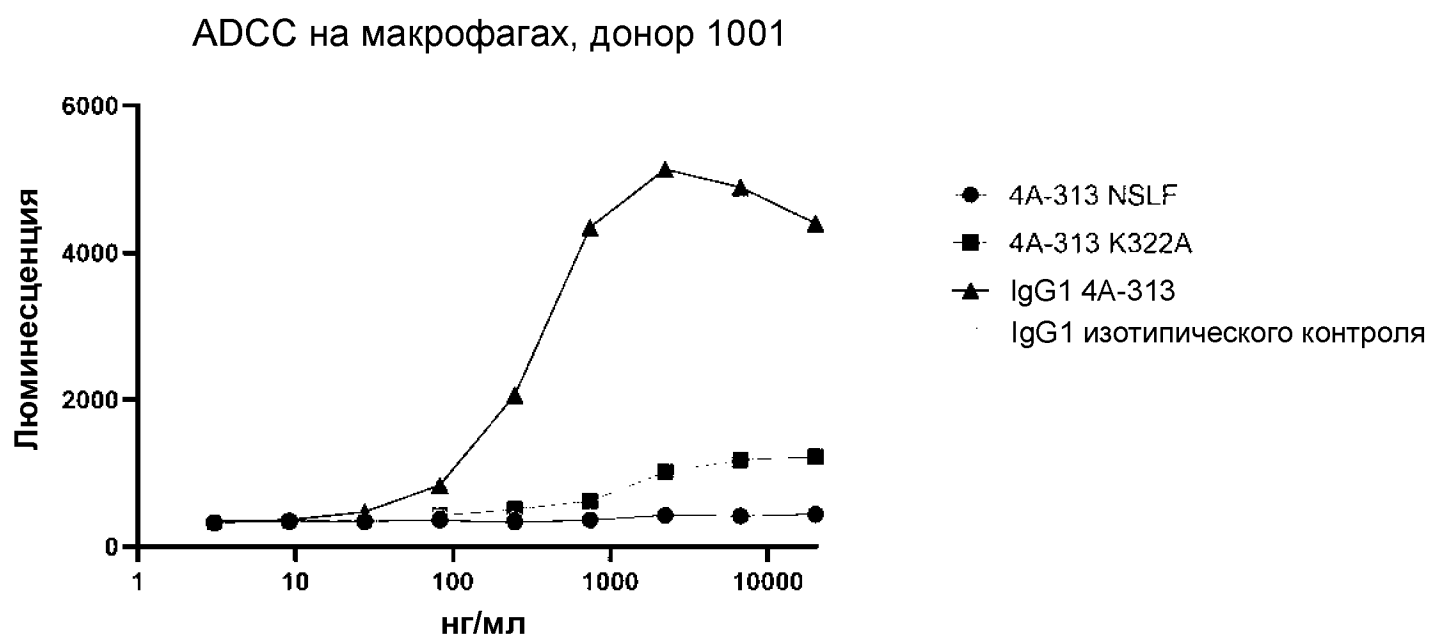
ФИГ. 19



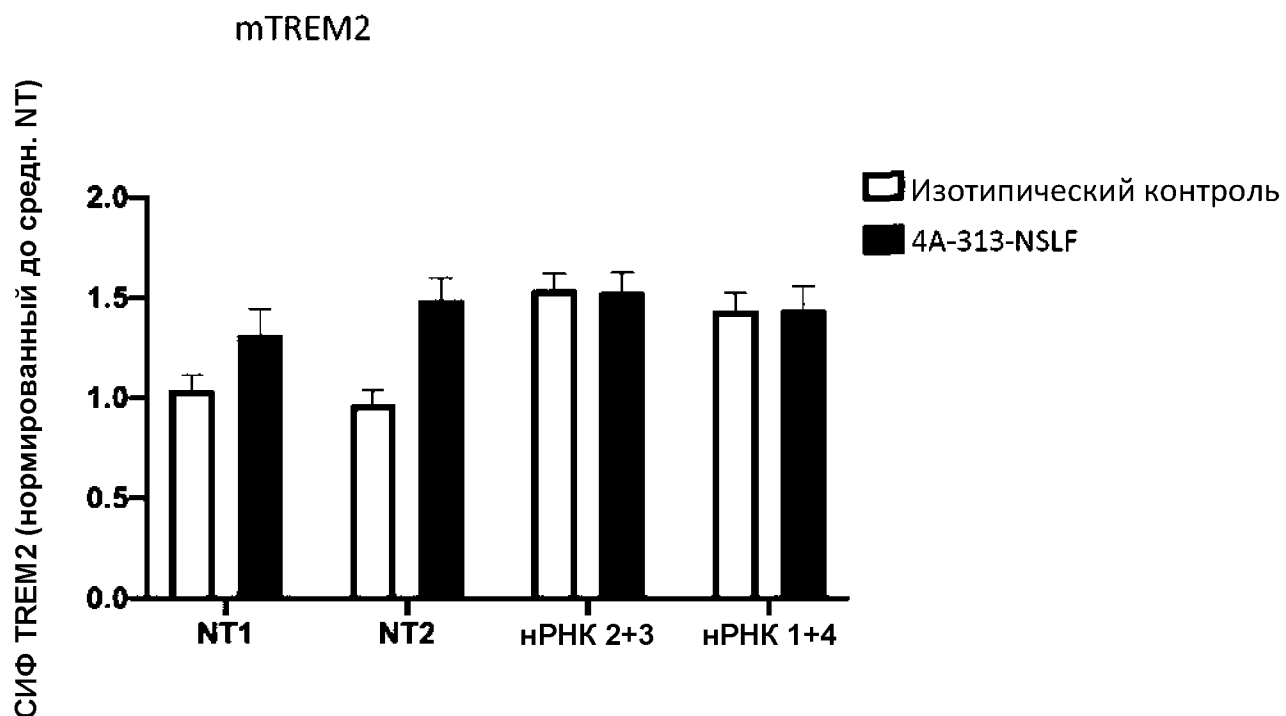
ФИГ. 20



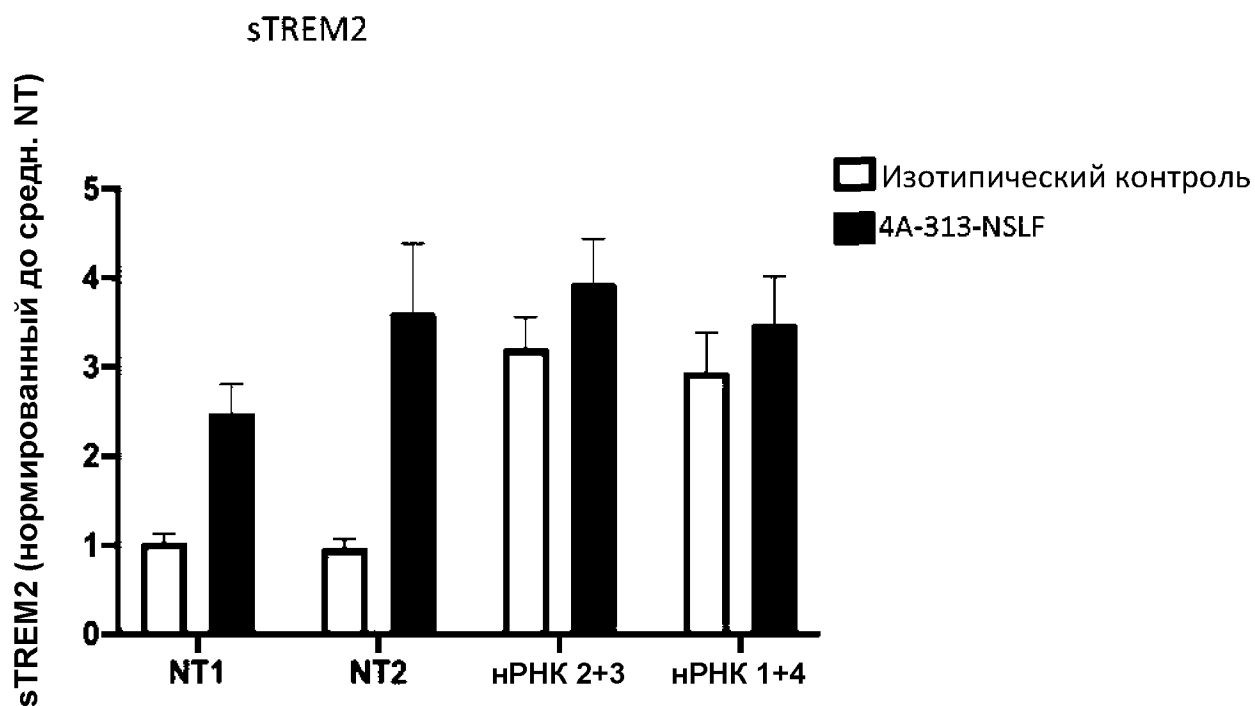
ФИГ. 21



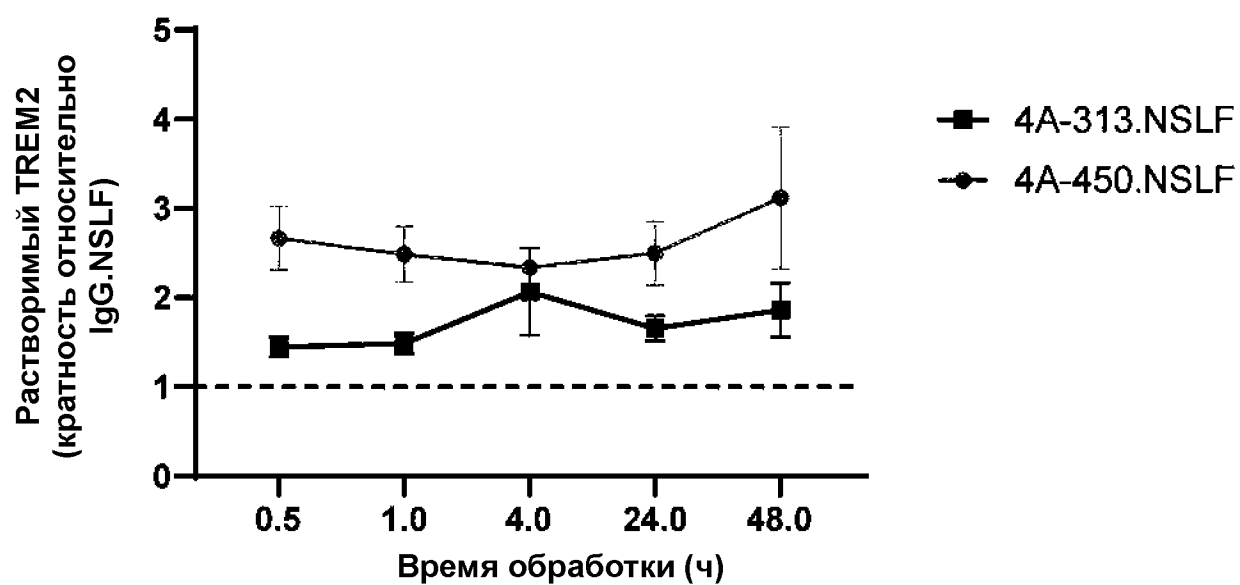
ФИГ. 22А



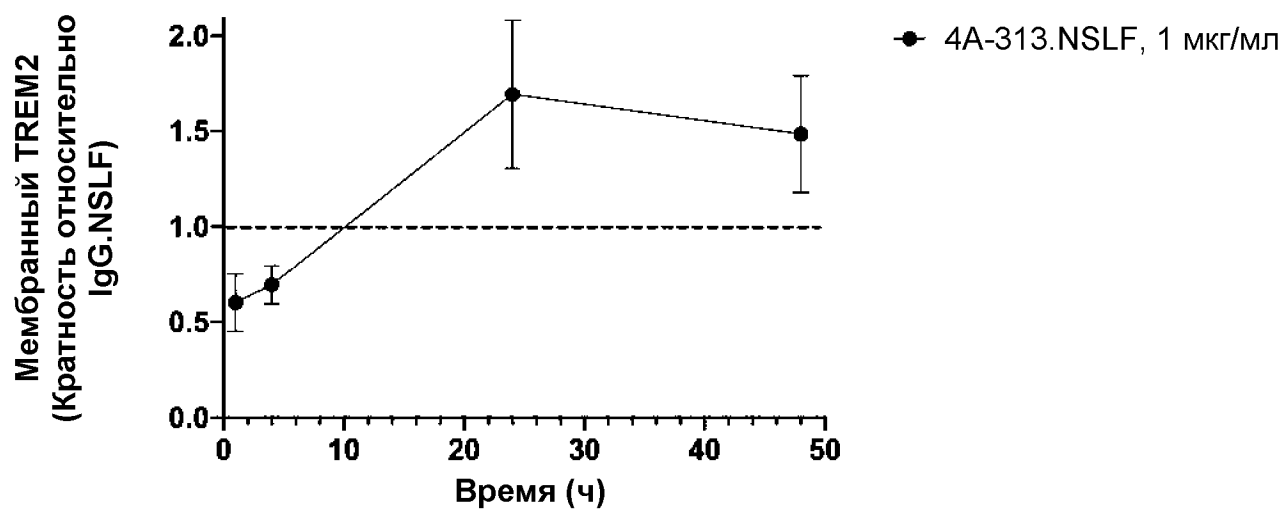
ФИГ. 22В



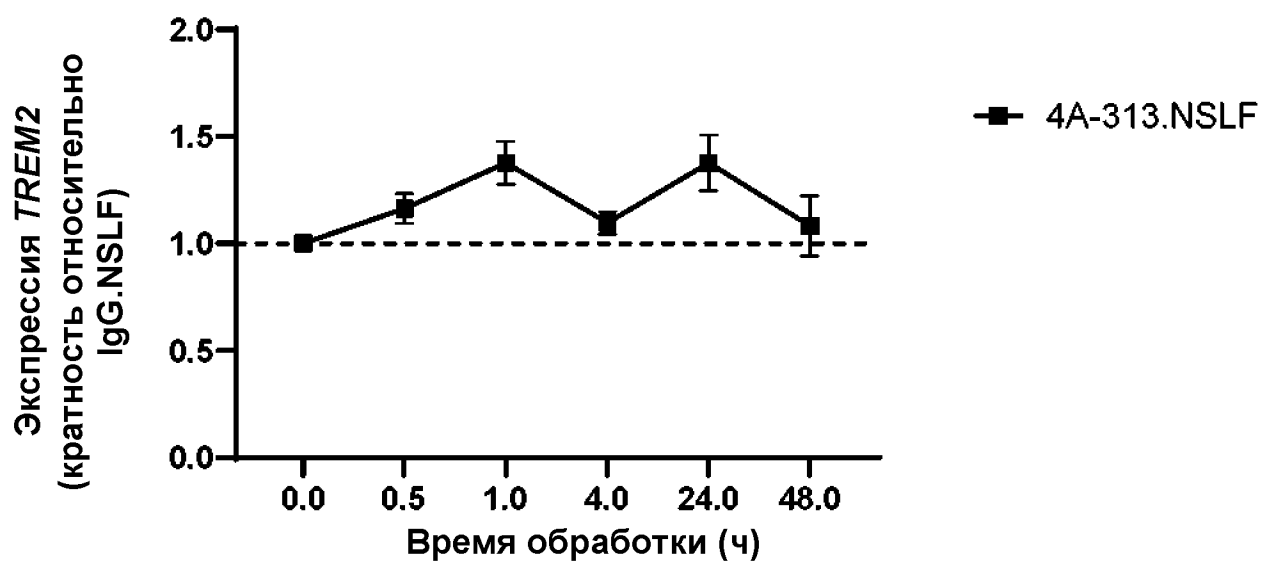
ФИГ. 23А



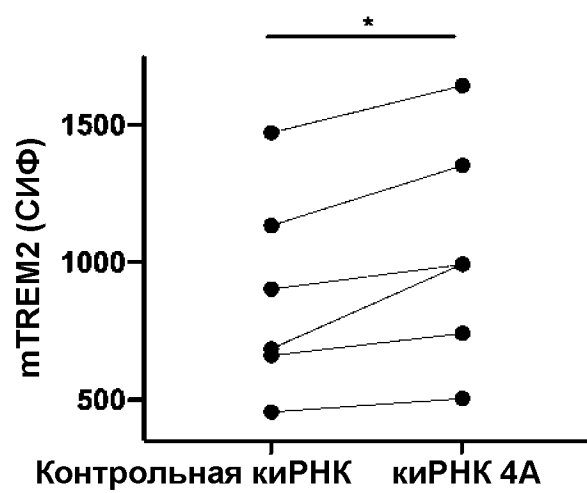
ФИГ. 23В



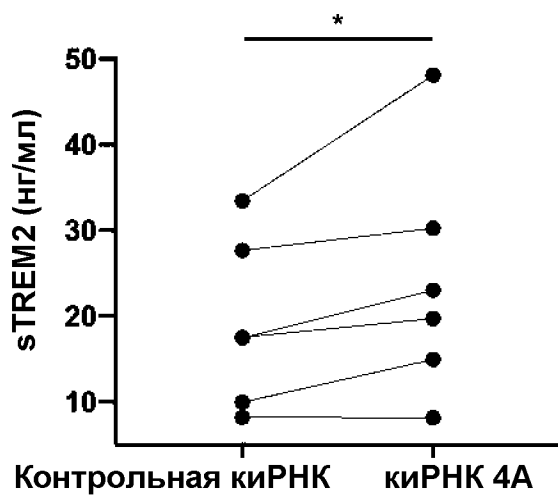
ФИГ. 23С



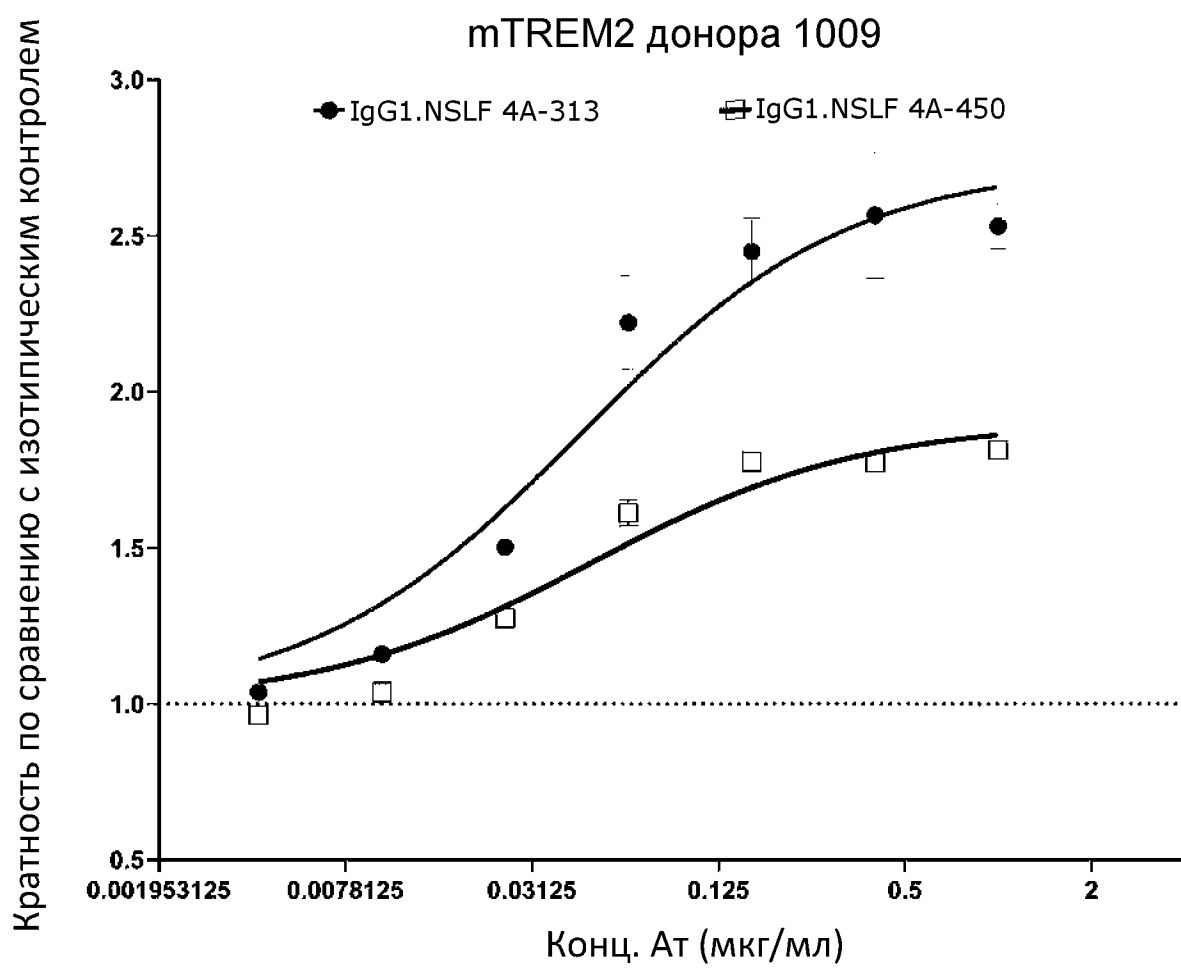
ФИГ. 24А



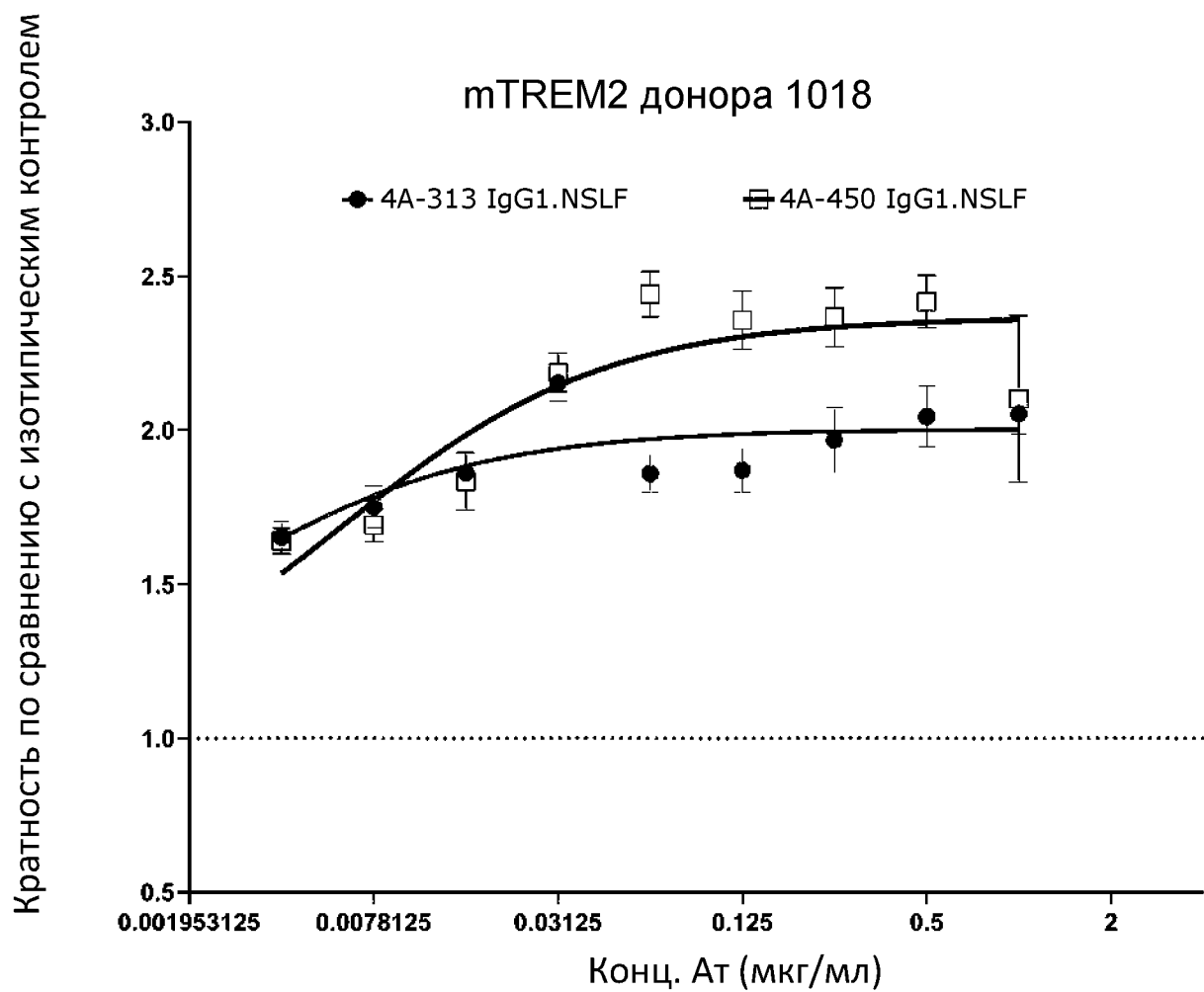
ФИГ. 24В



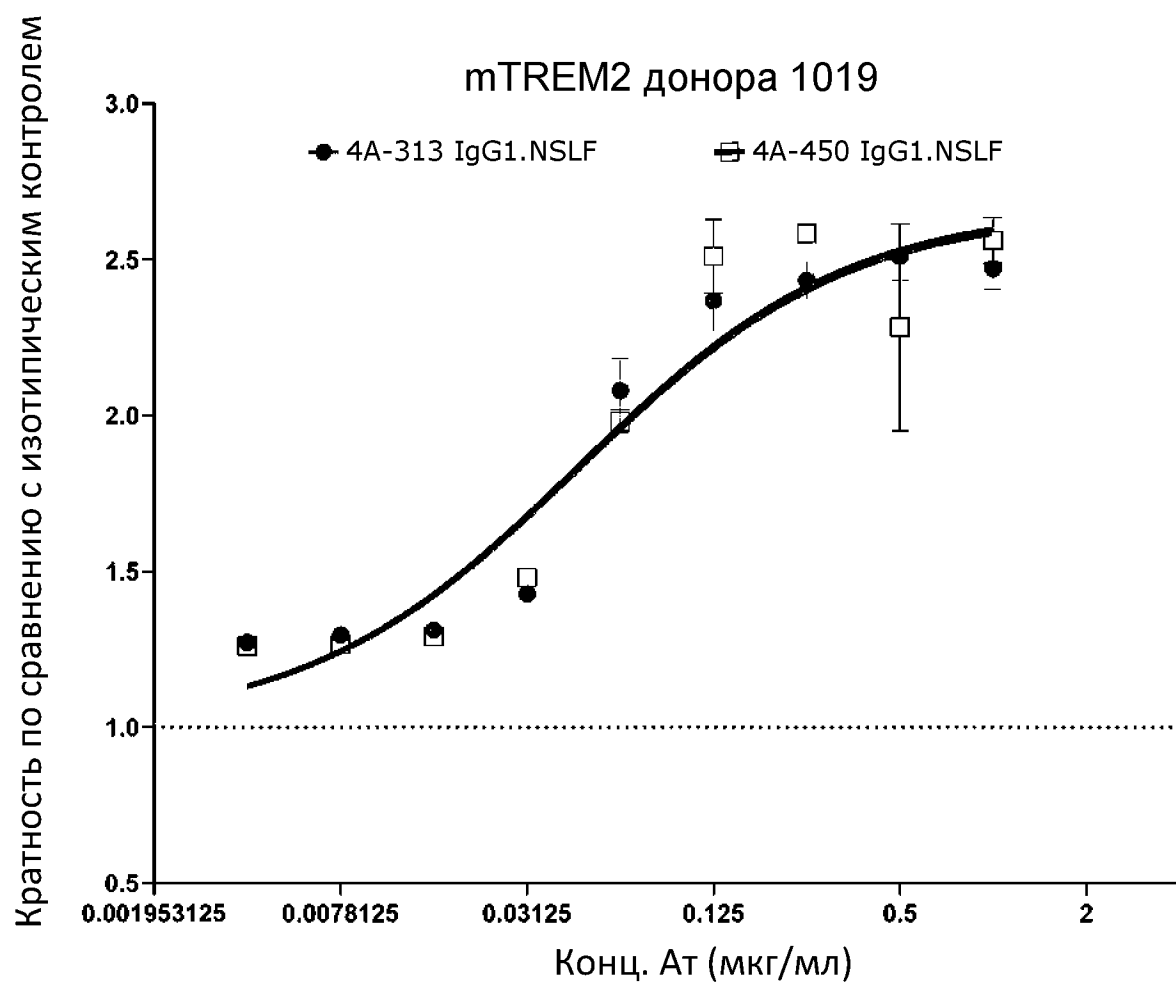
ФИГ. 25А



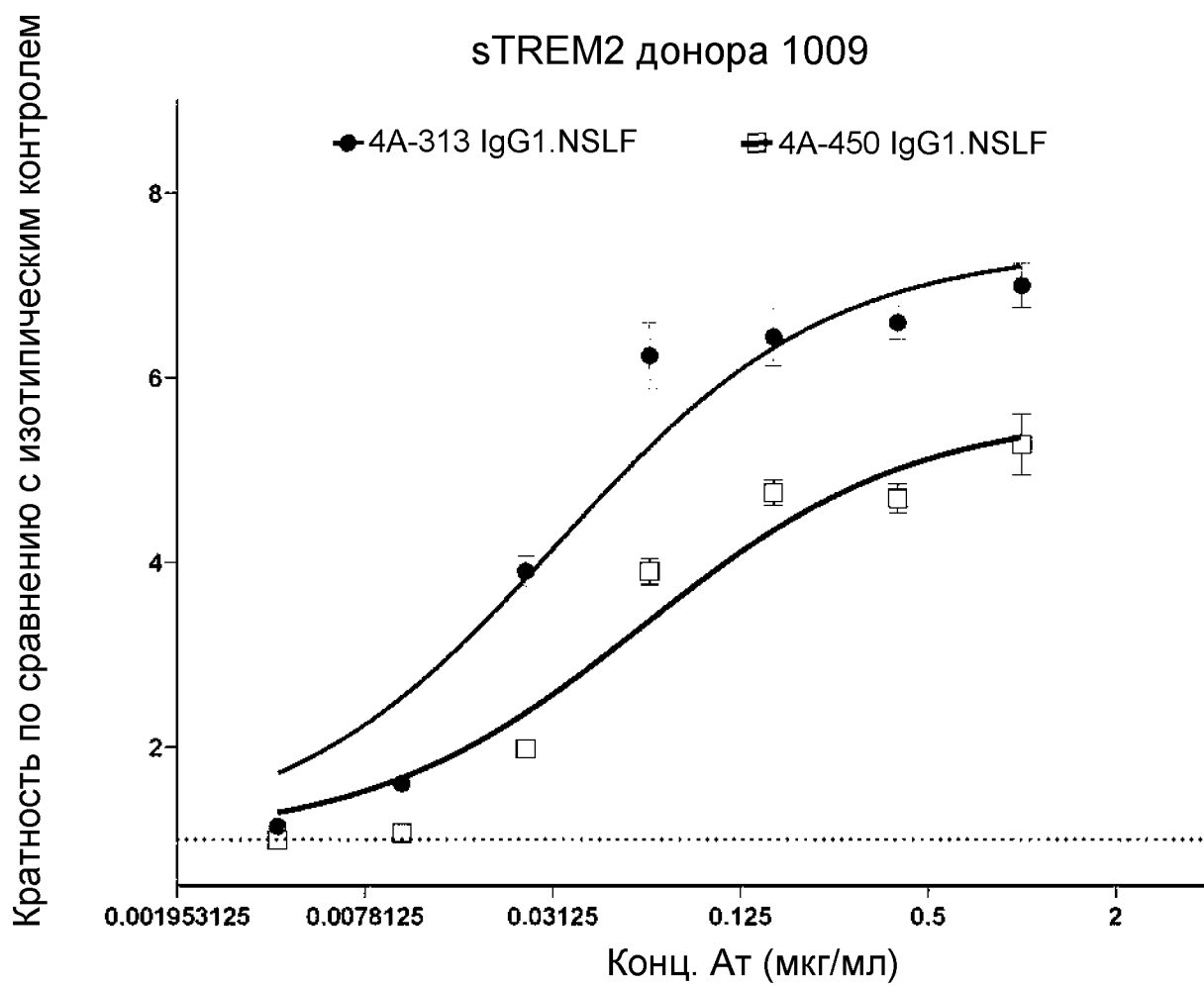
ФИГ. 25В



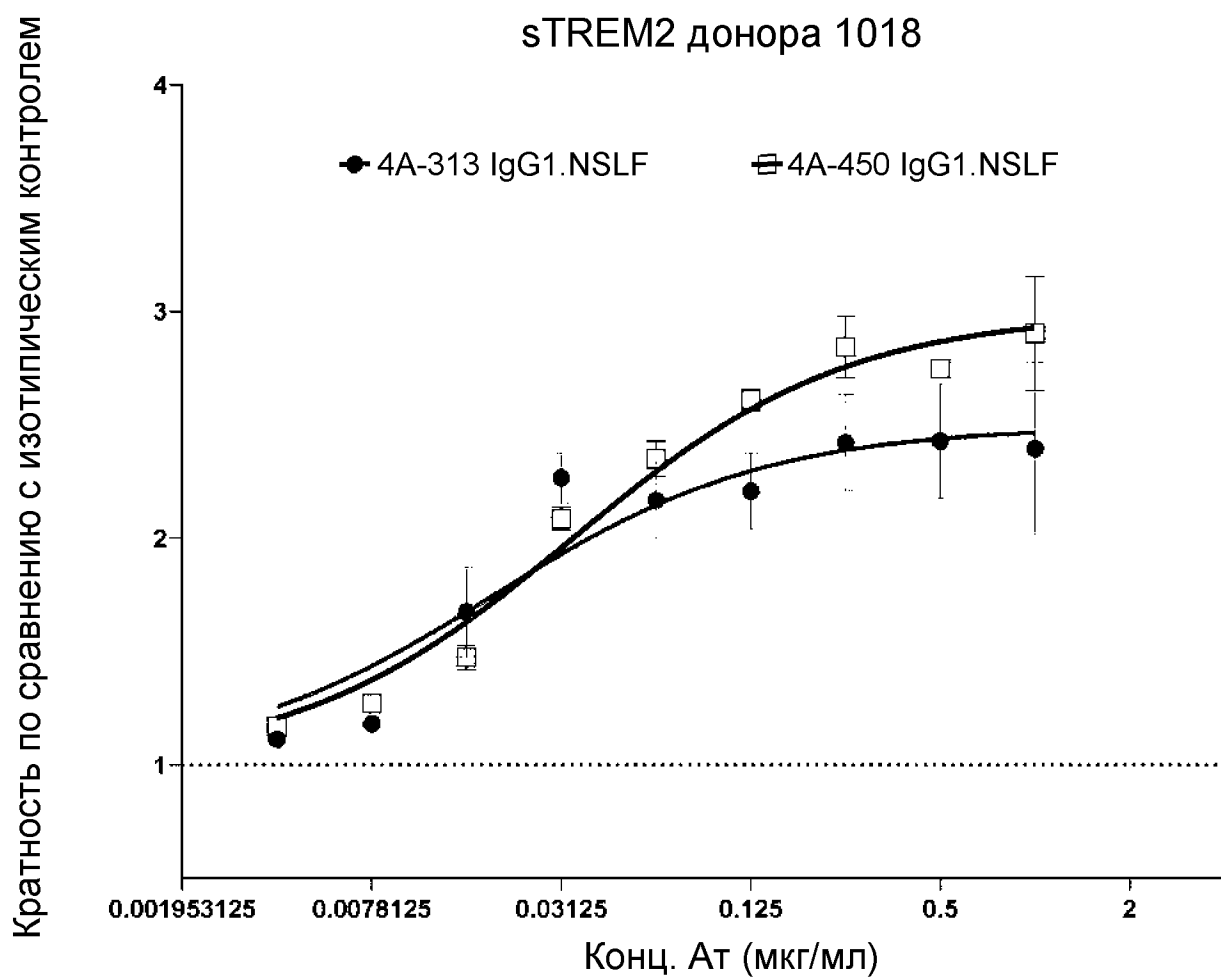
ФИГ. 25С



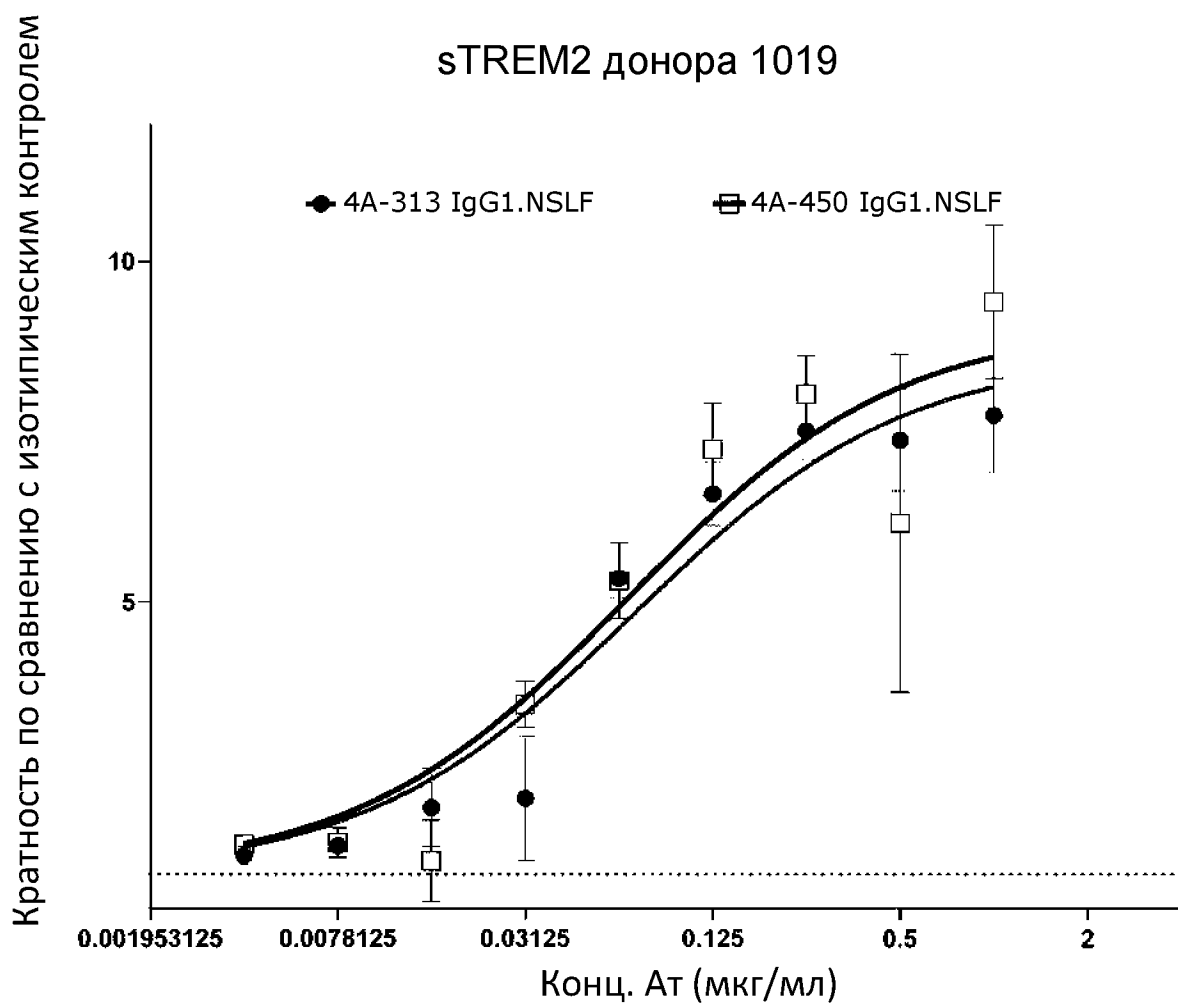
ФИГ. 26А



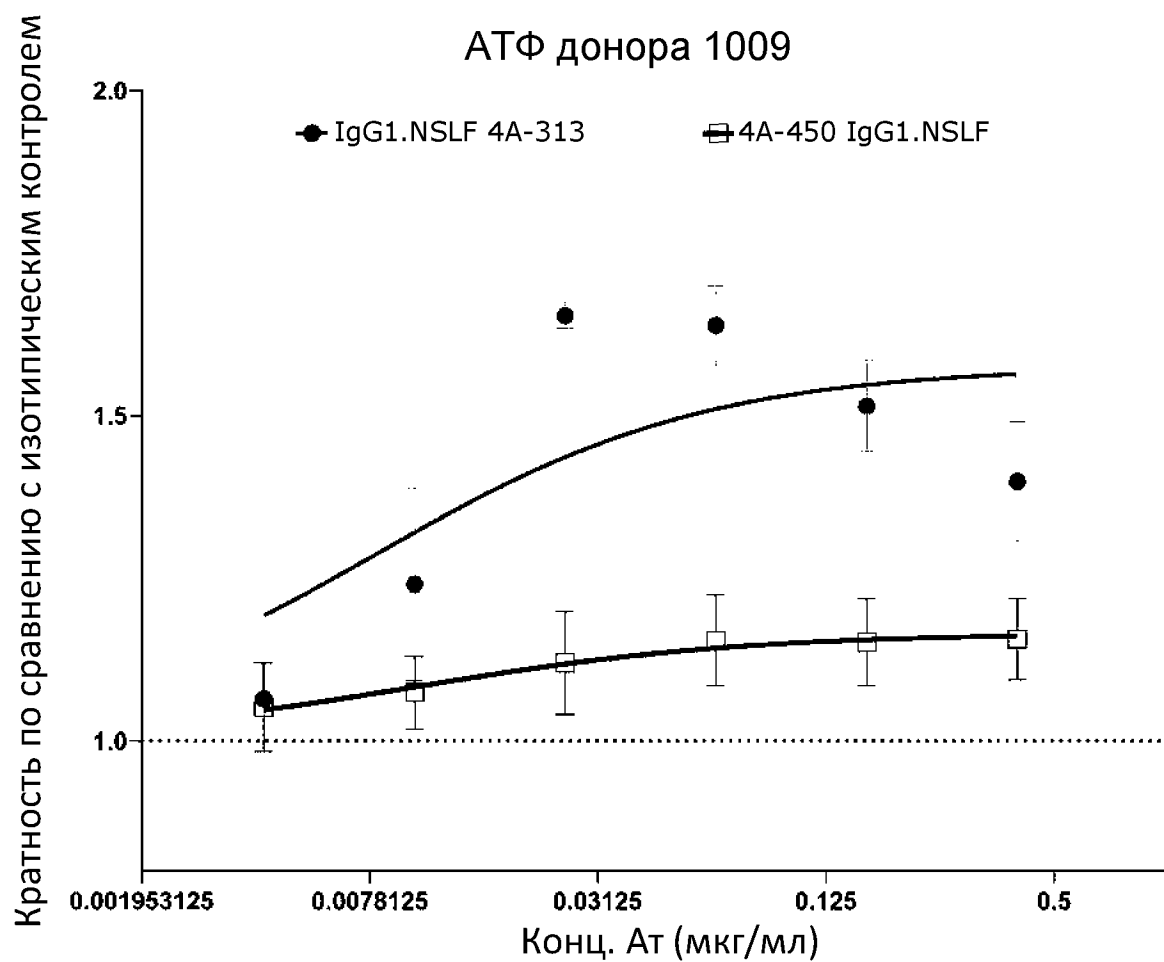
ФИГ. 26В



ФИГ. 26С

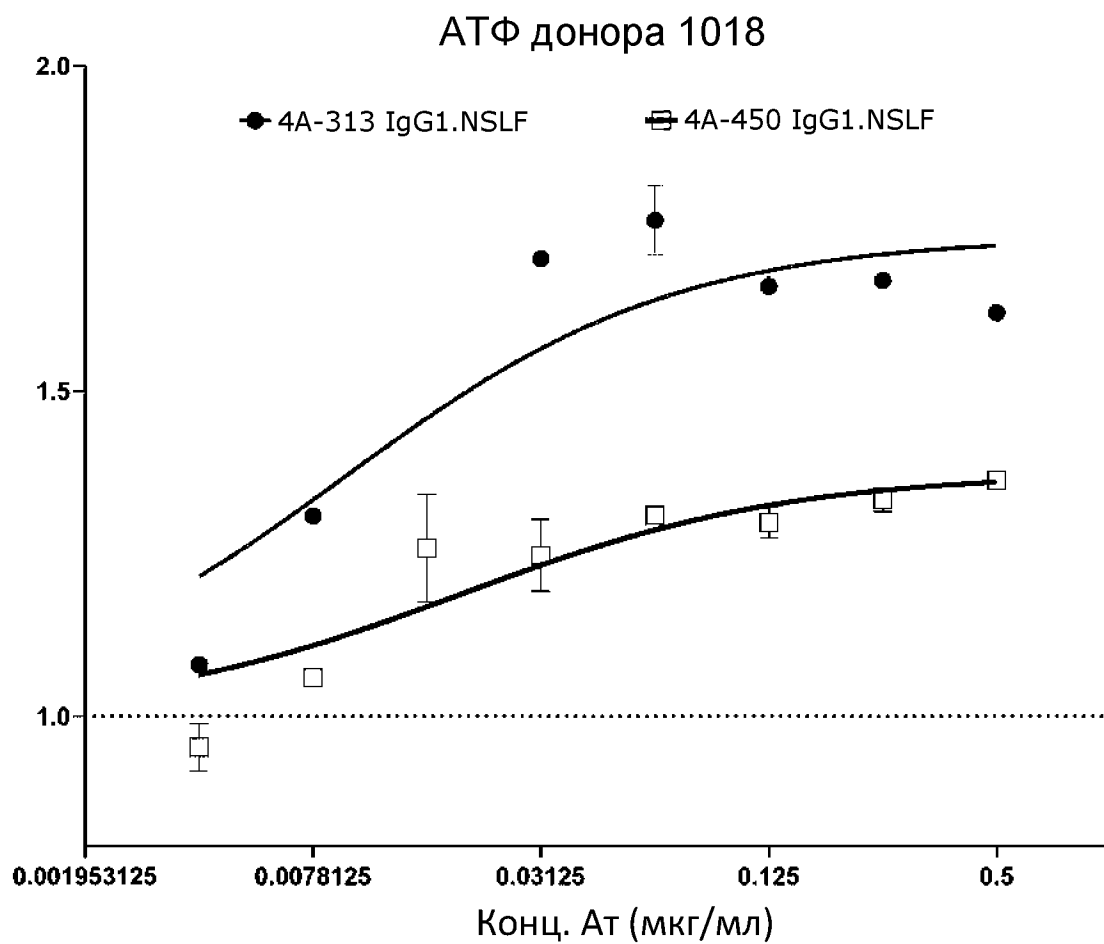


ФИГ. 27А

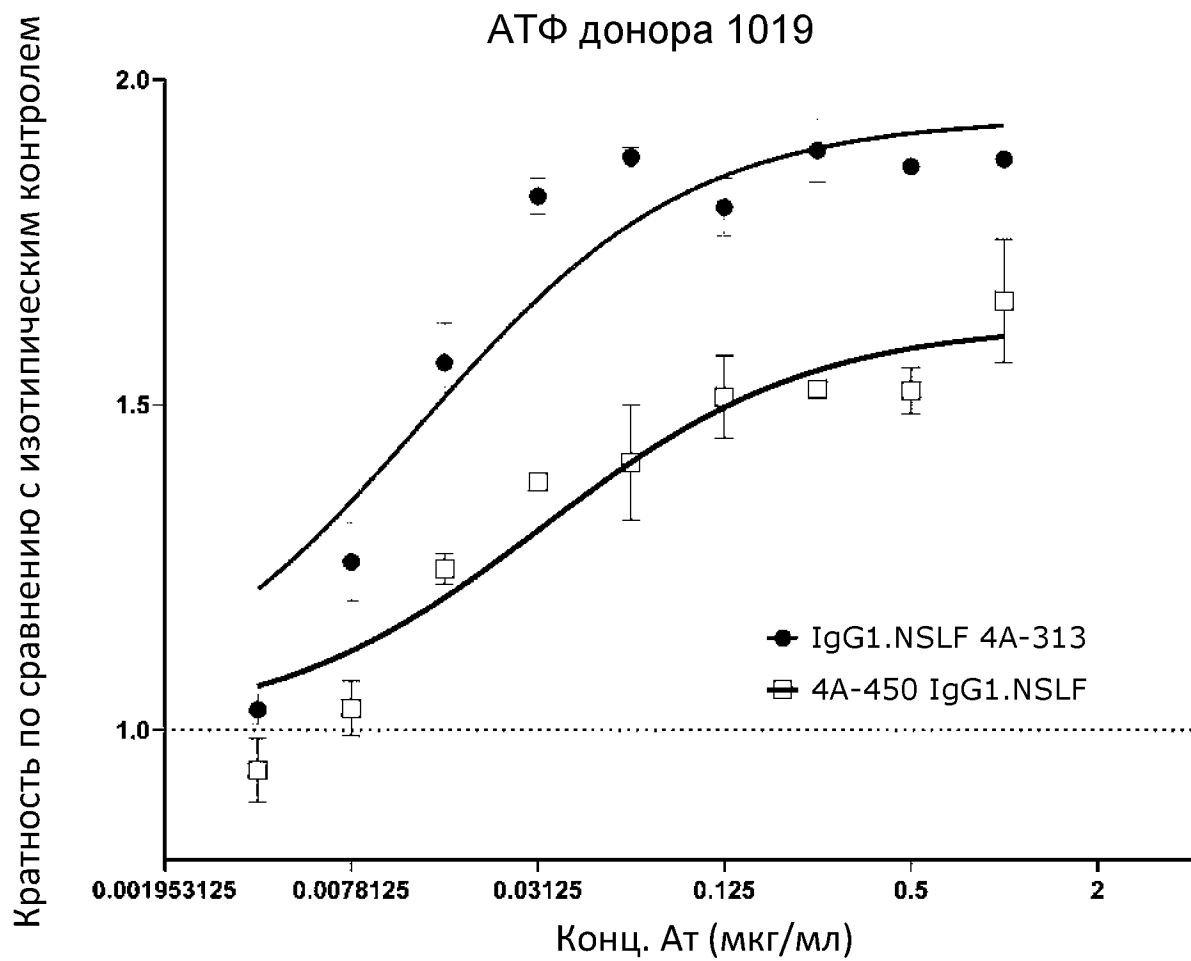


Кратность по сравнению с изотипическим контролем

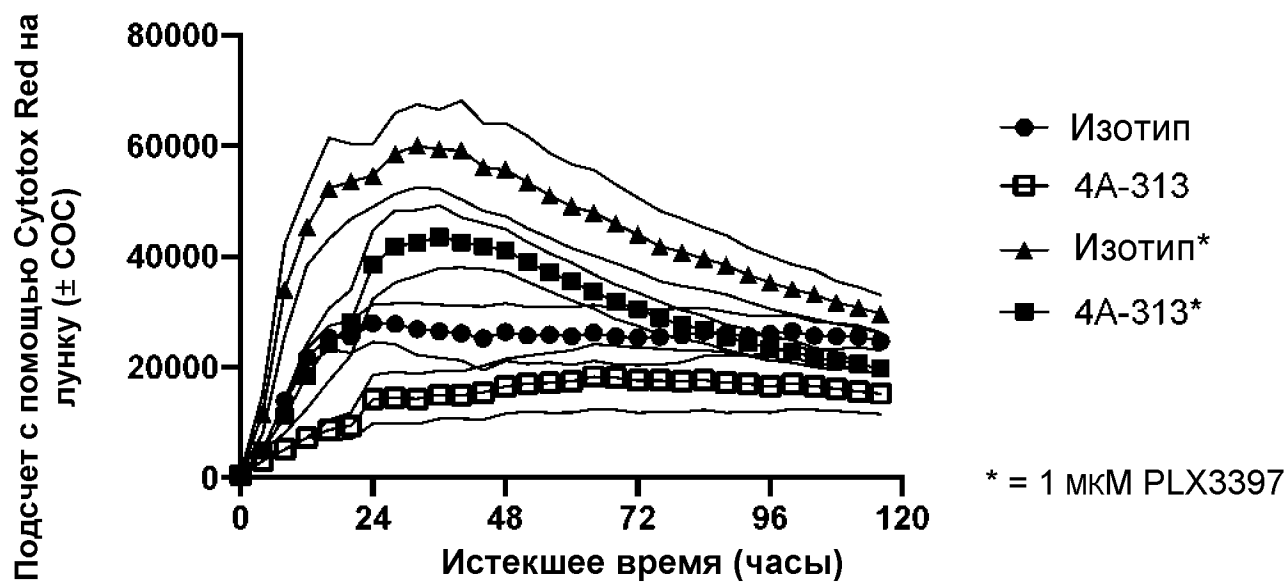
ФИГ. 27В



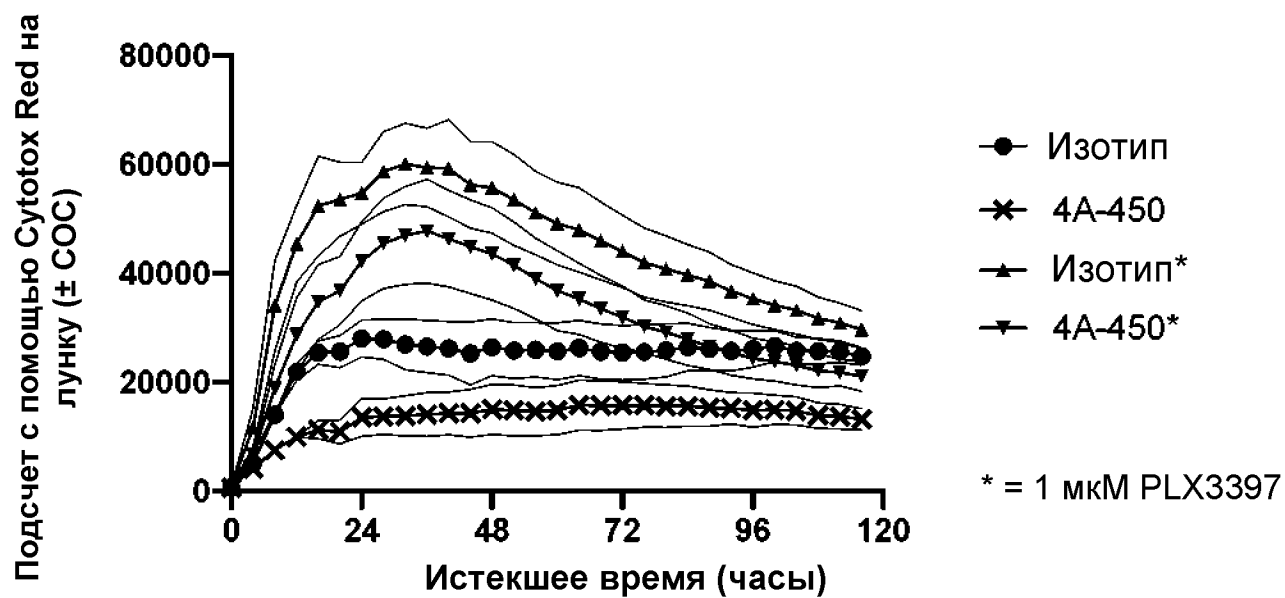
ФИГ. 27С



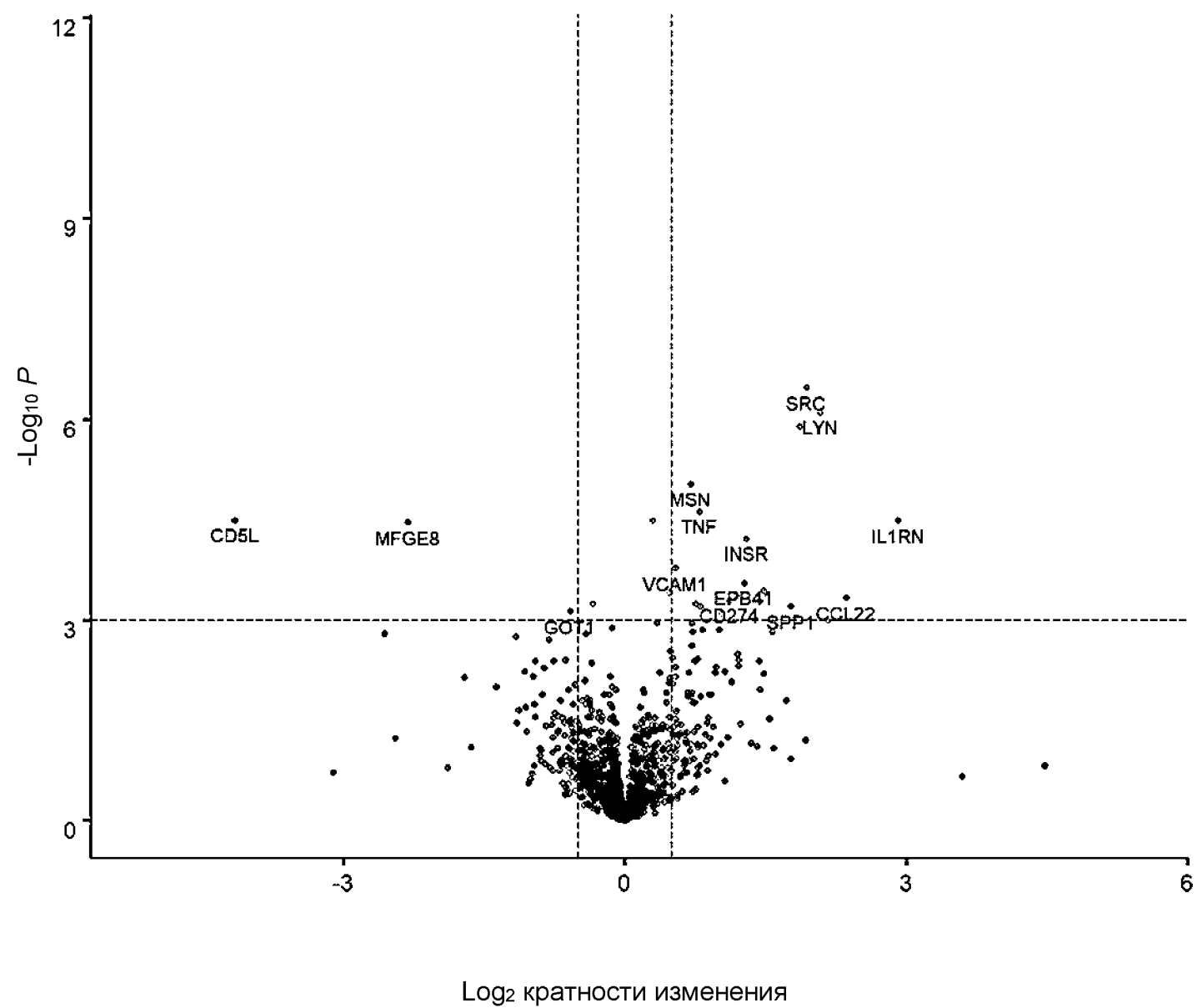
ФИГ. 28А



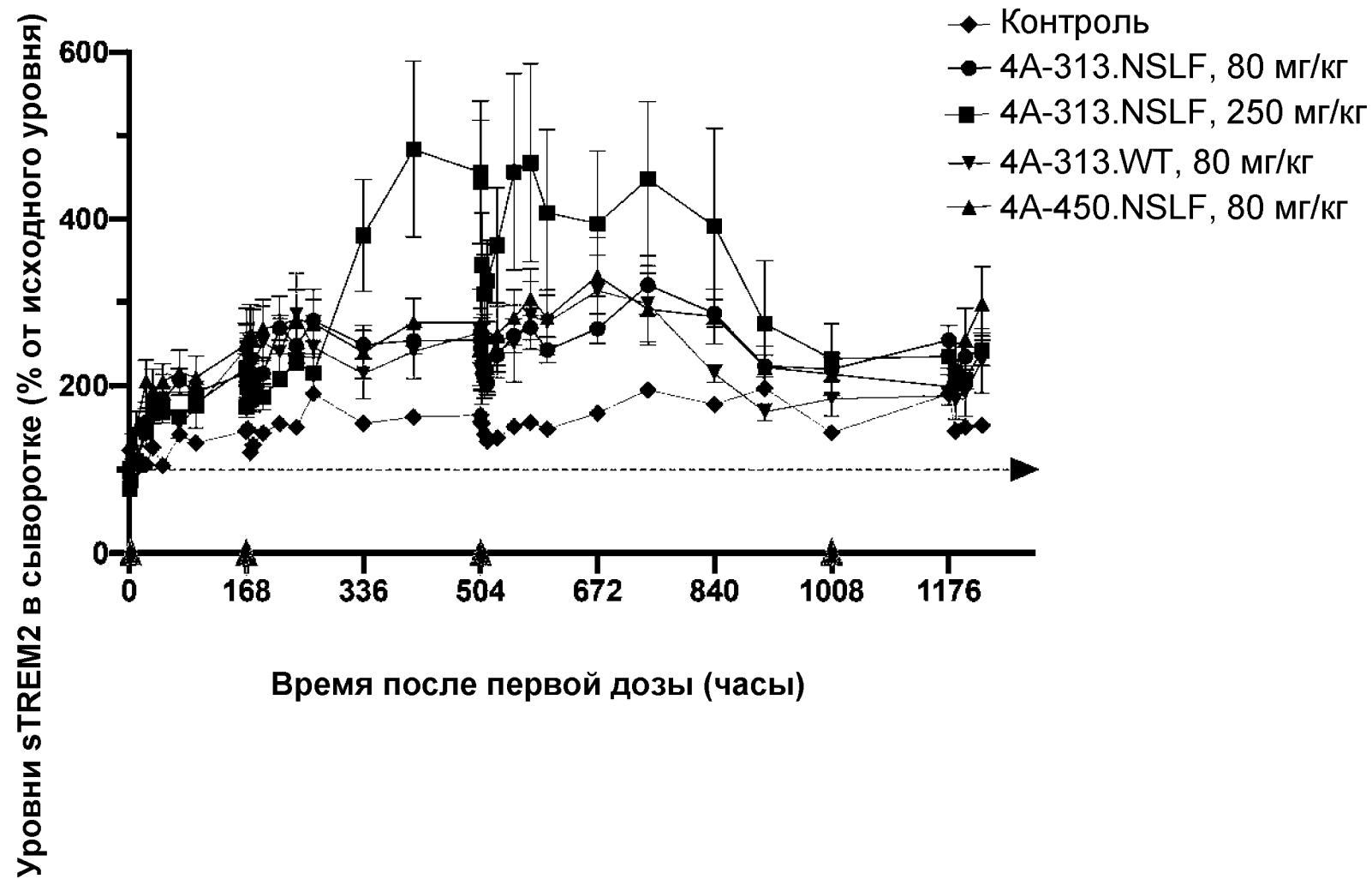
ФИГ. 28В



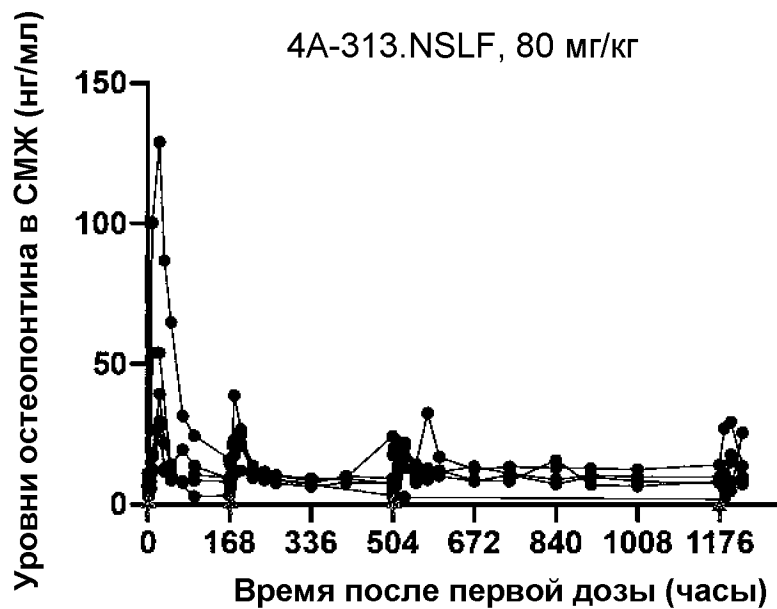
ФИГ. 29



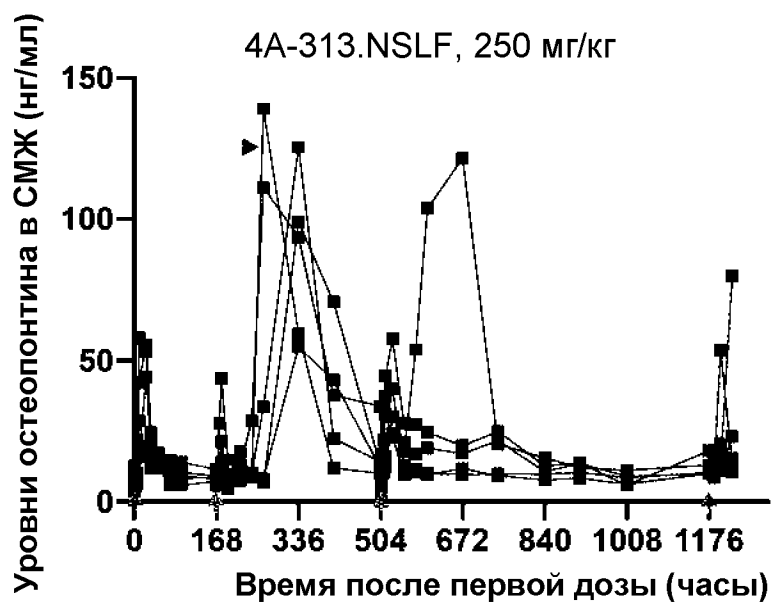
ФИГ. 30



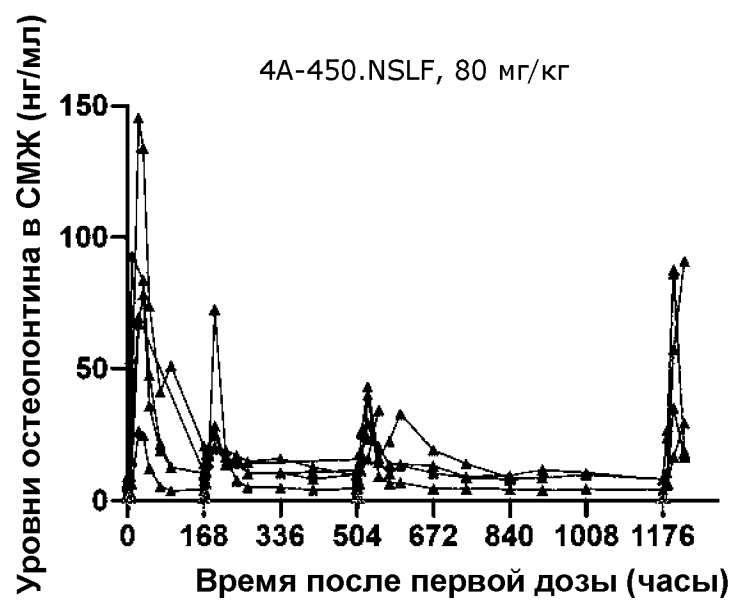
ФИГ. 31А



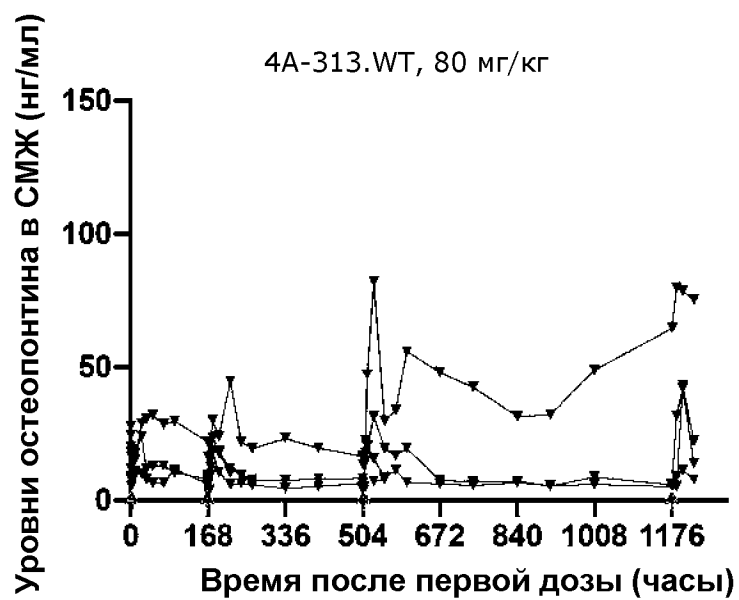
ФИГ. 31В



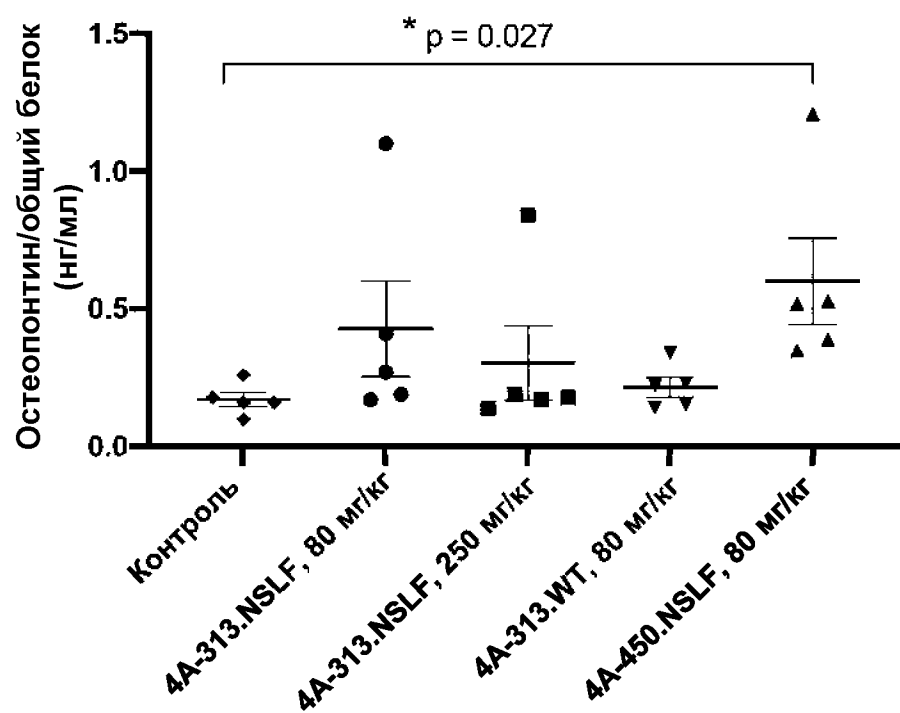
ФИГ. 31C



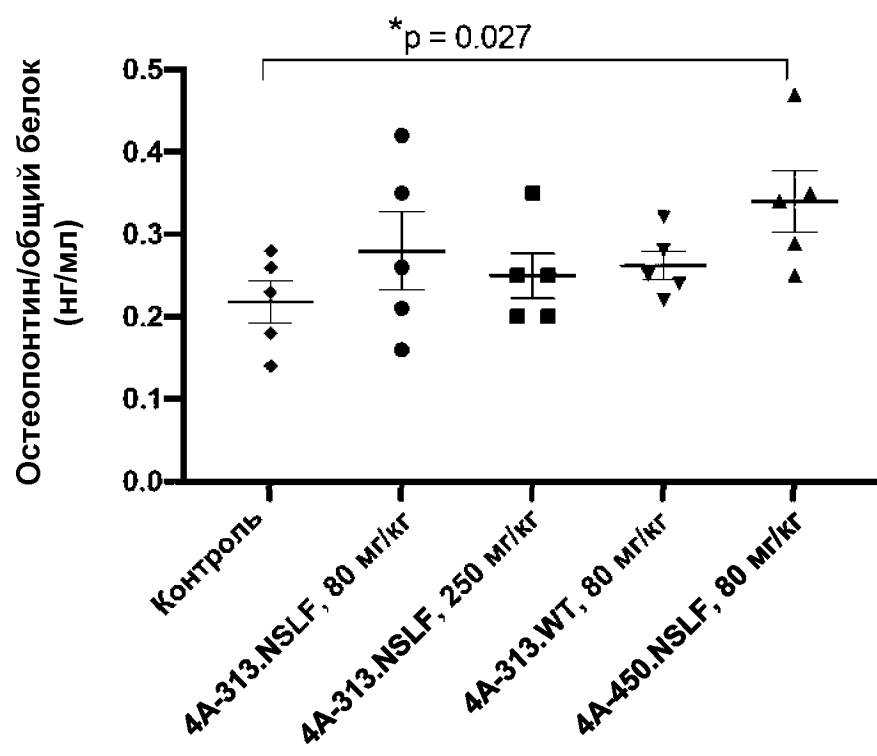
ФИГ. 31D



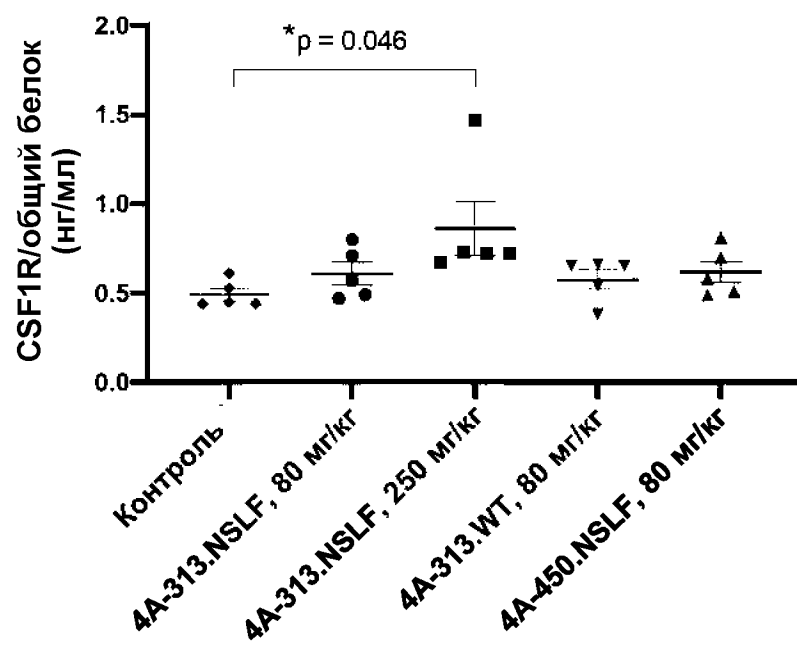
ФИГ. 32А



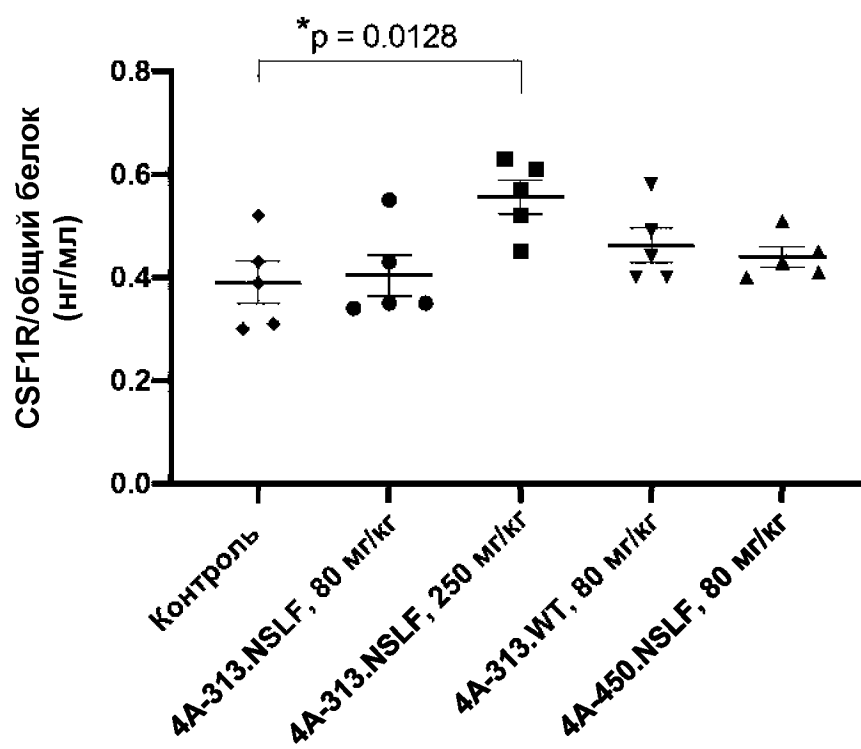
ФИГ. 32В



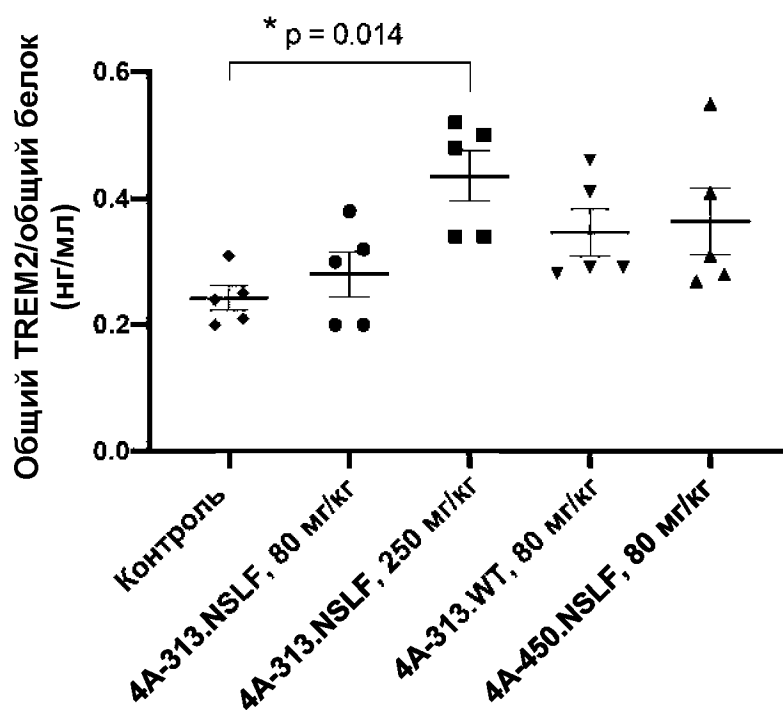
ФИГ. 33А



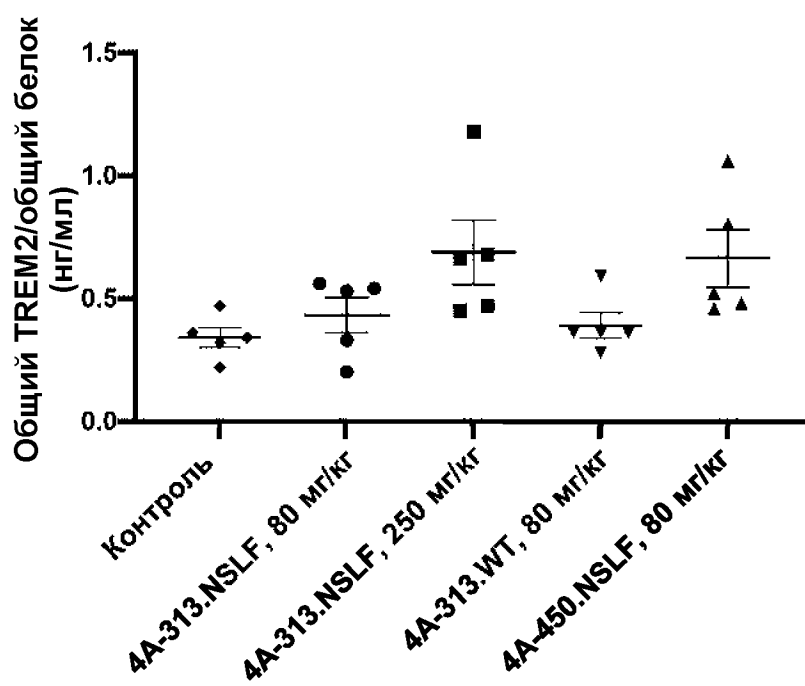
ФИГ. 33В

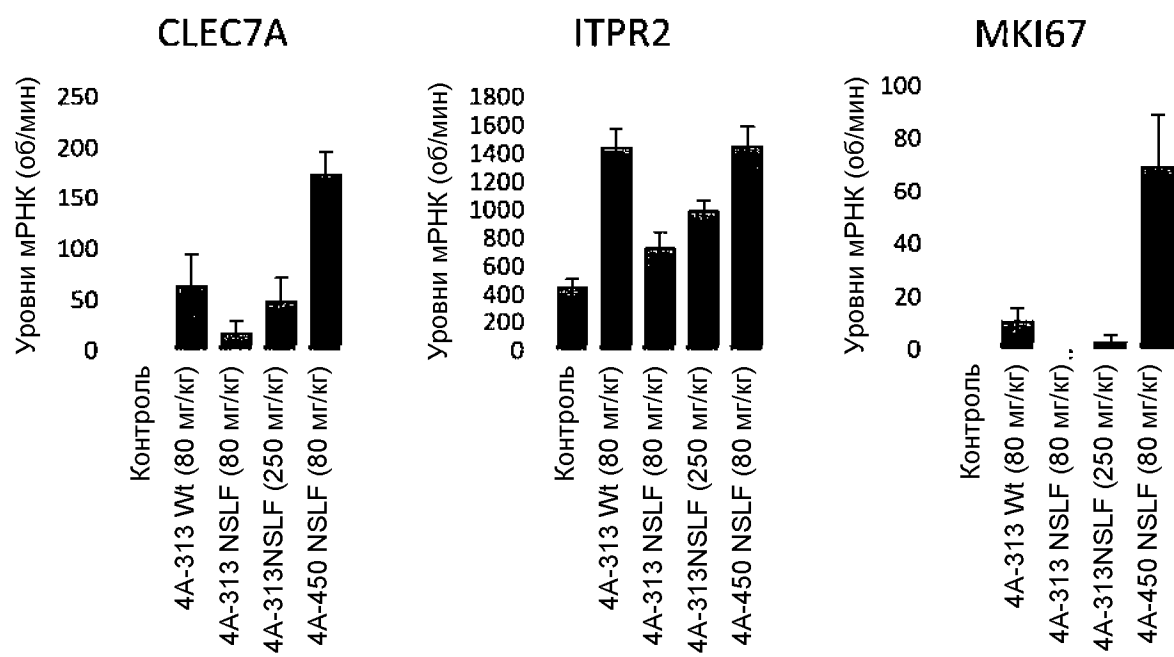


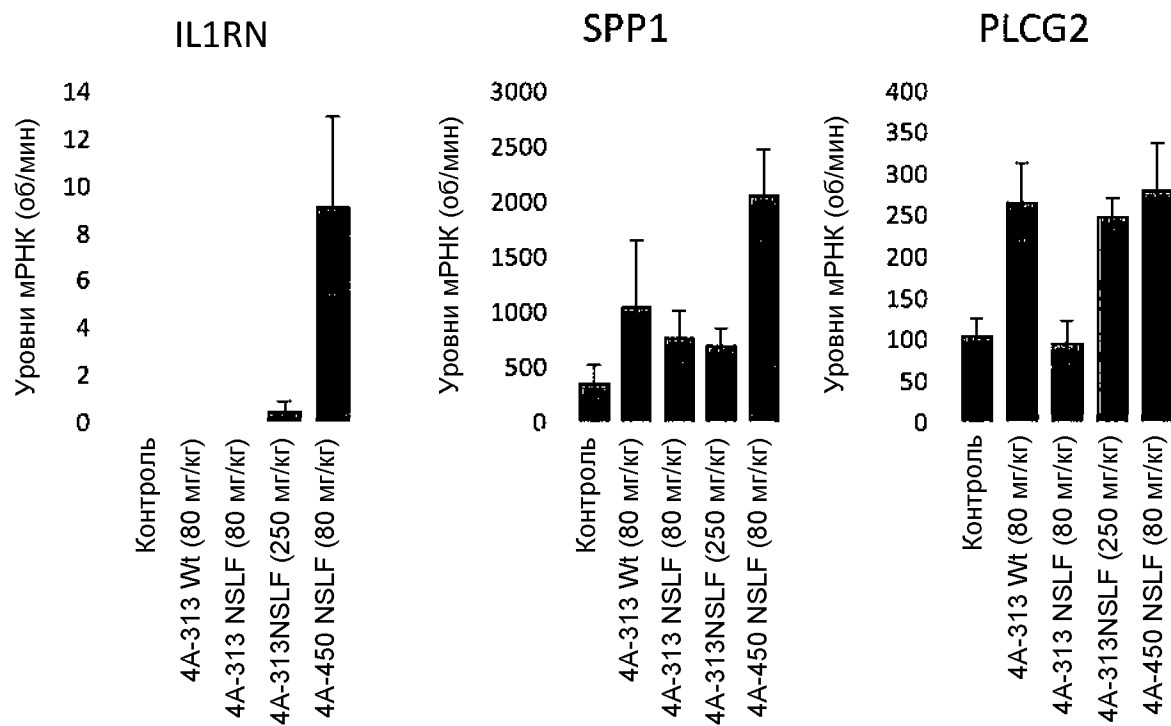
ФИГ. 34А



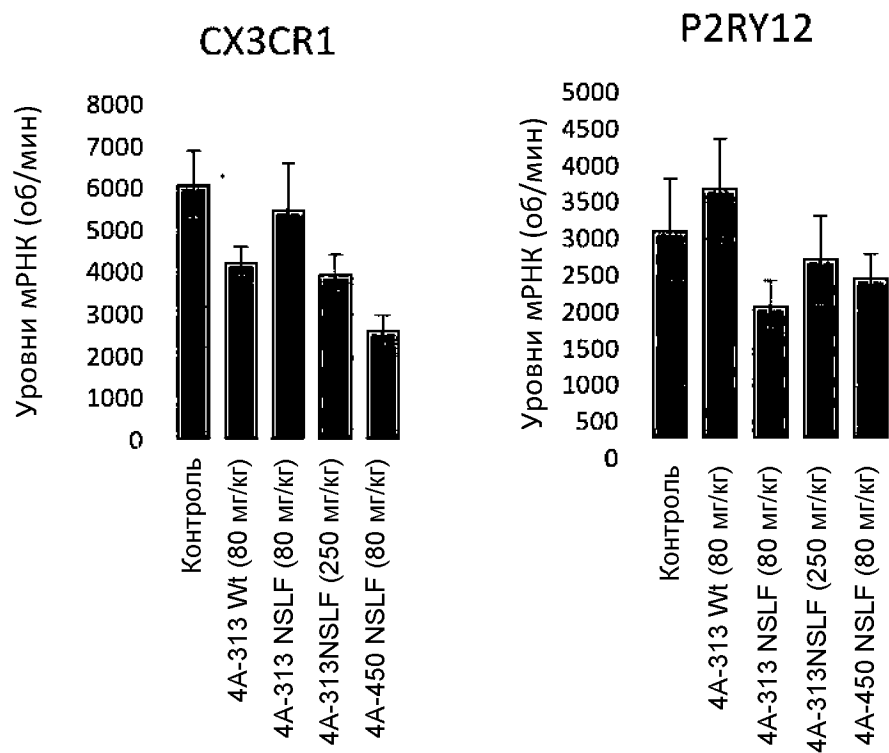
ФИГ. 34В



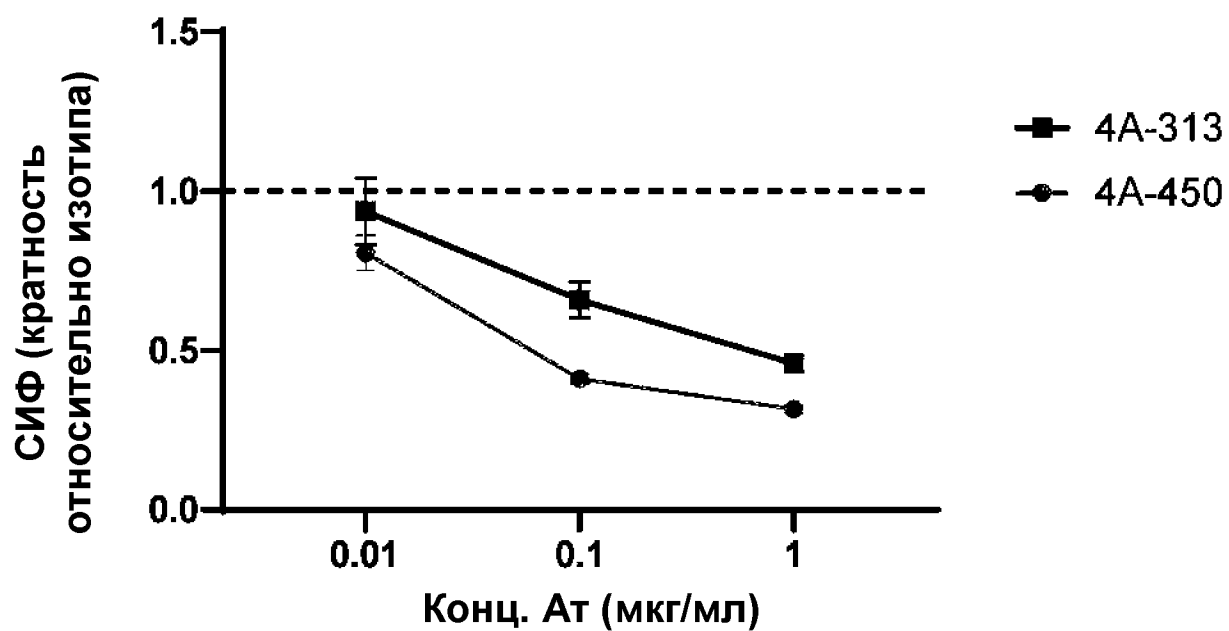
ФИГ. 35А

ФИГ. 35В

ФИГ. 35С



ФИГ. 36



ФИГ. 37

