

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7612658号
(P7612658)

(45)発行日 令和7年1月14日(2025.1.14)

(24)登録日 令和6年12月27日(2024.12.27)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
請求項の数 32 (全217頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-506146(P2022-506146)	(73)特許権者	517041235
(86)(22)出願日	令和2年7月30日(2020.7.30)		アレクトル エルエルシー
(65)公表番号	特表2022-542964(P2022-542964 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(43)公表日	令和4年10月7日(2022.10.7)		8 0 , サウス サンフランシスコ, オ
(86)国際出願番号	PCT/US2020/044335		イスター ポイント ブールヴァード 1
(87)国際公開番号	WO2021/022083	(74)代理人	3 1 , スイート 6 0 0
(87)国際公開日	令和3年2月4日(2021.2.4)		100102978
審査請求日	令和5年7月28日(2023.7.28)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/881,187	(74)代理人	100160923
(32)優先日	令和1年7月31日(2019.7.31)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507
(31)優先権主張番号	62/892,467		弁理士 刑部 俊
(32)優先日	令和1年8月27日(2019.8.27)	(74)代理人	100142929
	最終頁に続く	(74)代理人	弁理士 井上 隆一
			100148699
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗MS 4 A 4 A抗体、及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、

a) 前記重鎖可変領域が、配列番号：94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が、配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、または、

b) 前記重鎖可変領域が、配列番号308のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号309のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号310のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が、配列番号314のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号315のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号316のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、
前記抗体。

【請求項2】

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が、配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105のアミノ酸配

列を含むHVR-L2；及び配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、配列番号308のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号309のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号310のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が、配列番号314のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号315のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号316のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

前記抗体が、
重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域は、配列番号14のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖可変領域は、配列番号22のアミノ酸配列を含む、前記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域
を含む、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項5】

前記抗体が、
重鎖及び軽鎖であって、前記重鎖は、配列番号359または360のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号365のアミノ酸配列を含む、前記重鎖及び軽鎖
を含む、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項6】

前記抗体が、
重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域は、配列番号304のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖可変領域は、配列番号305のアミノ酸配列を含む、前記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域
を含む、請求項1または3に記載の抗体。

【請求項7】

前記抗体が、
重鎖及び軽鎖であって、前記重鎖は、配列番号324または325のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号363のアミノ酸配列を含む、前記重鎖及び軽鎖
を含む、請求項1または3に記載の抗体。

【請求項8】

前記抗体が、ヒトのもの、またはヒト化したものである、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項9】

前記抗体が、(a)MS4A4Aの細胞表面レベルを下げる、またはMS4A4Aの細胞内レベルを下げる、(b)骨髄細胞において、可溶性TREM2レベルを引き上げる、膜TREM2レベルを引き上げる、または可溶性TREM2を引き上げ、かつ膜TREM2レベルを引き上げる、ならびに／または(c)骨髄細胞でのM2細胞表面マーカーの発現を抑制する、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項10】

前記抗体が、骨髄細胞でのCD200R、Dectin-1、またはCD163の発現を抑制する、請求項8に記載の抗体。

【請求項11】

骨髄細胞でのゲルゾリン及び／またはオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質の発現を高める、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項12】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1～11のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項13】

前記抗体が、配列番号1のヒトMS4A4Aに対して結合する、または、前記抗体が、

10

20

30

40

50

配列番号 3 のカニクイザル M S 4 A 4 A に対してさらに結合する、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 1 4】

前記抗体が、I g G クラスに属し、かつ、I g G 1、I g G 2、または I g G 4 アイソタイプを有する、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 1 5】

前記抗体が、I g G 1 アイソタイプを有する、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記 I g G 1 アイソタイプが E U 付番法での K 3 2 2 A 変異を含む改変した F c を含む、請求項 1 5 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

前記抗体が、E U 付番法で定めた N 3 2 5 S 及び L 3 2 8 F 変異を含む改変した F c を含む、請求項 1 5 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

前記抗体が、抗体フラグメントである、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 1 9】

前記抗体フラグメントが、F a b、F a b'、F a b'-S H、F (a b')₂、F v、または s c F v フラグメントである、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

前記抗体が、第 1 の抗原及び第 2 の抗原を認識する二重特異性抗体である、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 2 1】

前記第 1 の抗原が M S 4 A 4 A であり、かつ、前記第 2 の抗原が、

(a) 血液脳関門を通過する輸送を促す抗原；

(b) トランスフェリン受容体 (T R)、インスリン受容体 (H I R)、インスリン様成長因子受容体 (I G F R)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 及び 2 (L P R-1 及び 2)、ジフテリア毒素受容体、C R M 1 9 7、ラマシングルドメイン抗体、T M E M 3 0 (A)、タンパク質形質導入ドメイン、T A T、S y n-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、アンジオペプチド、ベイシジン、G l u t 1、C D 9 8 h c、及び、A N G 1 0 0 5 からなる群から選択される、血液脳関門を通過する輸送を促す抗原；

(c) 病原ペプチドまたはタンパク質、または、病原核酸からなる群から選択される病原作用物質であって、前記病原核酸は、アンチセンス G G C C C C (G 2 C 4) 反復拡張 R N A であり、前記病原タンパク質は、アミロイドベータ、オリゴマーアミロイドベータ、アミロイドベータブラーク、アミロイド前駆体タンパク質、または、そのフラグメント、T a u、I A P P、アルファシヌクレイン、T D P-4 3、F U S タンパク質、C 9 o r f 7 2 (第 9 番染色体オープンリーディングフレーム 7 2)、c 9 R A N タンパク質、プリオンタンパク質、P r P S c、ハンチンチン、カルシトニン、スーパーオキシドジスムターゼ、アタキシン、アタキシン 1、アタキシン 2、アタキシン 3、アタキシン 7、アタキシン 8、アタキシン 1 0、レビー小体、心房性ナトリウム利尿因子、膵島アミロイドポリペプチド、インスリン、アポリポタンパク質 A I、血清アミロイド A、メジン、プロラクチン、トランスサイレチン、リゾチーム、ベータ 2 ミクログロブリン、ゲルゾリン、ケラトエピセリン、シスタチン、免疫グロブリン軽鎖 A L、S-I B M タンパク質、反復関連非 A T G (R A N) 翻訳産物、ジペプチド反復 (D i P e p t i d e r e p e a t) (D P R) ペプチド、グリシン-アラニン (G A) 反復ペプチド、グリシン-プロリン (G P) 反復ペプチド、グリシン-アルギニン (G R) 反復ペプチド、プロリン-アラニン (P A) 反復ペプチド、ユビキチン、及び、プロリン-アルギニン (P R) 反復ペプチドからなる群から選択される、前記病原作用物質；

(d) 免疫細胞で発現するリガンド、及び／または、タンパク質であって、C D 4 0、O X 4 0、I C O S、C D 2 8、C D 1 3 7 / 4-1 B B、C D 2 7、G I T R、P D-L 1、C T L A-4、P D-L 2、P D-1、B 7-H 3、B 7-H 4、H V E M、B T L

10

20

30

40

50

A、KIR、GAL9、TIM3、A2AR、LAG-3、及び、ホスファチジルセリンからなる群から選択される、前記リガンド、及び／または、タンパク質；または
(e) 1つ以上の腫瘍細胞で発現するタンパク質、脂質、多糖、または、糖脂質、である、請求項20に記載の抗体。

【請求項22】

請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体をコードする核酸配列を含む単離した核酸。

【請求項23】

請求項22に記載の核酸を含むベクター。

【請求項24】

請求項22に記載の核酸を含む単離した宿主細胞。

10

【請求項25】

ヒトMS4A4Aに対して結合する抗体を製造する方法であって、前記抗体を製造するために、請求項24に記載の細胞を培養することを含む、前記方法。

【請求項26】

細胞が産生した抗体を回収することをさらに含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体と、医薬として許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項28】

アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、及び、認知障害からなる群から選択される疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体を含む、前記医薬組成物。

20

【請求項29】

MS4A4Aの過剰発現、または、高まった活性に起因する、または、それらに関連する疾患、障害、病態、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体を含む、前記医薬組成物。

【請求項30】

CSF1R欠損疾患または障害を有する個体を治療するための医薬組成物であって、請求項1～21のいずれか1項に記載の抗体の治療有効量を含む、前記医薬組成物。

30

【請求項31】

前記CSF1R欠損疾患または障害が、軸索スフェロイド及び色素性グリアを伴う成人発症性白質脳症(ALSP)または遺伝性びまん性白質脳症(HDL S)である、請求項30に記載の医薬組成物。

【請求項32】

前記予防する、リスクを抑制する、または治療することが、前記医薬組成物の投与の前及び／または後でのオステオポンチン、ゲルゾリン、膜TREM2、及び／または可溶性TREM2のレベルを検出することを含む、請求項28～31のいずれか1項に記載の医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

ASCIIテキストファイルでの以下の提出物の全内容を、参照により、本明細書で援用する：コンピューターで読み取り可能な(CRF)配列表(ファイル名称：4503__008PC06__Seqlisting__ST25.TXT、作成日：2020年7月28日、サイズ：289,448バイト)。

【0002】

本開示の技術分野

50

本開示は、抗MS4A4A抗体、及び、そのような抗体の治療的使用に関する。

【背景技術】

【0003】

本開示の背景

4回膜貫通ドメインサブファミリーA (MS4A) 遺伝子クラスターは、染色体11q12に存在しており、また、18個の遺伝子を含む。このMS4A遺伝子ファミリーは、一般的には、テトラ貫通トポロジーを有する膜タンパク質をコードする (Ishibashi et al, 2001, Gene, 265:87-93; Liang and Tedder, 2001, Genomics, 72:119-127; Efthymiou and Goate, 2017, Molecular Neurodegeneration, 12:43)。これらの膜貫通ドメインは、1つの細胞内ループと、2つの細胞外ループで相互に接続されており、N末端とC末端の両方が細胞質の内部にある。大部分のMS4Aタンパク質は、MS4A1 (CD20) とアミノ酸配列の相同性 (20~30%の類似性) を共有しており、最初の3つの膜貫通ドメインで、最も高い配列同一性が認められる。異なるMS4Aタンパク質にまで及んで、これらの膜貫通領域内において高度に保存されたモチーフは、当該膜貫通ドメインが、MS4Aタンパク質の機能において重要な一般的な役割を果たすことを示唆している。MS4Aタンパク質の間での最大の変動領域が、N末端とC末端の細胞質ドメイン、及び第2の推定細胞外ループで認められており (Ishibashi et al, 2001, Gene, 265:87-93)、これらの領域が、独特の機能特性を付与することが示唆されている。

【0004】

この多様性にもかかわらず、MS4Aドメインには、幾つかの共有要素がある。例えば、MS4Aタンパク質 (MS4A8B、及び、MS4A12を除く) で保存されている注目に値する機能の1つは、ジスルフィド架橋を形成し得る第2の推定細胞外ループでの2つのシステイン残基の保存である。MS4Aタンパク質のN末端ドメインとC末端ドメインも、プロリン残基が豊富であるが、この機能的な重要性は未だ解明されていない (Hullett et al, 2001, Genomics, 72:119-127)。しかしながら、プロリンに富む領域は、一般的に、細胞骨格の再構成、転写の開始、シグナル伝達カスケード、及び、タンパク質間相互作用を促すアダプターシステムの一部としてSH3ドメインと関連するなど、様々な細胞プロセスに関与している (Kay et al, 2000, FASEB J, 14:231-241)。

【0005】

MS4Aタンパク質ファミリーは、一部の重要な例外：MS4A1 (CD20) は、Bリンパ球においてのみ発現し、当該タンパク質が、B細胞抗原受容体、及び、カルシウム流入によるシグナル伝達機能を有することを除いて、機能面では特徴決定があまり進んでいない。CD20は、慢性リンパ性白血病、リンパ腫、自己免疫疾患、及び、固形臓器移植での病原性B細胞を枯渇させるために使用する免疫療法抗体の標的である。MS4A2 (FcεRβ) は、肥満細胞に関する高親和性IgE受容体 (FcεRI) 、及び、低親和性IgG受容体 (FcεRII) のシグナル伝達サブユニットであり、過敏症とアレルギー反応において重要な役割を果たす。MS4A2は、4つのタンパク質の高親和性IgE受容体複合体を介してシグナルを増幅するITAMドメインのタンパク質である。MS4A3 (Htm4) は、リンパ系、及び、骨髄細胞の細胞内膜に発現し、そして、細胞周期調節のアダプタータンパク質として機能する。

【0006】

MS4Aファミリーのメンバーの大部分は特徴決定されていないが、MS4Aタンパク質が、脂肪酸、ペプチド、及び、硫酸化ステロイドなどの様々な外因性、及び、内因性リガンドの化学センサー、及び、化学受容体として機能しており、そして、カルシウム流入の媒介、エンドサイトーシスの調節、輸送に関与しており、また、シグナル伝達複合体のアダプターとして機能し得ることを示唆する報告がある (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】

特定のMS4A遺伝子は、様々な障害や疾患、特に、神経変性障害と遺伝的に関連している。例えば、ゲノムワイド有意性関連分析は、染色体11q12にあるMS4A遺伝子クラスターを、最も重要なアルツハイマー病の遺伝子座の1つとして特定した。特に興味深い同定された遺伝子の1つは、MS4A4Aである (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)。

10

【0008】

したがって、MS4A4A活性に関連する様々な疾患、障害、及び病態を治療するために、MS4A4Aに特異的に結合する抗体など、MS4A4Aを標的とする治療法、及び／または、例えば、MS4A4Aタンパク質レベルまたは活性を抑制してまたは大きくして、MS4A4Aの活性を調節する（例えば、阻害するまたは抑制する、活性化するまたは高める）ことができる治療法が必要とされている。

特許出願、及び、刊行物を含む、本明細書で引用するすべての文献を、参照により、それらの全内容を本明細書で援用する。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【文献】Ishibashi et al, 2001, Gene, 265:87-93

【文献】Liang and Tedder, 2001, Genomics, 72:119-127

【文献】Efthymiou and Goate, 2017, Molecular Neurodegeneration, 12:43

【文献】Hullett et al, 2001, Genomics, 72:119-127

【文献】Kay et al, 2000, FASEB J, 14:231-241

30

【文献】Cruse et al, 2015, Mol Biol Cell, 26:1711-1727

【文献】Greer et al, 2016, Cell, 165:1734-1748

【文献】Eon Kuek et al, 2016, Cell, 165:1734-1748

【文献】Koslowski et al, 2008, Cancer Res, 68:3458-3466

【文献】Bubien et al, 1993; J Cell Biol, 121:1121-1132

【文献】Lambert et al, 2013, Nat Genet, 45:1452-1458

40

【文献】Hollingworth et al, 2011, Nat Genet, 43:429-435

【文献】Naj et al, 2011, Nat Genet, 43:436-441

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示の概要

本開示は、一般的に、抗MS4A4A抗体、及び、そのような抗体を使用する方法に関する。本明細書で提供する方法は、神経変性疾患、障害、または、病態の予防、そのリスクの抑制、またはそれを有する個体の治療における用途を見出す。一部の実施形態では、

50

本開示は、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、認知症、及び、認知障害から選択する神経変性疾患、障害、または、病態を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。一部の実施形態では、本開示は、MS4A4Aの発現または活性の高まりに関連する疾患、障害、または、病態を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。

【0011】

ある態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域が：配列番号：94、108、116、146、147、308、及び311から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309、及び312から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310、及び313から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314、及び317から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105、106、114、139、140、141、142、143、159、160、161、315、及び318から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号107、115、144、145、163、316、及び319配列番号から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0012】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域が：配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96～99から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び、配列番号100～102から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号103～104から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105～106から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0013】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域が：配列番号308のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号309のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号310のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号314のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号315のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び、配列番号316のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0014】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域が：配列番号311のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号312のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び、配列番号313のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号317のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号318のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び、配列番号319のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0015】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域が：配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号110～111から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0016】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は：配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号118～122から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号123～129から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号130～138から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号139～143から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号144～145から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0017】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域が：配列番号146～147から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号149～153から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号154のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域が：配列番号156～158から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号159～161から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0018】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号5～15、304、及び306から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号24～30から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号40～53から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号76～84から選択するアミノ酸配列を含む。

【0019】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、配列番号17～22、305、及び307から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、配列番号32～36から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタン

10

20

30

40

50

パク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、配列番号 55～74 から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、配列番号 86～93 から選択するアミノ酸配列を含む。

【0020】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号 5～15、304、及び 306 から選択するアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号 17～22、305、及び 307 から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号 24～30 から選択するアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号 32～36 から選択するアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号 40～53 から選択するアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号 55～74 から選択するアミノ酸配列を含む。実施形態のいずれかと組み合わせることができる一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号 76～84 から選択したアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号 86～93 から選択するアミノ酸配列を含む。

【0021】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、当該重鎖は、配列番号 320～343 から選択するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、当該重鎖は、配列番号 336～343 から選択するアミノ酸配列を含む（任意に、当該軽鎖は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、さらに任意に、当該軽鎖は、配列番号 344 のアミノ酸配列を含む定常領域を含む）。一部の実施形態では、当該重鎖は、配列番号 320～327 から選択するアミノ酸配列を含む（任意に、当該軽鎖は、配列番号 304 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、さらに任意に、当該軽鎖は、配列番号 344 のアミノ酸配列を含む定常領域を含む）。一部の実施形態では、当該重鎖は、配列番号 328～335 から選択するアミノ酸配列を含む（任意に、軽鎖は、配列番号 305 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、さらに任意に、当該軽鎖は、配列番号 344 のアミノ酸配列を含む定常領域を含む）。

【0022】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号 94 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び配列番号 102 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含み；かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号 104 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、配列番号 105 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び配列番号 107 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、MS4A4A タンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、

MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、当該重鎖は、配列番号359または360のアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖は、配列番号365のアミノ酸配列を含む。

【0023】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は：配列番号308のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号309のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号310のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域は：配列番号314のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号315のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号316のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号304のアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は配列番号305のアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、当該重鎖は、配列番号324または325のアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖は、配列番号363のアミノ酸配列を含む。

【0024】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は：配列番号311のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号312のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号313のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み；かつ、当該軽鎖可変領域は：配列番号317のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号318のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号319のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、配列番号306のアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖可変領域は、配列番号307のアミノ酸配列を含む。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、当該重鎖は、配列番号332または333のアミノ酸配列を含み、かつ、当該軽鎖は配列番号364のアミノ酸配列を含む。

【0025】

ある態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に結合する単離した抗体に関し、当該抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、本明細書のいずれかの実施形態の1つ以上の抗体との結合を競合的に阻害する。

【0026】

別の態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体に関し、当該抗体は、本明細書のいずれかの実施形態の抗体と本質的に同じである、または重複しているMS4A4Aのエピトープに結合する。

【0027】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、ヒトMS4A4Aの細胞外ドメイン1に結合する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、配列番号1のアミノ酸配列CMASNTYGSNPIS（配列番号177）での1つ以上のアミノ酸残基に結合する

。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、ヒトMS4A4Aの細胞外ドメイン2に結合する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、配列番号1のアミノ酸配列SFHHPHYCNYYGNSNNCHGTMS（配列番号178）での1つ以上のアミノ酸残基に結合する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、配列番号1のアミノ酸配列SFHHPHYCNYYGNSNNCHGTMS（配列番号178）での1つ以上のアミノ酸残基に結合し、さらに当該抗体は、配列番号1のアミノ酸残基プロリン163（P163）に結合しない。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、ヒト抗MS4A4A抗体またはヒト化抗MS4A4A抗体である。

【0028】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であり、当該抗体は、MS4A4Aの細胞表面レベルを下げる、またはMS4A4Aの細胞内レベルを下げる。

【0029】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質は、哺乳動物タンパク質、またはヒトタンパク質である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質は、野生型タンパク質である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質は、天然に存在するバリエーションである。

【0030】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞において、可溶性TREM2レベルを引き上げる、膜TREM2レベルを引き上げる、または可溶性TREM2を増やし、膜TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、可溶性TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、膜TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、可溶性TREM2レベル、及び膜TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで、可溶性TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで、血清での可溶性TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで、脳脊髄液（CSF）での可溶性TREM2レベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで、血清及びCSFでの可溶性TREM2レベルを引き上げる。

【0031】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞でのM2細胞表面マーカー（例えば、受容体）の発現を抑制する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞、例えば、マクロファージにおけるM2細胞表面マーカーのレベルを下げる、または抑制する。

【0032】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞でのCD200R、Dec1-1、またはCD163の発

10

20

30

40

50

現を抑制する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞、例えば、マクロファージでのCD200R、Dectin-1、及び／またはCD163の細胞表面レベルを下げる、または抑制する。

【0033】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞でのゲルゾリン及び／またはオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質の発現を高める。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞でのIL1RNのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞でのCSF1RのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞でのプリン作動性受容体P2RY12及び／またはCX3Cケモカイン受容体1（CX3CR1）のmRNA及び／またはタンパク質のレベルを下げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞での1-ホスホチジルイノシトール-4,5-ニリン酸ホスホジエステラーゼガンマー2（PLCγ2）、C-タイプレクチンドメインファミリー7メンバーA（CLEC7A）、イノシトール1,4,5-三リン酸受容体2（ITPR2）、及び／または抗原KIE-67（MK167）のmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞での膜貫通糖タンパク質NMB（GPNMB）のmRNA及び／またはタンパク質のレベルを下げる。

【0034】

ある態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に結合する単離した抗体に関し、当該抗体は、骨髄細胞でのゲルゾリン及び／またはオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質の発現を高める。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該骨髄細胞は、ヒトマクロファージである。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体は、ヒトのもの、またはヒト化したものである。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、モノクローナル抗体、多価抗体、コンジュゲート抗体、またはキメラ抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体は、4A-18、4A-25、4A-214、4A-21、及び4A-202から選択する抗体と同じエピトープに結合する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体は、骨髄細胞でのM2マーカーの発現を抑制する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、当該骨髄細胞は、ヒトマクロファージである。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、当該M2マーカーは、CD200R、Dectin-1、及び／またはCD163である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体は、ヒトマクロファージでの原形質膜または細胞表面TREM2を、少なくとも50%、90%、100%、150%、200%、または250%増やす。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体は、ヒトマクロファージ上清での可溶性TREM2を、少なくとも15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、または70%増やす。

【0035】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、第1の抗原と、第2の抗原とを認識する二重特異性抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、第1の抗原は、MS4A4Aであ

り、かつ、第2の抗原は、血液脳関門を通過する輸送を促す抗原である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、当該第2の抗原を、MS4A4A、トランスフェリン受容体（TR）、インスリン受容体（HIR）、インスリン様成長因子受容体（IGFR）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2（LPR-1及び2）、ジフテリア毒素受容体、CRM197、ラマシングルドメイン抗体、TMM30（A）、タンパク質形質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、angiopepペプチド、ベシジン、Glut1、及びCD98hc、及びANG1005から選択する。

【0036】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、モノクローナル抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該抗体は、ヒト抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該抗体は、ヒト化抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該抗体は、二重特異性抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該抗体は、多価抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該抗体は、キメラ抗体である。

【0037】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、IgGクラス、IgMクラス、またはIgAクラスに属する。一部の実施形態では、当該抗体は、IgGクラスに属し、かつ、IgG1、IgG2、またはIgG4アイソタイプを有する。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、当該抗体は、抗体フラグメントである。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、当該抗体は、ヒトMS4A4Aまたは哺乳動物MS4A4Aタンパク質のアミノ酸残基を含むエпитープに対して結合する抗体フラグメントである。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、当該抗体フラグメントは、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、またはscFvフラグメントである。

【0038】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該抗体は、第1の抗原及び第2の抗原を認識する二重特異性抗体である。本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る一部の実施形態では、当該第1の抗原は、MS4A4Aであり、かつ、当該第2の抗原は：

（a）血液脳関門を通過する輸送を促す抗原；

（b）トランスフェリン受容体（TR）、インスリン受容体（HIR）、インスリン様成長因子受容体（IGFR）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2（LPR-1及び2）、ジフテリア毒素受容体、CRM197、ラマシングルドメイン抗体、TMM30（A）、タンパク質形質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、アンジオペプチド、及び、ANG1005から選択する、血液脳関門を通過する輸送を促す抗原；

（c）病原ペプチドまたはタンパク質、または、病原核酸から選択する病原作用物質であって、当該病原核酸は、アンチセンスGGCCCC（G2C4）反復拡張RNAであり、当該病原タンパク質は、アミロイドベータ、オリゴマーアミロイドベータ、アミロイドベータプラーク、アミロイド前駆体タンパク質、または、そのフラグメント、Tau、IAPP、アルファシヌクレイン、TDP-43、FUSタンパク質、C9orf72（第9番染色体オープンリーディングフレーム72）、c9RANタンパク質、プリオンタンパク質、PrPSc、ハンチンチン、カルシトニン、スーパーオキシドジスムターゼ、アタキシン、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、アタキシン7、アタキシン8、アタキシン10、レビー小体、心房性ナトリウム利尿因子、膵島アミロイドポリペプチド、インスリン、アポリポタンパク質AI、血清アミロイドA、メジン、プロラクチン、

10

20

30

40

50

トランスサイレチン、リゾチーム、ベータ2ミクログロブリン、ゲルゾリン、ケラトエピセリン、シスタチン、免疫グロブリン軽鎖AL、S-I-B-Mタンパク質、反復関連非ATG(RAN)翻訳産物、ジペプチド反復(Dipeptide repeat)(DPR)ペプチド、グリシン-アラニン(GA)反復ペプチド、グリシン-プロリン(GP)反復ペプチド、グリシン-アルギニン(GR)反復ペプチド、プロリン-アラニン(PA)反復ペプチド、ユビキチン、及び、プロリン-アルギニン(PR)反復ペプチドから選択する、当該病原作用物質；

(d) 免疫細胞で発現するリガンド、及び／またはタンパク質であって、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、及び、ホスファチジルセリンから選択する、当該リガンド、及び／または、タンパク質；または、

(e) 1つ以上の腫瘍細胞で発現するタンパク質、脂質、多糖、または、糖脂質である。
【0039】

別の態様では、本開示は、先行実施形態のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含む単離した核酸に関する。一部の実施形態では、本開示は、先行実施形態のいずれかの核酸を含むベクターに関する。一部の実施形態では、本開示は、先行実施形態のいずれかのベクターを含む単離した宿主細胞に関する。

【0040】

別の態様では、本開示は、抗MS4A4A抗体を製造するために、先行実施形態のいずれかの宿主細胞を培養することを含む、ヒトMS4A4A抗体に対して結合する抗体を製造する方法に関する。特定の実施形態では、この方法は、細胞が産生した抗MS4A4A抗体を回収することをさらに含む。

【0041】

別の態様では、本開示は、先行実施形態のいずれか1つの抗体と、医薬として許容可能な担体とを含む医薬組成物に関する。

【0042】

ある態様では、本開示は、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、及び認知障害から選択する、疾患、障害、または損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に対して、先行実施形態のいずれか1つの抗体の治療有効量を投与することを含む、当該方法に関する。別の態様では、本開示は、MS4A4Aの過剰発現または活性の増大が引き起こす、またはそのことに関連する疾患、障害、病態、または損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に対して、先行実施形態のいずれか1つの抗体の治療有効量を投与することを含む、当該方法に関する。本開示の一部の実施形態では、当該方法は、当該抗体の投与の前及び／または後でのオステオポンチン、ゲルゾリン、原形質膜または細胞表面のTREM2、及び／または可溶性TREM2のレベルを検出することをさらに含む。

【0043】

ある態様では、本開示は、CSF1R欠損疾患または障害を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に対して、先行実施形態のいずれか1つの抗体の治療有効量を投与することを含む、当該方法に関する。一部の実施形態では、当該CSF1R欠損疾患または障害は、軸索スフェロイド及び色素性グリアを伴う成人発症性白質脳症(ALSP)または遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)である。

【0044】

本開示のその他の態様は、先行実施形態のいずれかの方法で製造した単離した抗MS4A4A抗体に関する。本開示のその他の態様は、先行実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体と、医薬として許容可能な担体とを含む医薬組成物に関する。

【0045】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、（表 1、表 5、表 3 0、及び表 3 1 に示した）抗体 4 A-3 0 1、4 A-3 0 2、4 A-3 0 3、4 A-3 0 4、4 A-3 0 5、4 A-3 0 6、4 A-3 0 7、4 A-3 0 8、4 A-3 0 9、4 A-3 1 0、4 A-3 1 1、4 A-3 1 2、4 A-3 1 3、4 A-3 1 4、4 A-4 1 9、または 4 A-4 5 0 の H V R-H 1、H V R-H 2、及び H V R-H 3 を含む。

【0046】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、（表 1、表 5、表 3 0、及び表 3 1 に示した）抗体 4 A-3 0 1、4 A-3 0 2、4 A-3 0 3、4 A-3 0 4、4 A-3 0 5、4 A-3 0 6、4 A-3 0 7、4 A-3 0 8、4 A-3 0 9、4 A-3 1 0、4 A-3 1 1、4 A-3 1 2、4 A-3 1 3、4 A-3 1 4、4 A-4 1 9、または 4 A-4 5 0 の H V R-L 1、H V R-L 2、及び H V R-L 3 を含む。

【0047】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、H V R-H 1、H V R-H 2、及び H V R-H 3 を含む重鎖可変領域と、H V R-L 1、H V R-L 2、及び H V R-L 3 を含む軽鎖可変領域とを含み、当該抗体は、（表 1、表 5、表 3 0、及び表 3 1 に示した）抗体 4 A-3 0 1、4 A-3 0 2、4 A-3 0 3、4 A-3 0 4、4 A-3 0 5、4 A-3 0 6、4 A-3 0 7、4 A-3 0 8、4 A-3 0 9、4 A-3 1 0、4 A-3 1 1、4 A-3 1 2、4 A-3 1 3、4 A-3 1 4、4 A-4 1 9、または 4 A-4 5 0 の H V R-H 1、H V R-H 2、H V R-H 3、H V R-L 1、H V R-L 2、及び H V R-L 3 を含む。

【0048】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、（表 2 及び表 6 に示した）抗体 4 A-3 1 5、4 A-3 1 6、4 A-3 1 7、4 A-3 1 8、4 A-3 1 9、4 A-3 2 0、4 A-3 2 1、4 A-3 2 2、4 A-3 2 3、4 A-3 2 4、4 A-3 2 5、4 A-3 2 6、4 A-3 2 7、4 A-3 2 8、4 A-3 2 9、4 A-3 3 0、または 4 A-3 3 1 の H V R-H 1、H V R-H 2、及び H V R-H 3 を含む。

【0049】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、（表 2 及び表 6 に示した）抗体 4 A-3 1 5、4 A-3 1 6、4 A-3 1 7、4 A-3 1 8、4 A-3 1 9、4 A-3 2 0、4 A-3 2 1、4 A-3 2 2、4 A-3 2 3、4 A-3 2 4、4 A-3 2 5、4 A-3 2 6、4 A-3 2 7、4 A-3 2 8、4 A-3 2 9、4 A-3 3 0、または 4 A-3 3 1 の H V R-L 1、H V R-L 2、及び H V R-L 3 を含む。

【0050】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、H V R-H 1、H V R-H 2、及び H V R-H 3 を含む重鎖可変領域と、H V R-L 1、H V R-L 2、及び H V R-L 3 を含む軽鎖可変領域とを含み、当該抗体は、（表 2 及び表 6 に示した）抗体 4 A-3 1 5、4 A-3 1 6、4 A-3 1 7、4 A-3 1 8、4 A-3 1 9、4 A-3 2 0、4 A-3 2 1、4 A-3 2 2、4 A-3 2 3、4 A-3 2 4、4 A-3 2 5、4 A-3 2 6、4 A-3 2 7、4 A-3 2 8、4 A-3 2 9、4 A-3 3 0、または 4 A-3 3 1 の H V R-H 1、H V R-H 2、H V R-H 3、H V R-L 1、H V R-L 2、及び H V R-L 3 を含む。

【0051】

別の態様では、本開示は、MS 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、（表 3 及び表 7 に示した）抗体 4 A-3 3 2、4 A-3 3 3、4 A-3 3 4、4 A-3 3 5、4 A-3 3 6、4 A-3 3 7、4 A-3 3 8、4 A-3 3 9、4 A-3 4 0、4 A-3 4 1、4 A-3

10

20

30

40

50

4 A-3 4 2、4 A-3 4 3、4 A-3 4 4、4 A-3 4 5、4 A-3 4 6、4 A-3 4 7、4 A-3 4 8、4 A-3 4 9、4 A-3 5 0、4 A-3 5 1、4 A-3 5 2、4 A-3 5 3、4 A-3 5 4、4 A-3 5 5、4 A-3 5 6、4 A-3 5 7、4 A-3 5 8、4 A-3 5 9、4 A-3 6 0、4 A-3 6 1、4 A-3 6 1、4 A-3 6 3、4 A-3 6 4、4 A-3 6 5、4 A-3 6 6、4 A-3 6 7、4 A-3 6 8、4 A-3 6 9、4 A-3 7 0、4 A-3 7 1、4 A-3 7 2、4 A-3 7 3、4 A-3 7 4、4 A-3 7 5、4 A-3 7 6、4 A-3 7 7、4 A-3 7 8、4 A-3 7 9、4 A-3 8 0、または4 A-3 8 1のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む。

【0052】

別の態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、（表3及び表7に示した）抗体4 A-3 3 2、4 A-3 3 3、4 A-3 3 4、4 A-3 3 5、4 A-3 3 6、4 A-3 3 7、4 A-3 3 8、4 A-3 3 9、4 A-3 4 0、4 A-3 4 1、4 A-3 4 2、4 A-3 4 3、4 A-3 4 4、4 A-3 4 5、4 A-3 4 6、4 A-3 4 7、4 A-3 4 8、4 A-3 4 9、4 A-3 5 0、4 A-3 5 1、4 A-3 5 2、4 A-3 5 3、4 A-3 5 4、4 A-3 5 5、4 A-3 5 6、4 A-3 5 7、4 A-3 5 8、4 A-3 5 9、4 A-3 6 0、4 A-3 6 1、4 A-3 6 1、4 A-3 6 3、4 A-3 6 4、4 A-3 6 5、4 A-3 6 6、4 A-3 6 7、4 A-3 6 8、4 A-3 6 9、4 A-3 7 0、4 A-3 7 1、4 A-3 7 2、4 A-3 7 3、4 A-3 7 4、4 A-3 7 5、4 A-3 7 6、4 A-3 7 7、4 A-3 7 8、4 A-3 7 9、4 A-3 8 0、または4 A-3 8 1のHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。

【0053】

別の態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む重鎖可変領域と、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む軽鎖可変領域とを含み、当該抗体は、（表3及び表7に示した）抗体4 A-3 3 2、4 A-3 3 3、4 A-3 3 4、4 A-3 3 5、4 A-3 3 6、4 A-3 3 7、4 A-3 3 8、4 A-3 3 9、4 A-3 4 0、4 A-3 4 1、4 A-3 4 2、4 A-3 4 3、4 A-3 4 4、4 A-3 4 5、4 A-3 4 6、4 A-3 4 7、4 A-3 4 8、4 A-3 4 9、4 A-3 5 0、4 A-3 5 1、4 A-3 5 2、4 A-3 5 3、4 A-3 5 4、4 A-3 5 5、4 A-3 5 6、4 A-3 5 7、4 A-3 5 8、4 A-3 5 9、4 A-3 6 0、4 A-3 6 1、4 A-3 6 1、4 A-3 6 3、4 A-3 6 4、4 A-3 6 5、4 A-3 6 6、4 A-3 6 7、4 A-3 6 8、4 A-3 6 9、4 A-3 7 0、4 A-3 7 1、4 A-3 7 2、4 A-3 7 3、4 A-3 7 4、4 A-3 7 5、4 A-3 7 6、4 A-3 7 7、4 A-3 7 8、4 A-3 7 9、4 A-3 8 0、または4 A-3 8 1のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。

【0054】

別の態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該重鎖可変領域は、（表4及び表8に示した）抗体4 A-3 8 2、4 A-3 8 3、4 A-3 8 4、4 A-3 8 5、4 A-3 8 6、4 A-3 8 7、4 A-3 8 8、4 A-3 8 9、または4 A-3 9 0のHVR-H1、HVR-H2、及び抗HVR-H3を含む。

【0055】

別の態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、（表4及び表8に示した）抗体4 A-3 8 2、4 A-3 8 3、4 A-3 8 4、4 A-3 8 5、4 A-3 8 6、4 A-3 8 7、4 A-3 8 8、4 A-3 8 9、または4 A-3 9 0のHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。

【0056】

別の態様では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該

抗体は、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む重鎖可変領域と、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む軽鎖可変領域とを含み、当該抗体は、（表4及び表8に示した）抗体4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389、または4A-390のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む。

【0057】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、本開示は、MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体に関し、当該抗体は、骨髓細胞でのゲルゾリン及び／またはオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質の発現を高める。一部の実施形態では、当該骨髓細胞は、マクロファージである。

【0058】

本明細書のいずれかの実施形態と組み合わせ得る特定の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、ヒトMS4A4A、マウスMS4A4A、カニクイザルMS4A4A、またはそれらの組み合わせに対して特異的に結合する。

【0059】

[本発明1001]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する単離した抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号：94、108、116、146、147、308、及び311からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309、及び312からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号102、100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310、及び313からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が：配列番号104、103、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314、及び317からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105、106、114、139、140、141、142、143、159、160、161、315、及び318からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号107、115、144、145、163、316、及び319配列番号からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、前記抗体。

[本発明1002]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96～99からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号102、100、及び101からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が：配列番号104及び103からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105～106からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号110～111からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が：配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、本発明1001の抗体。

[本発明1004]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号118～122からなる群から選択す

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号123～129からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含む、かつ、前記軽鎖可変領域が；配列番号130～138からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号139～143からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号144～145からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、本発明1001の抗体。

[本発明1005]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号146～147からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号149～153からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号154

10

[本発明1006]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び、配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が；配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、本発明1001の抗体。

20

[本発明1007]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号308のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号309のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号310のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が；配列番号314のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号315のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号316のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、本発明1001の抗体。

[本発明1008]

前記抗体が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が：配列番号311のアミノ酸配列を含むHVR-H1；配列番号312のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び配列番号313のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、かつ、前記軽鎖可変領域が；配列番号317のアミノ酸配列を含むHVR-L1；配列番号318のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び配列番号319のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、本発明1001の抗体。

30

[本発明1009]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、抗体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、または4A-450のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む、前記抗体。

40

[本発明1010]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、また、前記軽鎖可変領域は、抗体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、または4A-450のHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む、前記抗体。

[本発明1011]

50

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む重鎖可変領域と、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む軽鎖可変領域とを含み、前記抗体は、抗体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、または4A-450のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む、前記抗体。

[本発明1012]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、抗体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、または4A-331のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む、前記抗体。

[本発明1013]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、抗体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、または4A-331のHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む、前記抗体。

[本発明1014]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む重鎖可変領域と、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む軽鎖可変領域とを含み、前記抗体は、抗体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、または4A-331のHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含む、前記抗体。

[本発明1015]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、抗体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、または4A-381のHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含む、前記抗体。

[本発明1016]

MS4A4Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、抗体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

10

20

30

40

50

− 3 5 7、4 A − 3 5 8、4 A − 3 5 9、4 A − 3 6 0、4 A − 3 6 1、4 A − 3 6 2、4 A − 3 6 3、4 A − 3 6 4、4 A − 3 6 5、4 A − 3 6 6、4 A − 3 6 7、4 A − 3 6 8、4 A − 3 6 9、4 A − 3 7 0、4 A − 3 7 1、4 A − 3 7 2、4 A − 3 7 3、4 A − 3 7 4、4 A − 3 7 5、4 A − 3 7 6、4 A − 3 7 7、4 A − 3 7 8、4 A − 3 7 9、4 A − 3 8 0、または4 A − 3 8 1のH V R − L 1、H V R − L 2、及びH V R − L 3を含む、前記抗体。

[本発明 1 0 1 7]

M S 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、H V R − H 1、H V R − H 2、及びH V R − H 3を含む重鎖可変領域と、H V R − L 1、H V R − L 2、及びH V R − L 3を含む軽鎖可変領域とを含み、前記抗体は、抗体4 A − 3 3 2、4 A − 3 3 3、4 A − 3 3 4、4 A − 3 3 5、4 A − 3 3 6、4 A − 3 3 7、4 A − 3 3 8、4 A − 3 3 9、4 A − 3 4 0、4 A − 3 4 1、4 A − 3 4 2、4 A − 3 4 3、4 A − 3 4 4、4 A − 3 4 5、4 A − 3 4 6、4 A − 3 4 7、4 A − 3 4 8、4 A − 3 4 9、4 A − 3 5 0、4 A − 3 5 1、4 A − 3 5 2、4 A − 3 5 3、4 A − 3 5 4、4 A − 3 5 5、4 A − 3 5 6、4 A − 3 5 7、4 A − 3 5 8、4 A − 3 5 9、4 A − 3 6 0、4 A − 3 6 1、4 A − 3 6 2、4 A − 3 6 3、4 A − 3 6 4、4 A − 3 6 5、4 A − 3 6 6、4 A − 3 6 7、4 A − 3 6 8、4 A − 3 6 9、4 A − 3 7 0、4 A − 3 7 1、4 A − 3 7 2、4 A − 3 7 3、4 A − 3 7 4、4 A − 3 7 5、4 A − 3 7 6、4 A − 3 7 7、4 A − 3 7 8、4 A − 3 7 9、4 A − 3 8 0、または4 A − 3 8 1のH V R − H 1、H V R − H 2、H V R − H 3、H V R − L 1、H V R − L 2、及びH V R − L 3を含む、前記抗体。

[本発明 1 0 1 8]

M S 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、抗体4 A − 3 8 2、4 A − 3 8 3、4 A − 3 8 4、4 A − 3 8 5、4 A − 3 8 6、4 A − 3 8 7、4 A − 3 8 8、4 A − 3 8 9、または4 A − 3 9 0のH V R − H 1、H V R − H 2、及びH V R − H 3を含む、前記抗体。

[本発明 1 0 1 9]

M S 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、また、前記軽鎖可変領域は、抗体4 A − 3 8 2、4 A − 3 8 3、4 A − 3 8 4、4 A − 3 8 5、4 A − 3 8 6、4 A − 3 8 7、4 A − 3 8 8、4 A − 3 8 9、または4 A − 3 9 0のH V R − L 1、H V R − L 2、及びH V R − L 3を含む、前記抗体。

[本発明 1 0 2 0]

M S 4 A 4 Aタンパク質に対して結合する抗体であって、前記抗体は、H V R − H 1、H V R − H 2、及びH V R − H 3を含む重鎖可変領域と、H V R − L 1、H V R − L 2、及びH V R − L 3を含む軽鎖可変領域とを含み、前記抗体は、抗体4 A − 3 8 2、4 A − 3 8 3、4 A − 3 8 4、4 A − 3 8 5、4 A − 3 8 6、4 A − 3 8 7、4 A − 3 8 8、4 A − 3 8 9、または4 A − 3 9 0のH V R − H 1、H V R − H 2、H V R − H 3、H V R − L 1、H V R − L 2、及びH V R − L 3を含む、前記抗体。

[本発明 1 0 2 1]

前記抗体は、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号5〜15、304、及び306からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明1001または本発明1009の抗体。

[本発明 1 0 2 2]

前記抗体は、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号24〜30からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明1001または本発明1012の抗体。

[本発明 1 0 2 3]

前記抗体は、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号40〜53からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明1001または本発明1015の抗体。

[本発明 1 0 2 4]

前記抗体は、重鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号76〜84からなる

群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 8 の抗体。

[本発明 1 0 2 5]

前記抗体は、軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号 1 7 ～ 2 2、3 0 5、及び 3 0 7 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 0 の抗体。

[本発明 1 0 2 6]

前記抗体は、軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号 3 2 ～ 3 6 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 3 の抗体。

[本発明 1 0 2 7]

前記抗体は、軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号 5 5 ～ 7 4 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 6 の抗体。

[本発明 1 0 2 8]

前記抗体は、軽鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は、配列番号 8 6 ～ 9 3 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 9 の抗体。

[本発明 1 0 2 9]

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号 5 ～ 1 5、3 0 4、及び 3 0 6 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、前記軽鎖可変領域は、配列番号 1 7 ～ 2 2、3 0 5、及び 3 0 7 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 1 の抗体。

[本発明 1 0 3 0]

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号 2 4 ～ 3 0 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、前記軽鎖可変領域は、配列番号 3 2 ～ 3 6 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 4 の抗体。

[本発明 1 0 3 1]

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号 4 0 ～ 5 3 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、前記軽鎖可変領域は、配列番号 5 5 ～ 7 4 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 1 7 の抗体。

[本発明 1 0 3 2]

前記抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域は、配列番号 7 6 ～ 8 4 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、前記軽鎖可変領域は、配列番号 8 6 ～ 9 3 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1 または本発明 1 0 2 0 の抗体。

[本発明 1 0 3 3]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 3 2 0 ～ 3 4 3 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、本発明 1 0 0 1、1 0 0 2、1 0 0 4、1 0 0 6 ～ 1 0 1 1、1 0 2 1、1 0 2 5、及び 1 0 2 9 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 3 4]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 3 3 6 ～ 3 4 3 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、かつ、前記軽鎖は、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、任意に、前記軽鎖は、配列番号 3 4 4 のアミノ酸配列を含む定常領域をさらに含む、本発明 1 0 0 1、1 0 0 2、1 0 0 6、1 0 0 9 ～ 1 0 1 1、1 0 2 1、1 0 2 5、1 0 2 9 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 3 5]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 3 2 0 ～ 3 2 7 からなる群から選択するアミノ酸配列を含む、前記軽鎖は、配列番号 3 0 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、任意に、前記軽鎖は、配列番号 3 4 4 のアミノ酸配列を含む定常領域をさらに含む、本発明 1 0 0 1、1 0 0 7、1 0 0 9 ～ 1 0 1 1、1 0 2 1、1 0 2 5、及び 1 0 2 9 のいずれかの抗体。

10

20

30

40

50

[本発明 1036]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 328～335 からなる群から選択するアミノ酸配列を含み、前記軽鎖は、配列番号 307 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、任意に、前記軽鎖は、配列番号 344 のアミノ酸配列を含む定常領域をさらに含む、本発明 1001、1008～1011、1021、1025、及び 1029 のいずれかの抗体。

[本発明 1037]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 355～362 からなる群から選択するアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号 365 のアミノ酸配列を含む、本発明 1001、1002、1006、1009～1011、1021、1025、及び 1029 のいずれかの抗体。

10

[本発明 1038]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 320～327 からなる群から選択するアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号 363 のアミノ酸配列を含む、本発明 1001、1007、1009～1011、1021、1025、及び 1029 のいずれかの抗体。

[本発明 1039]

前記抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖は、配列番号 328～335 からなる群から選択するアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号 364 のアミノ酸配列を含む、本発明 1001、1008～1011、1021、1025、及び 1029 のいずれかの抗体。

20

[本発明 1040]

前記抗体が：

a. 重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域は、配列番号 94 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、配列番号 96 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、及び配列番号 102 のアミノ酸配列を含む HVR-H3 を含む；かつ、前記軽鎖可変領域は、配列番号 104 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、配列番号 105 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び配列番号 107 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 を含む、前記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；

b. 重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域は、配列番号 14 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖可変領域は、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む、前記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；または

30

c. 重鎖及び軽鎖であって、前記重鎖は、配列番号 359 または 360 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号 365 のアミノ酸配列を含む、前記重鎖及び軽鎖、を含む、本発明 1002 の抗体。

[本発明 1041]

前記抗体が：

a. 重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域は、配列番号 304 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖可変領域は、配列番号 305 のアミノ酸配列を含む、前記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；または

40

b. 重鎖及び軽鎖であって、前記重鎖は、配列番号 324 または 325 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号 363 のアミノ酸配列を含む、前記重鎖及び軽鎖、を含む、本発明 1007 の抗体。

[本発明 1042]

前記抗体が：

a. 重鎖可変領域及び軽鎖可変領域であって、前記重鎖可変領域は、配列番号 306 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖可変領域は、配列番号 307 のアミノ酸配列を含む、前記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域；または

b. 重鎖及び軽鎖であって、前記重鎖は、配列番号 332 または 333 のアミノ酸配列を含み、かつ、前記軽鎖は、配列番号 364 のアミノ酸配列を含む、前記重鎖及び軽鎖、

50

を含む、本発明 1 0 0 8 の抗体。

[本発明 1 0 4 3]

MS 4 A 4 A タンパク質に対して結合する単離した抗体であって、前記抗体は、MS 4 A 4 A に対する結合に関して、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 2 のいずれかの 1 つ以上の抗体との結合を競合的に阻害する、前記抗体。

[本発明 1 0 4 4]

MS 4 A 4 A タンパク質に対して結合する単離した抗体であって、前記抗体は、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 2 のいずれかの抗体と本質的に同じである、または重複する MS 4 A 4 A のエピトープに対して結合する、前記抗体。

[本発明 1 0 4 5]

前記抗体が、配列番号 1 のアミノ酸配列 SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 1 7 8) の 1 つ以上のアミノ酸残基に対して結合し、前記抗体は、配列番号 1 のアミノ酸残基プロリン 1 6 3 に結合しない、本発明 1 0 4 4 の抗体。

[本発明 1 0 4 6]

前記抗体が、ヒト MS 4 A 4 A の細胞外ドメイン 1 に対して結合する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 2 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 4 7]

前記抗体が、配列番号 1 のアミノ酸配列 CMASNTYGSNPIS (配列番号 1 7 7) の 1 つ以上のアミノ酸残基に対して結合する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 2 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 4 8]

前記抗体が、ヒト MS 4 A 4 A の細胞外ドメイン 2 に対して結合する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 2 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 4 9]

前記抗体が、配列番号 1 のアミノ酸配列 SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 1 7 8) の 1 つ以上のアミノ酸残基に対して結合する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 2 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 5 0]

前記抗体が、ヒトのもの、またはヒト化したものである、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 4 9 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 5 1]

前記抗体が、MS 4 A 4 A の細胞表面レベルを下げる、または MS 4 A 4 A の細胞内レベルを下げる、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 5 0 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 5 2]

前記抗体が、骨髄細胞において、可溶性 TREM 2 レベルを引き上げる、膜 TREM 2 レベルを引き上げる、または可溶性 TREM 2 を増やし、膜 TREM 2 レベルを引き上げる、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 5 1 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 5 3]

前記抗体が、骨髄細胞での M 2 細胞表面マーカーの発現を抑制する、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 5 2 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 5 4]

前記抗体が、骨髄細胞での CD 2 0 0 R、Dectin-1、または CD 1 6 3 の発現を抑制する、本発明 1 0 5 3 の抗体。

[本発明 1 0 5 5]

前記抗体が、骨髄細胞でのゲルゾリン及び／またはオステオポンチンの mRNA 及び／またはタンパク質の発現を高める、本発明 1 0 0 1 ~ 1 0 5 0 のいずれかの抗体。

[本発明 1 0 5 6]

MS 4 A 4 A タンパク質に対して結合する単離した抗体であって、前記抗体は、骨髄細胞でのゲルゾリン及び／またはオステオポンチンの mRNA 及び／またはタンパク質の発現を高める、前記抗体。

10

20

30

40

50

[本発明 1057]

前記骨髄細胞が、ヒトマクロファージである、本発明 1056 の抗体。

[本発明 1058]

前記抗体が、ヒトのもの、またはヒト化したものである、本発明 1056 または 1057 の抗体。

[本発明 1059]

前記抗体は、4A-18、4A-25、4A-214、4A-21、及び 4A-202 からなる群から選択する抗体と同じエピトープに対して結合する、本発明 1056 ~ 1058 のいずれかの抗体。

[本発明 1060]

前記抗体が、骨髄細胞での M2 マーカーの発現を抑制する、本発明 1056 ~ 1059 のいずれかの抗体。

[本発明 1061]

前記骨髄細胞が、ヒトマクロファージである、本発明 1060 の抗体。

[本発明 1062]

前記 M2 マーカーが、CD200R、Dectin-1、及び/または CD163 である、本発明 1061 の抗体。

[本発明 1063]

前記抗体が、ヒトマクロファージでの膜 TREM2 を、少なくとも 50%、90%、100%、150%、200%、または 250% 増やす、本発明 1056 ~ 1062 のいずれかの抗体。

[本発明 1064]

前記抗体が、ヒトマクロファージ上清での可溶性 TREM2 を、少なくとも 15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、または 70% 増やす、本発明 1056 ~ 1063 のいずれかの抗体。

[本発明 1065]

前記抗体が、モノクローナル抗体である、本発明 1001 ~ 1064 のいずれかの抗体。

[本発明 1066]

前記抗体が、配列番号 1 のヒト MS4A4A に対して結合する、本発明 1001 ~ 1065 のいずれかの抗体。

[本発明 1067]

前記抗体が、配列番号 3 のカニクイザル MS4A4A に対してさらに結合する、本発明 1066 の抗体。

[本発明 1068]

前記抗体が、IgG クラスに属し、かつ、IgG1、IgG2、または IgG4 アイソタイプを有する、本発明 1001 ~ 1067 のいずれかの抗体。

[本発明 1069]

前記抗体が、IgG1 アイソタイプを有する、本発明 1068 の抗体。

[本発明 1070]

前記抗体が、EU 付番法で定めた N325S 及び L328F 変異を含む改変した Fc を含む、本発明 1069 の抗体。

[本発明 1071]

前記抗体が、抗体フラグメントである、本発明 1001 ~ 1070 のいずれかの抗体。

[本発明 1072]

前記抗体フラグメントが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、または scFv フラグメントである、本発明 1071 の抗体。

[本発明 1073]

前記抗体が、第 1 の抗原及び第 2 の抗原を認識する二重特異性抗体である、本発明 1001 ~ 1072 のいずれかの抗体。

[本発明 1074]

10

20

30

40

50

前記第1の抗原がMS4A4Aであり、かつ、前記第2の抗原が：

- (a) 血液脳関門を通過する輸送を促す抗原；
- (b) トランスフェリン受容体（TR）、インスリン受容体（HIR）、インスリン様成長因子受容体（IGFR）、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2（LPR-1及び2）、ジフテリア毒素受容体、CRM197、ラマシングルドメイン抗体、TMM30（A）、タンパク質形質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、アンジオペプチド、及び、ANG1005からなる群から選択する、血液脳関門を通過する輸送を促す抗原；
- (c) 病原ペプチドまたはタンパク質、または、病原核酸からなる群から選択する病原作用物質であって、前記病原核酸は、アンチセンスGGCCCC（G2C4）反復拡張RNAであり、前記病原タンパク質は、アミロイドベータ、オリゴマーアミロイドベータ、アミロイドベータブラーク、アミロイド前駆体タンパク質、または、そのフラグメント、Tau、IAPP、アルファシヌクレイン、TDP-43、FUSタンパク質、C9orf72（第9番染色体オープンリーディングフレーム72）、c9RANタンパク質、プリオンタンパク質、PrPSc、ハンチンチン、カルシトニン、スーパーオキシドジスムターゼ、アタキシン、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、アタキシン7、アタキシン8、アタキシン10、レビー小体、心房性ナトリウム利尿因子、膝島アミロイドポリペプチド、インスリン、アポリポタンパク質AI、血清アミロイドA、メジン、プロラクチン、トランスサイレチン、リゾチーム、ベータ2ミクログロブリン、ゲルゾリン、ケラトエピセリン、シスタチン、免疫グロブリン軽鎖AL、S-IBMタンパク質、反復関連非ATG（RAN）翻訳産物、ジペプチド反復（Dipeptide repeat）（DPR）ペプチド、グリシン-アラニン（GA）反復ペプチド、グリシン-プロリン（GP）反復ペプチド、グリシン-アルギニン（GR）反復ペプチド、プロリン-アラニン（PA）反復ペプチド、ユビキチン、及び、プロリン-アルギニン（PR）反復ペプチドからなる群から選択する、前記病原作用物質；
- (d) 免疫細胞で発現するリガンド、及び／または、タンパク質であって、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、及び、ホスファチジルセリンからなる群から選択する、前記リガンド、及び／または、タンパク質；または
- (e) 1つ以上の腫瘍細胞で発現するタンパク質、脂質、多糖、または、糖脂質、である、本発明1073の抗体。

[本発明1075]

先行本発明のいずれかの抗体をコードする核酸配列を含む単離した核酸。

[本発明1076]

本発明1075の核酸を含むベクター。

[本発明1077]

本発明1075の核酸、または本発明1076のベクターを含む単離した宿主細胞。

[本発明1078]

ヒトMS4A4Aに対して結合する抗体を製造する方法であって、前記抗体を製造するために、本発明1077の細胞を培養することを含む、前記方法。

[本発明1079]

細胞が産生した抗体を回収することをさらに含む、本発明1078の方法。

[本発明1080]

本発明1001～1074のいずれかの抗体と、医薬として許容可能な担体とを含む医薬組成物。

[本発明1081]

アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、及び、認知障害からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に対して、治療有効量の本発明1001

10

20

30

40

50

～1074のいずれかの抗体を投与することを含む、前記方法。

[本発明1082]

MS4A4Aの過剰発現、または、高まった活性に起因する、または、それらに関連する疾患、障害、病態、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に対して、治療有効量の本発明1001～1074のいずれかの抗体を投与することを含む、前記方法。

[本発明1083]

CSF1R欠損疾患または障害を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、それを必要とする個体に対して、本発明1001～1074のいずれかの抗体の治療有効量を投与することを含む、前記方法。

[本発明1084]

前記CSF1R欠損疾患または障害が、軸索スフェロイド及び色素性グリアを伴う成人発症性白質脳症(ALSP)または遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)である、本発明1083の方法。

[本発明1085]

前記抗体の投与の前及び／または後でのオステオポンチン、ゲルゾリン、膜TREM2、及び／または可溶性TREM2のレベルを検出することをさらに含む、本発明1081～1084のいずれかの方法。

本明細書に記載した様々な実施形態の1つ、一部、または全部の特性を組み合わせ、本開示のその他の実施形態を形成し得ることを理解されたい。本開示のこれらの態様、及びその他の態様は、当業者には自明である。本開示のこれらの実施形態、及びその他の実施形態を、以下にさらに詳細に説明する。

【0060】

特許または出願書類は、カラーで出力した少なくとも1枚の図面を含む。カラーで出力した図面を具備した特許公報、または、特許出願公報公開のコピーは、所定の請求を行い、かつ、所定の手数料を支払うことで、庁から提供を受ける。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】ヒトMS4A4Aの一次アミノ酸配列を示す。細胞内ドメインはイタリック体で示し、膜貫通ドメインには下線を付けて示し、細胞外ループは太字のイタリック体で示す。

【図2】Aは、RCSB Protein Data Bankから得た可溶性の4ヘリックスバンドルスキヤホールド(PDB ID: 1P68)の構造概略図を示しており、螺旋状のリボンとして認められる4つの膜貫通ドメインを構造内に有する。B及びCは、それぞれ、可溶性の4ヘリックスバンドルスキヤホールドPDB ID: 1P68及びPDB ID: 1M6Tの一次アミノ酸配列を示す；4つの膜貫通ドメインは、アミノ酸配列に下線を付した。

【図3A】Aは、ヒトMS4A4Aの2つの細胞外ループ(太い下線を付した)を加えた可溶性の4ヘリックスバンドルスキヤホールドJS1、JS5、及びJS6の一次アミノ酸配列を示す。

【図3B】Bは、ネガティブコントロールバリエーションとして使用する可溶性の4ヘリックスバンドルスキヤホールドJS4及びJS10の一次アミノ酸配列を示す。

【図4】ELISAによって、組換えMS4A4A可溶性ループグラフト化ポリペプチドJS1、JS4、JS5、JS6、及びJS10に対して結合する本開示の特定の抗MS4A4A抗体を示す。

【図5】組換えMS4A4A可溶性ループグラフト化ポリペプチドJS1に対して結合するマウス抗MS4A4A抗体4A-21の特定のヒト化した抗MS4A4A抗体バリエーションを示す。

【図6】組換えMS4A4A可溶性ループグラフト化ポリペプチドJS1に対して結合するマウス抗MS4A4A抗体4A-202の特定のヒト化した抗MS4A4A抗体バリエーションを示す。

10

20

30

40

50

【図7】組換えMS4A4A可溶性ループグラフト化ポリペプチドJS5に対して結合するマウス抗MS4A4A抗体4A-202のヒト化した、及び親和性成熟した特定の抗MS4A4A抗体バリエーションを示す。

【図8】組換えMS4A4A可溶性ループグラフト化ポリペプチドJS5に対して結合するマウス抗MS4A4A抗体4A-21のヒト化した、及び親和性成熟した特定の抗MS4A4A抗体バリエーションを示す。

【図9】組換えMS4A4A可溶性ループグラフト化ポリペプチドJS5に対して結合するマウス抗MS4A4A抗体4A-21のヒト化した、及び親和性成熟した特定の抗MS4A4A抗体バリエーションを示す。

【図10A】カニクイザルの血清でのsTREM2のレベルに関する抗MS4A4A抗体4A-202の効果を示す。抗MS4A4A抗体4A-202またはアイソタイプコントロール抗体(huIgG1)を、いずれも80mg/kgの用量で投与して、提示した時間(時間)が経過した時点でのカニクイザルの血清でのsTREM2のレベル(ng/mL)を示す。

10

【図10B】カニクイザルの血清でのsTREM2のレベルに関する抗MS4A4A抗体4A-202の効果を示す。抗MS4A4A抗体4A-202またはアイソタイプコントロール抗体(huIgG1)を、いずれも80mg/kgの用量で投与して、提示した時間(時間)が経過した時点でのカニクイザルの血清でのsTREM2のレベル(ベースラインのパーセント)を示す。

【図11A】カニクイザルの脳脊髄液(CSF)でのsTREM2のレベルに関する抗MS4A4A抗体4A-202の効果を示す。抗MS4A4A抗体4A-202またはアイソタイプコントロール抗体(huIgG1)を、いずれも80mg/kgの用量で投与して、提示した時間(時間)が経過した時点でのカニクイザルのCSFでのsTREM2のレベル(ng/mL)を示す。

20

【図11B】カニクイザルの脳脊髄液(CSF)でのsTREM2のレベルに関する抗MS4A4A抗体4A-202の効果を示す。抗MS4A4A抗体4A-202またはアイソタイプコントロール抗体(huIgG1)を、いずれも80mg/kgの用量で投与して、提示した時間(時間)が経過した時点でのカニクイザルのCSFでのsTREM2のレベル(ベースラインのパーセント)を示す。

【図12】組換えヒトMS4A4Aを発現するU937細胞に対する抗MS4A4A抗体4A-313野生型(WT) huIgG1及び4A-450 WT huIgG1の結合曲線を表すデータを示す。

30

【図13】抗MS4A4A抗体4A-450 WT huIgG1、4A-450 NSLF huIgG1、及び4A-450 K322A huIgG1で処理した初代ヒトマクロファージでの膜TREM2レベルを表すデータを示す。

【図14】抗MS4A4A抗体4A-313 WT huIgG1、4A-313 NSLF huIgG1、及び4A-313 K322A huIgG1で処理した初代ヒトマクロファージでの膜TREM2レベルを表すデータを示す。

【図15】抗MS4A4A抗体4A-450 huIgG1で処理した初代ヒトマクロファージの上清での可溶性TREM2レベルの増大を表すデータを示す。

40

【図16】抗MS4A4A抗体4A-313 huIgG1で処理した初代ヒトマクロファージの上清での可溶性TREM2レベルの増大を表すデータを示す。

【図17】抗MS4A4A抗体4A-313 NSLF huIgG1、4A-313 PS huIgG1、4A-450 NSLF huIgG1、及び4A-450 PS huIgG1で処理した初代ヒトマクロファージでのATPレベルの増大を表すデータを示す。

【図18】A~Cは、抗MS4A4A抗体4A-313 NSLF huIgG1及び4A-419 WT huIgG1で処理した初代ヒトマクロファージでのCD14、CD163、及びCD200Rのレベルの変化を表すデータを(それぞれ)示す。

【図19】ヨウ化プロピジウム取り込みで測定した、組換えヒトMS4A4Aを発現する

50

U937細胞における抗MS4A4A抗体4A-313 NSLF huIgG1、4A-313 K322A huIgG1及び4A-313 WT huIgG1の補体依存性細胞傷害性(CDC)活性を表すデータを示す。

【図20】FcγRIIIa活性化で測定した、初代ヒトマクロファージにおける抗MS4A4A抗体4A-313 NSLF huIgG1、4A-313 K322A huIgG1、及び4A-313 WT huIgG1のADCP活性を表すデータを示す。

【図21】FcγRIIIa活性化で測定した、初代ヒトマクロファージにおける抗MS4A4A抗体4A-313 NSLF huIgG1、4A-313 K322A huIgG1、及び4A-313 WT huIgG1のADCC活性を表すデータを示す。

【図22】A～Bは、初代ヒトマクロファージにおける膜TREM2(A)及び可溶性TREM2(B)に関するMS4A4Aノックアウトの効果を表すデータを示す。

10

【図23A】A～Cは、それぞれ、本開示の抗MS4A4A抗体で処理したヒトマクロファージでの可溶性TREM2タンパク質のレベル、膜TREM2タンパク質のレベル、及びTREM2 mRNAレベルの変化の動態を表すデータを示す。

【図23B】A～Cは、それぞれ、本開示の抗MS4A4A抗体で処理したヒトマクロファージでの可溶性TREM2タンパク質のレベル、膜TREM2タンパク質のレベル、及びTREM2 mRNAレベルの変化の動態を表すデータを示す。

【図23C】A～Cは、それぞれ、本開示の抗MS4A4A抗体で処理したヒトマクロファージでの可溶性TREM2タンパク質のレベル、膜TREM2タンパク質のレベル、及びTREM2 mRNAレベルの変化の動態を表すデータを示す。

20

【図24】A～Bは、MS4A4AのsiRNAノックダウンが、ヒトマクロファージにおける膜TREM2及び可溶性TREM2レベルを引き上げたことを表すデータを示す。

【図25A】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおける膜TREM2レベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図25B】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおける膜TREM2レベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図25C】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおける膜TREM2レベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

30

【図26A】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおける可溶性TREM2レベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図26B】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおける可溶性TREM2レベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図26C】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおける可溶性TREM2レベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

40

【図27A】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおけるATPレベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図27B】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおけるATPレベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図27C】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の3名の異なるドナーに由来する初代ヒトマクロファージにおけるATPレベルの用量依存的増加を表すデータを示す。

【図28】A～Bは、本開示の抗MS4A4A抗体が、CSF1R阻害が誘導する細胞死

50

を救済する上で有効であることを表すデータを示す。

【図29】本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルCSFでのプロテオームワイドの効果のボルケーノプロットを示す。

【図30】本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザル血清でのsTREM2レベルの増大を表すデータを示す。

【図31A】A～Dは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルCSFでのオステオポンチンレベルの増大を表すデータを示す。

【図31B】A～Dは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルCSFでのオステオポンチンレベルの増大を表すデータを示す。

【図31C】A～Dは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルCSFでのオステオポンチンレベルの増大を表すデータを示す。

10

【図31D】A～Dは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルCSFでのオステオポンチンレベルの増大を表すデータを示す。

【図32A】A～Bは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルの脳の前頭葉及び海馬のそれぞれでのオステオポンチンレベルの増大を表すデータを示す。

【図32B】A～Bは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルの脳の前頭葉及び海馬のそれぞれでのオステオポンチンレベルの増大を表すデータを示す。

【図33A】A～Bは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルの脳の前頭葉及び海馬のそれぞれでのCSF1Rレベルの増大を表すデータを示す。

【図33B】A～Bは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルの脳の前頭葉及び海馬のそれぞれでのCSF1Rレベルの増大を表すデータを示す。

20

【図34】A～Bは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のカニクイザルの脳の前頭葉及び海馬のそれぞれでの総TREM2タンパク質のレベルの増大を表すデータを示す。

【図35A】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与したカニクイザルの脳から単離したミクログリアにおけるミクログリア活性化、遊走、及び増殖のマーカーでのmRNAレベルの変化を表すデータを示す。

【図35B】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与したカニクイザルの脳から単離したミクログリアにおけるミクログリア活性化、遊走、及び増殖のマーカーでのmRNAレベルの変化を表すデータを示す。

【図35C】A～Cは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与したカニクイザルの脳から単離したミクログリアにおけるミクログリア活性化、遊走、及び増殖のマーカーでのmRNAレベルの変化を表すデータを示す。

30

【図36】本開示の抗MS4A4A抗体が、U937細胞において組換え的に発現したHA-シュノーケルタグを付けたMS4A4Aタンパク質の細胞表面発現を抑制することを表すデータを示す。

【図37】本開示の抗MS4A4A抗体が、初代ヒトマクロファージにおいて、GPNMB細胞表面発現を抑制したことを表すデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0062】

本開示は、抗MS4A4A抗体（例えば、モノクローナル抗体）；それらの抗体を作り出す、及び、使用する方法；それらの抗体を含む医薬組成物；それらの抗体をコードする核酸；及び、それらの抗体をコードする核酸を含む宿主細胞に関する。

40

【0063】

本明細書で説明または参照した技術や手順は、一般的に、よく理解がされており、そして、当業者であれば、例えば、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 Pra

50

ctical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)に記載されている方法論など、広く利用がされている方法論である従来の方法論を進んで使用している。

【0064】

I. 定義

本明細書では、用語「MS4A4A」または「MS4A4Aポリペプチド」を、互換的に使用しており、特に断りがない限り、霊長類（例えば、ヒト、及び、カニクイザル）、及び、齧歯類（例えば、マウス、及び、ラット）などの哺乳類を含む、あらゆる脊椎動物起源の天然のあらゆるMS4A4Aのことを指す。一部の実施形態では、この用語は、野生型配列、及び、天然に存在する変異配列、例えば、スプライスバリエント、または、対立遺伝子バリエントの両方を含む。一部の実施形態では、この用語は、「全長」の未処理MS4A4A、ならびに、細胞内での処理が関与するあらゆる形態のMS4A4Aを含む。一部の実施形態では、当該MS4A4Aは、ヒトMS4A4Aである。一部の実施形態では、例示的なMS4A4Aのアミノ酸配列は、2001年12月1日現在でのUniprot受託番号：Q96JQ5である。一部の実施形態では、例示的なヒトMS4A4Aのアミノ酸配列は、配列番号1である。

【0065】

用語「抗MS4A4A抗体」、「MS4A4Aに対して結合する抗体」、及び、「MS4A4Aに特異的に結合する抗体」は、MS4A4Aを標的にする診断薬、及び／または、治療薬として有用な抗体であり、MS4A4Aに対して十分な親和性で結合することができる抗体のことを指す。ある実施形態では、無関係の非MS4A4Aポリペプチドに対する抗MS4A4A抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）で決定したように、MS4A4Aに対する抗体の結合の約10%未満である。特定の実施形態では、MS4A4Aに対して結合する抗体は、 $<1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<0.01\text{nM}$ 、または、 $<0.001\text{nM}$ （例えば、 10^{-8}M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数（KD）を有する。特定の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、異なる種に由来するMS4A4Aの間で保存されているMS4A4Aのエピトープに対して結合する。

【0066】

標的分子に対する抗体の結合に関して、用語「特異的結合」または「特異的に結合する」、または、特定のポリペプチド、または、特定のポリペプチド標的に関するエピトープに「特異的」であるとは、非特異的相互作用とは異なる測定可能な結合を意味する。特異的結合は、例えば、コントロール分子の結合と比較して、分子の結合を決定して測定することができる。例えば、特異的結合は、標的、例えば、過剰の非標識標的に類似するコントロール分子と競合させて決定することができる。この事例では、プローブに対する標識した標的の結合を、過剰な非標識標的が競合的に阻害していれば、特異的結合を示す。本明細書で使用する用語「特異的結合」または「特異的に結合する」、または、特定のポリペプチド、または、特定のポリペプチド標的に関するエピトープに「特異的」であるとは、例えば、概ね、 10^{-4}M 以下、 10^{-5}M 以下、 10^{-6}M 以下、 10^{-7}M 以下、 10^{-8}M 以下、 10^{-9}M 以下、 10^{-10}M 以下、 10^{-11}M 以下、 10^{-12}M 以下のいずれかの標的に関するKD、または、 $10^{-4}\text{M}\sim 10^{-6}\text{M}$ 、または、 $10^{-6}\text{M}\sim 10^{-10}\text{M}$ 、または、 $10^{-7}\text{M}\sim 10^{-9}\text{M}$ の範囲のKDを有する分子として示すことができる。当業者であれば、親和性とKD値とが反比例することを理解する。抗原に対する高い親和性は、低いKD値として表れる。ある実施形態では、用語「特異的結合」とは、分子が、あらゆるその他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに対して実質的に結合せずに、特定のポリペプチド、または、特定のポリペプチドに関するエピトープに対して結合する結合のことを指す。

【0067】

本明細書では、用語「免疫グロブリン」（Ig）を、「抗体」と互換的に使用する。本

明細書において、用語「抗体」は、最も広い意味で使用しており、特に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成した多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び、所望の生物学的活性を示す限りは、抗体フラグメントを含む。

【0068】

「ネイティブ抗体」は、通常、2つの同一の軽（「L」）鎖、及び、2つの同一の重（「H」）鎖から構成されている約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。それぞれの軽鎖は、1つのジスルフィド共有結合で重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。それぞれの重鎖、及び、それぞれの軽鎖は、規則的な間隔を設けた鎖内ジスルフィド架橋も有する。それぞれの重鎖は、一端に、可変ドメイン（V_H）を有しており、これに、幾つかの定常ドメインが続く。それぞれの軽鎖は、一端に、可変ドメイン（V_L）を有しており、他端に、定常ドメインを有しており；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列しており、そして、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられる。

【0069】

異なる抗体クラスの構造及び特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Ed., Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照されたい。

【0070】

あらゆる脊椎動物種に由来する軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（「κ」）、及び、ラムダ（「λ」）と称する2つの明確に異なる種類のうちの一方に割り当てることができる。免疫グロブリンは、その重鎖の定常ドメイン（CH）のアミノ酸配列に応じて、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには；IgA、IgD、IgE、IgG、及び、IgMの5つのクラスがあり、それぞれ、アルファ（「α」）、デルタ（「δ」）、イプシロン（「ε」）、ガンマ（「γ」）、及び、ミュー（「μ」）と表記される重鎖を有する。γ及びαのクラスは、CH配列及び機能での相対的にわずかな相違に基づいて、サブクラス（アイソタイプ）にさらに分類され、例えば、ヒトでは、以下のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及び、IgA2を発現する。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造、及び、三次元構成は公知であり、例えば、Abbas et al, Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders Co., 2000)で概説されている。

【0071】

本開示の抗MS4A4A抗体などの抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインのことを指す。当該重鎖及び軽鎖の可変ドメインを、それぞれ、「V_H」及び「V_L」と称し得る。これらのドメインは、一般的に、（同じクラスのその他の抗体と比較して）最も変化しやすい抗体の箇所であり、そして、抗原結合部位を含む。

【0072】

用語「可変」とは、可変ドメインの特定のセグメントが、本開示の抗MS4A4A抗体などの抗体の間で配列が大きく異なるという事実のことを指す。当該可変ドメインは、抗原結合を媒介し、そして、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義する。しかしながら、当該可変性は、当該可変ドメイン全体に均一に分布しているわけではない。むしろ、それは、軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメインの超可変領域（HVR）と呼ばれている3つのセグメントに集中している。可変ドメインにおいて高度に保存されている部分を、フレームワーク領域（FR）と称する。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞ

れ、3つのHVRで接続した、ベータシート立体配置を主体とする4つのFR領域を含み、それらは、当該ベータシート構造に接続するループ、及び、一部の事例では、当該ベータシート構造の一部を形成するループを形成する。それぞれの鎖でのHVRは、FR領域に非常に近接して一緒に保持され、他方の鎖に由来するHVRとともに、それらの抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al, Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)を参照されたい)。当該定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞毒性への抗体の関与などの様々なエフェクター機能を呈する。

【0073】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体集団から得た抗体、例えば、本開示のモノクローナル抗MS4A4A抗体などの抗体のことを指し、すなわち、当該集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る自然発生の変異、及び／または、翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化など)を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、特異性が高く、1つ以上の抗原部位に指向する。一般的には異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は、当該抗原の単一の決定基に指向する。それらの特異性に加えて、当該モノクローナル抗体は、その他の免疫グロブリンによる汚染を受けていないハイブリドーマ培養で合成するという点で有利である。修飾語「モノクローナル」とは、実質的に同種の抗体集団から得られる抗体の特徴を示すものであって、あらゆる特定の方法で抗体を生産する必要があると解釈すべきではない。例えば、本開示にしたがって使用するモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、及び、ヒト免疫グロブリン遺伝子座、または、ヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部またはすべてを有する動物において、ヒトまたはヒト様抗体を生産する技術などの様々な技術によって生産し得る。

【0074】

用語「全長抗体」、「インタクト抗体」、または、「全抗体」とは、抗体フラグメントとは対照的に、その実質的にインタクトな形態にある本開示の抗MS4A4A抗体などの抗体を指すために、互換的に使用している。具体的には、全抗体は、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものを含む。当該定常ドメインは、ネイティブ配列の定常ドメイン(例えば、ヒトネイティブ配列の定常ドメイン)、または、そのアミノ酸配列変異体とし得る。一部の事例では、当該インタクト抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有し得る。

【0075】

「抗体フラグメント」とは、インタクト抗体が結合する抗原に対して結合するインタクト抗体の一部を含む、インタクト抗体以外の分子のことを指す。抗体フラグメントの例として、Fab、Fab'、(ab')₂、及びFvフラグメント；ダイアボディ；線状抗体(米国特許第5641870号、実施例2；Zapata et al, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)を参照されたい)；一本鎖抗体分子、及び、抗体フラグメントから形成した多重特異性抗体がある。

【0076】

本開示の抗MS4A4A抗体などの抗体をパイン消化すると、「Fab」フラグメントと称する2つの同一の抗原結合フラグメントと、容易に結晶化する能力を反映した名称を有する残留「Fc」フラグメントとを生成する。当該Fabフラグメントは、軽鎖全体に加えて、重鎖の可変領域ドメイン(V_H)と、1つの重鎖の第1の定常ドメイン(C_H1)とからなる。それぞれのFabフラグメントは、抗原結合に関しては一価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体をペプシン処理すると、単一の大きな(ab')₂フラグメントが得られ、これは、異なる抗原結合活性を有するジスルフィド結合した2つのFabフラグメントに概ね対応しており、また、依然として抗原を架橋することができる。Fab'フラグメントは、C_H1ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域に由来する1つ以上のシステインを含んだ幾つかのさらなる残基を有する点で、Fabフ

10

20

30

40

50

ラグメントと異なる。F a b ' - S Hとは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を持つF a b 'に関する本明細書での表記である。F (a b ')₂抗体フラグメントは、本来は、そのフラグメント間にヒンジシステインを有するF a b 'フラグメントのペアとして生産した。抗体フラグメントのその他の化学的カップリングも公知である。

【0077】

当該F cフラグメントは、ジスルフィドとともに保持された両方の重鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c領域の配列によって決定され、この領域は、特定の細胞型で認められるF c受容体（F c R）でも認識される。

【0078】

本開示の抗M S 4 A 4 A抗体などの抗体の「機能性フラグメント」は、インタクト抗体の一部を含み、一般的には、インタクト抗体の抗原結合領域または可変領域、または、F c R結合能力を保持する、または、改変したF c R結合能力を有する抗体のF c領域を含む。抗体フラグメントの例として、線状抗体、一本鎖抗体分子、及び、抗体フラグメントから形成した多重特異性抗体がある。

【0079】

用語「ダイアボディ」とは、可変ドメインの鎖内ではなく、鎖間のペアリングを達成し、それにより、二価フラグメント、すなわち、2つの抗原結合部位を有するフラグメントが得られるように、V_HドメインとV_Lドメインとの間に短いリンカー（約5～10個）の残基）を用いてs F vフラグメント（前出の段落を参照されたい）を構築して調製した小さな抗体フラグメントのことを指す。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のV_Hドメイン及びV_Lドメインが、異なるポリペプチド鎖に存在している、2つの「交差」s F vフラグメントのヘテロ二量体である。

【0080】

本明細書で使用する「キメラ抗体」とは、本開示のキメラ抗M S 4 A 4 A抗体などの抗体（免疫グロブリン）であって、重鎖及び／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体、または、特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体での対応する配列と同一または相同であり、かつ、その（それらの）鎖（複数可）の残部が、別の種に由来する抗体、または、別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体での対応する配列と同一または相同である抗体、ならびに、所望の生物活性を奏する限りは、それら抗体のフラグメントのことを指す。本明細書で対象とするキメラ抗体として、P R I M A T I Z E D（登録商標）抗体があり、当該抗体の抗原結合領域は、例えば、マカクザルを目的の抗原で免疫処置して生産した抗体に由来する。本明細書で使用する、「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットとして使用する。

【0081】

本開示の抗M S 4 A 4 A抗体のヒト化など、非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒトH V R由来のアミノ酸残基、及び、ヒトF R由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体である。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、及び、一般的には、2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、それぞれのH V R（例えば、C D R）のすべて、または、実質的にすべてが、非ヒト抗体のH V Rに対応しており、そして、それぞれのF Rのすべて、または、実質的にすべてが、ヒト抗体のF Rに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。抗体の「ヒト化形態」、例えば、非ヒト抗体とは、ヒト化を受けた抗体のことを指す。

【0082】

「ヒト抗体」は、本開示の抗M S 4 A 4 A抗体などの抗体であり、ヒトで生産した抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を持つ及び／または本明細書に開示したヒト抗体を作り出すためのいずれかの技術を使用して生産されている。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該技術分野で公知の様々な技術を使用して生産することができる。ヒト抗体は、かかる抗体を抗原接種に応答して生産するように修飾しているが、例えば、免疫処置したゼノマウス、ならびに、ヒトB細胞ハイブリドーマを介して生成させ

10

20

30

40

50

て、その内因性遺伝子座を無効化したトランスジェニック動物に対して当該抗原を投与して、調製することができる。

【0083】

本明細書で使用する用語「超可変領域」、「HVR」または「HV」とは、配列が超可変性であり、及び／または、構造的に定義したループを形成する、本開示の抗MS4A4A抗体の抗体可変ドメインの領域などの抗体可変ドメインの領域のことを指す。一般的に、抗体には、6つのHVRがあり；3つが、V_H（H1、H2、H3）にあり、そして、3つが、V_L（L1、L2、L3）にある。ネイティブ抗体では、H3及びL3が、6つのHVRのうちで最も多様性に富んでおり、そして、特に、H3が、抗体に対して優れた特異性を与える上で独特の役割を果たすものと考えられている。重鎖のみからなる天然ラクダ抗体は、軽鎖がなくとも機能的であり、かつ、安定している。

10

【0084】

数多くのHVRの記載を、本明細書で使用しており、かつ、本明細書に含んでいる。一部の実施形態では、これらのHVRは、配列変動性に基づいたKabat相補性決定領域（CDR）とし得るものであり、そして、最も一般的に使用している（Kabat et al, 上掲）。一部の実施形態では、これらのHVRは、Chothia CDRとし得る。Chothiaは、どちらかと言えば、構造的ループの位置を指す（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。一部の実施形態では、これらのHVRを、AbM HVRとし得る。これらのAbM HVRは、Kabat CDRと、Chothia構造的ループとの間の折衷案を示しており、そして、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアで使用されている。一部の実施形態では、これらのHVRを、「接触」HVRとし得る。当該「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づくものである。これらのHVRのそれぞれの残基を、以下に示す。

20

【表1】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
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 (Kabat 付番法)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 付番法)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

30

【0085】

HVRは、次の「伸長HVR」を含み得る：V_Lでの24～36または24～34（L1）、46～56または50～56（L2）、及び、89～97または89～96（L3）、及び、V_Hでの26～35（H1）、50～65または49～65（好ましい実施形態）（H2）、及び、93～102、94～102または95～102（H3）。当該可変ドメイン残基を、これらの伸長HVR定義のそれぞれに対して、Kabat et al, 上掲に従って付番する。

40

【0086】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義するHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0087】

本明細書で使用する「アクセプターヒトフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリン

50

レームワーク、または、ヒトコンセンサスフレームワークに由来するV_LまたはV_Hフレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク、または、ヒトコンセンサスフレームワークに「由来する」アクセプターヒトフレームワークは、当該フレームワークと同じアミノ酸配列を含み得る、または、既存のアミノ酸配列変化を含み得る。一部の実施形態では、既存のアミノ酸変化の数は、10個以下、9つ以下、8つ以下、7つ以下、6つ以下、5つ以下、4つ以下、3つ以下、または、2つ以下である。既存のアミノ酸変化がV_Hに存在する場合、好ましいアミノ酸変化は、位置71H、73H、及び、78Hのうちの3つ、2つ、または、1つのみに生じ；例えば、当該位置のアミノ酸残基は、71A、73T、及び／または、78Aとし得る。ある実施形態では、V_Lアクセプターヒトフレームワークは、配列において、V_Lヒト免疫グロブリンフレームワーク配列、または、ヒトコンセンサスフレームワーク配列と同一である。

【0088】

10

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンのV_LまたはV_Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的には、ヒト免疫グロブリンのV_LまたはV_Hフレームワーク配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループから行う。一般的には、配列のサブグループは、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)などのサブグループである。例として、V_Lに関するものとして、サブグループは、Kabat et al, 上掲などのサブグループカップⅠ、カップⅡ、カップⅢ、または、カップⅣとし得る。さらに、V_Hに関するものとして、サブグループは、Kabat et al, 上掲などのサブグループⅠ、サブグループⅡ、または、サブグループⅢとし得る。

20

【0089】

例えば、本開示の抗MS4A4A抗体のアミノ酸修飾など、指定した位置での「アミノ酸修飾」とは、指定した残基の置換もしくは欠失、または、少なくとも1つのアミノ酸残基を、指定した残基に隣接するように挿入することを指す。指定した残基に「隣接する」とは、そこから1個～2個の残基までに挿入することを意味する。当該挿入は、指定した残基のN末端側またはC末端側で行い得る。本明細書における好ましいアミノ酸修飾は、置換である。

30

【0090】

例えば、本開示の親和性成熟抗MS4A4A抗体などの「親和性成熟した」抗体とは、当該抗体の1つ以上のHVRが、1つ以上の改変を有し、その結果、抗原に対する抗体の親和性が、当該改変（複数可）を有しない親抗体と比較して改善した抗体である。ある実施形態では、親和性成熟した抗体は、標的抗原に対して、ナノモル、または、ひいてはピコモルの親和性を有する。親和性成熟した抗体は、当該技術分野で公知の手法で生産する。例えば、Marks et al, Bio/Technology 10:779~783 (1992)は、V_H-及びV_L-ドメインのシャッフリングを用いた親和性成熟について記載している。HVR、及び／または、フレームワーク残基のランダム変異導入については、例えば、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); 及び、Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に記載されている。

40

【0091】

「Fv」は、完全な抗原認識部位、及び、抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。このフラグメントは、1つの重鎖可変領域ドメインと、1つの軽鎖可変領域ドメインが、非共有結合で緊密に結合した二量体からなる。これらの2つのドメインの折り畳

50

みが、抗原結合のためのアミノ酸残基を提供して、この抗体に抗原結合特異性を与える、6つの超可変ループ（H及びL鎖からそれぞれ3つのループ）が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン（または、抗原に特異的なHVRを3つしか含まない半分のFv）であっても、全結合部位よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識して結合する能力を有する。

【0092】

「sFv」または「scFv」とも略称される「一本鎖Fv」は、単一のポリペプチド鎖の状態で接続したV_H及びV_L抗体ドメインを含む、抗体フラグメントである。好ましくは、当該sFvポリペプチドは、V_HとV_Lドメインとの間にポリペプチドリinkerをさらに含み、このリンカーは、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成する、ことを可能にする。

【0093】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（ネイティブ配列Fc領域、または、アミノ酸配列バリエーションFc領域）が関与する生物活性のことを指しており、また、抗体のアイソタイプに応じて異なる。

【0094】

本明細書で使用する用語「Fc領域」とは、ネイティブ配列Fc領域、及び、バリエーションFc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用する。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は様々であるが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、アミノ酸残基の位置Cys226、または、Pro230から、そのカルボキシル末端にまで及ぶものと定義される。当該Fc領域のC末端リジン（EU付番システムでの残基447）は、例えば、抗体の生産もしくは精製の間に、または、抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することで除去し得る。したがって、インタクト抗体の組成は、すべてのK447残基を除去した抗体集団、K447残基を除去していない抗体集団、及び、K447残基を持つ抗体と持たない抗体との混合物を有する抗体集団を含み得る。本開示の抗体における使用に好適なネイティブ配列Fc領域として、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及び、IgG4がある。

【0095】

「ネイティブ配列Fc領域」は、自然界で認められるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。ネイティブ配列のヒトFc領域として、ネイティブ配列のヒトIgG1 Fc領域（非A、及び、Aアロタイプ）、ネイティブ配列ヒトIgG2 Fc領域、ネイティブ配列ヒトIgG3 Fc領域、及び、ネイティブ配列ヒトIgG4 Fc領域、ならびに、それらの天然バリエーションがある。

【0096】

「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは、1つ以上のアミノ酸置換（複数可）によって、ネイティブ配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、当該バリエーションFc領域は、ネイティブ配列Fc領域、または、親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を有しており、例えば、ネイティブ配列Fc領域、または、親ポリペプチドのFc領域に、約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは、約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書でのバリエーションFc領域は、好ましくは、ネイティブ配列Fc領域、及び／または、親ポリペプチドのFc領域に対して、少なくとも約80%の相同性、及び、最も好ましくは、それらに対して少なくとも約90%の相同性、より好ましくは、それらに対して少なくとも約95%の相同性を有する。

【0097】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体のことを表す。好ましいFcRは、ネイティブ配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）と結合する抗体であり、そして、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIのサブクラスの受容体があり、これらの受容体の対立遺伝子バリエーション、及び、選択的スプライシング形態を含み、FcγRII受容体として、同様のアミノ

酸配列を有し、主にその細胞質ドメインが異なるFcγRIIA（「活性化受容体」）と、FcγRIIB（「阻害性受容体」）を含む。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（「ITAM」）を含む。阻害性受容体FcγRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン系阻害性モチーフ（「ITIM」）を含む。その他のFcRは、今後同定されるものを含めて、本明細書での用語「FcR」に含まれる。また、FcRは、抗体の血清での半減期を長くすることができる。

【0098】

ペプチド、ポリペプチド、または、抗体配列に関して本明細書で使用する、「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」及び「相同性」は、配列を整列させ、必要に応じて、最大配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後に、配列同一性の一部としてあらゆる保存的置換を考慮しない、指定のペプチド、または、ポリペプチド配列でのアミノ酸残基と同一である候補配列でのアミノ酸残基のパーセンテージのことを指す。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当該技術分野の技術範囲に属する様々な方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、または、MEGALIGN（商標）（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピューターソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる当該技術分野において公知のあらゆるアルゴリズムなど、アラインメントを評価するための適切なパラメーターを決定することができる。

【0099】

同じエпитープに関して競合する抗体（例えば、中和抗体）の文脈で使用する用語「競合する」とは、試験する抗体が、共通の抗原（例えば、MS4A4A、または、そのフラグメント）に対するリファレンス分子（例えば、リガンド、または、リファレンス抗体）の特異的結合を予防または阻害（例えば、抑制）するアッセイによって決定する抗体間の競合のことを意味する。無数のタイプの競合結合アッセイを使用して、抗体が、別の抗体と競合するか否かを判断することができ、例えば；固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接または間接酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253を参照されたい）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Kirkland et al, 1986, J. Immunol. 137: 3614-3619）固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）；1-125ラベルを使用した固相直接ラベルRIA（例えば、Morel et al, 1988, Molec. Immunol. 25: 7-15）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Cheung, et al, 1990, Virology 176: 546-552を参照されたい）；及び、直接標識RIA（Moldenhauer et al, 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77-82）がある。一般的には、そのようなアッセイは、非標識試験抗体、及び、標識リファレンス抗体のいずれかを担持する固体表面または細胞に結合した精製抗原の使用を含む。競合阻害は、試験抗体の存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定して測定する。通常、当該試験抗体は、過剰に存在する。競合アッセイ（競合抗体）で同定した抗体として、リファレンス抗体と同じエпитープに対して結合する抗体と、立体障害を招くリファレンス抗体が結合するエпитープに対して十分近位の隣接エпитープに対して結合する抗体がある。競合結合を決定するための方法に関するさらなる詳細を、本明細書の実施例において説明する。通常、競合する抗体が過剰に存在すると、共通抗原に対するリファレンス抗体の特異的結合は、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97.5%、及び／または、ほぼ100%を阻害（例えば、抑制）する。

10

20

30

40

50

【0100】

本明細書で使用するMS4A4Aポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の「相互作用」として、タンパク質間相互作用、物理的相互作用、化学的相互作用、結合、共有結合、及び、イオン結合があるが、これらに限定されない。本明細書において、抗体が、2つのポリペプチドの間の相互作用を、攪乱、抑制、または、完全に解消する場合、当該抗体は、2つのポリペプチドの間の「相互作用を阻害する」。その抗体が、2つのポリペプチドのうち的一方に結合する場合、本開示の抗体は、2つのポリペプチドの間の「相互作用を阻害する」。一部の実施形態では、当該相互作用は、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97.5%、及び／または、ほぼ100%のいずれかで阻害することができる。

10

【0101】

用語「エピトープ」として、抗体が結合することができる、あらゆる決定基がある。エピトープは、その抗原を標的とする抗体が結合する抗原の領域であり、また、抗原がポリペプチドである場合、当該抗体と直接に接触する特定のアミノ酸を含む。大抵の場合、エピトープは、ポリペプチドに存在するが、一部の事例では、核酸などのその他の種類の分子に存在することができる。エピトープ決定因子は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基などの分子に属する化学的に活性な表面を含み、そして、特定の三次元構造特性、及び／または、特定の電荷特性を有することができる。一般的に、特定の標的抗原に特異的な抗体は、ポリペプチド、及び／または、高分子の複雑な混合物での標的抗原に関するエピトープを優先的に認識する。

20

【0102】

「アゴニスト」抗体、または、「活性化」抗体は、抗体が抗原と結合した後に、当該抗原の1つ以上の活性または機能を誘導する（例えば、強める）抗体である。

【0103】

「アンタゴニスト」抗体、または、「ブロックング」抗体、または、「阻害」抗体とは、当該抗体が、抗原と結合した後に、1つ以上のリガンドに対する抗原結合を抑制し、阻害し、及び／または、解消する（例えば、弱める）抗体、及び／または、当該抗体が抗原と結合した後に、当該抗原の1つ以上の活性または機能を抑制し、阻害し、及び／または、解消する（例えば、弱める）抗体である。一部の実施形態では、アンタゴニスト抗体、または、ブロックング抗体、または、阻害抗体は、1つ以上のリガンドへの抗原結合、及び／または、当該抗原の1つ以上の活性または機能を、実質的または完全に阻害する。

30

【0104】

本開示の単離した抗MS4A4A抗体などの「単離した」抗体は、その生産環境の成分から（例えば、自然に、または、組換えて）同定、分離、及び／または、回収したものである。好ましくは、当該単離した抗体は、その生産環境に由来するその他のすべての汚染成分とは関連がない。組換えトランスフェクト細胞から得られるものなど、その生産環境に由来する汚染成分は、一般的には、抗体の研究、診断、または、治療への使用を妨げる物質であり、そして、酵素、ホルモン、及び、その他のタンパク質性、または、非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施形態では、抗体を：（1）例えば、ローリー法で決定した抗体の95重量%を超えるまで、そして、一部の実施形態では、99重量%を超えるまで；（2）スピニングカップシーケンサーを使用して、N末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または、（3）クマシーブルー、または、好ましくは、銀染色を使用する非還元または還元条件下でのSDS-PAGEで均一になるまで精製する。単離した抗体は、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換えT細胞内の元の位置に抗体を含む。しかしながら、通常、単離したポリペプチドまたは抗体は、少なくとも1つの精製工程で調製する。

40

【0105】

本開示の抗MS4A4A抗体などの抗体をコードする「単離した」核酸分子とは、それが生産された環境において通常会合している少なくとも1つの汚染核酸分子から同定及び分離した核酸分子である。好ましくは、当該単離した核酸は、その生産環境に関連するす

50

すべての構成成分とは会合しない。本明細書のポリペプチド、及び、抗体をコードする単離した核酸分子は、自然界で認められる形態または状況とは異なる形態で存在する。したがって、単離した核酸分子は、細胞内に自然に存在する本明細書のポリペプチド、及び、抗体をコードする核酸とは区別される。

【0106】

本明細書で使用する用語「ベクター」とは、それに結合した別の核酸を輸送することができる核酸分子のことを指す。「プラスミド」は、ベクターの一種であり、さらなるDNAセグメントをライゲーションすることができる環状二本鎖DNAのことを指す。ファージベクターは、別の種類のベクターである。別の種類のベクターとして、ウイルスベクターがあり、さらなるDNAセグメントを、ウイルスゲノムに対してライゲーションすることができる。特定のベクター（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、及び、エピソード哺乳動物ベクター）は、導入した宿主細胞で自己複製が可能である。その他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入すると、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、これにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結した遺伝子の発現を導くことができる。そのようなベクターは、本明細書では、「組換え発現ベクター」、または、簡略して「発現ベクター」と称する。一般的に、組換えDNA技法で利用する発現ベクターは、プラスミドの形態である場合が多い。本明細書では、「プラスミド」及び「ベクター」は、プラスミドが、ベクターのうちで最も一般的に使用される形態であるため、互換的に使用し得る。

【0107】

本明細書で互換的に使用する「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、あらゆる長さのヌクレオチドの重合体のことを指すものであり、そして、DNA及びRNAを含む。当該ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、及び／または、それらの類似体、または、DNAもしくはRNAポリメラーゼにより、または、合成反応により重合体に組み込まれ得るあらゆる基質とすることができる。

【0108】

「宿主細胞」は、ポリヌクレオチド挿入物を組み込むためのベクター（複数可）のレシピエントになることができる、または、レシピエントになっている個々の細胞、または、細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、そして、その子孫は、自然発生的、偶発的、または、意図的な変異により、起源の親細胞と必ずしも完全に（形態学的に、または、ゲノムDNA相補鎖において）同一でなくともよい。宿主細胞は、本開示のポリヌクレオチド（複数可）をインビボでトランスフェクションした細胞を含む。

【0109】

本明細書で使用する用語「膜TREM2」、「原形質膜TREM2」、及び「細胞表面TREM2」は、互換可能に使用する。

【0110】

本明細書で使用する「担体」は、使用する用量、及び、濃度で、そこに曝露される細胞または哺乳動物に対して無毒であり、医薬として許容可能な担体、賦形剤、または、安定剤を含む。

【0111】

本細書で使用する用語「予防する」とは、個体における特定の疾患、障害、または、病態の発生または再発に関して予防を提供することを含む。個体は、特定の疾患、障害、または、病態にかかりやすく、影響を受けやすく、または、そのような疾患、障害、または、病態を発症するリスクがあるが、未だに、当該疾患、障害、または、病態であると診断されていない。

【0112】

本明細書で使用する、特定の疾患、障害、または、病態を発症する「リスクのある」個体は、検出可能な疾患または疾患の症状を有し得る、または、有し得ず、そして、本明細書に記載した治療法を行う前に、検出可能な疾患または疾患の症状を示し得る、または、示し得ない。「リスクがある」とは、個体が、特定の疾患、障害、または、病態の発症と

相関する測定可能なパラメーターである当該技術分野で公知の1つ以上のリスク因子を有することを示す。これらのリスク因子の1つ以上を有する個体は、これらのリスク因子の1つ以上を持たない個体よりも、特定の疾患、障害、または、病態を発症する可能性が高くなる。

【0113】

本明細書で使用する用語「治療」とは、臨床病理の経過期間で治療を受けている個体の自然な経過を変えるようにデザインした臨床介入のことを指す。治療の望ましい効果として、進行速度の低下、病的状態の改善または緩和、及び、特定の疾患、障害、または、病態の寛解または予後の改善がある。例えば、特定の疾患、障害、または、病態に関連する1つ以上の症状が緩和または解消した場合、個体の「治療」は成功している。

10

【0114】

「有効量」とは、所望の治療的または予防的結果を達成するために必要な投薬量及び期間での少なくとも有効な量のことを指す。有効量は、1回以上の投与で提供することができる。本明細書に記載の有効量は、個体の病状、年齢、性別、及び、体重、ならびに、個体において所望の応答を誘発する治療の能力などの要因によって変化し得る。有効量は、治療でのあらゆる毒性または有害な効果よりも、治療的に有益な効果が勝る量でもある。予防的使用の場合、有益または望ましい結果として、疾患の生化学的、組織学的、及び／または、行動的症状、その合併症、及び、疾患の進行過程での中間的病理学的表現型など、疾患のリスクの排除または軽減、重症度の軽減、または、発症の遅延などの結果がある。治療的使用の場合、有益または望ましい結果として、疾患が関与する1つ以上の症状の抑制、疾患を煩った方々の生活の質の向上、疾患の治療に必要なその他の薬物の投与量の抑制、標的化などを介した別の薬物の効果の改善、疾患の進行の遅延、及び／または、生存期間の延長などがある。薬物、化合物、または、医薬組成物の有効量は、直接的または間接的のいずれかで予防的または治療的処置を達成するのに十分な量である。臨床の関連での理解では、薬物、化合物、または、医薬組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または、医薬組成物と組み合わせて達成し得る、または、達成し得ない。したがって、「有効量」は、1つ以上の治療薬を投与する状況で考慮し得るものであり、そして、単一の薬剤が、1つ以上のその他の薬剤と組み合わせて、所望の結果を達成し得る、または、達成するのであれば、有効量で与えられると考え得る。

20

【0115】

治療、予防、または、リスクの軽減を目的とする「個体」とは、ヒト、飼育動物、及び、家畜、ならびに、動物園展示用動物、競技用または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、アレチネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどを含む、哺乳動物に分類されるあらゆる動物のことを指す。一部の実施形態では、個体は、ヒトである。

30

【0116】

本明細書で使用する、別の化合物または組成物との「併用」投与とは、同時投与、及び／または、異なる時点での投与を含む。また、併用投与は、合剤としての投与、または、別個の組成物としての投与を含み、異なる投与頻度または間隔で、かつ、同じ投与経路、または、異なる投与経路を使用することを含む。一部の実施形態では、併用投与は、同じ治療レジメンの一部としての投与である。

40

【0117】

本明細書で使用する用語「約」とは、それぞれの数値の通常の誤差範囲のことを指しており、当該技術分野の当業者は容易に理解する。本明細書において「約」を付した値またはパラメーターへの言及は、その数値、または、パラメーターそれ自体を対象にした実施形態を含む（及び、説明する）。

【0118】

本明細書、及び、添付した特許請求の範囲で使用する単数形「a」、「an」、及び、「the」は、特に断りのない限り、複数形を含む。例えば、「抗体」への言及は、1つの抗体から、モル量の数多くの抗体までを指しており、そして、当業者に公知のそれらの

50

等価物なども含む。

【0119】

本明細書で説明する本開示の態様及び実施形態は、態様、及び、実施形態を「含む (comprising)」、「からなる (consisting)」、及び、「から本質的になる (consisting essentially of)」を含む、ことを理解されたい。

【0120】

II. 抗MS4A4A抗体

本明細書では、抗MS4A4A抗体を提供する。本明細書で提供する抗体は、例えば、MS4A4A関連障害の診断または治療に有用である。

【0121】

ある態様では、本開示は、本開示のMS4A4Aタンパク質のエピトープに結合する単離した（例えば、モノクローナル）抗体を提供する。本開示のMS4A4Aタンパク質として、哺乳動物MS4A4Aタンパク質、ヒトMS4A4Aタンパク質、マウスMS4A4Aタンパク質、及び、カニクイザルMS4A4Aタンパク質があるが、これらに限定されない。本開示のMS4A4Aタンパク質は、天然に存在するMS4A4Aのバリエーションを含む。

【0122】

ヒトMS4A4Aは、膜糖タンパク質をコードする239アミノ酸のタンパク質である。ヒトMS4A4Aのアミノ酸配列を、配列番号1に示す：

MHQTYSRHC RPEESTFSAAMTTMQGMEQAMP GAGPGVPQL
GNMAV I HSHLWKGLQEKFLKGEPKVLGVVQIL TALMSLSM
GITMMCMASNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIISGSL SIA
AGIRTTKGLVRGSLGMNITSSVLAASGILINTFSLAFYSF
HHPYCNYYGNSNNCHGTMSILMGLDGMVLLLSVLEFCIAV
SLSAFGCKVLCCTPGGVVLIILPSHSHMAETASPTPLNEV

【0123】

加えて、マウスMS4A4Aのアミノ酸配列を、配列番号2に示す：

MLVIQGT EQSALEAGYGAQQNGQPLYVNSH SWKRMTEKFL
KGEPKILGIVQIVIAIMNLSIGIMMIATVSTGEIPPSSV
YIGYPIWGS LMFIIISGSFSIVAGRRTTKGLVRSSLGLNIT
SSVFAFSGIVISSLSPGIYSFHVYYCTYRGSSEGC HMTLS
ILMGLDIVVVVLSVLEFCIGVSLSAFGCRMCCNP GGVM I
IMPSNPTKAETANPVT LQSGLMPP EHQERNVPENMH

【0124】

加えて、カニクイザル (cyno) MS4A4Aのアミノ酸配列を、配列番号3に示す：

HQTYRRHC RPEESTFSAAMTTMQGMEQATPGAGPGVPQLG
NMAVVHSHLWKGLQEKFLKGEPKVLGVVQILIALMSLSMG
ITMMCVA FSA YGHYPISVYIGYTIWGSVMFIISGSL SIAA
GIRTTKGLVRGSLGMNITSSVLA VSA I LINTISLTIYSFY
HRYCNYYGNPNCHGT VSI LMGM DGMVLLLSVLEFCIAVS
LSA FGCKA ICCTPGGVVLIIPSN SHMAE AAPLTPLNEV

【0125】

一部の実施形態では、MS4A4Aを、細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、骨髄細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、脳細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、成熟星状細胞など、これに限定されない星状細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、乏突起膠細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、ミクログリア細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、及び、T細胞などであるが、これらに限定されない免疫細胞で発現する。一部

の実施形態では、MS4A4Aを、嗅覚細胞で発現する。一部の実施形態では、MS4A4Aを、細胞表面で発現する。

【0126】

本開示のMS4A4Aタンパク質は、細胞質ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基1～64；配列番号1を参照されたい）；膜貫通ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基65～85）；ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基86～98に対応する細胞外ドメイン（細胞外ドメイン1；ECL1）；膜貫通ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基99～119）；細胞質ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基120～137）；膜貫通ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基138～158）；アミノ酸残基159～179に対応する細胞外ドメイン（細胞外ドメイン2；ECL2）；膜貫通ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基180～200）；及び、細胞質ドメイン（ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基201～239）などの幾つかのドメインがあるが、これらに限定されない。加えて、本開示のMS4A4Aタンパク質は、脳、ニューロン、グリア細胞、内皮細胞、血管周囲細胞、周皮細胞などであるが、これらに限定されない、数多くの組織、及び、細胞で発現する。

10

【0127】

マクロファージ及びミクログリア細胞機能でのMS4A4A

ミクログリアなどの中枢神経系（CNS）のマクロファージ及び骨髄細胞は、本質的に多様な表現型及び機能を有する。マクロファージは、インビトロで、食細胞性、及び、潜在的炎症性、表現型、及び、活性が異なる、M1マクロファージ及びM2マクロファージに分けることができる。例えば、末梢器官では、M1表現型を有するマクロファージは、炎症誘発性及び抗菌性の表現型及び機能を有するものと考えられており、一方で、M2表現型を有するマクロファージは、抗炎症性表現型及び機能を有しており、さらに恒常的な状態にあると考えられている。

20

【0128】

健康で恒常性状態に関連するミクログリアは、M1マーカー（例えば、CD16、MHCクラスII、CD86）の発現と比較して、それらの細胞表面で、より多くのM2マーカー（例えば、CD200R、CD163、及び、CD115など）を発現する（Ginhoux and Prinz, 2015, Cold Spring Harb Perspect Biol, 7:a020537）。しかしながら、アルツハイマー病のマウスモデルと、ヒトアルツハイマー病との両方の疾患関連ミクログリア（DAM）は、炎症性または活性化状態にある。炎症性または活性化状態の疾患関連ミクログリアは、アルツハイマー病、及び、その他の神経変性疾患に関連する病理の抑制に積極的な役割を果たしており、有益であると考えられている。

30

【0129】

MS4A4Aの発現は、インビトロで、M2マクロファージにおいて高まっており、また、MS4A4Aは、M2マクロファージの新規の細胞表面マーカーであることが示唆されている。加えて、MS4A4Aは、肥満細胞でのcKitの細胞表面輸送を調節することも示されており、肥満細胞の脱顆粒と生存調節におけるMS4A4Aの役割を示唆している（Cruse et al, 2015, Molecular Biol Cell, 26:1711-1727）。まとめると、これらの報告での知見は、MS4A4Aを標的にすると、M1及びM2マクロファージ表現型に関連する様々なマクロファージ細胞表面受容体の再利用、発現、及び／または、分解に影響を与え、それが故に、機能と活動に影響を与える可能性があることを示唆している。

40

【0130】

本開示の抗MS4A4A抗体は、M2マクロファージ細胞表面マーカーの発現に影響を与える。特に、本開示の抗MS4A4A抗体は、マクロファージにおけるCD200R、Dectin-1、及び、CD163の細胞表面発現を抑制しており、このことは、抗MS4A4A抗体が、M2マクロファージ細胞表面受容体の発現を抑制することで、マクロファージの分極、機能、及び／または、活性を調節することを示唆している。本開示の抗

50

MS4A4A抗体は、M2マクロファージ細胞表面受容体を抑制しており、このことは、本開示の抗MS4A4A抗体が、ミクログリア細胞の生理学的状態を、例えば、炎症性または活性化状態が高まった、より保護的な表現型へと（例えば、M1表現型が多くなるように）改変する上で有効であることを示唆している。したがって、本開示の抗MS4A4A抗体は、一部では、マクロファージ及びミクログリアの表現型を、炎症誘発性及び活性化状態に改変することで、アルツハイマー病、及び、その他の神経変性障害の治療において有用になる。

【0131】

本開示の抗MS4A4A抗体は、ミクログリアの活性化状態に影響を与える。本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで、ミクログリア活性化（例えば、C型レクチンドメインファミリー7メンバーA（CLEC7A））、ミクログリア遊走（例えば、イノシトール1,4,5-三リン酸受容体2（ITPR2））、及びミクログリア増殖（例えば、抗原KI-67（MKI67））に関連するタンパク質のmRNAレベルを引き上げた。加えて、本開示の抗MS4A4A抗体は、ミクログリア活性化マーカーIL1RN、SPP1、及びPLCG2のmRNAレベルを高めた。また、本開示の抗MS4A4A抗体は、恒常性ミクログリアマーカーであるプリン作動性受容体P2RY12及びCX3Cケモカイン受容体1（CX3CR1）のmRNAレベルを低下させた。したがって、本開示の抗MS4A4A抗体は、ミクログリアの活性化、遊走、及び増殖に関連するタンパク質の様々なmRNAレベルを引き上げること；及び、ミクログリアの恒常性に関連するタンパク質の様々なmRNAレベルを下げることにより証明されているように、インビボで、ミクログリアを活性化する上で有効である。

【0132】

MS4A4A及びTREM2の発現

神経変性疾患は、一部では、中枢神経系（CNS）の欠陥免疫機能によって特徴決定される。例えば、CNS骨髄細胞の一部の生存能力と機能の低下は、ミクログリアに限ったものではなく、アルツハイマー病などの神経変性疾患に対する感受性に寄与するものと考えられている。骨髄細胞の生存能力、及び／または、機能を高める薬理的介入は、そのような神経変性疾患、及び、障害の発症、重症度、または、進行を改善するための効果的な治療を提供する。

【0133】

骨髄細胞2（TREM2）で発現するトリガー受容体は、マクロファージ、樹状細胞、単球、皮膚のランゲルハンス細胞、クッパー細胞、破骨細胞、ミクログリアなどの骨髄細胞で主に発現する免疫グロブリン様受容体である。TREM2は、実験的自己免疫性脳脊髄炎、及び、アルツハイマー病の間に、CNSのミクログリア及び浸潤性マクロファージで高度に発現する（Piccio et al, 2007, Eur J Immunol, 37:1290-1301; Wang, 2015, Cell, 160:1061-1071）。当該TREM2経路は、CNS骨髄細胞の生存能力と機能の重要な調節因子と考えられている。

【0134】

ヒトの遺伝学研究のデータは、MS4A4AとTREM2との間に強い遺伝的関連があり、かつ、アルツハイマー病に罹患しやすいことを示唆している（Piccio et al, 2016, Acta Neuropathol, 131:925-9330）。特に、アルツハイマー病の予防のためのMS4A4A対立遺伝子は、患者の脳脊髄液でのsTREM2レベルの増大に関連している。

【0135】

本発明の抗MS4A4A抗体は、マクロファージにおける細胞ATPレベルを引き上げており、このことは、抗MA4A4A抗体が、細胞（例えば、マクロファージ、骨髄細胞、ミクログリア）の生存能力及び機能の増大、維持、または増強に有効であることを示している。加えて、本発明の抗MS4A4A抗体は、市販の抗MS4A4A抗体5C12が、培養したヒトマクロファージの上清でのsTREM2レベルを抑制したことを報告した

従前の報告とは対照的に、マクロファージでの s T R E M 2、及び、m T R E M 2 レベルを引き上げた (Deming et al, 2018, bioRxiv, doi:dxdoi.org/10.1101/352179)。アルツハイマー病に関する MS 4 A 4 A 保護対立遺伝子は、s T R E M 2 レベルの増大と関連しているので、本明細書で提供した結果は、本発明の抗 MS 4 A 4 A 抗体が、s T R E M 2、及び、m T R E M 2 レベルの増大を受けて、アルツハイマー病などの神経変性疾患、及び、障害での保護的表現型を、模倣または複製することを示すものである。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) における T R E M 2 の細胞表面発現を、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 90 %、少なくとも 100 %、少なくとも 125 %、少なくとも 150 %、少なくとも 200 %、または少なくとも 250 % 増やす。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) における可溶性 T R E M 2 レベルを、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 100 % 引き上げる。

【0136】

一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) での m T R E M タンパク質のレベルを引き上げ、E C 50 は約 0.028 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約 0.039 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) での s T R E M タンパク質のレベルを引き上げ、E C 50 は約 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約 0.069 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。なおもその他の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) での A T P レベルを引き上げ、E C 50 は約 0.010 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約 0.021 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) での A T P レベルを、抗 MS 4 A 4 A 抗体の非存在下でそれら細胞での A T P のレベルの約 1.2 倍、約 1.4 倍、または約 1.7 倍引き上げる。

【0137】

一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、インビボで (例えば、非ヒト霊長類、またはヒトにおいて)、可溶性 T R E M 2 レベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を投与する前のインビボでの血清におけるベースライン可溶性 T R E M 2 レベルよりも、インビボで血清での可溶性 T R E M 2 レベルを、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 25 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 90 %、少なくとも 100 %、少なくとも 125 %、または少なくとも 150 % 引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を投与する前のインビボでの血清におけるベースライン可溶性 T R E M 2 レベルよりも、インビボで血清での可溶性 T R E M 2 レベルを、約 50 % 引き上げる。

【0138】

一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を投与する前のインビボでの血清における可溶性 T R E M 2 レベルと比較して、インビボで血清での可溶性 T R E M 2 レベルを、少なくとも 1.1 倍、少なくとも 1.2 倍、少なくとも 1.3 倍、少なくとも 1.4 倍、少なくとも 1.5 倍、少なくとも 1.6 倍、少なくとも 1.7 倍、少なくとも 1.8 倍、少なくとも 1.9 倍、または少なくとも 2 倍引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体は、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を投与する前のインビボでの血清における可溶性 T R E M 2 レベルと比較して、インビボで血清での可溶性 T R E M 2 レベルを、約 1.5 倍引き上げる。

【0139】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでの血清における可溶性TREM2レベルと比較して、インビボで血清での可溶性TREM2レベルを、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間、少なくとも7日間、少なくとも8日間、少なくとも9日間、少なくとも10日間、少なくとも11日間、少なくとも12日間、少なくとも13日間、少なくとも14日間、少なくとも15日間、少なくとも16日間、少なくとも17日間、少なくとも18日間、少なくとも19日間、または少なくとも20日間引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでの血清における可溶性TREM2レベルと比較して、インビボで血清での可溶性TREM2レベルを、少なくとも20日間引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでの血清における可溶性TREM2レベルと比較して、インビボで血清での可溶性TREM2レベルを、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも96時間、少なくとも120時間、少なくとも144時間、少なくとも168時間、少なくとも192時間、少なくとも216時間、少なくとも240時間、少なくとも264時間、少なくとも288時間、少なくとも312時間、少なくとも336時間、少なくとも360時間、少なくとも384時間、少なくとも408時間、432時間、少なくとも456時間、または少なくとも480時間引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでの血清における可溶性TREM2レベルと比較して、インビボで血清での可溶性TREM2レベルを、少なくとも480時間引き上げる。

【0140】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおけるベースライン可溶性TREM2レベルから、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも225%、少なくとも250%、少なくとも275%、少なくとも300%、少なくとも325%、少なくとも350%、少なくとも375%、または少なくとも400%引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおけるベースライン可溶性TREM2レベルから、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、約300%引き上げる。

【0141】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおける可溶性TREM2レベルと比較して、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、少なくとも1.4倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.8倍、少なくとも2.0倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.8倍、少なくとも3.0倍、少なくとも3.2倍、少なくとも3.4倍、少なくとも3.6倍、少なくとも3.8倍、または少なくとも4.0倍増やす。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおける可溶性TREM2レベルと比較して、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、約2倍から約4倍増やす。

【0142】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおける可溶性TREM2レベルと比較して、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、または少なくとも4日間引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおける可溶性TREM2レベルと比較して、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、少なくとも4日間引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、

本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおける可溶性TREM2レベルと比較して、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、または少なくとも96時間は引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、本開示の抗MS4A4A抗体を投与する前のインビボでのCSFにおける可溶性TREM2レベルと比較して、インビボでCSFでの可溶性TREM2レベルを、少なくとも96時間は引き上げる。

【0143】

本明細書で提供する証拠は、本開示の抗MS4A4A抗体が、TREM2に影響を与えることを実証しているが、その他の経路を介して作用する抗体は除外しない。

【0144】

アンタゴニスト抗体

一部の実施形態では、MS4A4Aタンパク質に結合する抗体として、MS4A4Aとそのリガンド（複数可）との間の相互作用を妨げる、あるいは、リガンドの存在下で、MS4A4Aのシグナルを細胞質へ伝達することを妨げることで、MS4A4Aに結合して、1つ以上のMS4A4A活性を阻害するアンタゴニスト抗体があり得る。一部の実施形態では、本開示のアンタゴニスト抗体は、本開示のアゴニスト抗体のエピトープ特異性を有し得るが、Fcγ受容体に結合することができず、したがって、例えば、MS4A4A受容体のクラスターを形成することができないFcドメインを有する。

【0145】

一部の実施形態では、本開示の抗体は、アンタゴニスト抗体である。一部の実施形態では、当該アンタゴニスト抗体は、1つ以上のMS4A4A活性を阻害する。一部の実施形態では、当該アンタゴニスト抗体は、1つ以上のMS4A4A依存性遺伝子の活性を抑制する。一部の実施形態では、当該アンタゴニスト抗体は、MS4A4Aと、1つ以上のMS4A4Aリガンドとの間の相互作用を阻害する。一部の実施形態では、当該アンタゴニスト抗体は、MS4A4Aシグナル伝達を阻害する。一部の実施形態では、当該アンタゴニスト抗体は、MS4A4Aと、1つ以上のMS4A4Aリガンドとの間の相互作用を阻害し、そして、MS4A4Aシグナル伝達を阻害する。

【0146】

一部の実施形態では、MS4A4Aタンパク質のレベルのダウンレギュレーションまたはMS4A4A活性の抑制は、細胞内のMS4A4Aタンパク質のレベルをダウンレギュレーションするまたは抑制する抗MS4A4A抗体で達成する。一部の実施形態では、MS4A4Aタンパク質のレベルのダウンレギュレーションまたはMS4A4A活性の抑制は、当業者に公知で、かつ利用可能な方法を使用して、例えば、アンチセンス方法論、遺伝子治療などを使用して、MS4A4A核酸発現またはレベルをダウンレギュレーションして達成する。したがって、一部の実施形態では、MS4A4Aタンパク質のレベルまたは活性の抑制は、本開示の抗MS4A4A抗体を使用して、またはMS4A4A核酸（例えば、mRNA）の発現またはレベルを下げることで達成する。

【0147】

一部の実施形態では、アゴニスト抗体機能のために、抗体架橋が必要である。抗体架橋は、インビトロでの二次抗体への結合を介して、または、インビボでのFc受容体への結合を介して作り出すことができる。例えば、アンタゴニスト抗体は、インビトロでのビオチン／ストレプトアビジン架橋、または、二次抗体結合を介して、アゴニスト抗体へと変換することができる（例えば、Gravestein et al, 1996、J. Exp. Med. 184: 675-685; Gravestein et al, 1994、International Immunol, 7: 551-557を参照されたい）。アゴニスト抗体は、受容体リガンドの生物学的活性を模倣する、または、受容体凝集を増強することで、それらの活性を発揮し、それにより、受容体シグナル伝達を活性化し得る。一部の実施形態では、抗体架橋を存在させないことが、アンタゴニスト活性のために必要となる。アンタゴニスト抗体は、受容体－リガンド相互作用をブロックすることで、それらの活性を発揮し得る。

10

20

30

40

50

【0148】

ゲルゾリン、オステオポンチン、及びアルツハイマー病保護対立遺伝子の表現型模写

MS4A遺伝子クラスターには3つのSNPがあり、それらは、遅発性アルツハイマー病のリスク増大に関連している。これらには、MS4A4Aのrs4938933、MS4A4Eのrs670139、そして、MS4A6Aのrs610932がある (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)。加えて、MS4A4A遺伝子座SNP (rs2304933、及びrs2304935) は、MS4A4Aのレベルの増加、及び遅発性アルツハイマー病 (LOAD) を含むアルツハイマー病のリスクの増加と関連している (Allen et al, 2012, Neurology, 79:221-228)。

10

【0149】

MS4A遺伝子クラスターに関連するアルツハイマー病に関連する遺伝的変異 (SNP) が特定されている。それらのバリエーション対立遺伝子の1つが、rs1582763であり、これは、CSF sTREM2レベルの増大、アルツハイマー病のリスクの低下、そして、発症年齢の遅延に関連しているため、保護対立遺伝子とみなされている (Deming et al, 2018, bioRxiv, doi:dx.doi.org/10.1101/352179)。このrs1582763保護対立遺伝子は、血中でのMS4A4A mRNAレベルの低下に関連している。さらに、これらの知見は、rs1582763対立遺伝子が、MS4A4Aレベルを低下させ、アルツハイマー病のリスクまたは重症度を抑制することで、保護的な役割を果たすことを示唆している。この保護rs1582763は、オステオポンチンの発現レベルの増大、及びゲルゾリンのレベルの増大にも関連している。本発明の抗MS4A4A抗体は、少なくともMS4A4A発現の抑制、オステオポンチン発現の増大、ゲルゾリン発現の増大、及び／またはsTREM2レベルの増大に関して、保護対立遺伝子でのこれらの態様を表現型模写する上で有効である。本開示の一部の態様では、抗MS4A4A抗体を提供し、当該抗体は、アルツハイマー病のリスクの低下、及び／またはアルツハイマー病の発症年齢の遅延に関連するMS4Aの1つ以上の対立遺伝子を表現型模写する。

20

【0150】

本開示の抗MS4A4A抗体は、ヒト末梢血単核細胞由来マクロファージにおいて、オステオポンチン (SPP1) のmRNAレベルを高め、また、ゲルゾリン (GSN) のmRNAレベルを高めた。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、オステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、ゲルゾリンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) におけるオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも250%引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞 (例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア) におけるゲルゾリンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも250%引き上げる。

30

40

【0151】

本開示の抗MS4A4A抗体は、非ヒト霊長類においてオステオポンチン (SPP1)

50

レベルを高めた。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで（例えば、非ヒト霊長類またはヒトにおいて）、オステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、血清及び／またはCSFにおけるオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、血清及び／またはCSFでのオステオポンチンのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも250%引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、脳内のオステオポンチンのタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、前頭葉及び／または海馬におけるオステオポンチンのタンパク質のレベルを引き上げる。

【0152】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、オステオポンチン及びゲルゾリンの発現の増加に関して、保護rs1582763対立遺伝子を表現型模写する。その他の態様では、本開示の抗MS4A4A抗体は、オステオポンチン、ゲルゾリン、及び／またはsTREM2の発現を高める上で有効であり、保護rs1582763対立遺伝子と同様に、アルツハイマー病のリスク及び／または重症度の抑制において生物学的に活性である。このデータは、SPP1とGSNが、rs1582763対立遺伝子に関連する保護生物活性の薬力学的マーカーであることを示した。

【0153】

CSFR1及びIL1RNの発現

本開示の抗MS4A4A抗体は、非ヒト霊長類においてCSF1Rレベルを高めた。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、インビボで（例えば、非ヒト霊長類またはヒトにおいて）、CSF1RのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、血清及び／またはCSFにおけるCSF1RのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、血清及び／またはCSFでのCSF1RのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも250%引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、脳内のCSF1Rのタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、前頭葉及び／または海馬におけるCSF1Rのタンパク質のレベルを引き上げる。

【0154】

CSF1R欠損症は、脳内のミクログリアの発達に悪影響を及ぼし（Swerdlow et al (2000) *Neurology*, 111:300-311; Baba et al (2006) *Acta Neuropath*, 111:300-311）、そして、最近の研究は、CSF1R遺伝子の変異と、軸索スフェロイド及び色素性グリアを伴う成人発症性白質脳症（ALSP）、及びスフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症（HDL S）などの様々な障害との関連を突き止めている（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）。本開示の抗MS4A4A抗体は、CSF1R阻害後のヒトマクロファージの細胞死を抑制し、その生存を持続させた。したがって、一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、ALSPまたはHDL SなどのCSF1R欠損疾患または障害を有する個体を治療する上で

有用である。

【0155】

本開示の抗MS4A4A抗体は、ヒト末梢血単核細胞由来マクロファージにおいてIL1RNレベルを高めた。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、IL1RNのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、IL1RNのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを引き上げる。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞（例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア）におけるIL1RNのmRNA及び／またはタンパク質のレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも250%引き上げる。

10

【0156】

GPNMB発現

GPNMB（糖タンパク質非転移性黒色腫タンパク質B）；は、組織マクロファージやミクログリアなどの複数の細胞型で発現する表面糖タンパク質である。幾つかの遺伝的バリエーションが、パーキンソン病（PD）のリスクに関連している。GPNMBタンパク質のレベルは、PD患者の黒質で上昇しており、また、GPNMBレベルは、リソソームストレス後に高まる（Moloney et al., 2018, Neurobio Dis. 120:1-11）。加えて、GPNMB発現の増大は、SNP rs199347に関連しており、このリスクSNPは、GPNMB遺伝子内に位置している（Murthy et al, Neurogenetics, 2017, 18:121-133）。

20

【0157】

本開示の抗MS4A4A抗体は、ヒト初代マクロファージにおけるGPNMB細胞表面タンパク質のレベルを低下させた。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、骨髄細胞（例えば、マクロファージ、ヒトマクロファージ、ミクログリア）におけるGPNMB細胞表面タンパク質のレベルを、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%引き下げる。GPNMBレベルの増大は、PDのリスク対立遺伝子に関連しているため、抗MS4A4A抗体を加えた後のGPNMBの低下は、PDの治療手段を提供し得る。

30

【0158】

A. 例示的な抗体、及び特定のその他の抗体の実施形態

一部の実施形態では、本明細書では：（a）配列番号94、108、116、146、147、308、及び311からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号94、108、116、146、147、308、及び311からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H1；（b）配列番号96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309、及び312からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309、及び312からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H2；（c）配列番号100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310、及び313からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310、及び313からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H3；（d）配列番号103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314、及び317からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号103、104、113、

40

50

130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314、及び317からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L1；(e)配列番号105、106、114、139、140、141、142、143、160、161、315、及び318からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号105、106、114、139、140、141、142、143、160、161、315、及び318からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107、115、144、145、163、316、及び319からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号107、115、144、145、163、316、及び319からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L3、から選択する少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む抗MS4A4A抗体を提供する。

10

【0159】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号94及び308からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号94及び308からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H1；(b)配列番号96、97、98、99、及び309からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号96、97、98、99、及び309からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H2；(c)配列番号100、101、102、及び310からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号100、101、102、及び310からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H3；(d)配列番号103、104、及び314からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号103、104、及び314からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L1；(e)配列番号105、106、及び315からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号105、106、及び315からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107及び316からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号107及び316からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L3、から選択する少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む抗MS4A4A抗体を提供する。

20

30

【0160】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号108のアミノ酸配列、または配列番号108のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H1；(b)配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H2；(c)配列番号112のアミノ酸配列、または配列番号112のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H3；(d)配列番号113のアミノ酸配列、または配列番号113のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L1；(e)配列番号114のアミノ酸配列、または配列番号114のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L2；及び(f)配列番号115のアミノ酸配列、または配列番号115のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L3、から選択する少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む抗MS4A4A抗体を提供する。

40

【0161】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号116のアミノ酸配列、または配列番号116のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H1；(b)配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号118、119、120、121、及び122からな

50

る群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H2；(c)配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H3；(d)配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L1；(e)配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L2；及び(f)配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L3、から選択する少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0162】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H1；(b)配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H2；(c)配列番号154のアミノ酸配列、または配列番号154のアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-H3；(d)配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L1；(e)配列番号159、160、及び161からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号159、160、及び161からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L2；及び(f)配列番号163からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号163からなる群から選択するアミノ酸と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸を含むHVR-L3、から選択する少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0163】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号97のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号98のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号103のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号101のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号103のアミノ酸配列

を含むHVR-L1；(e)配列番号106のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号96のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号102のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3；または、(a)配列番号94のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号99のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号100のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号107のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

10

【0164】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号308のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号309のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号310のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号314のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号315のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号316のアミノ酸配列を含むHVR-L3；または、(a)配列番号311のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号312のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号313のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号317のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号318のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号319のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

20

【0165】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号110のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3；または、(a)配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号111のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

30

【0166】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号118のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号123のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号130のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号139のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号144のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号119のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号123のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号130のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号139のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号144のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号120のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号123のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号130のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号139のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号144のアミノ酸配列を含むHVR-L3；(a)配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号121のアミノ酸配列を含むHVR-H2；(c)配列番号123のアミノ酸配列を含むHVR-H3；(d)配列番号130のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(e)配列番号139のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(f)配列番号144のアミノ酸配列を含むHVR-L3。

40

50

50

50

30

50

R-L2；及び（f）配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3；（a）配列番号147のアミノ酸配列を含むHVR-H1；（b）配列番号151のアミノ酸配列を含むHVR-H2；（c）配列番号154のアミノ酸配列を含むHVR-H3；（d）配列番号158のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（e）配列番号159のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び（f）配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3；（a）配列番号146のアミノ酸配列を含むHVR-H1；（b）配列番号152のアミノ酸配列を含むHVR-H2；（c）配列番号154のアミノ酸配列を含むHVR-H3；（d）配列番号156のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（e）配列番号161のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び（f）配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3；（a）配列番号146のアミノ酸配列を含むHVR-H1；（b）配列番号153のアミノ酸配列を含むHVR-H2；（c）配列番号154のアミノ酸配列を含むHVR-H3；（d）配列番号158のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（e）配列番号159のアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び（f）配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

10

【0168】

一部の実施形態では、本明細書では、（a）配列番号94のアミノ酸配列、または配列番号94のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；（b）配列番号96、97、98、及び99からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号96、97、98、及び99からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び（c）配列番号100、101、及び102からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号100、101、及び102からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのV_H HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

20

【0169】

一部の実施形態では、本明細書では、（a）配列番号308のアミノ酸配列、または配列番号308のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；（b）配列番号309のアミノ酸配列、または配列番号309のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び（c）配列番号310のアミノ酸配列、または配列番号310のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのV_H HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

30

【0170】

一部の実施形態では、本明細書では、（a）配列番号311のアミノ酸配列、または配列番号311のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；（b）配列番号312のアミノ酸配列、または配列番号312のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び（c）配列番号313のアミノ酸配列、または配列番号313のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのV_H HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

40

【0171】

一部の実施形態では、本明細書では、（a）配列番号103及び104からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号103及び104からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；（b）配列番号105及び106からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号105及び106からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び（c）配列番号107のアミノ酸配列、または配列番号107のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含む

50

HVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0172】

一部の実施形態では、本明細書では、(a) 配列番号314のアミノ酸配列、または配列番号314のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b) 配列番号315のアミノ酸配列、または配列番号315のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c) 配列番号316のアミノ酸配列、または配列番号316のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

10

【0173】

一部の実施形態では、本明細書では、(a) 配列番号317のアミノ酸配列、または配列番号317のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b) 配列番号318のアミノ酸配列、または配列番号318のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c) 配列番号319のアミノ酸配列、または配列番号319のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

20

【0174】

一部の実施形態では、本明細書では：(a) (i) 配列番号94のアミノ酸配列、または配列番号94のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii) 配列番号96、97、98、及び99からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号96、97、98、及び99からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii) 配列番号100、101、及び102からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号100、101、及び102からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b) (i) 配列番号103及び104からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号103及び104からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii) 配列番号105及び106からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号105及び106からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(iii) 配列番号107のアミノ酸配列、または配列番号107のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメイン、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

30

【0175】

一部の実施形態では、本明細書では：(a) (i) 配列番号308のアミノ酸配列、または配列番号308のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii) 配列番号309のアミノ酸配列、または配列番号309のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii) 配列番号310のアミノ酸配列、または配列番号310のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b) (i) 配列番号314のアミノ酸配列、または配列番号314のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii) 配列番号315のアミノ酸配列、または配列番号315のアミノ酸配列と少なくとも約95%

40

50

の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(iii)配列番号316のアミノ酸配列、または配列番号316のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLDメイン、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0176】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)(i)配列番号311のアミノ酸配列、または配列番号311のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii)配列番号312のアミノ酸配列、または配列番号312のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii)配列番号313のアミノ酸配列、または配列番号313のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号317のアミノ酸配列、または配列番号317のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii)配列番号318のアミノ酸配列、または配列番号318のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(iii)配列番号316のアミノ酸配列、または配列番号316のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLDメイン、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0177】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号24、25、26、27、28、29、及び30からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号24、25、26、27、28、29、及び30からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号112のアミノ酸配列、または配列番号112のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0178】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号113のアミノ酸配列、または配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号114のアミノ酸配列、または配列番号114のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号115のアミノ酸配列、または配列番号115のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0179】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)(i)配列番号108のアミノ酸配列、または配列番号108のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii)配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列、または、配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii)配列番号112のアミノ酸配列、または配列番号112のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列

番号113のアミノ酸配列、または配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii)配列番号114のアミノ酸配列、または配列番号114のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(iii)配列番号115のアミノ酸配列、または配列番号115のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLDメイン、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0180】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号116のアミノ酸配列、または配列番号116のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0181】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0182】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)(i)配列番号116のアミノ酸配列、または配列番号116のアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii)配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii)配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii)配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の相同性を有す

るアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(iii)配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLDメイン、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0183】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(c)配列番号154のアミノ酸配列、または配列番号154のアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0184】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(c)配列番号163のアミノ酸配列、または配列番号163のアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0185】

一部の実施形態では、本明細書では：(a)(i)配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii)配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び(iii)配列番号154のアミノ酸配列、または配列番号154のアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、及び(b)(i)配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii)配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列、または配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L2；及び(iii)配列番号163のアミノ酸配列、または配列番号163のアミノ酸配列と少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLDメイン、を含む抗MS4A4A抗体を提供する。

【0186】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号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、及び306からなる群から選択す

るアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（V_H）配列を含む。特定の実施形態では、配列番号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、及び306からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_H配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号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、または306において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号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、または306において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号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、または306のV_H配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Hは：（a）配列番号94、108、116、146、147、及び308、及び311からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309、及び312からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310、及び313からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3、から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0187】

別の態様では、抗MS4A4A抗体を提供し、当該抗体は、配列番号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、及び307からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む。特定の実施形態では、配列番号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、及び307からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_L配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。一部の実施形態では、配列番号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、または307において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号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、または307において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号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、または307のV_L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Lは：（a）配列番号103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314、及び317からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号105、106、114、139、140、141、142、143、160、161、315、及び318からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号107、115、144、145、163、316、及び319からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3、から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0188】

一部の実施形態では、抗MS4A4A抗体を提供し、当該抗体は、先に提供した実施形態のいずれかでのV_Hと、先に提供した実施形態のいずれかでのV_Lとを含む。一部の実施形態では、本明細書では抗MS4A4A抗体を提供しており、当該抗体は、先に提供した実施形態のいずれかでのV_Hと、先に提供した実施形態のいずれかでのV_Lとを含む。ある実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それらの配列は、それぞれ、配列番号5～15及び配列番号17～22であり、これらの配列の翻訳後修飾を含む。ある実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それらの配列は、それぞれ、配列番号24～30及び配列番号32～36であり、これらの配列の翻訳後修飾を含む。ある実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それらの配列は、それぞれ、配列番号40～53及び配列番号55～74であり、これらの配列の翻訳後修飾を含む。ある実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それらの配列は、それぞれ、配列番号76～84及び配列番号86～93であり、これらの配列の翻訳後修飾を含む。ある実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それらの配列は、それぞれ、配列番号304及び配列番号305であり、これらの配列の翻訳後修飾を含む。ある実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それらの配列は、それぞれ、配列番号306及び配列番号307であり、これらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0189】

一部の実施形態では、本明細書では、重鎖可変ドメイン（V_H）、及び軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む抗MS4A4A抗体を提供し、当該V_H及びV_Lを：配列番号5のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号5のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号18のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号6のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号5のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号19のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号7のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号5のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号20のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号8のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号9のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号10のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号18のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号11のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号12のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号17のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号13のアミノ酸配列を含むV_H、

【 0 1 9 0 】

20

【 0 1 9 1 】

50

酸配列を含むV_H、及び配列番号64のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号65のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号66のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号67のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号68のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号69のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号70のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号71のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号72のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号73のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号47のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号74のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号48のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号70のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号48のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号74のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号48のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号62のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号48のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号55のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号48のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号72のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号48のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号69のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号49のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号71のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号49のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号55のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号49のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号73のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号50のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号62のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号51のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号62のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号52のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号62のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号53のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号62のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号53のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号63のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号53のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号64のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号53のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号65のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号53のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号66のアミノ酸配列を含むV_L；及び配列番号53のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号67のアミノ酸配列を含むV_Lからなる群から選択する。

【0192】

一部の実施形態では、本明細書では、重鎖可変ドメイン（V_H）、及び軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む抗MS4A4A抗体を提供し、当該V_H及びV_Lを：配列番号76のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号86のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号77のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号87のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号78のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号88のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号79のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号89のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号80のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号90のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号81のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号91のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号82のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号91のアミノ酸配列を含むV_L；配列番号83のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号92のアミノ酸配列を含むV_L；及び配列番号84のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号93のアミノ酸配列を含むV_Lからなる群から選択する。

【0193】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304、及び306からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（V_H）配列を含む。特定の実施形態では、配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304、及び306からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_H配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304、または306において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304、または306において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304、または306のV_H配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Hは：（a）配列番号94及び308からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号96、97、98、99、及び309からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号100、101、102、及び310からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3、から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0194】

別の態様では、抗MS4A4A抗体が提供され、当該抗体は、配列番号17、18、19、20、21、22、305、及び307からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（V_L）配列を含む。特定の実施形態では、配列番号17、18、19、20、21、22、305、及び307からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_L配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。一部の実施形態では、配列番号17、18、19、20、21、22、305、または307において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号17、18、19、20、21、22、305、または307において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号17、18、19、20、21、22、305、または307のV_L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Lは：（a）配列番号103、104、及び314からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号105、106、及び315からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号107及び316からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3、から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0195】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号24、25、26、27、28、29、及び30からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（V_H）配列を含む。特定の実施形態では、配列番号24、25、26、27、28、29、及び30からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_H配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号24、25、26、27、28、29、または30において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号2

4、25、26、27、28、29、または30において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号24、25、26、27、28、29、または30のV_H配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Hは：（a）配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0196】

別の態様では、抗MS4A4A抗体を提供し、当該抗体は、配列番号32、33、34、35、及び36からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む。特定の実施形態では、配列番号32、33、34、35、及び36からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_L配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。一部の実施形態では、配列番号32、33、34、35、または36において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号32、33、34、35、または36において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号32、33、34、35、または36のV_L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Lは：（a）配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0197】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、及び53からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（V_H）配列を含む。特定の実施形態では、配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、及び53からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_H配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または53において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または53において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または53のV_H配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Hは：（a）配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択

10

20

30

40

50

する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0198】

別の態様では、抗MS4A4A抗体が提供され、当該抗体は、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、及び74からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(V_L)を含む。特定の実施形態では、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、及び74からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_L配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。一部の実施形態では、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、または74において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、または74において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、または74のV_L配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Lは：（a）配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0199】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号76、77、78、79、80、81、82、83、及び84からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(V_H)配列を含む。特定の実施形態では、配列番号76、77、78、79、80、81、82、83、及び84からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するV_H配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号76、77、78、79、80、81、82、83、または84において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号76、77、78、79、80、81、82、83、または84において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号76、77、78、79、80、81、82、83、または84のV_H配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、V_Hは：（a）配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び（c）配列番号154のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

【0200】

別の態様では、抗MS4A4A抗体が提供され、当該抗体は、配列番号86、87、88、89、90、91、92、及び93からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。特定の実施形態では、配列番号86、87、88、89、90、91、92、及び93からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。一部の実施形態では、配列番号86、87、88、89、90、91、92、または93において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号86、87、88、89、90、91、92、または93において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。任意に、抗MS4A4A抗体は、配列番号86、87、88、89、90、91、92、または93のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の実施形態では、VLは：（a）配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、（b）配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（c）配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択する1つ、2つ、または3つのHVRを含む。

10

20

【0201】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号320～335及び355～362からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する全長重鎖アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、配列番号320～335及び355～362からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する全長重鎖アミノ酸配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号320～335及び355～362において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号320～335及び355～362において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。

30

【0202】

別の態様では、抗MS4A4A抗体は、配列番号363～365からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する全長軽鎖アミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、配列番号363～365からなる群から選択するアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する全長重鎖アミノ酸配列は、リファレンス配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対して結合する能力を保持している。特定の実施形態では、配列番号363～365において、合計で1～10個のアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、配列番号363～365において、合計で1～5つのアミノ酸を、置換、挿入、及び／または欠失している。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、LVRの外側の領域（すなわち、FR）で起こる。

40

50

【0203】

一部の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、配列番号355～362の全長重鎖アミノ酸配列と、配列番号365の全長軽鎖アミノ酸配列とを含む。一部の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、配列番号320～327の全長重鎖アミノ酸配列と、配列番号363の全長軽鎖アミノ酸配列とを含む。一部の実施形態では、抗MS4A4A抗体は、配列番号328～335の全長重鎖アミノ酸配列と、配列番号364の全長軽鎖アミノ酸配列とを含む。

【0204】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、4A-202、4A-301、4A-302、4A-330、4A-304、4A-305、4A-306、4A-307、4A-308、4A-309、4A-310、4A-311、4A-312、4A-313、4A-314、4A-419、及び4A-450から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体の結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、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、及び4A-331から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体の結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、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、及び4A-381から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体の結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、4A-25、4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389、4A-390から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体の結合を競合的に阻害する。

【0205】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、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、及び4A-450から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体が結

10

20

30

40

50

合するMS4A4Aエピトープと同一である、または重複するヒトMS4A4Aのエピトープに対して結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングする例示的な方法の詳細は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に記載されている。

【0206】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、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、4A-450から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせの結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、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から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせの結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、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、及び4A-381から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせの結合を競合的に阻害する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、4A-25、4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389、または4A-390から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせの結合を競合的に阻害する。

【0207】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、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、及び4A-450から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせと同じである、または重複する、MS4A4Aでのエピトープを有する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、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、及び4A-331から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせと同じである、または重複する、MS4A4Aでのエピトープを有する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、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、A-376、4A-377、4A-378、4A-379、4A-380、及び4A-381から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせと同じである、または重複する、MS4A4Aでのエピトープを有する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aに対する結合に関して、4A-25、A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389、及び4A-390、から選択する少なくとも1つのリファレンス抗体、及びそれらのあらゆる組み合わせと同じである、または重複する、MS4A4Aでのエピトープを有する。

10

【0208】

一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aの細胞外ドメイン1（ECL1）に対して結合する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、配列番号1のアミノ酸配列CMASNTYGSNPIS（配列番号177）での1つ以上のアミノ酸に対して結合する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aの細胞外ドメイン2（ECL2）に対して結合する。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、配列番号1のアミノ酸配列SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS（配列番号178）での1つ以上のアミノ酸に対して結合する。

20

【0209】

当該技術分野で公知のあらゆる適切な競合アッセイまたはMS4A4A結合アッセイ、例えば、BIACore分析、ELISAアッセイ、またはフローサイトメトリーなどを利用して、抗MS4A4A抗体が、MS4A4Aに対する結合に関して、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、及び4A-450、及びそれらのあらゆる組み合わせから選択する1つ以上のリファレンス抗体と競合する（または、競合的にその結合を阻害する）か否かを決定し得る。例示的な競合アッセイでは、固定化したMS4A4A、または細胞表面にMS4A4Aを発現する細胞を、MS4A4Aに対して結合する第1の標識抗体（例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類）と、MS4A4Aに対する結合に関して第1の抗体と競合する能力について試験する第2の非標識抗体とを含む溶液でインキュベーションする。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清に存在し得る。コントロールとして、固定化したMS4A4A、またはMS4A4Aを発現する細胞を、第2の非標識抗体ではなく、第1の標識抗体を含む溶液においてインキュベーションする。MS4A4Aに対する第1の

30

40

50

抗体の結合を許容する条件下でインキュベーションした後に、過剰な非結合抗体を除去し、そして、固定化したMS4A4A、またはMS4A4Aを発現する細胞に関連する標識の量を測定する。固定化したMS4A4A、またはMS4A4Aを発現する細胞に関連する標識の量が、コントロール試料と比較して、試験試料において実質的に減っていれば、このことは、MS4A4Aに対する結合について、第2の抗体が、第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

【0210】

本明細書では、抗MS4A4A抗体の結合を競合的に阻害する、及び／または当該抗体への結合について競合する抗MS4A4A抗体をさらに提供しており、これらの抗体は、
(a) (i) 配列番号94及び308からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号96、97、98、99、及び309からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号100、101、102、及び310からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び
(b) (i) 配列番号103、104、及び314からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号105、106、及び315からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号107及び316からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号5～15及び304、及び配列番号17～22及び305である。

【0211】

本明細書では、抗MS4A4A抗体が結合するエピトープと同じである、または重複するヒトMS4A4Aのエピトープに対して結合する抗MS4A4A抗体を提供しており、これらの抗体は、(a) (i) 配列番号94及び308からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号96、97、98、99、及び309からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号100、101、102、及び310からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び
(b) (i) 配列番号103、104、及び314からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号105、106、及び315からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号107及び316からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号5～15及び304、ならびに配列番号17～22及び305である。一部の実施形態では、ヒトMS4A4Aのエピトープは、抗MS4A4A抗体が結合するものと同じエピトープである。

【0212】

本明細書では、抗MS4A4A抗体の結合を競合的に阻害する、及び／または当該抗体への結合について競合する抗MS4A4A抗体をさらに提供しており、これらの抗体は、
(a) (i) 配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び
(b) (i) 配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号24～30、及び配列番号32～36である。

【0213】

本明細書では、抗MS4A4A抗体が結合するエピトープと同じである、または重複するヒトMS4A4Aのエピトープに対して結合する抗MS4A4A抗体を提供しており、

これらの抗体は、(a) (i) 配列番号108のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号110及び111からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号112のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び(b) (i) 配列番号113のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号114のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号115のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号24～30、及び配列番号32～36である。一部の実施形態では、ヒトMS4A4Aのエピトープは、抗MS4A4A抗体が結合するものと同じエピトープである。

【0214】

本明細書では、抗MS4A4A抗体の結合を競合的に阻害する、及び／または当該抗体への結合について競合する抗MS4A4A抗体をさらに提供しており、これらの抗体は、(a) (i) 配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び(b) (i) 配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号40～53、及び配列番号55～74である。

【0215】

本明細書では、抗MS4A4A抗体が結合するエピトープと同じである、または重複するヒトMS4A4Aのエピトープに対して結合する抗MS4A4A抗体を提供しており、これらの抗体は、(a) (i) 配列番号116のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号118、119、120、121、及び122からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号123、124、125、126、127、128、及び129からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び(b) (i) 配列番号130、131、132、133、134、135、136、137、及び138からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号139、140、141、142、及び143からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号144及び145からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号40～53、及び配列番号55～74である。一部の実施形態では、ヒトMS4A4Aのエピトープは、抗MS4A4A抗体が結合するものと同じエピトープである。

【0216】

本明細書では、抗MS4A4A抗体の結合を競合的に阻害する、及び／または当該抗体への結合について競合する抗MS4A4A抗体をさらに提供しており、これらの抗体は、(a) (i) 配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号154のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び(b) (i) 配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号76～84、及び配列番号86～93である。

【0217】

本明細書では、抗MS4A4A抗体が結合するエピトープと同じである、または重複するヒトMS4A4Aのエピトープに対して結合する抗MS4A4A抗体を提供しており、これらの抗体は、(a) (i) 配列番号146及び147からなる群から選択するアミノ配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号149、150、151、152、及び153からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び(iii) 配列番号154のアミノ配列を含むHVR-H3を含むV_Hドメイン、及び(b) (i) 配列番号156、157、及び158からなる群から選択するアミノ配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号160及び161からなる群から選択するアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号163のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含むV_Lドメインを含む。一部の実施形態では、当該抗体は、V_H及びV_L配列を含み、それぞれ、配列番号76～84、及び配列番号86～93である。一部の実施形態では、ヒトMS4A4Aのエピトープは、抗MS4A4A抗体が結合するものと同じエピトープである。

10

【0218】

一部の実施形態では、前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体は、ヒト化、及び／または、ヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、当該抗MS4A4A抗体は、抗体フラグメント、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、または、F(ab')₂フラグメントである。一部の実施形態では、当該抗MS4A4A抗体は、実質的な全長抗体、例えば、本明細書で定義するIgG1抗体、IgG2a抗体、または、その他の抗体クラス、または、アイソタイプである。

20

【0219】

一部の実施形態では、前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体を、以下の第1～7節に記載したように、あらゆる特徴を、単独で、または、組み合わせて取り込み得る。

【0220】

(1) 抗MS4A4A抗体結合親和性

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、 $<1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<0.01\text{nM}$ 、または、 $<0.001\text{nM}$ （例えば、 10^{-8}M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数(K_d)を有する。解離定数は、ELISA、表面プラズモン共鳴(SPR)、バイオレイヤー干渉法（例えば、ForteBioのOctet Systemを参照されたい）、等温滴定カロリーメトリー(ITC)、示差走査熱量測定法(DSC)、円偏光二色性(CD)、ストップフロー分析、及び、比色分析、または、蛍光タンパク質融解分析などのあらゆる生化学的または生物物理学的技法など、あらゆる解析技法で決定することができる。ある実施形態では、K_dを、放射性標識抗原結合アッセイ(RIA)で測定する。一部の実施形態では、RIAを、例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)に記載された、目的の抗体のFabバージョン、または、その抗原を用いて実施する。一部の実施形態では、BIACORE表面プラズモン共鳴アッセイ、例えば、BIACORE-2000、または、BIACORE-3000(BIACore, Inc., Piscataway, NJ)を使用するアッセイを使って、約10反応単位(RU)の固定化した抗原CM5チップを用いて、25℃で、K_dの測定を行う。一部の実施形態では、当該K_Dを、一価抗体（例えば、Fab）、または、全長抗体を使用して決定する。一部の実施形態では、当該K_Dを、一価形態の全長抗体を使用して決定する。

30

40

【0221】

(2) 抗体フラグメント

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、抗体フラグメントである。抗体フラグメントとして、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂、Fv、及び、scFvフラグメント、及び、後述するその他のフラグメントがあるが、これらに限定されない。特定の抗体フラグメントの概説については、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003)を参照されたい。scFvフラグ

50

メントの概説については、例えば、WO 93 / 1 6 1 8 5 ; 及び、米国特許第 5 5 7 1 8 9 4 号、及び、第 5 5 8 7 4 5 8 号を参照されたい。サルベージ受容体結合エプトープ残基を含み、かつ、インビボでの半減期が延びた Fab、及び F (a b ')₂ フラグメントの考察については、米国特許第 5 8 6 9 0 4 6 号を参照されたい。

【0222】

ダイアボディは、二価、または、二重特異性であり得る 2 つの抗原結合部位を有する抗体フラグメントである。例えば、EP 4 0 4 0 9 7 ; WO 1 9 9 3 / 0 1 1 6 1 ; Hudson et al. Nat. Med. 9 : 1 2 9 - 1 3 4 (2 0 0 3) を参照されたい。トリアボディ、及び、テトラボディも、Hudson et al. Nat. Med. 9 : 1 2 9 - 1 3 4 (2 0 0 3) に記載されている。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部または一部、または、軽鎖可変ドメインの全部または一部を含む抗体フラグメントである。特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である（例えば、米国特許第 6 2 4 8 5 1 6 号を参照されたい）。

10

【0223】

抗体フラグメントは、本明細書に記載した通り、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、ならびに、組換え宿主細胞（例えば、E. coli、または、ファージ）による生産などであるが、これらに限定されない様々な技術で生産することができる。

【0224】

(3) キメラ、及び、ヒト化抗体

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号に記載されている。ある例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または、サルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域）、及び、ヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスを、親抗体のものから変更した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合フラグメントを含む。

20

【0225】

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、ヒト化抗体である。一般的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を抑制するためにヒト化する。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒトにおいて実質的に非免疫原性である。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、標的に対して、ヒト化抗体が由来する別の種に由来する抗体と実質的に同じ親和性を有する。例えば、米国特許第 5 5 3 0 1 0 1 号、第 5 6 9 3 7 6 1 号；第 5 6 9 3 7 6 2 号；及び、第 5 5 8 5 0 8 9 号を参照されたい。特定の実施形態では、免疫原性を低下させながら、抗原結合ドメインの本来の親和性を抑制せずに修飾することができる抗体可変ドメインのアミノ酸を同定する。例えば、米国特許第 5 7 6 6 8 8 6 号、及び、第 5 8 6 9 6 1 9 号を参照されたい。一般的に、ヒト化抗体は、HVR（またはその一部）が、非ヒト抗体に由来し、かつ、FR（またはその一部）が、ヒト抗体配列に由来する 1 つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。一部の実施形態では、ヒト化抗体で一部の FR 残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復または改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR 残基が由来する抗体）に由来する対応する残基で置換する。

30

40

【0226】

ヒト化抗体、及び、それらを生産する方法は、例えば、Almagro et al. Front. Biosci. 13 : 1 6 1 9 - 1 6 3 3 (2 0 0 8) で概説されており、また、例えば、米国特許第 5 8 2 1 3 3 7 号、第 7 5 2 7 7 9 1 号、第 6 9 8 2 3 2 1 号、及び、第 7 0 8 7 4 0 9 号に記載されている。ヒト化に使用し得るヒトフレームワーク領域として、「ベストフィット」法を使用して選択したフレームワーク領域（例えば、Simms et al. J. Immunol. 151 : 2 2 9 6 (1 9 9 3) を参照されたい）；軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al. Proc. Natl. Aca

50

d. Sci. USA 89:4285 (1992); 及び、Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993) を参照されたい); ヒトの成熟した (体細胞変異) フレームワーク領域、または、ヒトの生殖系列フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) を参照されたい)、及び FR ライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域 (例えば、Baca et al. J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)、及び、Rosok et al. J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) を参照されたい) があるが、これらに限定されない。

【0227】

(4) ヒト抗体

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で公知の様々な技術を使用して生産することができる。ヒト抗体は、一般的には、van Dijk et al. Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001)、及び、Lonberg Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) で説明されている。

【0228】

ヒト抗体は、抗原接種に応答して、ヒト可変領域を有する、インタクトなヒト抗体、または、インタクトな抗体を生産するように修飾したトランスジェニック動物に対して免疫原を投与して調製することができる。そのようなマウスが、マウス抗体の非存在下でヒト抗体を生産するものとして予想して、ヒト Ig 遺伝子座の大きなフラグメントを有するマウス抗体生産を欠損しているマウス系統を遺伝子操作することができる。大きなヒト Ig フラグメントは、大きな可変遺伝子の多様性、ならびに、抗体の生産と発現の適切な調節を続けることができる。抗体の多様化と選択、及び、ヒトタンパク質に対する免疫学的寛容の欠如のためのマウス機構を利用することで、これらのマウス系統において再現したヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原などの目的の抗原に対する高親和性完全ヒト抗体を生み出すことができる。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を、生産及び選択することができる。特定の例示的な方法は、米国特許第 5545807 号、EP 546073、及び、EP 546073 で説明されている。また、例えば、XENOMOUSE (商標) 技術を記載している米国特許第 6075181 号、及び、第 6150584 号; HUMAB (登録商標) 技術を記載している米国特許第 5770429 号; K-M MOUSE (登録商標) 技術を記載している米国特許番号 7041870 号、及び、VELOCIMOUSE (登録商標) 技術を記載している米国特許出願公開第 US 2007/0061900 号を参照されたい。そのような動物が生成したインタクトな抗体に由来するヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせ、さらに改変し得る。

【0229】

また、ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づいた方法で生産することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒト骨髓腫、及び、マウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol. 133:3001 (1984)、及び、Boerner et al. J. Immunol. 147:86 (1991))。ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術を介して生成したヒト抗体は、Li et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) に記載されている。さらなる方法として、例えば、(ハイブリドーマ細胞株由来のモノクローナルヒト IgM 抗体の生産を説明している) 米国特許第 7189826 号に記載されている方法がある。ヒトハイブリドーマ技術 (トリオーマ技術) は、Vollmers et al. Histology and Histopathology 20(3):927-937 (2005)、及び、Vollmers et al. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-91 (2005) に記載されている

10

20

30

40

50

。また、ヒト抗体は、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択したFvクローン可変ドメイン配列を単離することで生成し得る。次に、そのような可変ドメイン配列を、所望のヒト定常ドメインと組み合わせ得る。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術を、以下に説明する。

【0230】

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、インビトロ法、及び／または、所望の1つ以上の活性を有する抗体に関するコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングして単離したヒト抗体である。適切な例として、ファージディスプレイ (CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion (かつてのProliferon)、Affimed) リボソームディスプレイ (CAT)、酵母ディスプレイ (Adimab) などがあるが、これらに限定されない。特定のファージディスプレイ法では、VH、及び、VL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で別々にクローニングし、次いで、Winter et al. Ann. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994) に記載されているファージライブラリーでランダムに再結合する。例えば、当該技術分野では、ファージディスプレイライブラリーを生成し、そして、所望の結合特性を保有する抗体に関する当該ライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が公知である。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); 及び、Lee et al. J. Immunol. Methods 284 (-2):119-132 (2004) も参照されたい。一般的に、ファージは、一本鎖Fv (scFv) フラグメント、または、Fabフラグメントのいずれかで抗体フラグメントを表す。免疫源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要がなく、免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。あるいは、未処理のレパートリーを、(例えば、ヒトから) クローニングして、Griffiths et al. EMBO J. 12:725-734 (1993) に記載されているようにして、免疫化処置をせずに、広範囲の非自己抗原、それに、自己抗原に対する単一の抗体源を提供することができる。最後に、ナイーブライブラリーは、幹細胞から再配置していないV遺伝子セグメントをクローニングし、そして、ランダム配列を含むPCRプライマーを使用して可変性に富んだHVR3領域をコードし、そして、Hoogenboom et al. J. Mol. Biol., 227:381-388、1992に記載されているようにして、インビトロでの再配置を達成した。ヒト抗体ファージライブラリーを記載している特許文献として、例えば：米国特許第5750373号、ならびに、米国特許公開第2007/0292936号、及び、第2009/0002360号がある。ヒト抗体ライブラリーから単離した抗体は、本明細書では、ヒト抗体またはヒト抗体フラグメントと見なす。

【0231】

(5) Fc領域を含む定常領域

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、Fcを含む。一部の実施形態では、当該Fcは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及び／または、IgG4アイソタイプである。一部の実施形態では、当該抗体は、IgGクラス、IgMクラス、または、IgAクラスの抗体である。

【0232】

本明細書で提供するあらゆる抗体の特定の実施形態では、当該抗体は、IgG2アイソタイプを有する。一部の実施形態では、当該抗体は、ヒトIgG2定常領域を含む。一部の実施形態では、当該ヒトIgG2定常領域は、Fc領域を含む。一部の実施形態では、当該抗体は、1つ以上のMS4A4A活性を誘導し、または、Fc受容体に対する結合とは無関係に誘導する。一部の実施形態では、当該抗体は、阻害性Fc受容体に対して結合する。特定の実施形態では、当該阻害性Fc受容体は、阻害性Fc-ガンマ受容体IIB

(FcγIIB)である。

【0233】

本明細書で提供するあらゆる抗体の特定の実施形態では、当該抗体は、IgG1アイソタイプを有する。一部の実施形態では、当該抗体は、マウスIgG1定常領域を含む。一部の実施形態では、当該抗体は、ヒトIgG1定常領域を含む。一部の実施形態では、当該ヒトIgG1定常領域は、Fc領域を含む。一部の実施形態では、ヒトIgG1軽鎖定常領域は、配列番号344のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、当該抗体は、阻害性Fc受容体に対して結合する。特定の実施形態では、当該阻害性Fc受容体は、阻害性Fc-ガンマ受容体IIB (FcγIIB)である。

【0234】

本明細書で提供するあらゆる抗体の特定の実施形態では、当該抗体は、IgG4アイソタイプを有する。一部の実施形態では、当該抗体は、ヒトIgG4定常領域を含む。一部の実施形態では、当該ヒトIgG4定常領域は、Fc領域を含む。一部の実施形態では、当該抗体は、阻害性Fc受容体に対して結合する。特定の実施形態では、当該阻害性Fc受容体は、阻害性Fc-ガンマ受容体IIB (FcγIIB)である。

【0235】

本明細書で提供するあらゆる抗体の特定の実施形態では、当該抗体は、ハイブリッドIgG2/4アイソタイプを有する。一部の実施形態では、当該抗体は、EU付番法で定めたヒトIgG2のアミノ酸118~260、及び、EU付番法で定めたヒトIgG4のアミノ酸261~447を含む、アミノ酸配列を含む(WO1997/11971; WO2007/106585)。

【0236】

一部の実施形態では、当該Fc領域は、アミノ酸置換を含まないFc領域を含む対応する抗体と比較して、補体を活性化せずに、クラスター形成を高める。一部の実施形態では、当該抗体は、当該抗体が特異的に結合する標的の1つ以上の活性を誘導する。一部の実施形態では、当該抗体は、MS4A4Aに対して結合する。

【0237】

本開示の抗MS4A4A抗体を修飾して、エフェクター機能を修飾すること、及び／または、抗体の血清半減期を長くすることも望ましい。例えば、当該定常領域のFc受容体結合部位を修飾または変異させて、FcγRI、FcγRII、及び／または、FcγRIIIなどの特定のFc受容体に対する結合親和性を除去または抑制して、抗体依存性細胞性細胞毒性を抑制し得る。一部の実施形態では、当該抗体の(例えば、IgGのCH2ドメインにおける)Fc領域のN-グリコシル化を除去すると、当該エフェクター機能は低下する。一部の実施形態では、WO99/58572、及び、Armour et al. Molecular Immunology 40:585-593 (2003); Reddy et al. J. Immunology 164:1925-1933 (2000)に記載されているようなヒトIgGの233~236、297、及び／または、327~331などの領域を修飾すると、当該エフェクター機能は低下する。その他の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体を修飾してエフェクター機能を修飾すると、ITIM含有FcγRIIb (CD32b)に対する発見選択性を高めて、抗体依存性細胞媒介細胞毒性、及び、抗体依存性細胞食作用などの体液性応答を活性化せずに、隣接細胞でのMS4A4A抗体のクラスター形成を高めることも望ましい。

【0238】

当該抗体の血清半減期を長くするために、例えば、米国特許第5739277号に記載されているようにして、サルベージ受容体結合エピトープを、当該抗体(特に、抗体フラグメント)に組み込み得る。本明細書で使用する用語「サルベージ受容体結合エピトープ」とは、インビボでのIgG分子の血清半減期の延長に関与するIgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、または、IgG4)のFc領域のエピトープのことを指す。その他のアミノ酸配列の修飾。

【0239】

(6) 多重特異性抗体

多重特異性抗体とは、同じまたは別のポリペプチド（例えば、本開示の1つ以上のMS4A4Aポリペプチド）のエピトープなど、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体のことである。一部の実施形態では、当該多重特異性抗体を、二重特異性抗体とすることができる。一部の実施形態では、当該多重特異性抗体を、三重特異性抗体とすることができる。一部の実施形態では、当該多重特異性抗体を、四重特異性抗体とすることができる。そのような抗体を、全長抗体、または、抗体フラグメント（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）に由来する抗体とすることができる。一部の実施形態では、当該多重特異性抗体は、MS4A4Aでの第1の部位に対して結合する第1の抗原結合領域を含み、かつ、MS4A4Aでの第2の部位に対して結合する第2の抗原結合領域を含む。一部の実施形態では、当該多重特異性抗体は、MS4A4Aに対して結合する第1の抗原結合領域、及び、第2のポリペプチドに対して結合する第2の抗原結合領域を含む。

10

【0240】

本明細書では、第1の抗原結合領域を含む多重特異性抗体を提供しており、当該第1の抗原結合領域は、MS4A4Aに対して結合する本明細書に記載の抗体の6つのHVR、及び、第2のポリペプチドに対して結合する第2の抗原結合領域を含む。一部の実施形態では、当該第1の抗原結合領域は、本明細書に記載している抗体のV_HまたはV_Lを含む。

【0241】

当該多重特異性抗体のいずれかの一部の実施形態では、当該第2のポリペプチドは、a) 血液脳関門を通る輸送を促す抗原；(b) トランスフェリン受容体 (TR)、インスリン受容体 (HIR)、インスリン様成長因子受容体 (IGFR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2 (LPR-1及び2)、ジフテリア毒素受容体、CRM197、ラマシングルドメイン抗体、TMM30 (A)、タンパク質形質導入ドメイン、TAT、Syn-B、ペネトラチン、ポリアルギニンペプチド、angiopепепチド、及び、ANG1005から選択した血液脳関門を通る輸送を促す抗原；(c) アミロイドベータ、オリゴマーアミロイドベータ、アミロイドベータブランク、アミロイド前駆体タンパク質、または、そのフラグメント、Tau、IAPP、アルファシヌクレイン、TDP-43、FUSタンパク質、C9orf72 (第9染色体オープンリーディングフレーム72)、c9RANタンパク質、プリオンタンパク質、PrPSc、ハンチンチン、カルシトニン、スーパーオキシドジスムターゼ、アタキシン、アタキシン1、アタキシン2、アタキシン3、アタキシン7、アタキシン8、アタキシン10、レビー小体、心房性ナトリウム利尿因子、膵島アミロイドポリペプチド、インスリン、アポリポタンパク質A1、血清アミロイドA、メジン、プロラクチン、トランスサイレチン、リゾチーム、ベータ2ミクログロブリン、ゲルゾリン、ケラトエピセリン、シスタチン、免疫グロブリン軽鎖AL、S-IBMタンパク質、反復関連非ATG (RAN) 翻訳産物、ジペプチド反復 (Dipeptide repeat) (DPR) ペプチド、グリシン-アラニン (GA) 反復ペプチド、グリシン-プロリン (GP) 反復ペプチド、グリシン-アルギニン (GR) 反復ペプチド、プロリン-アラニン (PA) 反復ペプチド、ユビキチン、及び、プロリン-アルギニン (PR) 反復ペプチドから選択した疾患原因タンパク質；(d) 免疫細胞で発現するリガンド、及び／または、タンパク質であって、当該リガンド、及び／または、タンパク質を、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、及び、ホスファチジルセリンから選択する；及び／または、(e) 1つ以上の腫瘍細胞、及び、それらのあらゆる組み合わせで発現するタンパク質、脂質、多糖、または糖脂質である。

20

30

40

【0242】

血液脳関門を通る輸送を促す多数の抗原は、当該技術分野で公知である（例えば、Gathuler R. Neurobiol. Dis. 37:48-57 (2010)）

50

。そのような第2の抗原として、トランスフェリン受容体 (TR)、インスリン受容体 (HIR)、インスリン様成長因子受容体 (IGFR)、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1及び2 (LPR-1及び2)、CRM197 (ジフテリア毒素の非毒性変異体) などのジフテリア毒素、TMEM30 (A) (Flippase) などのラマ単一ドメイン抗体、TAT、Syn-B、または、ペネトラチンなどのタンパク質形質導入ドメイン、ポリアルギニン、または、一般的に正電荷を有するペプチド、ANG1005などのAngiopepペプチド (例えば、Gabathuler、2010を参照されたい)、及び、血液脳関門内皮細胞で濃縮を受けるその他の細胞表面タンパク質 (例えば、Daneman et al. PLoS One 5 (10): e13741 (2010) を参照されたい) があるが、これらに限定されない。

【0243】

当該多価抗体は、MS4A4A抗原、ならびに、さらなる抗原Aβペプチド、抗原またはα-シヌクレインタンパク質抗原、または、Tauタンパク質抗原、または、TDP-43タンパク質抗原、または、プリオンタンパク質抗原、または、ハンチンチンタンパク質抗原、または、RAN、グリシン-アラニン (GA)、グリシン-プロリン (GP)、グリシン-アルギニン (GR)、プロリン-アラニン (PA)、または、プロリン-アルギニン (PR)、からなるジペプチド反復 (DiPeptide Repeats)、(DPRペプチド) を含む翻訳産物抗原、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体などを認識し得るが、これらに限定されない。トランスフェリン受容体、または、抗体の移動を促すその他の抗原は、血液脳関門を通る。一部の実施形態では、当該第2のポリペプチドは、トランスフェリンである。一部の実施形態では、当該第2のポリペプチドは、Tauである。一部の実施形態では、当該第2のポリペプチドは、Aβである。一部の実施形態では、当該第2のポリペプチドは、TREM2である。一部の実施形態では、当該第2のポリペプチドは、α-シヌクレインである。

【0244】

当該多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖 (及び、好ましくは、2つのポリペプチド鎖) を含み、1つ以上の当該ポリペプチド鎖は、2つ以上の可変ドメインを含む。例えば、1つ以上のポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを含み得るものであり、VD1は、第1の可変ドメインであり、VD2は、第2の可変ドメインであり、Fcは、Fc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1及びX2は、アミノ酸またはポリペプチドを表し、そして、nは、0または1である。同様に、1つ以上のポリペプチド鎖は、V_H-C_H1可撓性リンカー-V_H-C_H1-Fc領域鎖；または、V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc領域鎖を含む。本明細書の多価抗体は、好ましくは、少なくとも2つ (及び、好ましくは4つ) の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含む。本明細書の多価抗体は、例えば、約2〜約8個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。本明細書で企図する軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、また、任意に、CLドメインをさらに含む。

【0245】

多重特異性抗体を作り出す技術として、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組換え共発現があるが、これらに限定されない (Milstein and Cuello Nature 305: 537 (1983)、WO93/08829、及び、Traunecker et al. EMBO J. 10: 3655 (1991))、及び、「ノブ-イン-ホール」遺伝子操作 (例えば、米国特許第5731168号を参照されたい) を参照されたい。また、WO2013/026833 (CrossMab) も参照されたい。また、多特異性抗体は、抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作り出す静電ステアリング効果を操作して (WO2009/089004A1)；2つ以上の抗体を架橋して (例えば、米国特許第4676980号を参照されたい)；ロイシンを使用して；二重特異性抗体フラグメントを作り出す「ダイアボディ」技術を使用して (例えば、Hollinger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) を参照されたい)；そして、一本鎖Fv (scFv) 二量体を

10

20

30

40

50

使用して（例えば、Gruber et al, J. Immunol. 152:5368 (1994) を参照されたい）；及び、例えば、Tutt et al. J. Immunol. 147:60 (1991) に記載されているようにして三重特異性抗体を調製して、作り出し得る。

【0246】

本明細書は、「オクトパス抗体」などの3つ以上の機能的な抗原結合部位を有する遺伝子操作した抗体も含む（例えば、US2006/0025576を参照されたい）。また、本明細書の抗体は、複数のMS4A4Aに対して結合する抗原結合部位を含む「二重作用Fab」または「DAF」を含む（例えば、US2008/0069820を参照されたい）。

【0247】

（7）抗体バリエーション

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体のアミノ酸配列のバリエーションを企図している。例えば、抗体の結合親和性、及び／または、その他の生物学的特性を改善することが望ましい。

【0248】

（i）置換、挿入、及び、欠失バリエーション

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体バリエーションを提供する。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することで、または、ペプチド合成により調製し得る。そのような修飾として、例えば、当該抗体のアミノ酸配列での残基の欠失、及び／または、挿入、及び／または、残基の置換がある。

【表2】

表A：アミノ酸置換

当初の残基	例示的置換	好ましい残基
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; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; 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; Norleucine	Leu

【0249】

当該抗体の生物特性の実質的な修飾は、（a）置換領域内のポリペプチド主鎖の構造、

例えば、シートまたはヘリックス構造、(b) 標的部位における分子の電荷または疎水性、または、(c) 側鎖の嵩を維持することに対する作用が著しく異なる置換を選択することで達成される。天然に存在する残基は、共通する側鎖特性に基づいて：

- (1) 疎水性：N o l l o y s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n；
- (3) 酸性：A s p、G l u；
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o；及び
- (6) 芳香族性：T r p、T y r、P h e、に分けられる。

【0250】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを、別のクラスのものとの交換することに関係する。そのような置換した残基は、例えば、非ヒト抗体と相同であるヒト抗体の領域、または、当該分子の非相同領域に導入することができる。

【0251】

本明細書に記載のポリペプチドまたは抗体に変更を加える場合、特定の実施形態では、アミノ酸の疎水性指標を考慮することができる。それぞれのアミノ酸には、その疎水性と電荷特性に基づいて、疎水性指標を割り当てている。それらは：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン／システイン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸塩 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸塩 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リジン (-3.9)；及び、アルギニン (-4.5)である。

【0252】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を付与する際の疎水性アミノ酸指標の重要性は、当該技術分野で理解されている。K y t e e t a l. J. M o l. B i o l., 157:105-131 (1982)。特定のアミノ酸では、類似の疎水性指標、または、スコアを有するその他のアミノ酸の代わりに使用することができ、かつ、なおも類似の生物活性を保持することができる、ことは公知である。疎水性指標に基づいて変更を加える場合、特定の実施形態では、疎水性指標が±2以内であるアミノ酸の置換を含む。特定の実施形態では、±1以内の事例を含み、そして、特定の実施形態では、±0.5以内の事例を含む。

【0253】

また、類似のアミノ酸の置換を、親水性に基づいて効果的に行うことができ、特に、そうして生成した生物学的機能性タンパク質またはペプチドは、本事例のように免疫学的実施形態での使用を意図している、ことも理解されたい。特定の実施形態では、隣接するアミノ酸の親水性が支配するタンパク質の最大の局所平均親水性は、その免疫原性、及び、抗原性、すなわち、タンパク質の生物学的特性と相関する。

【0254】

これらのアミノ酸残基には：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0±1)；アスパラギン酸塩 (+3.0±1)；グルタミン酸塩 (+3.0±1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5±1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)、及び、トリプトファン (-3.4)の親水性値を割り当てている。類似の親水性値に基づいて変更を加える場合、特定の実施形態では、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換を含み、特定の実施形態では、±1以内のアミノ酸の置換を含み、特定の実施形態では、±0.5以内のアミノ酸の置換を含む。親水性に基づいて、一次アミノ酸配

10

20

30

40

50

列からエピトープを同定することもできる。これらの領域を、「エピトープコア領域」とも称する。

【0255】

特定の実施形態において、置換、挿入、または、欠失は、そのような改変が、抗体が抗原に対して結合する能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVRで起こり得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書で提供する保存的置換）は、HVRで行い得る。そのような改変は、例えば、HVRの抗原接触残基の外側で行い得る。前出の変異VH、及び、VL配列の特定の実施形態では、それぞれのHVRは改変されておらず、または、1つ、2つ、または、3つ以下のアミノ酸置換を含む。

【0256】

アミノ酸配列挿入として、1残基〜100以上の残基の長さのポリペプチドまでの範囲のアミノ末端、及び／または、カルボキシル末端での融合、ならびに、1つ以上のアミノ酸残基の配列内挿入がある。末端挿入の例として、N末端メチオニル残基を有する抗体がある。抗体分子のその他の挿入バリエーションとして、（例えば、ADEPTに関しては）抗体のN-またはC-末端、または、当該抗体の血清半減期を長くするポリペプチドへの融合がある。

【0257】

抗体の適切な立体構造の維持に関与しないシステイン残基も、一般的に、セリンで置換することができ、分子の酸化安定性を改善し、そして、異常な架橋を阻止することができる。逆に、システイン結合（複数可）を抗体に付加すると、その安定性を改善することができる（特に、当該抗体が、Fvフラグメントなどの抗体フラグメントである場合）。

【0258】

(ii) グリコシル化バリエーション

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体を改変して、当該抗体がグリコシル化する程度を増大または抑制する。抗体に対するグリコシル化部位の追加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位を、生成または除去するように当該アミノ酸配列を改変することで好都合に達成し得る。

【0259】

抗体のグリコシル化は、一般的に、N結合またはO結合のいずれかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖に対する炭水化物部分の付着のことを指す。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、及び、アスパラギン-X-スレオニンがあり、式中、Xは、プロリン以外のあらゆるアミノ酸であり、これらの配列は、アスパラギン側鎖に対する炭水化物部分の酵素的付着の認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。O結合型グリコシル化とは、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、または、キシロースの1つが、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的には、セリン、または、スレオニンに対して付着することを指すが、5-ヒドロキシプロリン、または、5-ヒドロキシリジンも使用し得る。

【0260】

抗体に対するグリコシル化部位の付加は、（N-結合グリコシル化部位に関する）上記したトリペプチド配列の1つ以上を含むようにアミノ酸配列を改変することを、好都合に達成する。また、当該改変は、（O-結合型グリコシル化部位に関しては）当初の抗体の配列に対して、1つ以上のセリン、または、スレオニン残基を追加または置換しても達成し得る。

【0261】

当該抗体が、Fc領域を含む場合、そこに付着した炭水化物を改変し得る。哺乳動物細胞が生成するネイティブ抗体は、一般的に、Fc領域のCH2ドメインのKabat付番法でのAsn297に対するN結合で一般的に付着している分岐した二分岐オリゴ糖を含む。このオリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、ガラクトース、及び、シアル酸、ならびに、二分岐オリゴ糖構造の「

10

20

30

40

50

ステム」においてGlcNAcに付着したフコースを含み得る。一部の実施形態では、本開示の抗体でのオリゴ糖の修飾を、特定の改善した特性を有する抗体変異体を作り出すために行い得る。

【0262】

ある実施形態では、Fc領域に（直接的に、または、間接的に）付着したフコースを欠いた炭水化物構造を有する抗体変異体を提供する。例えば、米国特許公開第2003/0157108号、及び、第2004/0093621号を参照されたい。「脱フコシル化」または「フチコース欠損」抗体変異体に関連する刊行物の例として：US2003/0157108；US2003/0115614；US2002/0164328；US2004/0093621；US2004/0132140；US2004/0110704；US2004/0110282；US2004/0109865；Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)がある。脱フコシル化抗体を生産することができる細胞株の例として、タンパク質フコシル化を欠損したLed 3 CHO細胞がある(Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；US2003/0157108)、及び、アルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株（例えば、Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)、及び、Kanda et al., Biotechnol. Bioeng. 94(4):680-688 (2006)を参照されたい）がある。

【0263】

(iii) 修飾した定常領域

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体Fcとは、抗体Fcアイソタイプ、及び／または、修飾である。一部の実施形態では、当該抗体Fcアイソタイプ、及び／または、修飾は、Fcガンマ受容体に対して結合することができる。

【0264】

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該修飾した抗体Fcは、IgG1修飾Fcである。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、1つ以上の修飾を含む。例えば、一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、（例えば、同じアイソタイプの野生型Fc領域に関連して）1つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、1つ以上の当該アミノ酸置換を、そのアミノ酸位置をEU付番法で定めている、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；Alegreet 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、及び／または、T256Eから選択する。

【0265】

あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのN297A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのD265A、及び、N297A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の

実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのN297A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのK322A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのN297A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのP331S変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのD270A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのL234A、及び、L235A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのL234A、及び、G237A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのL234A、L235A、及び、G237A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのP238D、L328E、E233、G237D、H268D、P271G、及び、A330R変異の（すべてを含む）1つ以上を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での1つ以上のS267E／L328F変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのN325S及びL328F変異（N325S／L328F）を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのP238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、及び、A330R変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのP238D、L328E、G237D、H268D、P271G、及び、A330R変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのP238D、S267E、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G、及び、A330R変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのP238D、S267E、L328E、G237D、H268D、P271G、及び、A330R変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、Fcは、EU付番法によるC226S、C229S、E233P、L234V、及び、L235A変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのL234F、L235E、及び、P331S変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのS267E、及び、L328F変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのS267E変異を含む。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、IgG1の定常重鎖1（CH1）及びヒンジ領域を、CH1で置換すること、及び、IgG2のヒンジ領域（EU付番法によるIgG2のアミノ酸118～230）を、カッパ軽鎖で置換することを含む。

【0266】

あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、2つ以上のアミノ酸置換を含まないFc領域を有する対応する抗体と比較して、補体を活性化せずに、抗体クラスター形成を高める2つ以上のアミノ酸置換を含む。したがって、あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、Fc領域を含む抗体であり、当該抗体は、位置E430Gでのアミノ酸置換、及び、EU付番法でのL234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、及び、これらのあらゆる組み合わせから選択した残基位置でのFc領域における1つ以上のアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、L234A、L235A、及び、P331Sにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置L234A、L235A、及びP331Sにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、及び、P331Sにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、及び、K322Aにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、A330S、及び、P331Sにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、K322A、A330S

10

20

30

40

50

、及び、P331Sにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、K322A、及び、A330Sにアミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法での位置E430G、K322A、及び、P331Sにアミノ酸置換を含む。

【0267】

あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、本明細書では、当該IgG1修飾Fcをさらに含み、かつ、補体の活性化を回避するために、EU付番規定でのA330L変異(Lazar et al. Proc Natl Acad Sci USA, 103:4005-4010 (2006))、または、L234F、L235E、及び／または、P331S変異の1つ以上(Sazinsky et al. Proc Natl Acad Sci USA, 105:20167-20172 (2008))と組み合わせ得る。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番法でのA330L、A330S、L234F、L235E、及び／または、P331Sの1つ以上をさらに含み得る。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、ヒト血清での抗体半減期を長くする1つ以上の変異(例えば、EU付番規定でのM252Y、S254T、及び、T256E変異の(すべてを含む)1つ以上)をさらに含み得る。あらゆるIgG1修飾Fcの一部の実施形態では、当該IgG1修飾Fcは、EU付番でのE430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、S440Y、及び／または、S440Wの1つ以上をさらに含み得る。

【0268】

本開示のその他の態様は、修飾した定常領域(すなわち、Fc領域)を有する抗体に関する。FcγR受容体に対する結合に依存して標的化受容体を活性化させる抗体を、FcγR結合を解消するように遺伝子操作すると、そのアゴニスト活性を喪失し得る(例えば、Wilson et al. Cancer Cell 19:101-113 (2011); Armour et al. Immunology 40:585-593 (2003); 及び、White et al. Cancer Cell 27:138-148 (2015)を参照されたい)。したがって、当該抗体が、ヒトIgG2アイソタイプ(CH1、及び、ヒンジ領域)由来のFcドメイン、または、阻害性FcγRIIB受容体、または、その変異体を優先的に結合することができる別のタイプのFcドメインを有していれば、適正なエпитープ特異性を有する本開示の抗MS4A4A抗体は、最小限の副作用で、標的抗原を活性化できると考えられる。

【0269】

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該修飾抗体Fcは、IgG2修飾Fcである。一部の実施形態では、当該IgG2修飾Fcは、1つ以上の修飾を含む。例えば、一部の実施形態では、当該IgG2修飾Fcは、(例えば、同じアイソタイプの野生型Fc領域に関連して)1つ以上のアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、1つ以上の当該アミノ酸置換を、EU付番規定での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(US2007/0148167; 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、及び／または、C220S(White et al. Cancer Cell 27, 138-148 (2015)); S267E、L328F(Chu et al. Mol Immunol, 45:3926-3933 (2008)); 及び、M252Y、S254T、及び／または、T256Eから選択す

る。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置V234A、及び、G237Aでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置C219S、または、C220Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置A330S、及び、P331Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置S267E、及び、L328Fでのアミノ酸置換を含む。

【0270】

あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番規定でのC127Sアミノ酸置換を含む(White et al., (2015) Cancer Cell 27:138-148; Lightle et al. Protein Sci. 19:753-762 (2010); 及び、WO2008/079246)。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該抗体は、EU付番規定でのC214Sアミノ酸置換を含むカッパ軽鎖定常ドメインを持ったIgG2アイソタイプを有する(White et al. Cancer Cell 27:138-148 (2015); Lightle et al. Protein Sci. 19:753-762 (2010); 及び、WO2008/079246)。

【0271】

あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番規定でのC220Sアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該抗体は、EU付番規定でのC214Sアミノ酸置換を含むカッパ軽鎖定常ドメインを持ったIgG2アイソタイプを有する。

【0272】

あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番規定でのC219Sアミノ酸置換を含む。あらゆるIgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該抗体は、EU付番規定でのC214Sアミノ酸置換を含むカッパ軽鎖定常ドメインを持ったIgG2アイソタイプを有する。

【0273】

あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、IgG2アイソタイプ重鎖定常ドメイン1(CH1)と、ヒンジ領域とを含む(White et al. Cancer Cell 27:138-148 (2015))。あらゆる当該IgG2修飾Fcの特定の実施形態では、当該IgG2アイソタイプCH1、及び、ヒンジ領域は、EU付番法での118~230のアミノ酸配列を含む。あらゆるIgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該抗体Fc領域は、EU付番法でのS267Eアミノ酸置換、L328Fアミノ酸置換、または、その両方、及び／または、N297AまたはN297Qアミノ酸置換を含む。

【0274】

あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、S440Y、及び、S440Wに1つ以上のアミノ酸置換をさらに含む。あらゆるIgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、ヒト血清での抗体半減期を長くする1つ以上の変異(例えば、EU付番規定でのM252Y、S254T、及び、T256E変異の(すべてを含む)1つ以上)をさらに含み得る。あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、A330S、及び、P331Sをさらに含み得る。

【0275】

あらゆる当該IgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、IgG2/4ハイブリッドFcである。一部の実施形態では、当該IgG2/4ハイブリッドFcは、IgG2アミノ酸118~260、及び、IgG4アミノ酸261~447を含む。あらゆるIgG2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置H268Q、

10

20

30

40

50

V 3 0 9 L、A 3 3 0 S、及び、P 3 3 1 Sに1つ以上のアミノ酸置換を含む。

【0276】

あらゆる当該I g G 1、及び／または、I g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのA 3 3 0 L、L 2 3 4 F；L 2 3 5 E、または、P 3 3 1 S；及び、それらのあらゆる組み合わせから選択した1つ以上のさらなるアミノ酸置換を含む。

【0277】

あらゆる当該I g G 1、及び／または、I g G 2修飾Fcの特定の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのC 1 2 7 S、L 2 3 4 A、L 2 3 4 F、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、S 2 6 7 E、K 3 2 2 A、L 3 2 8 F、A 3 3 0 S、P 3 3 1 S、E 3 4 5 R、E 4 3 0 G、S 4 4 0 Y、及びそれらのあらゆる組み合わせから選択する残基位置に1つ以上のアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G、L 2 4 3 A、L 2 3 5 A、及びP 3 3 1 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G及びP 3 3 1 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G及びK 3 2 2 Aでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G、A 3 3 0 S、及びP 3 3 1 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G、K 3 2 2 A、A 3 3 0 S、及びP 3 3 1 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G、K 3 2 2 A、及びA 3 3 0 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 4 3 0 G、K 3 2 2 A、及びP 3 3 1 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置S 2 6 7 E及びL 3 2 8 Fでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置C 1 2 7 Sでのアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 1及び／またはI g G 2修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E 3 4 5 R、E 4 3 0 G、及びS 4 4 0 Yでのアミノ酸置換を含む。

【0278】

本明細書で提供するあらゆる抗体の一部の実施形態では、当該修飾抗体Fcは、I g G 4修飾Fcである。一部の実施形態では、当該I g G 4修飾Fcは、1つ以上の修飾を含む。例えば、一部の実施形態では、当該I g G 4修飾Fcは、（例えば、同じアイソタイプの野生型Fc領域に関連して）1つ以上のアミノ酸置換を含む。あらゆる当該I g G 4修飾Fcの一部の実施形態では、1つ以上の当該アミノ酸置換は、EU付番規定でのL 2 3 5 A、G 2 3 7 A、S 2 2 9 P、L 2 3 6 E（Reddy et al. J Immunol 164:1925-1933（2000））、S 2 6 7 E、E 3 1 8 A、L 3 2 8 F、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、及び／または、T 2 5 6 Eから選択する。あらゆる当該I g G 4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番規定でのL 2 3 5 A、G 2 3 7 A、及び、E 3 1 8 Aをさらに含み得る。あらゆる当該I g G 4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番規定でのS 2 2 8 P、及び、L 2 3 5 Eをさらに含み得る。あらゆる当該I g G 4修飾Fcの一部の実施形態では、当該I g G 4修飾Fcは、EU付番規定でのS 2 6 7 E、及び、L 3 2 8 Fをさらに含み得る。

【0279】

あらゆる当該I g G 4修飾Fcの一部の実施形態では、当該I g G 4修飾Fcは、EU付番規定でのS 2 2 8 P変異（Angal et al. Mol Immunol. 30:105-108（1993））、及び／または、（Peters et al. J Biol Chem. 287（29）:24525-33（2012））に記載されている1つ以上の変異と組み合わせて、抗体安定性を高め得る。

【0280】

あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該IgG4修飾Fcは、ヒト血清での抗体半減期を長くする1つ以上の変異（例えば、EU付番規定でのM252Y、S254T、及び、T256E変異の（すべてを含む）1つ以上）をさらに含み得る。

【0281】

あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのL235Eを含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのS228P変異を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのS267E及びL328F変異を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの特定の実施形態では、当該Fcは、EU付番法でのC127S、F234A、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、E345R、E430G、S440Y、及び、それらのあらゆる組み合わせから選択した残基位置に1つ以上のアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E430G、L243A、L235A、及び、P331Sにアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E430G及びP331Sにアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E430G及びK322Aにアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E430にアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E430G及びK322Aにアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置S267E及びL328Fにアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置C127Sにアミノ酸置換を含む。あらゆる当該IgG4修飾Fcの一部の実施形態では、当該Fcは、EU付番法での位置E345R、E430G、及び、S440Yにアミノ酸置換を含む。

【0282】

一部の実施形態では、抗体は、配列番号336のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号328のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号320のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0283】

一部の実施形態では、抗体は、C末端リジンを持たないヒトIgG1重鎖を有する。一部の実施形態では、抗体は、P331S変異を有するヒトIgG1重鎖を有する。一部の実施形態では、抗体は、P331S変異を有し、C末端リジンを持たないヒトIgG1重鎖を有する。一部の実施形態では、抗体は、N325S及びL328F変異（N325S／L328F）を有するヒトIgG1重鎖を有する。一部の実施形態では、抗体は、N325S／L328F変異を有し、C末端リジンを持たないヒトIgG1重鎖を有する。一部の実施形態では、抗体は、K322A変異を有するヒトIgG1重鎖を有する。一部の実施形態では、抗体は、K322A変異を有し、C末端リジンを持たないヒトIgG1重鎖を有する。前出の実施形態では、変異を、EU付番法に従って示す。

【0284】

一部の実施形態では、抗体は、配列番号337のアミノ酸配列を含む重鎖アミノを含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号338のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号339のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号340のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号341のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号342のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号343のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0285】

一部の実施形態では、抗体は、配列番号329のアミノ酸配列を含む重鎖アミノを含む

。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 330 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 331 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 332 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 333 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 334 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 335 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0286】

一部の実施形態では、抗体は、配列番号 321 のアミノ酸配列を含む重鎖アミノを含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 322 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 323 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 324 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 325 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 326 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 327 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0287】

(8) その他の抗体修飾

あらゆる抗体の一部の実施形態では、当該抗体は、誘導体である。用語「誘導体」とは、アミノ酸（または、核酸）の挿入、欠失、または、置換以外の化学修飾を含む分子のことを指す。特定の実施形態では、誘導体は、ポリマー、脂質、または、その他の有機もしくは無機部分を有する化学結合などであるが、これらに限定されない共有結合修飾を含む。特定の実施形態では、化学修飾した抗原結合タンパク質は、化学修飾を受けていない抗原結合タンパク質よりも循環半減期を長くすることができる。特定の実施形態では、化学修飾した抗原結合タンパク質は、所望の細胞、組織、及び／または、臓器に対する標的化能力を改善することができる。一部の実施形態では、誘導体抗原結合タンパク質は、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコール、または、ポリプロピレングリコールなどであるが、これらに限定されない1つ以上の水溶性ポリマー付着を含むように共有結合的に修飾する。例えば、米国特許第 4640835 号、第 4496689 号、第 4301144 号、第 4670417 号、第 4791192 号、及び、第 4179337 号を参照されたい。特定の実施形態では、誘導体抗原結合タンパク質は、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリー 1, 3-ジオキソラン、ポリー 1, 3, 6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー、または、ランダムコポリマーのいずれか）、ポリー（N-ビニルピロリドン）-ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、及び、ポリビニルアルコール、ならびに、そのようなポリマーの混合物などであるが、これらに限定されない1つ以上のポリマーを含む。

【0288】

特定の実施形態では、誘導体は、ポリエチレングリコール（PEG）サブユニットで共有結合的に修飾する。特定の実施形態では、1つ以上の水溶性ポリマーを、誘導体の1つ以上の特定の位置、例えば、アミノ末端に対して結合する。特定の実施形態では、1つ以上の水溶性ポリマーは、誘導体の1つ以上の側鎖に対してランダムに結合する。特定の実施形態では、PEG を、抗原結合タンパク質の治療能力を改善するために使用する。特定の実施形態では、PEG を、ヒト化抗体の治療能力を改善するために使用する。このような特定の方法は、例えば、米国特許第 6133426 号で論じられており、本明細書の一部を構成するものとして、同文献を、あらゆる目的のために援用する。

【0289】

ペプチド類似体は、製薬業界では、テンプレートペプチドの特性に類似した特性を有する非ペプチド薬として一般的に使用されている。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチド模倣物（peptide mimetics）」または「ペプチド模倣物（p

10

20

30

40

50

eptidomimetics)」と称されている。本明細書の一部を構成するものとして、あらゆる目的のために援用する、Fauchere, J. Adv. Drug Res., 15:29 (1986); 及び、Evans et al, J. Med. Chem., 30:1229 (1987)。このような化合物は、コンピューター化した分子モデリングを利用して、開発されることが多い。治療的に有用なペプチドと構造的に類似しているペプチド模倣物を使用して、類似の治療効果、または、予防効果を得ることができる。一般的に、ペプチド模倣物は、ヒト抗体などのパラダイムポリペプチド（すなわち、生化学的特性、または、薬理学的活性を有するポリペプチド）と構造的に似ているが、当該技術分野で周知の方法で： $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ （シス、及び、トランス）、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、及び、 $-CH_2SO$ から選択する結合で任意に置換した1つ以上のペプチド結合を有する。特定の実施形態では、コンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸を、同じタイプのD-アミノ酸（例えば、L-リジンの代わりにD-リジン）で体系的に置換すると、安定性が高まったペプチドを生成することができる。加えて、コンセンサス配列、または、実質的に同一のコンセンサス配列変異を含む固定化したペプチドは、当該技術分野で公知の方法（Rizzo and Gierasch Ann. Rev. Biochem., 61:387 (1992)、本明細書の一部を構成するものとして、あらゆる目的のために援用する）、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を加えることで、生成することができる。

【0290】

薬物コンジュゲーションは、生物学的活性細胞毒性（抗がん）ペイロード、または、特定の腫瘍マーカーを特異的に標的とする抗体（例えば、理想的には、腫瘍細胞内、または、腫瘍細胞上にだけ認められるポリペプチド）に対する薬物のカップリングに関与する。抗体は、これらのタンパク質を体内で追跡し、そして、がん細胞の表面に付着する。当該抗体と標的タンパク質（抗原）との間の生化学的反応は、当該腫瘍細胞においてシグナルを発生させ、次いで、当該抗体を、細胞毒素とともに、吸収し、または、内部に取り込む。ADCを内部に取り込んだ後に、細胞毒性薬を放出して、がんを死滅させる。この標的作用により、理想的には、当該薬物の副作用が小さくなり、かつ、その他の化学療法剤よりも治療ウィンドウが広がる。抗体をコンジュゲートする技術は、当該技術分野で公知である（例えば、Jane de Lartigue OncLive July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; 及び、Ducry et al. Bioconjugate Chemistry 21(1):5-13 (2010)を参照されたい。

【0291】

III. 核酸、ベクター、及び、宿主細胞

本開示の抗MS4A4A抗体は、例えば、米国特許第4816567号に記載の組換え方法、及び、組成物を使用して生産し得る。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体のいずれかをコードするヌクレオチド配列を有する単離した核酸を提供する。かかる核酸は、抗MS4A4A抗体の V_L を含むアミノ酸配列、及び／または、 V_H を含むアミノ酸配列（例えば、当該抗体の軽鎖、及び／または、重鎖）をコードし得る。一部の実施形態では、かかる核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）を提供する。一部の実施形態では、かかる核酸を含む宿主細胞も提供する。一部の実施形態では、当該宿主細胞は、（1）当該抗体の V_L を含むアミノ酸配列、及び、当該抗体の V_H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または、（2）当該抗体の V_L を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、及び、当該抗体の V_H を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、形質導入している）。一部の実施形態では、当該宿主細胞は、真核生物、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または、リンパ系細胞（例えば、YO、NSO、Sp20細胞）である。また、本開示の宿主細胞として、単離した細胞、インビトロで培養した細胞、及び、エクスピボで培養した細胞があるが、これらに限定されない。

【0292】

本開示の抗MS4A4A抗体を作り出す方法を提供する。一部の実施形態では、当該方法は、抗MS4A4A抗体をコードする核酸を含有する本開示の宿主細胞を、当該抗体の発現に好適な条件下で培養することを含む。一部の実施形態では、当該抗体を、その後に、宿主細胞（または、宿主細胞培養培地）から回収する。

【0293】

本開示の抗MS4A4A抗体を組換え生産するために、抗MS4A4A抗体をコードする核酸を単離し、そして、宿主細胞でのさらなるクローニング、及び／または、発現のために、1つ以上のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、当該抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）、容易に単離を行い、そして、配列決定し得る。

【0294】

本開示の抗MS4A4A抗体、または、細胞表面で発現したそのフラグメント、または、ポリペプチド、本明細書に記載したポリペプチド（抗体を含む）のいずれかをコードする核酸配列を含有する好適なベクターとして、クローニングベクター、及び、発現ベクターがあるが、これらに限定されない。好適なクローニングベクターは、標準的技法に従って構築することができ、または、当該技術分野において入手可能な数多くのクローニングベクターから選択し得る。選択するクローニングベクターは、使用予定の宿主細胞に応じて変わり得るが、有用なクローニングベクターは、一般的に、自己複製能を有しており、特定の制限エンドヌクレアーゼのための単一の標的を有することができ、及び／または、当該ベクターを含むクローンの選択に用いることができるマーカーの遺伝子を保持し得る。好適な例として、プラスミド、及び、細菌ウイルス、例えば、pUC18、pUC19、Bluescript（例えば、pBS SK+）、及び、その誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、ならびに、pSA3、及び、pAT28などのシャトルベクターがある。これらのクローニングベクター、及び、数多くのその他のクローニングベクターは、BioRad、Stratagene、及び、Invitrogenなどの業者から入手可能である。

【0295】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞として、原核細胞または真核細胞がある。例えば、本開示の抗MS4A4A抗体は、特に、グリコシル化、及びFcエフェクター機能を必要としない場合には、細菌において生産し得る。細菌での抗体フラグメント、及び、ポリペプチドの発現については、（例えば、米国特許第5648237号、第5789199号、及び、第5840523号。発現の後に、当該抗体を、可溶性画分での細菌細胞ペーストから単離し、そして、さらに精製することができる。

【0296】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物も、抗体をコードするベクターに好適なクローニング宿主または発現宿主であり、このようなものとして、グリコシル化経路を「ヒト化」して、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体を生産する真菌株及び酵母株がある（例えば、Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)；及び、Liet al, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)）。

【0297】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物、及び、脊椎動物）から得ることもできる。無脊椎動物細胞の例として、植物細胞、及び、昆虫細胞がある。昆虫細胞とともに、特に、Spodoptera frugiperda細胞のトランスフェクションに使用することができる、数多くのバキュロウイルス株が同定されている。また、植物細胞培養物も、宿主として利用することができる（例えば、トランスジェニック植物で抗体を生産するためのPLANTIBODIES（商標）技術について記載している米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号、及び、第6417429号）。

【0298】

また、脊椎動物細胞も、宿主として使用し得る。例えば、懸濁液で成長するように適合させた哺乳動物細胞株が有用である。有用な宿主哺乳動物細胞株のその他の例として、SV40で形質転換したサル腎臓CV1株(COS-7)；ヒト胚性腎臓株(293細胞、または、例えば、Graham et al, J. Gen. Virol. 36:59 (1977)に記載されているような293細胞)；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)；マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)に記載されたTM4細胞)；サル腎臓細胞(CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA)；イヌ科腎臓細胞(MDCK)；バッファローラット肝細胞(BRL 3A)；ヒト肺細胞(W138)；ヒト肝細胞(Hep G2)；マウス乳腺腫瘍(MMT 060562)；例えば、Mather et al, Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載のTRI細胞；MRC5細胞；及びFS4細胞がある。その他の有用な宿主哺乳動物細胞株として、DHFR-CHO細胞(Urlaub et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))などのチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞；ならびに、Y0, NS0、及び、Sp2/0などの骨髓腫細胞株がある。抗体生産に好適な特定の宿主哺乳動物細胞株の総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照されたい。

10

20

【0299】

IV. 医薬組成物／製剤

本明細書では、本開示の抗MS4A4A抗体、及び、医薬として許容可能な担体を含む医薬組成物、及び／または、医薬製剤を提供する。

【0300】

一部の実施形態では、医薬として許容可能な担体は、好ましくは、使用する用量、及び、濃度でレシピエントに対して無毒である。本明細書に記載の抗体は、固体、半固体、液体、または、気体の形態の調製物に製剤し得る。このような製剤の例として、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル剤、マイクロスフェア、及び、エアロゾル剤があるが、これらに限定されない。医薬として許容可能な担体は、所望の製剤に応じて、動物またはヒト投与のための医薬組成物を製剤するために一般的に使用するビヒクルである、医薬として許容可能な非毒性の希釈剤の担体を含み得る。特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解または放出の速度、吸着または浸透を改変、維持、または、保存するための製剤材料を含むことができる。

30

【0301】

特定の実施形態では、医薬として許容可能な担体として、アミノ酸(グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、または、リジンなど)；抗菌剤；酸化防止剤(アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または、亜硫酸水素ナトリウム)；緩衝剤(ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または、その他の有機酸など)；増量剤(マンニトール、または、グリシンなど)；キレート剤(エチレンジアミン四酢酸(EDTA)など)；錯化剤(カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリン、または、ヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリンなど)；増量剤；単糖類；二糖類；及び、その他の炭水化物(グルコース、マンノース、または、デキストリンなど)；タンパク質(血清アルブミン、ゼラチン、または、免疫グロブリンなど)；着色剤、矯味矯臭剤、及び、希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー(ポリビニルピロリドンなど)；低分子量ポリペプチド；塩を形成する対イオン(ナトリウムなど)；防腐剤(塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または、過酸化水素など)；溶媒(グリセリン、プロピレングリコール、または、ポリエチレングリコールなど)

40

50

；糖アルコール（マンニトール、または、ソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤、または、湿潤剤（プルロニック（登録商標）、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパルなど）；安定性増強剤（スクロース、または、ソルビトールなど）；等張化増強剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトールなど）；送達媒体；希釈剤；賦形剤、及び／または、医薬用アジュバントがあるが、これらに限定されない。様々な種類の投与に適した製剤のさらなる例は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press 22nd ed. (2013) に認められる。薬物送達法の簡潔な総説については、Langer, Science 249:1527-1533 (1990) を参照されたい。
【0302】

10

非経口投与に好適な製剤として、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び、製剤を対象のレシピエントの血液と等張にする溶質を含むことができる水性及び非水性の等張性無菌注射液剤と、懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、及び、防腐剤を含むことができる水性及び非水性の無菌懸濁剤とがある。

【0303】

製剤を、脳または中枢神経系で保持し、そして、安定させるように最適化し得る。作用物質を頭蓋区画に投与すると、その作用物質が、その区画内に保持され、拡散せず、または、拡散しても血液脳関門を通過しないことが望ましい。安定化技法として、分子量の増大を達成するために、架橋、多量体化、または、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、中性タンパク質担体などの基への結合などがある。

20

【0304】

保持を確実にしめるためのその他の方策として、生分解性または生体侵食性インプラントへの本開示の抗MS4A4A抗体の封じ込めがある。治療的活性物質の放出速度は、ポリマーマトリックスを介した輸送速度、及び、インプラントの生分解速度によって制御される。インプラントは、粒子、シート、パッチ、ブランク、繊維、マイクロカプセルなどとし得るものであり、また、選択した挿入部位に適合するあらゆるサイズまたは形状とし得る。使用し得る生分解性ポリマー組成物は、分解したときにモノマーなど、生理学的に許容可能な分解生成物を生成する有機エステルまたはエーテルとし得る。無水物、アミド、オルトエステルなどを、単独で、または、その他のモノマーと組み合わせて使用し得る。これらのポリマーを、縮合ポリマーとし得る。これらのポリマーは、架橋したもの、または、未架橋のものとし得る。特に対象となるものは、ホモポリマーまたはコポリマーのいずれかであるヒドロキシ脂肪族カルボン酸のポリマー、それに、多糖である。対象となるポリエステルとして、D-乳酸、L-乳酸、ラセミ乳酸、グリコール酸、ポリカプロラクトン、及び、これらの組み合わせのポリマーがある。対象となる多糖として、アルギン酸カルシウム、及び、官能化セルロース、特に、非水溶性であり、分子量が約5kD～500kDであることを特徴とするカルボキシメチルセルロースエステルなどがある。生分解性ヒドロゲルも、本開示のインプラントに採用し得る。ヒドロゲルとは、一般的に、液体を吸収する能力を特徴とするコポリマー材料である。

30

40

【0305】

V. 治療用途

本明細書で開示したように、本開示の抗MS4A4A抗体は、疾患及び障害を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを治療するために使用し得る。一部の実施形態では、本開示の抗MS4A4A抗体は、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、及び認知障害を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれらを治療する上で有効である。

【0306】

疾患標的としてのMS4A4A

ゲノムワイド関連研究は、MS4Aファミリーの様々なメンバーが、アルツハイマー病に関連していることを確認している。これらは、MS4A2、MS4A3、MS4A4A

50

、MS4A4E、MS4A6A、及び、MS4A6Eである。関連するSNPは、MS4A6Aの3'UTR(rs610932)、及び、MS4A4EとMS4A6Aとの間の遺伝子間領域(rs670139)で認められる。MS4A遺伝子クラスターの3つのSNPは、遅発性アルツハイマー病のリスクの高まりと関連している。これらには、MS4A4Aのrs4938933、MS4A4Eのrs670139、及び、MS4A6Aのrs610932などがある(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)。加えて、MS4A4A遺伝子座のSNP(rs2304933、及び、rs2304935)は、MS4A4Aのレベルが高くまること、また、遅発性アルツハイマー病(LOAD)などのアルツハイマー病のリスクが高くなることと関連していた(Allen et al, 2012, Neurology, 79:221-228)。

【0307】

本明細書で提供する方法は、神経変性疾患、障害、または、病態の予防、そのリスクの抑制、またはそれを有する個体の治療における用途を見出す。一部の実施形態では、本開示は、神経変性障害を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。

【0308】

一部の実施形態では、本開示は、アルツハイマー病を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。

【0309】

一部の実施形態では、本開示は、遅発性アルツハイマー病を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。

【0310】

一部の実施形態では、本開示は、軽度認知機能障害を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。

【0311】

一部の実施形態では、本開示は、MS4A4Aの過剰発現または活性の増大に関連する疾患、障害、または、病態を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。

【0312】

一部の実施形態では、本開示は、CSF1R欠損疾患または障害を予防する、そのリスクを抑制する、または、それを有する個体を治療する方法を提供するものであり、当該方法は、それを必要とする個体に対して、治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。一部の実施形態では、CSF1R欠損疾患または障害は、軸索スフェロイド及び色素性グリアを伴う成人発症性白質脳症(ALSP)またはスフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症(HDLS)である。

【0313】

本開示のその他の態様は、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、軽度認知機能障害、血管性認知症、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、外傷性脳損傷、脊髄損傷、長期鬱病、動脈硬化性血管疾患、正常な老化の望ましくない症状、認知症、混合型認知症、クロイツフェルト・ヤコブ病、正常圧水頭症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、タウパチー病、脳卒中、急性外傷、慢性外傷、狼瘡、急性及び慢性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、マラリア、本態性振戦、中枢神経系ループス、ベーチェット

病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、変性椎間板疾患、シャイ・ドレーガー症候群、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核神経節変性症、急性播種性脳脊髄炎、肉芽腫性障害、サルコイドーシス、加齢性疾患、加齢性黄斑変性症、緑内障、網膜色素変性症、網膜変性、気道感染症、敗血症、眼感染症、全身感染症、炎症性障害、関節炎、多発性硬化症、代謝障害、肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病、組織または血管の損傷、外傷、炎症性細胞の破片またはタンパク質凝集体、異常な循環骨髄細胞、不健康な老化、加齢性認知機能障害、加齢性脳萎縮、炎症やニューロン脱落などであるが、これらに限定されない加齢関連形質、及び、高齢者の前頭大脳皮質の認知障害など、公知の脳疾患が認められない認知障害などの認知障害、及び、正常な老化の1つ以上の望ましくない症状からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法であって、当該個体に対して、前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体の治療有効量を投与することを含む、当該方法に関する。

本開示のその他の態様は、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、外傷性脳損傷、脊髄損傷、長期鬱病、動脈硬化性血管疾患、正常な老化の望ましくない症状、認知症、混合型認知症、クロイツフェルト・ヤコブ病、正常圧水頭症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、タウパチー病、脳卒中、急性外傷、慢性外傷、狼瘡、急性及び慢性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、マラリア、本態性振戦、中枢神経系ループス、ベーチェット病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、変性椎間板疾患、シャイ・ドレーガー症候群、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核神経節変性症、急性播種性脳脊髄炎、肉芽腫性障害、サルコイドーシス、加齢性疾患、加齢性黄斑変性症、緑内障、網膜色素変性症、網膜変性、気道感染症、敗血症、眼感染症、全身感染症、炎症性障害、関節炎、多発性硬化症、代謝障害、肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病、組織または血管の損傷、外傷、炎症性細胞の破片またはタンパク質凝集体、異常な循環骨髄細胞、不健康な老化、加齢性認知機能障害、加齢性脳萎縮、炎症やニューロン脱落などであるが、これらに限定されない加齢関連形質、及び、高齢者の前頭大脳皮質の認知障害など、公知の脳疾患が認められない認知障害などの認知障害、及び、正常な老化の1つ以上の望ましくない症状からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷の予防、そのリスクの抑制、またはそれを有する個体の治療における使用のための前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体に関する。本開示のその他の態様は、がんの予防、そのリスクの抑制、またはそれを有する個体の治療に使用するための前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体に関する。

10

20

30

【0314】

本開示のその他の態様は、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、軽度認知機能障害、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、外傷性脳損傷、脊髄損傷、長期鬱病、動脈硬化性血管疾患、正常な老化の望ましくない症状、認知症、混合型認知症、クロイツフェルト・ヤコブ病、正常圧水頭症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、タウパチー病、脳卒中、急性外傷、慢性外傷、狼瘡、急性及び慢性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、マラリア、本態性振戦、中枢神経系ループス、ベーチェット病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、変性椎間板疾患、シャイ・ドレーガー症候群、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核神経節変性症、急性播種性脳脊髄炎、肉芽腫性障害、サルコイドーシス、加齢性疾患、加齢性黄斑変性症、緑内障、網膜色素変性症、網膜変性、気道感染症、敗血症、眼感染症、全身感染症、炎症性障害、関節炎、多発性硬化症、代謝障害、肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病、組織または血管の損傷、外傷、炎症性細胞の破片またはタンパク質凝集体、異常な循環骨髄細胞、不健康な老化、加齢性認知機能障害、加齢性脳萎縮、炎症やニューロン脱落などであるが、これらに限定されない加齢関連形質、及び、高齢者の前頭大脳皮質の認知障害など、公知の脳疾患が認められない認知障害などの認知障害、及び、正常な老化の1つ以上の望ましくない症状からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを

40

50

抑制する、またはそれを有する個体を治療するための医薬の製造における、前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体の使用に関する。本開示のその他の態様は、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、軽度認知機能障害、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、脊髄損傷、認知症、脳卒中、パーキンソン病、急性播種性脳脊髄炎、網膜変性、加齢性黄斑変性症、緑内障、多発性硬化症、敗血症ショック、細菌感染、関節炎、及び、変形性関節症からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する方法に関し、当該方法は、個体に対して、前出の実施形態のいずれか治療有効量の抗MS4A4A抗体を投与することを含む。本開示のその他の態様は、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、軽度認知機能障害、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、脊髄損傷、認知症、脳卒中、パーキンソン病、急性播種性脳脊髄炎、網膜変性、加齢性黄斑変性症、緑内障、多発性硬化症、敗血症ショック、細菌感染、関節炎、及び、変形性関節症からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷の予防、そのリスクの抑制、またはそれを有する個体の治療のために使用する前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体に関する。本開示のその他の態様は、前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、アルツハイマー病、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症、外傷性脳損傷、脊髄損傷、認知症、脳卒中、パーキンソン病、急性播種性脳脊髄炎、網膜変性、加齢性黄斑変性症、緑内障、多発性硬化症、敗血症ショック、細菌感染、関節炎、及び、変形性関節症からなる群から選択する疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療する医薬の製造における、前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体の使用に関する。

【0315】

一部の実施形態では、対象または個体は、哺乳動物である。哺乳動物として、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及び、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、そして、サルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、齧歯類（例えば、マウス、及び、ラット）があるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、当該対象または個体は、ヒトである。

【0316】

本明細書で提供する抗体（及び、あらゆるさらなる治療薬）を、非経口、肺内、鼻腔内、病巣内投与、脳脊髄内、頭蓋内、髄腔内、滑膜内、髄腔内、経口、局所、または、吸入経路などのあらゆる適切な手段で投与することができる。非経口注入として、ボラスとしての筋肉内、静脈内投与、または、一定期間にわたる持続注入、動脈内、関節内、腹腔内、または、皮下投与がある。一部の実施形態では、当該投与は、静脈内投与である。一部の実施形態では、当該投与を、皮下にする。投与時間の長短をも加味して、投与は、適切な経路、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射で実施できる。本明細書では、単回投与、または、様々な時点に及ぶ複数回投与、ボラス投与、及び、パルス注入などであるが、これらに限定されない様々な投薬スケジュールを企図している。

【0317】

本明細書で提供する抗体は、優れた医療行為と一致する方法で、製剤、投薬、及び、投与する。この関連で考慮すべき要素として、治療する特定の障害、治療を受ける特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、作用物質の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び、開業医に公知のその他の要素がある。当該抗体は、必須ではないが、問題の障害の予防または治療のために現在利用されている1つ以上の作用物質を用いて、任意に製剤する。そのようなその他の作用物質の有効量は、製剤に存在する抗体の量、障害または治療の種類、及び、先述した考察でのその他の要素によって定まる。これらは、一般的には、本明細書に記載したのと同じ用量、及び、投与経路で、または、本明細書に記載した用量の約1～99%、または、あらゆる用量で、かつ、経験的／臨床的に適切であると決定したあらゆる経路で使用する。

【0318】

疾患の予防または治療のための（単独で、または、1つ以上のその他のさらなる治療剤と組み合わせて使用する場合は）本開示の抗体の適切な用量は、治療する疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度と経過、当該抗体を予防または治療のいずれの目的で投与するのかの区別、従前の治療、患者の病歴と抗体に対する反応、及び、主治医の裁量によって定まる。当該抗体を、一度に、または、一連の治療において、適切に患者に対して投与する。

【0319】

疾患の種類、及び、重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ の抗体を、例えば、1回以上の別々の投与、または、持続注入のいずれかで、当該患者に対して投与する最初の候補用量とすることができる。上記した要素に応じて、ある一般的な1日用量を、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲とし得る。病態に応じて、数日以上 10
の反復投与に関しては、一般的に、治療は、疾患症状に所望の抑制が認められるまで続ける。当該抗体のある例示的な用量は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $150\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり、そのような用量を、断続的に、例えば、毎週、または、3週間ごと（例えば、当該患者が、約2～約20用量、または、例えば、約6用量の抗体の投与を受けるよう）に投与し得る。特定の実施形態では、投薬頻度は、1日3回、1日2回、1日1回、隔日1回、週1回、2週間に1回、4週間に1回、5週間に1回、6週間に1回、7週間に1回、8週間に1回、9週間に1回、10週間に1回、または、月1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、または、それ以上である。最初に高負荷用量を、続いて、1回以上の低用量を投与し得る。しかしながら、その他の投与計画も有用であり得る。この治療法の進行状況は、従来の技術とアッセイで容易にモニターできる。 20

【0320】

VI. 診断用途

あらゆる抗体の一部の実施形態では、本明細書で提供するあらゆる抗MS4A4A抗体は、試料または個体でのMS4A4Aの存在を検出する上で有用である。本明細書で使用する用語「検出する」とは、定量的または定性的検出を含む。本明細書では、個体、または、個体に由来する組織試料でのMS4A4Aの検出など、診断目的で本開示の抗体を使用する方法を提供する。一部の実施形態では、当該個体は、ヒトである。

【0321】

当該検出方法は、抗原に結合した抗体の定量が関与し得る。生物学的試料での抗体検出は、免疫蛍光顕微鏡、免疫細胞化学、免疫組織化学、ELISA、FACS分析、免疫沈降、または、マイクロ陽電子放射断層撮影など、当該技術分野で公知のあらゆる方法で行い得る。特定の実施形態では、当該抗体を、例えば、 ^{18}F で放射性標識し、次いで、マイクロ陽電子放射断層撮影分析を利用して検出する。また、抗体結合も、陽電子放出断層撮影（PET）、X線コンピューター断層撮影、単一光子放出コンピューター断層撮影（SPECT）、コンピューター断層撮影（CT）、及び、コンピューター断層撮影（CAT）などの非侵襲的手法で、患者において定量し得る。 30

【0322】

VII. 製造物

本明細書では、本明細書で説明した抗MS4A4A抗体を含む製造物（例えば、キット）を提供する。製造物は、本明細書に記載した抗体を含む1つ以上の容器を含み得る。容器は、バイアル、ボトル、ジャー、可撓性包装（例えば、密封したMylar、または、プラスチックバッグ）などであるが、これらに限定されない、あらゆる適切な包装とし得る。これらの容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、複数用量パッケージ）、または、サブユニット用量とし得る。 40

【0323】

一部の実施形態では、これらのキットは、第2の作用物質をさらに含み得る。一部の実施形態では、当該第2の作用物質は、注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、及び、デキストロース溶液などであるが、これらに限定されない、医薬として許容可能な緩衝剤または希釈剤である。一部の実施形態では、当該第2の作用物質は、医薬として活性な作用物質である。 50

【0324】

あらゆる製造物の一部の実施形態では、当該製造物は、本開示の方法に従って使用するための指示書をさらに含む。一般的に、当該指示書は、意図した治療のための用量、投薬スケジュール、及び、投与経路に関する情報を含む。一部の実施形態では、これらの指示書は、本開示のあらゆる方法に従って、前頭側頭型認知症、アルツハイマー病、遅発性アルツハイマー病、認知障害または認識機能障害、軽度認知機能障害、血管性認知症、血管性認知症、発作、網膜ジストロフィー、外傷性脳損傷、脊髄損傷、長期鬱病、動脈硬化性血管疾患、正常な老化の望ましくない症状、認知症、混合型認知症、クロイツフェルト・ヤコブ病、正常圧水頭症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、タウパチー病、脳卒中、急性外傷、慢性外傷、狼瘡、急性及び慢性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、マラリア、本態性振戦、中枢神経系ループス、ベーチェット病、パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症、変性椎間板疾患、シャイ・ドレーガー症候群、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核神経節変性症、急性播種性脳脊髄炎、肉芽腫性障害、サルコイドーシス、加齢性疾患、加齢性黄斑変性症、緑内障、網膜色素変性症、網膜変性、気道感染症、敗血症、眼感染症、全身感染症、炎症性障害、関節炎、多発性硬化症、代謝障害、肥満、インスリン抵抗性、2型糖尿病、組織または血管の損傷、外傷、炎症性細胞の破片またはタンパク質凝集体、異常な循環骨髓細胞、不健康な老化、加齢性認識機能障害、加齢性脳萎縮、炎症やニューロン脱落などであるが、これらに限定されない加齢関連形質、及び、高齢者の前頭大脳皮質の認知障害など、公知の脳疾患が認められない認知障害などの認知障害、及び、正常な老化の1つ以上の望ましくない症状から選択する疾患、障害、または、損傷を予防する、そのリスクを抑制する、またはそれを有する個体を治療するための、本開示の単離した抗体（例えば、本明細書で説明した抗MS4A4A抗体）の投与であって、当該個体に対して、前出の実施形態のいずれかの抗MS4A4A抗体の治療有効量を投与することを含む、当該投与に関する説明を含む。

10

20

【0325】

一部の実施形態では、当該指示書は、抗MS4A4A抗体、及び、第2の作用物質（例えば、医薬として活性な第2の作用物質）の使用に関する説明を含む。

【0326】

以下の実施例を参照することで、本開示の理解は十分に深まる。しかしながら、それらを、本開示の範囲を限定するものとして解釈すべきではない。本開示全体でのすべての引用を、本明細書の一部を構成するものとして、明示的に援用する。

30

【実施例】

【0327】

実施例1：マウス抗MS4A4Aマウス抗体のヒト化

本実施例の目的は、国際特許出願第PCT/US2019/016156号で開示されている特定の親マウス抗MS4A4A抗体のヒト化バリエーションの生成であった。

【0328】

親マウス抗MS4A4A抗体4A-202は：

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVKQR
PGQGLEWIGATHPGHGDTRYTQKFKGKATLSADKSSSTAY
MQLSNLASEDSAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDVWGRGTLV
TVSS（配列番号164）

40

のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGVSFMNWF
QQKPGQPPKLLIYGASNQGSGVPAFSGSGSGTDFTSLNIH
PMEEDDTAMYFCQQSKEVPPTFGGGTKLEIK（配列番号165）

のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0329】

親マウス抗MS4A4A4A-18は：

QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQR

50

PGQGLEWIGNINPTNGGTNYNERFKSKATLTVDKSSSTAY
MQLSSLTSEDSAVYYCARAYYYGSSLFAYWGQGTLVTVSS
(配列番号166)

のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSI TCKASQNVGTAVAWSQQKP
GQSPKLLIYSASYSRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNMQS
EDLADYFCQQYSTYPWTFGGGTTKLEIK (配列番号167)

のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0330】

親マウス抗MS4A4A抗体4A-21は：

QIQLVQSGPELK KPGETVKISCKASGYIFTSYGLSWVKQT
PGKGLKWMGWINTYSGVPTYANDFKGRFAFSLETSASTTY
LRINNLKNDDTATYFCARSLVDYWGQGTP LTVSS (配列番号168)

のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

DVVMTQTPTFTLSVTIGQSASISCKSSQSLLYS DGKTYLSW
LLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKI
SRVEAEDLG VYYCWQGIDFHQT FGGGTTKLEIK (配列番号169)

のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0331】

親マウス抗MS4A4A抗体4A-25は：

QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLRTSDMGVGVWR
QPSGEGLEWLADIWWDDNKYYNPSLKSRLTISKDTSSNQV
FLKITSVDTADTATY YCARRANYGNLFDYWGQGTA VTVSS
(配列番号170)

のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

DIVMTQSLKFMSTSVGDRVSI TCKASQNVRS AVAWYQQKP
GQSPKVLIIYWASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS
EDLADYFCLQHWN YLTFGSGTTKLEIK (配列番号171)

のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0332】

非ヒト抗体をヒト化する1つの方法は、非ヒト（例えば、マウス）抗体由来のCDRを、ヒト抗体アクセプターフレームワークに移植することである。そのようなCDR移植を行うと、そのフレームワークの変動に起因して、その標的に対するヒト化抗体の親和性の減弱または完全な喪失を招き得る。結果として、ヒトフレームワークでの特定のアミノ酸残基を、マウス抗体フレームワークの対応する位置のアミノ酸残基で置換（逆変異）して、低下または喪失した親和性を回復させる必要があり得る。したがって、選択したヒト抗体生殖細胞系列アクセプターフレームワークの関連で置換するアミノ酸残基は、ヒト化抗体が機能及びパラトープを実質的に保持しておくように決定しなければならない。加えて、良好な製造可能性及び下流発達のための、熱安定性及び溶解性の保持または改善が望まれる。

【0333】

したがって、MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canada) のBioMOEモジュールを使用して、構造ベースの抗体モデリングを、マウス抗MS4A4Aモノクローナル抗体4A-202、4A-18、4A-21、及び4A-25をヒト化するプロセスに適用した。簡潔に説明すると、ヒト化するマウスモノクローナル抗体のVH及びVLアミノ酸配列を、IMGT (<http://www.imgt.org/>) から取得したヒトVL、VH、LJ、HJ機能性生殖細胞系列アミノ酸配列と比較した。偽遺伝子とORFは分析から除外した。1つのマウスモノクローナル抗体（クエリ

10

20

30

40

50

一) ごとに、最も類似した5つのVLと、最も類似した5つのVH生殖細胞系列アミノ酸配列を選択し、そして、最も類似したVJ及びHJ遺伝子を組み合わせると、25個のヒト化アミノ酸配列が生成された。ヒトのフレームワークに移植するCDRは、AbMの定義 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrdef>) に従って定義した。

【0334】

このクエリーと、25個のヒト化アミノ酸配列を使用して、BioMOEモジュールまたはMOEのAntibody Modelerモジュール (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canada) を利用して、Fv相同性モデルを作成した。AMBER10: EHT力場分析は、抗体相同性モデリングプロセスを介したエネルギー最小化のために使用した。得たFv相同性モデルに基づいて、VLとVHとの間の相互作用エネルギー、座標をベースとした等電点 (3Dpi)、疎水性パッチ、及び帯電表面積などの分子記述子を、MOEが提供するスコアリングメトリクスによって計算、分析、及び選別した。これらの分子記述子を利用して、タンパク質発現、精製、結合親和性研究、及び機能アッセイなどの下流の実験手順に向けてヒト化モノクローナル抗体に優先順位を付けた。

【0335】

MOEのBioMOEモジュールは、逆変異の可能性のある残基を視覚化及び分類するためのツールであるMutation Site Propertiesを提供する。これに関連して、逆変異を、ヒト化したアミノ酸配列を置き換える当初のクエリーアミノ酸配列に戻すアミノ酸置換として定義する。このツールを使用して、当初のクエリー (リファレンス) を、3D Fv相同性モデルの1次アミノ酸配列と3D構造の両方について選択したヒト化バリエーションと個別に比較した。

【0336】

リファレンス (すなわち、親) 抗体とヒト化バリエーションとの間の変化を、アミノ酸タイプの差異、CDR残基との相互作用ポテンシャル、VL/VHペアリングについての影響ポテンシャル、ならびにCDRの内部及び近傍での疎水性及び荷電表面積の潜在的な変化に基づいて分類した。

【0337】

有意な電荷の差異を有する、または強いH結合相互作用を含むCDRまたはVL/VH界面の近傍での変異を個別に評価し、そして、有意に攪乱を示す変異を、当初のクエリー残基に戻した。その結果、ヒト化アミノ酸配列は、最大で5つの逆変異を含み得る。可変重鎖及び可変軽鎖クエリーマウスモノクローナル抗体 (マウス抗MS4A4A抗体4A-202、マウス抗MS4A4A抗体4A-18、マウス抗MS4A4A抗体4A-21、及びマウス抗MS4A4A抗体4A-25)、ならびに逆変異を有する、または有していないヒト化モノクローナル抗体のアミノ酸配列を、以下の表1~4に示す。表1~4では、CDR配列 (Kabab) に、下線を付けている。

【表 3 - 1】

表 1

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-202	QVQLQQSGAELARPGASVK LSCKASGYTFTNYWMQWV KQRPQGQLEWIGATHPGHG DTRYTQKFKGKATLSADKS SSTAYMQLSNLASEDSAVY YCAREEVYYGFRSYWYFD VWGRGTLVTVSS	4	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASESVDNYGVSFMNWFQOKP GQPPKLLIYGASNQSGVPAF SGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTA MYFCQOSKEVPPTFGGGTKLEI K	16
4A-301	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYWMQW VRQAPQGQLEWMGATHPG HGDTRYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY FDVWGRGTLVTVSS	5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASESVDNYGVSFMNWYQQ KPGQPPKLLIYGASNQSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQOSKEVPPTFGGGTKV EIK	17
4A-302	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYWMQW VRQAPQGQLEWMGATHPG HGDTRYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY FDVWGRGTLVTVSS	5	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASESVDNYGVSFMNWYQQK PGQAPRLLIYGASNQSGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQOSKEVPPTFGGGTKVEI K	18
4A-303	EVQLVQSGAEVKKPGESLK ISCKGSGYTFTNYWMQWV RQMPGKGLEWMGATHPGH	6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASESVDNYGVSFMNWYQQ KPGQPPKLLIYGASNQSGVDP	17

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
	<u>GDTRYSPSFQ</u> QVTISADKS ISTAYLQWSSLKASDTAMY YCAREEVYYGFRSYWYFD <u>VWGRGTLVT</u> VSS		RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKV EIK	
4A-304	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTR</u> DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLVT</u> VSS	5	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC <u>RASESVDNYGV</u> SFMNWHYQQ PGQAPRLLIYGASNOGSGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEI K	19
4A-305	EVQLVQSGAEVKKPGATV KISCKVSGYTFTNYWMQW VQAPGKGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAEKFQGRVTITAD</u> TSTDATYMESSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLVT</u> VSS	7	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CRASESVDNYGV</u> SFMNWHYQQ KPGQPPKLLIYGASNOGSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKV EIK	17
4A-306	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTR</u> DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLVT</u> VSS	5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT <u>CRASESVDNYGV</u> SFMNWHYQQ KPGKAPKLLIYGASNOGSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKV EIK	20
4A-307	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTA</u> DKSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAREEVYYGFRSYW <u>YFDVWGRGTLVT</u> VSS	8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CRASESVDNYGV</u> SFMNWHYQQ KPGQPPKLLIYGASNOGSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKV EIK	17
4A-308	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTA</u> DKSTSTAYMESSLRSEDT AVYYCAREEVYYGFRSYW <u>YFDVWGRGTLVT</u> VSS	9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CRASESVDNYGV</u> SFMNWHYQQ KPGQPPKLLIYGASNOGSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKV EIK	17

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-309	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTLTA</u> DKSISTAYMELSLRSDDTV VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	10	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASESVDNYGVSEFMN</u> WYQQK PGQAPRLLIYGASNOQSGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQOSKEVPPTFGGGTKVEI K	18
4A-310	EVQLVQSGAEVKKPGESLK ISCKGSGYTFTNYWMQWV RQMPGKGLEWMGATHPGH <u>GDTRYSPSFQGV</u> TISADKS SSTAYLQWSSLKASDTAMY YCAREEVYYGFRSYWYFD <u>VWGRGTLTVSS</u>	11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASEVDNYGVSEFMNWYQQ KPGQPPKLLIYGASNOQSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQOSKEVPPTFGGGTKV EIK	17
4A-311	EVQLVQSGAEVKKPGATV KISCKVSGYTFTNYWMQW VQAPGKGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAEKFQGRVTITAD</u> KSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CRASEVDNYGVSEFMNWYQQ KPGQPPKLLIYGASNOQSGVDP RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQOSKEVPPTFGGGTKV EIK	17
4A-312	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTR</u> DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVDYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASESVDNYGVSEFMN</u> WYQQK PGQAPRLLIYGASNOQSGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQOSKEVPPTFGGGTKVEI K	21
4A-313	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGATHPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTR</u> DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDLWGRGTLTVSS</u>	14	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASESVDNYGVSRMN</u> WYQQK PGQAPRLLIYGASNOQSGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQOSKEVPPTFGGGTKVEI K	22
4A-314	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYTFTNYWMQW VRQAPGQGLEWMGTTLPG <u>HGDTRYAQKFQGRVTMTR</u> DTSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCAREEVYYGFRSYWY <u>FDVWGRGTLTVSS</u>	15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASESVDNYGVSRMN</u> WYQQK PGQAPRLLIYGASNOQSGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQOSKEVPPTFGGGTKVEI K	22

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 2

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-18	QVQLQQPGTEL VKPGASVK L SCKASGYTFTSYWIHWVK QRPQGQGLEWIGNINPTNGG TNYNERFKSKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYY CARAYYYGSSLFAYWGQ TLVTVSS	23	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSI TCKASQNVGTAVAWSQQKP GQSPKLLIYSASYRHTGVPDR FTGSGSGTDFTLTITNMQSED LADYFCQQYSTYPWTFGGGT KLEIK	31
4A-315	QVQLVQSGAEVKKPGASV KV SCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMESSLRSED TAV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	24	DIVMTQSPSFLSASVGDRV TI TCKASQNVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32
4A-316	QVQLVQSGAEVKKPGASV KV SCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTMTVD KSTSTVYMESSLRSED TAV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	25	DIQLTQSPSFLSASVGDRV TI CKASQNVGTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRHTGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSTYPWTFGGGTKV EIKR	33
4A-317	QVQLVQSGAEVKKPGASV KV SCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTMTVD KSTSTVYMESSLRSED TAV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	25	DIVMTQSPSFLSASVGDRV TI TCKASQNVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-318	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTMTVD KSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	26	DIQLTQSPSFLSASVGDRVIT CKASQNVGTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRHTGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSTYPWTFGGGTKV EIKR	33
4A-319	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTMTVD KSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	26	DIVMTQSPSFLSASVGDRVIT TCKASQNVGTAVAWYQQKPG GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32
4A-320	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTSTRDT SISTAYMELSRRLRSDDTVVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	27	DIVMTQSPSFLSASVGDRVIT TCKASQNVGTAVAWYQQKPG GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32
4A-321	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTSTRDT SISTAYMELSRRLRSDDTVVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	27	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT TCKASQNVGTAVAWYQQKPG EKAPKSLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	34
4A-322	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTSTVD KSISTAYMELSRRLRSDDTVV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	28	DIQLTQSPSFLSASVGDRVIT CKASQNVGTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRHTGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSTYPWTFGGGTKV EIKR	33

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-323	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTSTVD KSISTAYMELSRLRSDDTVV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	28	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTI TCKASQNVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32
4A-324	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTSTVD KSISTAYMELSRLRSDDTVV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVGTAVAWYQQKP EKAPKSLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	35
4A-325	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQGLEWMGNINPTN GGTNYAQKFQGRVTSTVD KSISTAYMELSRLRSDDTVV YYCARAYYYGSSLFAYWG QGTLVTVSS	28	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVGTAVAWYQQKP EKAPKSLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	34
4A-326	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQRLWWMGNINPTNG GTNYSQKFQGRVTITRDTS ASTAYMELSSLRSEDNAVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	29	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTI TCKASQNVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32
4A-327	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQRLWWMGNINPTNG GTNYSQKFQGRVTITRDTS ASTAYMELSSLRSEDNAVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	29	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	36

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-328	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQRLEWMGNINPTNG <u>GTNYSQKFQGRVTITVDKS</u> ASTAYMELSSLRSEDNAVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	30	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITIT CKASONVGTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRHTGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSTYPWTFGGGTKV EIK	37
4A-329	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQRLEWMGNINPTNG <u>GTNYSQKFQGRVTITVDKS</u> ASTAYMELSSLRSEDNAVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	30	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITI TCKASONVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	32
4A-330	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQRLEWMGNINPTNG <u>GTNYSQKFQGRVTITVDKS</u> ASTAYMELSSLRSEDNAVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	30	AIQLTQSPSSLASVGDRVITIT CKASONVGTAVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQYSTYPWTFGGGTKV EIK	38
4A-331	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHWV RQAPGQRLEWMGNINPTNG <u>GTNYSQKFQGRVTITVDKS</u> ASTAYMELSSLRSEDNAVY YCARAYYYGSSLFAYWGQ GTLVTVSS	30	AIQMTQSPSSLASVGDRVITI TCKASONVGTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQYSTYPWTFGGGTK VEIK	36

10

20

30

【表 5 - 1】

表 3

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-21	QIQLVQSGPELKKPGETV KISCKASGYIFTSYGLSW VKQTPGKGLKWMGWIN <u>TYSGVPTYANDFKGRFA</u> FSLETSASTTYLRINNLK NDDTATYFCARSLVDYW GQGTPLTVSS	39	DVVMQTQPFTLSVTIGQSAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW LLQRPGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYYCWQGIDE <u>HQTFGGGTKLEIK</u>	54

40

50

【表 5 - 2】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-332	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLLTVSS	40	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	55
4A-333	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTTYLQISLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLLTVSS	41	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	55
4A-334	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLLTVSS	40	DIVMTQTPLSSPVTLGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW LQQRPGQPPRLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGIDF HQTFGGGTKVEIK	56
4A-335	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLLTVSS	40	DVVMTQTPLSSPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WLQQRPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGAGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQ GIDFHQTFGGGTKVEIK	57
4A-336	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLLTVSS	40	DVVMTQTPLSSPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WLQQRPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGAGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQ GIDFHQTFGGGTKVEIK	58
4A-337	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTTYLQISLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLLTVSS	41	DIVMTQTPLSSPVTLGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW LQQRPGQPPRLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGIDF HQTFGGGTKVEIK	56

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-338	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFLDTSVSTTYLQISSLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLVTVSS	41	DVVMQTQPLSSPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WLQQRPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGAGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQ GIDFHQTFGGGKVEIK	57
4A-339	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFLDTSVSTTYLQISSLK AEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLVTVSS	41	DVVMQTQPLSSPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WLQQRPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGAGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCWQ GIDFHQTFGGGKVEIK	58
4A-340	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQRLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TITLDTASATTYMESSLR SEDTAVYYCARSLVDYW GQGTLVTVSS	42	DVVMQTQPLSLSVTPGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WYLQKPGQPPQLLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGKVEIK	59
4A-341	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQRLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TITRDTASATYMESSL RSEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLVTVSS	43	DVVMQTQPLSLSVTPGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WYLQKPGQPPQLLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGKVEIK	59
4A-342	QIQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLVTVSS	44	DVVMQTQPLSLSVTPGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WYLQKPGQPPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGKVEIK	60
4A-343	QIQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TMTLDTSTSTTYMESSL RSEDTAVYYCARSLVDY WGQGTLVTVSS	45	DVVMQTQPLSLSVTPGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WYLQKPGQPPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGKVEIK	60

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-344	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSL RSED ~~TAVYYCARSLVDY~~ WGQGT ~~LVTVSS~~	46	DVVM ~~TQTPLSLSVTPGQPA~~ SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WYLQKPGQPPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVG ~~VYYCWQGI~~ DFHQTFGGG ~~TKVEIK~~	60
4A-345	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQRL ~~EW~~ MGWI NTYSGVPTY ~~SOKFQGRV~~ TITRDT ~~SASTAYMELSSL~~ RSED ~~TAVYYCARSLVDY~~ WGQGT ~~LVTVSS~~	43	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW YLQKPGQPPQLLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG ~~VYYCWQGIDF~~ HQT ~~F~~ GGG ~~TKVEIK~~	61
4A-346	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSL RSED ~~TAVYYCARSLVDY~~ WGQGT ~~LVTVSS~~	46	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW YLQKPGQPPQLLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG ~~VYYCWQGIDF~~ HQT ~~F~~ GGG ~~TKVEIK~~	61
4A-347	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQRL ~~EW~~ MGWI NTYSGVPTY ~~SOKFQGRV~~ TITLDT ~~SASTTYMELSSL~~ SED ~~TAVYYCARSLVDY~~ WGQGT ~~LVTVSS~~	42	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW YLQKPGQPPQLLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG ~~VYYCWQGIDF~~ HQT ~~F~~ GGG ~~TKVEIK~~	61
4A-348	QIQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TMTRDTSTSTVYMELSSL RSED ~~TAVYYCARSLVDY~~ WGQGT ~~LVTVSS~~	44	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW YLQKPGQPPQLLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG ~~VYYCWQGIDF~~ HQT ~~F~~ GGG ~~TKVEIK~~	61
4A-349	QIQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQKFQGRV TMTLDTSTSTTYMELSSL RSED ~~TAVYYCARSLVDY~~ WGQGT ~~LVTVSS~~	45	DIVMTQTPLSLSVTPGQPAS ISCKSSQSLLYSDGKTYLSW YLQKPGQPPQLLIYLVSKLD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVG ~~VYYCWQGIDF~~ HQT ~~F~~ GGG ~~TKVEIK~~	61

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-350	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI <u>NTYSGVPTYAQGFTGRF</u> VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK <u>LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL</u> KISRVEAEDVGVYYCWQGI <u>DFHQT</u> FGGGTKVEIK	55
4A-351	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI <u>NTYSGVPTYAQGFTGRF</u> VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK <u>LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL</u> KISRVEAEDVGVYYCWQGI <u>DFHQT</u> FGGGTKVEIK	62
4A-352	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI <u>NTYSGVPTYAQGFTGRF</u> VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSGGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK <u>LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL</u> KISRVEAEDVGVYYCWQGI <u>DFHQT</u> FGGGTKVEIK	63
4A-353	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI <u>NTYSGVPTYAQGFTGRF</u> VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSEGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK <u>LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL</u> KISRVEAEDVGVYYCWQGI <u>DFHQT</u> FGGGTKVEIK	64
4A-354	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI <u>NTYSGVPTYAQGFTGRF</u> VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSAGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK <u>LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL</u> KISRVEAEDVGVYYCWQGI <u>DFHQT</u> FGGGTKVEIK	65
4A-355	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI <u>NTYSGVPTYAQGFTGRF</u> VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSSGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK <u>LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL</u> KISRVEAEDVGVYYCWQGI <u>DFHQT</u> FGGGTKVEIK	66

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-356	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSQGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLDGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	67
4A-357	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYEVSK LDGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	68
4A-358	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLDGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI RFHQTFGGGTKVEIK	69
4A-359	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKASQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLDGVPDRFSGSGSGADFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	70
4A-360	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSGQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS RLDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	71
4A-361	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLESGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	72

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-362	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYL <u>VSRL</u> DSGVPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYC <u>WQGID</u> FHQTFGGGTKVEIK	73
4A-363	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLADY WGQGTLVTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYL <u>VSK</u> LSSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC <u>WQGI</u> DFHQTFGGGTKVEIK	74
4A-364	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT <u>SYGLS</u> WIRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTMVDY WGQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKASQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYL <u>VSK</u> LDSGVPDRFSGSGSGADFTL KISRVEAEDVGVYYC <u>WQGI</u> DFHQTFGGGTKVEIK	70
4A-365	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT <u>SYGLS</u> WIRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTMVDY WGQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYL <u>VSK</u> LSSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC <u>WQGI</u> DFHQTFGGGTKVEIK	74
4A-366	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT <u>SYGLS</u> WIRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTMVDY WGQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYL <u>VSK</u> LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC <u>WQGI</u> DFHQTFGGGTKVEIK	62
4A-367	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFT <u>SYGLS</u> WIRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTMVDY WGQGTLVTVSS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYL <u>VSK</u> LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC <u>WQGI</u> DFHQTFGGGTKVEIK	55

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-368	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFTSYGLS WIRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTMVDY WGQGTLLTVSS	48	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK LESGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	72
4A-369	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYTFTSYGLS WIRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTMVDY WGQGTLLTVSS	48	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI RFHQTFGGGTKVEIK	69
4A-370	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLG DY WGQGTLLTVSS	49	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSGQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSR L DSGVPDRFSGSGSGTDFTL K ISRVEAEDVGVYYCWQGI D FHQTFGGGTKVEIK	71
4A-371	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLG DY WGQGTLLTVSS	49	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	55
4A-372	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLG DY WGQGTLLTVSS	49	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSQSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSR L DSGVPDRFSGSGSGTDFTL K ISRVEAEDVGVYYCWQGI D FHQTFGGGTKVEIK	73
4A-373	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARTLVDY WGQGTLLTVSS	50	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	62

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-374	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFAGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTLVYD WGQGTILVTVSS	51	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	62
4A-375	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSLADY WGQGTILVTVSS	52	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	62
4A-376	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSMADY WGQGTILVTVSS	53	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSDGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	62
4A-377	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSMADY WGQGTILVTVSS	53	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSGGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	63
4A-378	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSMADY WGQGTILVTVSS	53	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSEGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	64
4A-379	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCASGYIFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARSMADY WGQGTILVTVSS	53	DVVMQTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSAGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	65

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 0】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-380	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCAR <u>SMADY</u> WGQGTLVTVSS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSSGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLDGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	66
4A-381	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYIFT <u>SYGLS</u> WVRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCAR <u>SMADY</u> WGQGTLVTVSS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSQGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS KLDGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	67

10

【表 6 - 1】

表 4

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-25	QVTLKESGPGILQPSQTL TCSFSGFSLRTSDMGVGV RQPSGEGLEWLADIWDD NKYYNPSLKSRLTISKDTSS NQVFLKITSVDTADTATYY CARRANYGNLFDYWGGQT AVTVSS	75	DIVMTQSLKFMSTSVGDRV SITCKASQNVRSAVAWYQQ KPGQSPKVLIIYWASNRHTG VPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQSEDLADYFCLQHWNYL TFGSGTKLEIK	85
4A-382	QVTLKESGPALVQPTQTL TCTFSGFSLRTSDMGVSWIR QPPGEALEWLALIWWDDN KYYSTSLKTRLTISKDTSSN QVVLMTNMDPVDATATYY CARRANYGNLFDYWGGQT AVTVSS	76	DIVLTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQNVRSAVAWYQQK PGQAPKVLIIYWASNRHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQHWNYLTFG GGTKVEIK	86
4A-383	QVTLKESGPTLVQPTQTL TCTFSGFSLRTSDMGVGI RQPPGKALEWLALIWWDD NKYYSPSLKSRLTISKDTSS NQVVLMTNMDPVDATATY YCARRANYGNLFDYWGGQ TLVTVSS	77	DIVLTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQNVRSAVAWYQQK PGQAPKLLIYWASNRHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQHWNYLTFG GGTKVEIK	87

30

40

50

【表 6 - 2】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-384	QVTLRESGPALVQPTQTLTL TCTFSGFSLRTSDMGVSWIR QPPGEALEWLALIWWDDN KYYSTSLKTRLTISKDTSSN QVVLMTNMDPVDATATYY CARRANYGNLFDYWGQGT LVTVSS	78	DIVMTQSPSSMSASVGDRV TITCOASONVRSAAVWYQQ KPGKAPKLLIYWASNRHTG VPSRFGSGSGTDFTFITSSL QPEDIATYYCQQHWNLYLTF GGGTKVEIK	88
4A-385	QVTLKESGPTLVKPTQTLTL TCTFSGFSLRTSDMGVGWI RQPPGKALEWLALIWWDD NKYYSPSLKSRLTITKDTSS NQVVLMTNMDPVDATATY YCARRANYGNLFDYWGQG TLVTVSS	79	DIVMTQSPSSLSTSVGDRV ITCRASONVRSALAWYQQK PEKAPKSLIYWASNRHSGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQHWNLYLTFG GGGTKVEIK	89
4A-386	QVTLKESGPGLVQPTETLTL TCTFSGFSLRTSDMGVSWIR QPPGKALEWLAHIWWDDN KSYSTSLKSRLTISKDTSSN QVVLMTNMDPVDATATYY CARRANYGNLFDYWGQGT LVTVSS	80	DIVMTQSPSSLASVGDRV ITCRASONVRSALAWYQQK PEQAPKSLIYWASNRHSGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQHWNLYLTFG GGGTKVEIK	90
4A-387	QVTLKESGPVLVKPTETLTL TCTFSGFSLRTSDMGVSWIR QPSGKALEWLAHIWWDDN KSYSTSLKSRLTISKDTSKN QVVLMTNMDPVDATATYY CARRANYGNLFDYWGQGT LVTVSS	81	DIVMTQSPSSLASVGDRV ITCOASONVRSALNWYQQK PGKAPKLLIYWASNRHTGV PSRFGSGSGTDFTFITSSLQ SEDIATYYCQQHWNLYLTFG GGGTKVEIK	91
4A-388	QVTLKESGPVLVKPTETLTL TCTFSGFSLRTSDMGVSWIR QPSGEGLEWLAHIWWDDN KSYSTSLKSRLTISKDTSKN QVVLMTNMDPVDATATYY CARRANYGNLFDYWGQGT LVTVSS	82	DIVMTQSPSSLASVGDRV ITCOASONVRSALNWYQQK PGKAPKLLIYWASNRHTGV PSRFGSGSGTDFTFITSSLQ SEDIATYYCQQHWNLYLTFG GGGTKVEIK	91
4A-389	QVTLQESGPGLVKPSETLSL TCAVSGFSLRTSDMGVGWI RQPPGEGLEWIGSIWWDDN KYYNPSLKSRLTISKDTSKN QVSLKLSSVDAADTAVYYC ARRANYGNLFDYWGQGT VTVSS	83	DIQMTQSPSSLASVGDRV ITCRASONVRSALAWYQQK PEQAPKSLIYWASSLQSGVP SRFGSGSGTDFTLTISNRHP EDFATYYCQQHWNLYLTFG GGGTKVEIK	92

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

抗体	重鎖可変	配列 番号	軽鎖可変	配列 番号
4A-390	QVQLQESGPGLVQPSETLSL TCAVSGFSLRTSDMGVGI RQPPGKGLEWIGSIWYDDN <u>KYYNPSLKSRVTISKDTSSN</u> QFSLKLSSVTAADTAVYYC ARRANYGNLFDYWGQGT LVTVSS	84	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVT ITCQASQNVRSALNWYQQK PGKAPKLLIYWASNRHTGV PSRFGSGSGTDFFTISLQ SEDIATYYCQQHWNLYLTFG GGTKVEIK	93

10

【 0 3 3 8 】

本開示の抗MS4A4A抗体に関して、KabatによるCDR配列を、以下の表5～8に提供する。

20

30

40

50

表 5

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-202	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYTQK FKG	95	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-301	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-302	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-303	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYSPS FQG	97	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-304	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-305	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAEK FQG	98	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-306	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-307	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-308	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-309	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYIGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSEFM N	103	GASNOGS	105	QQSKEVP PT	107

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-310	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYSPS FQG	97	EEVYYGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVFSF N	103	GASNQGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-311	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAEK FQG	98	EEVYYGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVFSF N	103	GASNQGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-312	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVDYGF RSYWYFD V	101	RASESVD NYGVFSF N	103	GASNQQS	106	QQSKEVP PT	107
4A-313	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYGF RSYWYFD L	102	RASESVD NYGVSRM N	104	GASNQGS	105	QQSKEVP PT	107
4A-314	NYWMQ	94	TTLPFGH DTRYAQK FQG	99	EEVYYGF RSYWYFD V	100	RASESVD NYGVSRM N	104	GASNQGS	105	QQSKEVP PT	107

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 6

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-18	SYWTH	108	NINPTNG GTNYNER FKS	109	AVYYGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-315	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FOG	110	AVYYGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-316	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FOG	110	AVYYGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-317	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FOG	110	AVYYGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

抗体	CDR-H1	配列 番号	CDR-H2	配列 番号	CDR-H3	配列 番号	CDR-L1	配列 番号	CDR-L2	配列 番号	CDR-L3	配列 番号
4A-318	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-319	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-320	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-321	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-322	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-323	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-324	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-325	SYWTH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-326	SYWTH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-327	SYWTH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-328	SYWTH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYVGSS LFAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASyrHT	114	QQYSTYP WT	115

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

抗体	CDR-H1	配列 番号	CDR-H2	配列 番号	CDR-H3	配列 番号	CDR-L1	配列 番号	CDR-L2	配列 番号	CDR-L3	配列 番号
4A-329	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYGSS LEAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-330	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYGSS LEAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-331	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYGSS LEAY	112	KASQNVG TAVA	113	SASVRHT	114	QQYSTYP WT	115

10

20

30

40

50

表 7

抗体	CDR-H1	配列 番号	CDR-H2	配列 番号	CDR-H3	配列 番号	CDR-L1	配列 番号	CDR-L2	配列 番号	CDR-L3	配列 番号
4A-21	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAND FKG	117	SLVDY	123	KSSQSLI YSDGKTY LS	130	LVSCLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-332	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLI YSDGKTY LS	130	LVSCLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-333	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLI YSDGKTY LS	130	LVSCLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-334	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLI YSDGKTY LS	130	LVSCLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-335	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLI YSDGKTY LS	130	LVSCLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-336	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLI YSDGKTY LS	130	LVSCLDS	139	WQGIDFH QT	144

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-337	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-338	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-339	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-340	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-341	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-342	SYGLS	116	INTYSGV PTYAQKF QG	120	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-343	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-344	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-345	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-346	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-347	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-348	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FTG	121	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-349	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FTG	121	SLVDY	123	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-350	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-351	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSRSLL YSDGKTY LS	131	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-352	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSRSLL YSGGKTY LS	132	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-353	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSRSLL YSEGKTY LS	133	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-354	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSRSLL YSAGKTY LS	134	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-355	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSRSLL YSSGKTY LS	135	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-356	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSRSLL YSQGKTY LS	136	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-357	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	EVSKLDS	140	WQGIDFH QT	144
4A-358	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	TLADY	124	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIREFH QT	145

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

抗体	CDR-H1	配列 番号	CDR-H2	配列 番号	CDR-H3	配列 番号	CDR-L1	配列 番号	CDR-L2	配列 番号	CDR-L3	配列 番号
4A-359	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KASQSLL YSDGKTY LS	137	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-360	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSGQSLL YSDGKTY LS	138	LVSRLDS	141	WQGIDFH QT	144
4A-361	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLES	142	WQGIDFH QT	144
4A-362	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSRLDS	141	WQGIDFH QT	144
4A-363	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLSS	143	WQGIDFH QT	144
4A-364	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KASQSLL YSDGKTY LS	137	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-365	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLSS	143	WQGIDFH QT	144
4A-366	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSRSLL YSDGKTY LS	131	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-367	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144
4A-368	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLES	142	WQGIDFH QT	144
4A-369	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQGIREFH QT	145

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-370	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLGDY	126	KSQSLL YSDGKTY LS	138	LVSRLDS	141	WQIDFH QT	144
4A-371	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLGDY	126	KSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-372	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLGDY	126	KSQSLL YSDGKTY LS	130	LVSRLDS	141	WQIDFH QT	144
4A-373	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLVDY	127	KSRSL YSDGKTY LS	131	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-374	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FAG	122	TLVDY	127	KSRSL YSDGKTY LS	131	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-375	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLADY	128	KSRSL YSDGKTY LS	131	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-376	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSRSL YSDGKTY LS	131	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-377	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSRSL YSGGKTY LS	132	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-378	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSRSL YSEGKTY LS	133	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-379	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSRSL YSAGKTY LS	134	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144
4A-380	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSRSL YSSGKTY LS	135	LVSKLDS	139	WQIDFH QT	144

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-38I	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQG FTG	118	SMADY	129	KSSRSLL YSQGKTY LS	136	LVSKLDS	139	WQGIDFH QT	144

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 1】

表 8

抗体	CDR-H1	配列 番号	CDR-H2	配列 番号	CDR-H3	配列 番号	CDR-L1	配列 番号	CDR-L2	配列 番号	CDR-L3	配列 番号
4A-25	TSDMGV G	146	DIWDD NKYYNP SLKS	148	RANYGN LFDY	154	KASQNV RSAVA	155	WASNRH T	159	QHWNYL T	162
4A-382	TSDMGV S	147	LIWDD NKYST SLKT	149	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRH S	160	QHWNY LT	163
4A-383	TSDMGV G	146	LIWDD NKYYSP SLKS	150	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRH S	160	QHWNY LT	163
4A-384	TSDMGV S	147	LIWDD NKYST SLKT	149	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSAVA	157	WASNRH T	159	QHWNY LT	163
4A-385	TSDMGV G	146	LIWDD NKYYSP SLKS	150	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRH S	160	QHWNY LT	163
4A-386	TSDMGV S	147	HIWDD NKSYST SLKS	151	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRH S	160	QHWNY LT	163
4A-387	TSDMGV S	147	HIWDD NKSYST SLKS	151	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSALN	158	WASNRH T	159	QHWNY LT	163

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

4A-388	TSDMGV S	147	HIWDD NKSYST SLKS	151	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSALN	158	WASNRH T	159	QQHWNY LT	163
4A-389	TSDMGV G	146	SIWDD NKYYNP SLKS	152	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASSLQ S	161	QQHWNY LT	163
4A-390	TSDMGV G	146	SIWYDD NKYYNP SLKS	153	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSALN	158	WASNRH T	159	QQHWNY LT	163

【0339】

実施例 2：組換え MS 4 A 4 A 可溶性ポリペプチドの調製

ヒト MS 4 A 4 A の一次アミノ酸配列（配列番号 1）を分析して、その二次及び三次構造に関する情報を提供した。ヒト MS 4 A 4 A タンパク質には 4 つの膜貫通ドメイン（TMD）があり、それぞれの TMD は、21 個のアミノ酸で構成されている。アミノ酸組成、残基数、及び脂質二重層の厚みから考えて、MS 4 A 4 A は、N 末端から C 末端に向けて、TMD 1 と TMD 2、及び TMD 3 と TMD 4 のそれぞれを接続する 2 つの余分な細胞ループ（ECL）を備えた 4 ヘリックスバンドル（4HB）を含むものと予測される（図 1 を参照されたい）。図 1 は、ヒト MS 4 A 4 A の一次アミノ酸配列を示しており。細

胞内ドメインをイタリック体で記載しており、膜貫通ドメインには下線を付けており、また、2つの細胞外ループは、太字のイタリック体で記載している。

【0340】

可溶性4HBスキヤホールドタンパク質（これらは、MS4A4Aの形状と構成を模倣すると考えられている）の2つのテンプレート構造を、RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) を使用して識別した。これらのタンパク質スキヤホールドのPDB_IDは、1P68と1M6Tである。図2A、図2B、及び図2Cは、2つの可溶性4ヘリックスバンドルスキヤホールド（PDB_ID: 1P68及びPDB_ID: 1M6T）の構造と一次アミノ酸配列を示す。図2Aでは、膜貫通ドメインは、螺旋状の構造になっている；図2B及び図2Cでは、膜貫通ドメインは、1P68及び1M6Tの対応するアミノ酸配列において下線を付けている。

10

【0341】

ヒトMS4A4Aの2つのECLのアミノ酸配列を、1P68に組換え的に配置して、ポリペプチドJS1及びポリペプチドJS4（ポリペプチドJS1のネガティブコントロール）をもたらし、また、1M6Tに配置して、ポリペプチドJS5、ポリペプチドJS6；及び、ポリペプチドJS10（ポリペプチドJS5及びポリペプチドJS6のネガティブコントロールとして機能する）をもたらした。（図3を参照されたい。）図3Aは、ポリペプチドJS1、ポリペプチドJS5、及びポリペプチドJS6のアミノ酸配列を示す。図3Bは、ネガティブコントロールポリペプチドJS4及びネガティブコントロールポリペプチドJS10のアミノ酸配列を示す。これらのタンパク質／ポリペプチドスキヤホールドをコードする核酸を、それぞれ、3' hisタグとAviタグを備えたpcDNA3.4発現ベクターに挿入した。得たクローンをExp293細胞で発現させ、そして、製造業者のプロトコルを使用して、Ni-NTAアガロース（QIAGENカタログ番号30230）で精製した。抗体結合の特徴決定のための可溶性試薬として使用するためのMS4A4Aの2つのECLの構造と機能を模倣する可溶性タンパク質を得るために、これらの組換えMS4A4A可溶性ポリペプチド（別名、ループグラフト抗原）を製造した。

20

【0342】

実施例3：ペプチド結合による抗MS4A4A抗体のエピトープ決定

30

抗MS4A4A抗体4A-21のエピトープ結合の特徴を、次のようにして決定した。まず、ヒトMS4A4A（配列番号1）の細胞外ループ（ECL）に由来する重複ペプチドのパネルを、JPTペプチド（Berlin, Germany）で合成した。これらのペプチドは、15アミノ酸長であり、それぞれに、2個のアミノ酸を補った。これらのペプチドを、N末端でビオチン化した。ペプチド4A.1~4A.4は、ヒトMS4A4A ECL1と、その周辺領域に由来するものであった。ペプチド4A.5~4A.12は、ヒトMS4A4A ECL2と、その周辺領域に由来するものであった。

【0343】

当該ペプチドライブラリーを、Continuous Flow Microspotter (CFM) を使用して、ストレプトアビジンでコーティングしたチップ（Xantec SAD50M, Düsseldorf, Germany）に印刷した。まず、このチップを、100mM MES、pH5.5、100µL EDC（最終濃度133mM）、100µLのS-NHS（最終濃度33.3mM）を用いて活性化した。当該ペプチドライブラリーを、1mg/ml BSA、及び、1µg/mlマウスIgG-ビオチンを含むHBS-EP+緩衝剤（Teknovaカタログ番号H8022）で希釈した250nM/ペプチドで、チップに固定化した。固定化の後に、当該チップの表面を、1Mエタノールアミンで、pH8.5で、10分間かけて不活性化した。ハイブリドーマ上清、及び、精製した抗MS4A4A抗体を、1mg/ml BSAを含むHBS-EP+緩衝剤で希釈し、そして、チップに注入した。再現性を確保するために、それぞれの抗MS4A4A抗体の重複測定を行った。それぞれのペプチド-抗体の組み合わせに対して結合の特徴

40

50

決定を行い、それぞれの抗体が相互作用する線形ペプチド領域のマッピングを可能にする。

【0344】

抗MS4A4A抗体4A-21、及び、市販の抗MS4A4A抗体5C12は、以下の表9において太字で示したように、ヒトMS4A4A ECL2の領域に対応するペプチドに対して強固な結合を示した。抗MS4A4A抗体4A-21は、ペプチド4A.5～4A.9に結合し、ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基155～177に及ぶ。抗MS4A4A抗体5C12は、ペプチド4A.6～4A.9に結合し、ヒトMS4A4Aのアミノ酸残基157～177に及ぶ。これら2つの抗体の結合領域は、重複しているが同一ではなく、このことは、ヒトMS4A4AのECL2内での異なる残基と相互作用することを示している。これらの2つの抗体のいずれも、上記した方法論を使用しても、ヒトMS4A4A ECL1に対する結合を示さなかった。

【表11】

表9

ペプチド	配列	4A-21	5C12
4A.1	ITMMCMASTYGSNP (配列番号292)	-11.16	-1.49
4A.2	MMCMASNTYGSNPIS (配列番号293)	-11.53	-0.19
4A.3	CMASNTYGSNPISVY (配列番号294)	-10.55	-1.54
4A.4	ASNTYGSNPISVYIG (配列番号295)	-7.90	-0.46
4A.5	LAFYSFHHPYCNYYG (配列番号296)	382.80	1.60
4A.6	FYSFHHPYCNYYGNS (配列番号297)	485.67	44.38
4A.7	SFHHPYCNYYGNSNN (配列番号298)	446.10	17.75
4A.8	HHPYCNYYGNSNNCH (配列番号299)	308.63	22.30
4A.9	PYCNYYGNSNNCHGT (配列番号300)	225.21	30.86
4A.10	CNYYGNSNNCHGTMS (配列番号301)	-4.50	1.13
4A.11	YYGNSNNCHGTMSIL (配列番号302)	-6.50	-2.73
4A.12	GNSNNCHGTMSILMG (配列番号303)	-5.20	-4.08

【0345】

実施例4：ヒトMS4A4A細胞外ドメインに対応するペプチドに対して結合する抗MS4A4A抗体

抗MS4A4Aハイブリドーマ上清（原体）、または、精製したmIgG（5 µg/ml）を、ECL1（配列番号1のヒトMS4A4Aのアミノ酸残基86～98）、及び、

ECL2（配列番号1のヒトMS4A4Aのアミノ酸残基159～179）に対応するヒトMS4A4Aペプチドに対する結合に関して、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）を使用して試験した。簡潔に説明すると、96ウェルポリスチレンプレートを、2または10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の合成物不含ペプチド、または、BSAコンジュゲートペプチドを含むコーティング緩衝剤（0.05M炭酸塩緩衝剤、pH9.6, Millipore Sigmaカタログ番号C3041）で、4℃で、一晚、コーティングした。次いで、コーティングしたプレートを、ELISA希釈剤（PBS+0.5% BSA+0.05% Tween（登録商標）20）で、1時間、ブロックし、PBST（PBS+0.05% Tween20、Thermoカタログ番号28352）の3×300 μL で洗浄した後に、これらの抗体を、プレートに加えた（50 μL /ウェル）。30分間インキュベーション（室温、震盪）した後に、これらのプレートを、PBSTの3×300 μL で洗浄した。二次抗マウスHRP抗体（Jackson ImmunoResearchカタログ番号115-035-003）を、ELISA希釈剤（50 μL /ウェル）で、1:1000希釈で、そして、震盪しながら、室温で、30分間、インキュベーションした。最後の洗浄セット（PBSTで3×300 μL ）の後に、50 μL のTMB基質（BioFxCatalog番号TMBW-1000-01）を加え、そして、5～10分後に、50 μL の反応停止液（BioFxCatalog番号BSTP-1000-01）で反応を停止させた。反応停止させた反応ウェルを、GEN5 2.04ソフトウェアを使用して、BioTek Synergyマイクロプレートリーダーで、650 nmの吸光度で検出した。

【0346】

精製した抗MS4A4Aマウス抗体、及び3つの市販のマウス抗MS4A4A抗体（5C12、3F2、及び、4H2）を試験した。マウス抗MS4A4A抗体（4A-21、4A-25、4A-202、及び、4A-214）は、無関係のネガティブペプチドコントロールであるBSAマウスDAP12で認められたものと比較して、hMS4A4A-ECL2不含ペプチドに対して強力に結合した。3つの市販の抗MS4A4A抗体は、ヒトMS4A4A ECL1、及びECL2ペプチドに対する結合を示さなかった。

【0347】

実施例5：抗MS4A4A抗体のエピトープ決定

MS4A4Aの一次アミノ酸配列は、その二次及び三次構造に関する重要な情報を提供する。当該MS4A4Aタンパク質は、4回膜貫通ドメイン（TMD）を有しており、それぞれのTMDは、21個のアミノ酸から構成されている。一般的なTMDは、厚さが約40 Åのホスホジエステル脂質二重層からなる。当該リン酸の頭部は、細胞外、または、細胞質スペースのいずれかで、親水性環境と相互作用する親水性層を作り出しており、また、当該脂質の尾部は、TMDの親油性残基と相互作用する内部脂質二重層を作り出す。当該TMD脂質二重層の厚さは、約32～34 Åである。アミノ酸組成、残基数、及び、脂質二重層の厚みから予測すると、MS4A4Aは、N末端からC末端にかけて、それぞれ、TMD1とTMD2、そして、TMD3とTMD4とを接続している2つの余分な細胞ループ（ECL）を有する4ヘリックスバンドル（4HB）を含むものと考えられる。4ヘリックスバンドルは、ヘリックス-脂質二重層相互作用と、ヘリックス-ヘリックス相互作用から得られる有意なエンタルピーゲインによって、膜内のMS4A4Aを安定させる。

【0348】

MS4A4A ECLの主要なアミノ酸配列と組成は、エピトープと動的特性に関連する重要な特徴を示す。ECL1は、1つのシステイン、1つのメチオニン、1つのアラニン、3つのセリン、1つのスレオニン、2つのアスパラギン、1つのチロシン、1つのプロリン、1つのイソロイシン、及び、唯一のグリシン残基（複数可）を含む、13個のアミノ酸からなる。ECL2は、2つのシステイン残基を含む21個のアミノ酸で構成されており、それらは、3つのセリン、1つのスレオニン、1つのフェニルアラニン、3つのヒスチジン、1つのプロリン、3つのチロシン、4つのアスパラギン、1つのメチオニンの8種のアミノ酸と、2つだけのグリシン残基で分けられる。ECL1及びECL2には

、グリシン残基はほとんどなく、幾つかの大きなベータ分岐アミノ酸残基と、プロリン残基が認められる。さらに、ECL2は、構造内エントロピーをさらに減少させるループ内ジスルフィド結合を生成すると考えられる2つのシステイン残基を含む。その結果、ECL1及びECL2は、剛体タイプの内部運動で互いに相互作用する立体配座異性体の個数が大幅に減少する傾向がある。

【0349】

C末端GFPタグを含むヒトMS4A4A (NM_024021) をコードする発現プラスミドを、Origene (カタログ番号RG223557) から購入し、そして、ヒトMS4A4Aの細胞外ループ1 (ECL1) のコード領域に単一のアラニンスキャン変異を生成するためのテンプレートとして使用した (以下の表10での4A. Ala1-Ala13; ECL1に対応する配列番号1のC67~S79; CMASNTYGSNPIS; ヒトMS4A4Aの細胞外ループ2 (ECL2) のコード領域内 (以下の表10での4A. Ala14-Ala34; ECL2に対応する配列番号1のS140~S160; SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS; 及び、以下の表11でのECL2欠失変異 (4A. Ala35 (ECL2での配列番号1のアミノ酸残基150~152の欠失)、及び、4A. Ala36 (ECL2での配列番号1のアミノ酸残基148~152の欠失))。これらの突然変異は、当該技術分野で標準的な重複ポリメラーゼ連鎖反応技術を使用して行った。それぞれのポリメラーゼ連鎖反応ポリ核酸フラグメントを精製し、そして、MluIとAclI制限部位を使用して、発現ベクターにサブクローニングした。

【0350】

アラニンスキャン技術を使用してエピトープ決定を行う前に、HEK293T細胞での上記した発現構築物の一時的トランスフェクションを使用して、以下のようにして、当該抗MS4A4A抗体の相対的EC50を決定した。HEK293T細胞を、6ウェルプレートに播種し、そして、一晩、増殖させた。翌日、製造業者のプロトコルに従って、Fugene HD (Promega)、または、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、4:1の比率のFugeneとDNA、または3:1の比率のLipofectamineとDNAで細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの約24時間後に、トリプシン-EDTAを使用して細胞を回収し、そして、FACS染色のために処理した。

【0351】

FACS染色については、150,000個の細胞を、96ウェルプレートのそれぞれのウェルに加え、次いで、抗MS4A4A抗体の滴定を、FACS緩衝剤 (PBS+2% FBS) に対して加え、そして、氷上で、60分間、インキュベーションした。プレートを遠心分離し (1,400 rpm、3分間)、上清をデカントして、細胞を、200 µlのFACS緩衝剤で3回洗浄した後に、それぞれを、遠心分離とデカントの工程に供した。抗体を、msIgG1、または、huIgG1キメラとして試験し、そして、ヤギ抗ヒトPE (Southern Biotech、カタログ番号2040-09、1:200)、または、ヤギ抗マウスAPC (BD Biosciences、カタログ番号550826、1:100) のいずれかを、氷上で、30分間、FACS緩衝剤に加えた。続いて、細胞を、200 µlのFACS緩衝剤で2回洗浄し、そして、iQueサイトメーターで画像化した。蛍光強度の中央値 (MFI) を、MS4A4Aを発現する細胞を表すGFPポジティブ集団で測定した。

【0352】

最初に試験した抗MS4A4A抗体のうちの6つは、野生型 (WT) MS4A4A-GFPを発現するHEK293T細胞に結合する; このようなものとして、抗MS4A4A抗体4A-18、4A-21、4A-202、ならびに、公開されたマウスモノクローナル抗MS4A4A抗体4H2 (Kerafast)、5C12 (Biolegend)、3F2 (Millipore) がある。それぞれの抗体の滴定曲線を決定して、その後のエピトープマッピング研究に最適な抗MS4A4A抗体濃度を確立した。

【0353】

エピトープマッピング実験については、HEK293T細胞を、異なるヒトMS4A4A発現構築物（上記した通り、以下の表10を参照されたい）でトランスフェクトし、そして、6つの異なる抗MS4A4A抗体：4A-21、4A-18、4A-202、4H2、5C12、及び、3F5を使用して、抗体結合を測定した。抗MS4A4A抗体結合は、野生型ヒトMS4A4A発現構築物でトランスフェクトした細胞に対する結合でのMFIの%として計算した。当該MS4A4Aポリペプチドでのアミノ酸変異が、抗体結合を、野生型MS4A4Aに対する結合の20%未満にまで低下させていれば、当該変異したアミノ酸は、MS4A4Aタンパク質に対する抗MS4A4A抗体の結合に必要な重要なアミノ酸と考えられる。当該MS4A4Aタンパク質の一部のアミノ酸変異が、抗MS4A4A抗体結合を、（野生型MS4A4Aに対する結合と比較して）51%未満から20%を超えるまで抑制していれば、そのようなアミノ酸を、MS4A4Aタンパク質に対する抗MS4A4A抗体の結合に寄与するアミノ酸として定義した。

【0354】

MS4A4Aの一部のアミノ酸は、MS4タイプのタンパク質でシステイン架橋を形成すると考えられている2つのシステイン、C165及びC174など、試験したすべての抗体の結合に影響を及ぼした。そのようなアミノ酸は、構造アミノ酸であると考えられた。

【0355】

これらの実験の結果を、以下の表10に示す。上記したように、Ala.1~Ala.13とは、ECL1でのMS4A4A変異のことを指す；Ala.14~Ala.36とは、ECL2でのMS4A4A変異のことを指す。データは、野生型MS4A4Aタンパク質に対する抗MS4A4A抗体の結合と比較して、様々なアラニンスキャン変異に対する抗MS4A4A抗体の%結合として示している。これらのマッピング実験は、独立して、2回繰り返しており、非常に類似した結果が得られた。1つの差異は、抗MS4A4A抗体4A-21及び4A-18が、2つの濃度で、huIgG1として1度目の試験を、そして、msIgG1として2度目の試験をしたことであった。以下の表11は、これらの抗体のmsIgG1試験の結果を示している。その他のすべての抗体について、表10は、両方の実験における平均抗体結合を示している。MS4A4Aタンパク質に対する抗MS4A4A抗体の結合を示す数値の内、野生型MS4A4Aに対する結合についての測定値の20%未満のものを、以下の表10では、太字で示している。

【0356】

すべての変異は、約22~33%の同等のトランスフェクション効率を示した（データは示さず）。細胞内の平均抗体結合とGFPLレベルとの間に相関関係は認められず、このことは、GFPLレベルが、MS4A4A細胞表面発現の予測因子として使用できないことを示唆している。

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 1】

表 1 0

構築物	ループ構造	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
WT ECL1	CMA ~~S~~ NTYGSNPIS (配列番号 289)	100					
4A.Ala.1	~~S~~ MA ~~S~~ NTYGSNPIS (配列番号 255)	84.1	96.6	86.99	72.80	82.36	79.58
4A.Ala.2	C ~~A~~ ASNTYGSNPIS (配列番号 256)	12.5	19.1	9.93	7.42	11.04	7.33
4A.Ala.3	CM ~~S~~ SNTYGSNPIS (配列番号 257)	90.7	116.6	99.12	87.76	94.47	87.46
4A.Ala.4	CMA ~~A~~ NTYGSNPIS (配列番号 258)	91.2	85.8	92.48	77.90	88.62	82.49
4A.Ala.5	CMA ~~S~~ ~~A~~ TYGSNPIS (配列番号 259)	93.1	65.6	81.64	75.95	80.92	83.89
4A.Ala.6	CMA ~~S~~ N ~~A~~ YGSNPIS (配列番号 260)	100.4	87.5	83.22	77.29	78.57	78.38
4A.Ala.7	CMA ~~S~~ NT ~~A~~ GSNPIS (配列番号 261)	114.5	15.8	98.41	93.36	94.96	92.91
4A.Ala.8	CMA ~~S~~ NTY ~~A~~ SNPIS (配列番号 262)	94.6	70.4	83.82	74.41	17.39	84.41
4A.Ala.9	CMA ~~S~~ NTYGA ~~N~~ NPIS (配列番号 263)	99.6	106.0	102.06	85.83	89.83	94.67
4A.Ala.10	CMA ~~S~~ NTYGS ~~A~~ PIS (配列番号 264)	102.3	103.2	124.27	91.27	93.95	89.57
4A.Ala.11	CMA ~~S~~ NTYGSNA ~~I~~ S (配列番号 265)	28.7	14.8	35.06	20.53	32.79	25.29
4A.Ala.12	CMA ~~S~~ NTYGSNP ~~A~~ S (配列番号 266)	66.4	91.4	57.21	48.93	56.33	49.19
4A.Ala.13	CMA ~~S~~ NTYGSNP ~~I~~ A (配列番号 267)	38.4	41.8	32.34	27.38	36.36	28.92
WT ECL2	SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 290)	100					
4A.Ala.14	~~A~~ FHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 268)	94.3	87.8	78.14	83.99	81.28	85.27
4A.Ala.15	S ~~A~~ FHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 269)	118.7	116.9	111.77	84.71	98.51	87.20
4A.Ala.16	SF ~~A~~ FHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 270)	71.0	48.1	76.87	58.00	71.46	64.58
4A.Ala.17	SFH ~~A~~ FHPYCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 271)	102.8	99.4	125.37	77.01	82.95	85.21
4A.Ala.18	SFH ~~H~~ ~~A~~ YCNYYGNSNNCHGTMS (配列番号)	101.4	103.7	89.39	36.92	46.13	42.33
4A.Ala.19	SFHHP ~~A~~ CNYYGNSNNCHGTMS (配列番号 272)	83.8	16.3	26.68	1.66	42.27	1.08
4A.Ala.20	SFHHPY ~~S~~ CNYYGNSNNCHGTMS	5.0	2.8	8.66	1.94	1.74	1.60

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

構築物	ループ構造	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
	(配列番号 273)						
4A.Ala.21	SFHHPYCA ~~Y~~ Y ~~G~~ NSNNCHGTMS (配列番号 274)	1.8	73.3	93.33	70.08	73.76	80.30
4A.Ala.22	SFHHPYCNA ~~Y~~ GNSNNCHGTMS (配列番号 275)	1.8	3.0	31.23	1.10	0.99	0.88
4A.Ala.23	SFHHPYCNY ~~A~~ GNSNNCHGTMS (配列番号 276)	1.4	2.7	50.05	1.19	0.96	0.95
4A.Ala.24	SFHHPYCNY ~~Y~~ ANSNNCHGTMS (配列番号 277)	57.5	63.0	75.76	27.67	18.20	33.76
4A.Ala.25	SFHHPYCNY ~~Y~~ GASNNCHGTMS (配列番号 278)	69.2	40.0	100.54	37.09	25.55	45.60
4A.Ala.26	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNANNNCHGTMS (配列番号 279)	89.3	96.5	90.84	68.48	81.73	68.38
4A.Ala.27	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSANCHGTMS (配列番号)	98.3	118.6	98.39	99.46	91.60	94.25
4A.Ala.28	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNACHGTMS (配列番号 280)	87.3	116.4	98.61	86.22	85.94	83.37
4A.Ala.29	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNNSHGTMS (配列番号 281)	8.4	2.7	4.54	1.09	1.01	0.91
4A.Ala.30	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNNCAGTMS (配列番号 282)	87.5	62.6	92.83	72.87	80.56	82.45
4A.Ala.31	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNNCHATMS (配列番号 283)	147.8	158.6	142.81	123.13	124.19	135.58
4A.Ala.32	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNNCHGAMS (配列番号 284)	61.6	42.9	63.28	44.61	56.19	45.14
4A.Ala.33	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNNCHGTAS (配列番号 285)	81.8	36.1	73.09	62.83	59.85	60.45
4A.Ala.34	SFHHPYCNY ~~Y~~ GNSNNCHGTMA (配列番号 286)	113.4	91.0	117.02	102.44	99.15	103.80
4A.Ala.35	SFHHPYCNY ~~Y~~ ---NNCHGTMS (配列番号 287)	107.3	2.7	73.14	1.08	1.00	0.88
4A.Ala.36	SFHHPYCN ~~Y~~ ----NNCHGTMS (配列番号 288)	1.3	2.6	0.07	0.99	0.93	0.83

* h u I g G 1 キメラとして試験した抗体

【0 3 5 7】

上記した結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、MS4A4Aでの別個の線形エピトープ、及び／または、3D構造エピトープを認識することを示唆している。

【0 3 5 8】

これらの実験から得た抗MS4A4A抗体結合データに基づいて、ヒトMS4A4Aでの次のループアミノ酸残基を、MS4A4Aタンパク質での構造アミノ酸とみなしたが、これは、それらのそれぞれを変異させると、試験した抗MS4A4A抗体：M87、C165、Y167、Y168、C174（ヒトMS4A4Aタンパク質に基づく；配列番号1）の結合に影響を及ぼしたためである。アミノ酸残基C165及びC174は、ECL2にてループを形成するシステイン架橋を確立すると考えられた。このシステイン架橋がないと、抗MS4A4A抗体は、MS4A4Aタンパク質に対して結合せず、このことは、MS4A4AのECL2でのループ構造が、抗体結合に重要であることを示唆している。ループ構造が重要であるとのさらなる証拠は、これらの抗体の結合にも強く影響する2つのループ欠変異体（Ala.35、及び、Ala.36）から得られる。

【0 3 5 9】

これらの結果は、アミノ酸残基Y167及びY168が、抗MS4A4A抗体4A-21、4A-18、4H2、5C12、及び、3F2の結合に強く影響することをさらに示した。これらのアミノ酸残基は、抗MS4A4A抗体4A-202の結合には、あまり影響しなかった。加えて、ECL1でのアミノ酸残基P96、I97、及び、S98は、試

験したすべての抗MS4A4A抗体の結合を、ある程度は抑制した。これらの結果は、これらの5つのアミノ酸残基のいずれかの変異が、抗体の認識と結合において重要な細胞外ドメインの構造を改変すること、あるいは、これらのアミノ酸残基が、列挙した6つの抗MS4A4A抗体のそれぞれの相互作用と結合において重要であることを示唆した。プロリンは、最も抑制を受けたアミノ酸残基であり、ポリペプチドの二次、及び、三次構造において重要である。例えば、プロリンは、アルファヘリックスやベータシートのものなど、通常の二次構造要素の中央で攪乱物質として機能する；しかしながら、通常、プロリンは、アルファヘリックスの最初のアミノ酸残基として、かつ、ベータシートの端において認められる。チロシン、イソロイシン、及び、セリン残基は、例えば、ファンデルワールス相互作用（複数可）、パイ-パイスタッキング、及び、パイ-フェイシアル水素結合相互作用、及び／または、水素結合など、複数の抗原抗体相互作用を提供する。したがって、チロシン、プロリン、イソロイシン、または、セリン残基のいずれかは、明確に定義した構造エピトープを作り出すことができる。これらの4つのアミノ酸残基の微妙な変化は、抗体の結合親和性を著しく損ないかねない。

【0360】

MS4A4Aでのアミノ酸残基M87Aの変異は、試験したすべての抗MS4A4A抗体の結合を、大幅に抑制または解消した。ECL1とECL2は、明確に定義した堅牢な構造を使用しており、また、互いに相互作用し得るという予測に基づいて、M87A結合結果は、M87の側鎖が、主鎖-側鎖、及び／または、主鎖-主鎖相互作用を介して、ファンデルワールス接触と水素結合によって、ECL1、及び／または、ECL2の1つ以上のベータ分岐アミノ酸と相互作用できるので、M87アミノ酸残基が、MS4A4Aの堅牢なループ構造を維持する上で最も重要な残基の1つであると考えられることを示した。

【0361】

以下の表11は、本明細書に開示した抗MS4A4A抗体の独特の結合アミノ酸残基を列挙している。抗MS4A4A抗体4A-21は、ヒトMS4A4Aに対して結合するにあたって、ECL2にN166を必要とする。このデータは、抗MS4A4A抗体4A-18及び5C12が、ヒトMS4A4AのECL1ならびにECL2に結合することを示した。抗MS4A4A抗体4A-202では、アミノ酸残基Y164が、結合において多少なりとも寄与した。

【0362】

3つの市販の抗MS4A4A抗体は、すべてP163に結合するが、ここで開示し、かつ、この研究で試験した抗MS4A4A抗体は、いずれも結合しなかった。ヒトMS4A4AのこのプロリンP163は、カニクイザルMS4A4Aタンパク質では、アルギニンに置換されている。そのような知見は、このプロリンからアルギニンへの変化が、市販のMS4A4A抗体の結合特性が示すように、カニクイザルの交差反応性、または、その欠如を決定する上で重要である、ことを示唆している。プロリンは、構造的に最も抑制を受けたアミノ酸残基であり、そして、（カニクイザルMS4A4Aでの）アルギニンは、生理的pHで、正に帯電したアミノ酸である。ヒトとカニクイザルのMS4A4Aにおけるプロリンとアルギニンの差異は、MS4A4Aタンパク質の立体配座に大きな影響を与え得るものであり、したがって、市販のMS4A4A抗体との結合を妨げる。抗MS4A4A抗体4A-18、4A-21、及び、4A-202は、結合については、このアミノ酸に依存しておらず、したがって、カニクイザルタンパク質に対する結合には影響がなかったと考えられた。

【0363】

まとめると、抗MS4A4A抗体4A-21、4A-18、及び、4A-202は、市販の抗MS4A4A抗体のものとは異なるMS4A4Aでのエピトープに結合した（下記の表11）。市販の抗MS4A4A抗体4H2及び3F2は、抗MS4A4A抗体5C12のエピトープと大半が重複している同一のエピトープを示した。対照的に、抗MS4A4A抗体4A-18、4A-21、及び、4A-202は、それぞれが、互いに相違しており、市販の抗MS4A4A抗体とは異なる独自のエピトープ結合特性を示した。結合特

性でのこれらの差異を、表 10 に示す。加えて、これらの結果は、試験した 2 つの抗 MS 4 A 4 A 抗体が、ヒト MS 4 A 4 A での同一のエピトープに結合しないことを示した；しかしながら、一部の、または、すべての抗体で、アミノ酸結合残基（例えば、アミノ酸残基 Y 1 6 7、及び、Y 1 6 8、Y 1 6 4、N 1 7 0、T 1 7 7）が共有されている。

【表 13】

表 11

抗体	ECL1 残基	ECL2 残基
4A-21		N166 (必須)
4A-18	Y92 (必須)	Y164 (必須) H161、N170、T177、M178 (寄与)
4A-202		Y164 (寄与)
4H2		Y164 (必須) P163、G169、N170、T177 (寄与)
5C12	G93 (必須)	G169 (必須) P163、Y164、N170 (寄与)
3F2		Y164 (必須) P163、G169、N170、T177 (寄与)

【0364】

実施例 6：組換え MS 4 A 4 A 可溶性ポリペプチドに対する抗 MS 4 A 4 A 抗体の結合

本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を、実施例 2 に記載したようにして、異なる組換え MS 4 A 4 A 可溶性ポリペプチドに対して結合するそれら抗体の能力について、次のようにして試験した。本開示のヒト化抗 MS 4 A 4 A 抗体の VH 及び VL ドメインをコードする核酸を、ヒト Ig G 1 重鎖定常ドメイン、またはヒトカッパ定常ドメインのいずれかを含む p c D N A 3 . 4 ベクターにクローニングした。ヒト化抗 MS 4 A 4 A 抗体を、Exp i 2 9 3 細胞で発現し、そして、M a b 選択抗体精製樹脂 (G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e、カタログ番号 1 7 5 1 9 9 0 2) によって、製造業者のプロトコルに従って精製した。E L I S A で実施して、組換え MS 4 A 4 A 可溶性ポリペプチドに対する本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体の結合を測定した。1 μ g / m l のビオチン化抗原を、ストレプトアビジンでコーティングした E L I S A プレート (T h e r m o S c i e n t i f i c、カタログ番号 P I 1 5 1 2 0) で、1 時間、プレインキュベーションした。プレートを 3 回洗浄した後に、抗体 (1 μ g / m l、0 . 3 3 μ g / m l、及び 0 . 1 1 μ g / m l 抗体) を加えた。プレートを、室温で、1 時間振とうしながらインキュベーションを行い、3 回洗浄した後に、H R P コンジュゲートヤギ抗ヒトカッパ抗体の 1 / 2 5 0 0 希釈液を加えた (S i g m a A l d r i c h カタログ番号 A 7 1 6 4 - 1 M L)。

【0365】

図 4 は、組換え MS 4 A 4 A 可溶性ポリペプチド JS 1、JS 4、JS 5、JS 6、及び JS 10 に対して結合する特定のヒト化抗 MS 4 A 4 A 抗体の E L I S A での結合の結果を示す。図 4 に示したように、特定の抗 MS 4 A 4 A 抗体 (4 A - 1 8 . h F c、4 A - 2 1 . h F c、4 A - 2 0 2 . h F c、4 A - 2 2 0 . m F c、4 A - 2 1 4 . m F c、4 A - 2 0 4 . m F c、h F c は、ヒト F c のことを指し；m F c は、マウス F c のことを指す) は、E L I S A で、ヒト MS 4 A 4 A の 2 つの E C L を含む組換え MS 4 A 4

A可溶性ポリペプチドJS1、JS5、及びJS6に対する結合を示した。本発明の抗MS4A4A抗体は、ネガティブコントロールポリペプチドであり、かつ、MS4A4A ECL領域配列を含まない組換え可溶性ポリペプチドJS4及びJS10には結合しなかった。2つの市販の抗MS4A4A抗体、5C12及び4H2は、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドのいずれにも結合を示さなかった（図4を参照されたい）。図4において、抗MS4A4A抗体4A-214は、すでに国際特許出願第PCT/US2019/016156号に開示されており、また、

EVKLEESGGGLVQPGRSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQS
PEKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSS
VYLQMNNLRAEDTGIYYC SSMIIVDYWGQGTTVTVSS（配列
番号179）

の重鎖可変領域アミノ酸配列と、

DIVLTQSPASLT VSLGQRATISCRASQSVSSSTYSYLHWY
QQRPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGT VFTLN IH
PVEEEDTATYYCQHSWEIPLTFGAGTKLEMK（配列番号180）

の軽鎖可変領域アミノ酸配列とを有する。

【0366】

図4に提示した結果は、表12に示すデータから導き出した：

【表14】

表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

【0367】

図5は、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS1に対するマウス抗MS4A4A抗体4A-21のヒト化バージョンのELISAでの結合の結果を示す。これらの抗体は、1μg/mlの濃度で使用した。図5に示したように、抗MS4A4A抗体4A-21のヒト化バージョンの多くは、この組換えポリペプチドに対して結合する能力を保持していた。抗MS4A4A抗体4A-21の特定のヒト化バージョンでは、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS1に対する結合が低下したことが示された。

【0368】

図5に提示した結果は、表13に示すデータから導き出した：

10

20

30

40

50

【表 1 5】

表 1 3

抗体	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
アイソタイプ	0.113

【0369】

図6は、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS1に対するマウス抗MS4A4A抗体4A-202のヒト化バージョンのELISAでの結合の結果を示す。これらの抗体は、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用した。図6に示したように、抗MS4A4A抗体4A-202のヒト化バージョンは、この組換えポリペプチドに対して結合することができた。

【0370】

図6に提示した結果は、表14に示すデータから導き出した：

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 4

抗体	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
アイソタイプ	0.113

【0 3 7 1】

マウス抗MS4A4A抗体4A-202、及びマウス抗MS4A4A抗体4A-21の様々なヒト化バージョンを、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドに対して結合するそれら抗体の能力について、さらに試験した。ヒト化抗MS4A4A抗体4A-332、及びヒト化抗MS4A4A抗体4A-302は、妥当な結合を示しており、そして、以下のように、さらなる親和性の改善のために選択した。抗MS4A4A抗体4A-322、及び抗MS4A4A抗体4A-302の6つのCDRに対して、オーバーラップPCR法を使用して、無作為に変異を導入した。ビオチン化組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS5を、これらの抗体バリエーションのファージディスプレイパニングに使用した。3ラウンドのパニングの後に、約190の変異型抗MS4A4A抗体バリエーションを選択し、そして、TGI細胞で発現させて、それらの溶解物を、ELISAでスクリーニングした。22個のヒト化抗MS4A4A抗体4A-21バリエーションと、15個のヒト化抗MS4A4A抗体4A-202バリエーションを選択し、組換えにより完全ヒトIgGに変換し、そして、Exp1293細胞で発現させた。抗MS4A4A抗体を、MabSelect Antibody Purification Resin (GE Healthcare Life Science, カタログ番号17519902) によって、製造業者のプロトコルに示されるように精製した。続けて、ELISAとフローサイトメトリー実験を反復した。

【0 3 7 2】

ヒト化した、及び親和性成熟した抗MS4A4A抗体4A-312、4A-313、及び4A-314は、ELISAによって、様々な抗体濃度（1 µg/ml、0.33 µg/ml、及び0.11 µg/ml）で、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS5に対する結合を示し（図7を参照されたい）、そして、さらなる機能分析のために選択した。

【0 3 7 3】

図7に提示した結果は、表15に示すデータから導き出した：

【表 1 7】

表 1 5

抗体	1 ug/ml	0.33 ug/ml	0.11 ug/ml
4A-312	0.184	0.11	0.097
4A-313	1.262	1.05	0.741
4A-314	1.142	0.682	0.399
4A-302	0.128	0.103	0.091
4A-202	0.188	0.111	0.079

【0 3 7 4】

ヒト化した、及び親和性成熟した抗MS4A4A抗体4A-351及び4A-376（ $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）は、ELISAによって、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS5に対して良好な結合を示した（図8を参照されたい）。次いで、これらの抗MS4A4A抗体を、CDR-L1でのアミノ酸D28にアミノ酸置換を行うためのテンプレートとして使用するために選択した；そのようなアミノ酸置換として、D28G、D28E、D28S、D28A、及びD28Qが含まれた。

【0 3 7 5】

図8に提示した結果は、表16に示すデータから導き出した：

10

20

30

40

50

【表 18】

表 16

抗体	OD450
4A-350	0.939
4A-351	0.99
4A-357	0.892
4A-358	0.901
4A-359	0.892
4A-360	0.797
4A-361	0.79
4A-362	0.908
4A-363	0.833
4A-364	0.959
4A-365	0.845
4A-366	0.875
4A-367	0.961
4A-368	0.901
4A-369	0.852
4A-370	0.822
4A-371	0.955
4A-372	0.873
4A-373	0.907
4A-374	0.833
4A-375	0.996
4A-376	0.977
4A-332	0.821
4A-21	0.925

【0376】

これらのさらなる抗MS4A4A抗体として、抗MS4A4A抗体4A-352、4A-353、4A-354、4A-355、4A-356、4A-377、4A-378、4A-379、4A-380、及び4A-381が含まれ、そして、ELISAによって、3つの異なる抗体濃度（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.33\mu\text{g}/\text{ml}$ 、及び $0.11\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS5に対するそれらの結合について試験した。これらの研究の結果を、図9に示す。図9に示したように、これらのさらなる抗MS4A4A抗体は、組換えMS4A4A可溶性ポリペプチドJS5に対して結合したことを示した。

【0377】

図9に提示した結果は、表17に示すデータから導き出した：

【表19】

表17

抗体	1 ug/ml	0.33 ug/ml	0.11 ug/ml
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

【0378】

実施例7：ヒトMS4A4Aを過剰発現するU937細胞に対するヒト化した、及び親和性成熟した抗MS4A4A抗体の結合

本開示の抗MS4A4A抗体のヒト化した、及び親和性成熟したバージョンを、次のようにして、ヒトMS4A4Aを発現するU937細胞に対するそれらの結合について評価した。

【0379】

試験した抗MS4A4A抗体は、ハイブリドーマ上清から精製したマウスIgG、またはExp1293細胞で組換え産生したヒトIgG1Fcキメラのいずれかであった。細胞に対する親和性結合は、次のようにして決定した。簡潔に説明すると、細胞を回収し、洗浄し、そして、生死判別のためにAqua Live/Deadで標識した。PBSで洗浄した後に、 2×10^4 個の細胞を、96ウェルU底プレートでウェルごとに分注し、そして、様々な濃度（ $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ から開始する3倍希釈）の精製した抗MS4A4A抗体を含む $50 \mu\text{L}$ のFACS緩衝剤（PBS+2%FBS+1mMEDTA）とともにインキュベーションした。この一次インキュベーションを行った後に、上清を遠心分離で除去し、 $150 \mu\text{L}$ の氷冷FACS緩衝剤で2回洗浄し、そして、氷上で、適切な二次抗体とともに15分間インキュベーションした。二次抗体のインキュベーションの後に、これらの細胞を、再び氷冷FACS緩衝剤で2回洗浄し、そして、最終体積が $200 \mu\text{L}$ であるFACS緩衝剤に再懸濁した。フローサイトメトリー分析を、FACSCantoシステム（BD Biosciences）で行った。結合データを、蛍光強度の中央値（Median Fluorescent Intensity）（MFI）として表した。

【0380】

これらの結合実験の結果を、以下の表18及び表19に示す。表18は、組換えヒトM

S 4 A 4 A を過剰発現する U 9 3 7 細胞に対する本開示の特定の抗 M S 4 A 4 A 抗体の結合を示す。これらの実験は、5 μ g / m l の濃度の抗 M S 4 A 4 A 抗体を使用して行っており、また、細胞結合に関しては、フローサイトメトリーでアッセイした。

【表 2 0】

表 1 8

抗体	MFI
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
アイソタイプ コントロール	33.4

【0 3 8 1】

表 1 9 は、組換えヒト M S 4 A 4 A を過剰発現する U 9 3 7 細胞に対する本開示の特定の抗 M S 4 A 4 A 抗体の結合を示す。これらの実験は、5 μ g / m l の濃度の抗 M S 4 A 4 A 抗体を使用して行っており、また、細胞結合に関しては、フローサイトメトリーでアッセイした。このアッセイでは、二次抗体だけで染色した細胞の M F I 値は、約 2 0 0 であった。

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 1 9

抗体	MFI
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

【0 3 8 2】

実施例 8：抗 MS 4 A 4 A 抗体は、初代ヒト骨髄細胞の TREM 2 タンパク質を調節する MS 4 A 遺伝子座での SNP が、ヒトの可溶性 TREM 2 (s TREM 2) レベル、一般的には、TREM 2 経路、そして、アルツハイマー病の感受性に対して影響を及ぼすことが報告されている。アルツハイマー病保護 MS 4 A 4 A 対立遺伝子は、脳脊髄液での s TREM 2 レベルの増大に関連している。これらの経路が合わさると、アルツハイマー病や、その他の神経変性疾患の予防において役割を果たし得る。加えて、ヒトマクロファージの培養物を、市販の抗 MS 4 A 4 A 抗体で処理すると、s TREM 2 レベルが低下することが報告されている (Piccio et. al. Acta Neuropathol 2016、131：925－933)。マクロファージでの s TREM 2 及び原形質膜／細胞表面 TREM 2 (m TREM 2) レベルを調節する本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体の効果を調べるために、以下の研究を行った。

【0 3 8 3】

初代ヒトマクロファージを、96ウェルプレートに播種し、そして、抗MS4A4A抗体のパネル(10 µg/ml)を含む完全RPMIで処理した。48時間のインキュベーションの後に、上清を回収し、そして、Meso Scale Discovery (MSD)を使用して、sTREM2レベルを測定した。簡潔に説明すると、MSDプレート(カタログ番号L15XA-3)のウェルを、オービタルシェーカーで、4℃で、500 RPMで、一晚、1 µg/mlの捕捉抗体とインキュベーションした。ウェルを洗浄した後に、オービタルシェーカーで、500 RPMで、20℃で、1時間、結合緩衝剤(1%熱不活性化高品質BSA)を含むPBS)でブロックした。標準(Recombinant Human Trem2 Fc 1828-T2 (R&D Systems))、及び、未知の試料を、適切な濃度で、結合緩衝剤で調製し、ウェルに加え、次いで、オービタルシェーカーで、500 RPMで、20℃で、1時間、インキュベーションした。これらのウェルを洗浄した後に、オービタルシェーカーで、500 RPMで、20℃で、1時間、100 ng/mlの二次抗体(ビオチン化ヤギ抗ヒトTREM2 (R&D Systems カタログ番号BAF1828))とインキュベーションした。ウェルを洗浄し、次いで、0.2 µg/mlの検出試薬(Sulfo Tag-Streptavidin; MSD カタログ番号R32AD)を含む結合緩衝剤でインキュベーションした。次いで、ウェルを洗浄し、150 µlの読取り緩衝剤(read buffer) (1×、MSD)をそれぞれのウェルに加え、そして、それらのプレートを、Sector Imagerで読み取った。

【0384】

これとは別に、抗MS4A4A抗体で処理した細胞(前出)を回収し、そして、フローサイトメトリーに供して、アロフィコシアニンまたは類似のフルオロフォアとコンジュゲートした抗TREM2抗体(Alector)を使用して、mTREM2レベルを決定した。

【0385】

表20に示すように、抗MS4A4A抗体は、様々なドナーから得た培養ヒト初代マクロファージの上清でのsTREM2のレベルを引き上げた。本明細書に記載した結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、ヒト初代マクロファージの上清でのsTREM2レベルを引き上げる、またはアップレギュレーションすることを示した。表20で報告している数値は、100に設定したアイソタイプコントロール抗体を使用して得た数値に関連するものである。

【表22】

表20

抗体	ドナー		
	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

【0386】

以下の表21に示すように、抗MS4A4A抗体は、様々なドナーから得た培養ヒト初代マクロファージの原形質膜/細胞表面TREM2(mTREM2)のレベルを引き上げ

た。これらの結果は、上記した表 20 に示すように、これらの細胞の上清で認められた s T R E M 2 の対応する増大と一致していた。表 21 で報告している数値は、100 に設定したアイソタイプコントロール抗体を使用して得た数値に関連するものである。

【表 23】

表 21

抗体	ドナー		
	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

10

【0387】

これらのデータは、本発明の抗 M S 4 A 4 A 抗体でヒト初代マクロファージを処理することで、骨髓細胞系列でのこれらの細胞での s T R E M 2 及び m T R E M 2 レベルの双方が増大したことを示した。これらの結果は、市販の抗 M S 4 A 4 A 抗体 5 C 1 2 が、培養したヒトマクロファージの上清での s T R E M 2 レベルを抑制したことを示す従前の報告とは符合しない (D e m i n g e t a l、前掲)。

20

【0388】

可溶性 T R E M 2 及び膜 T R E M 2 に関する抗 M S 4 A 4 A 抗体の効果を調べる前出の実験は、低レベルのエンドトキシンを有するように調製した抗 M S 4 A 4 A 抗体を使用して反復して行った。培養上清で測定した s T R E M 2 のレベルを、以下の表 22 に示す。本開示の大抵の抗 M S 4 A 4 A 抗体は、高度に精製しており、かつ、本質的にエンドトキシンを含んでいなければ、s T R E M 2 レベルを様々な程度にまで引き上げた。市販の抗 M S 4 A 4 A 抗体 3 F 2、4 H 2、及び 5 C 1 2 も、s T R E M 2 レベルを引き上げたが、低レベルのものでしかなかった。これらの結果は、これらの市販の抗 M S 4 A 4 A 抗体が、培養物において s T R E M 2 レベルを下げることを示した従前に公開されたデータとは対照的である。このことは、市販の製剤に存在するエンドトキシン、不純物、及び凝集体による汚染が原因であると考えられる。表 22 のデータは、n g / m l を単位とする s T R E M 2 のレベルを示しており、また、アイソタイプコントロール抗体で認められたものに正規化している。

30

【0389】

認められた s T R E M 2 の増加は、抗 M S 4 A 4 A 抗体で処理した後の膜結合 T R E M 2 (m T R E M 2) レベルの増加と平行していた (以下の表 23)。ドナー間の反応性のばらつきがあるにもかかわらず、ほとんどの抗 M S 4 A 4 A 抗体は、試験した 3 名のドナーのうち 2 名または 3 名で、m T R E M 2 のレベルを引き上げた。市販の抗 M S 4 A 4 A 抗体 (3 F 2、4 H 2 及び 5 C 1 2) と比較した場合、本開示の多くの抗体は、同等または優れた活性を示している。以下の表 23 に示すレベルは、フローサイトメトリーによって決定した平均蛍光強度 (M e a n F l u o r e s c e n c e I n t e n s i t y) として表しており、また、アイソタイプコントロール抗体を使用して認められたものに正規化されている。

40

50

【表 2 4】

表 2 2

	ドナー		
抗体	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
4H2	-1.0	7.5	-5.1
5C12	-0.4	5.5	35.2

10

20

30

40

50

【表 2 5】

表 2 3

	TREM2 MFI, コントロールとの差分		
抗体	ドナー 753	ドナー 754	ドナー 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

【0390】

遺伝学的研究は、アルツハイマー病保護MS4A4A対立遺伝子とアルツハイマー病患者でのsTREM2のレベルの増加とを関連付けているので、これらの結果は、抗MS4A4A抗体が、TREM2活性と機能を調節する（すなわち、高める）ことによる、アルツハイマー病、及びその他の神経変性障害の効果的な治療法であることを示唆した。

【0391】

sTREM2及び膜結合TREM2（mTREM2）に関する本開示のヒト化抗MS4A4A抗体の効果も決定した。このことを調べるために、2名のドナーに由来するヒト初代マクロファージを、本開示の抗MS4A4A抗体で、48時間処理した。培養上清を回収し、そして、Mesoscale Discoveryアッセイを使用して、可溶性TREM2のレベルをアッセイした。細胞表面のTREM2は、フルオロフォアとコンジュケートした抗TREM2抗体で染色した後に、フローサイトメトリーで別々に処理した細胞で測定した。Mesoscale Discoveryシステム（MSD, Rockville, MD, USA）を使用して、マクロファージの培養上清での可溶性TREM2を測定した。

【0392】

以下の表24は、可溶性TREM2レベルの変化に関する抗MS4A4A抗体の効果の結果を示す。表24では、可溶性TREM2レベルを、ng/mlの単位で示す。表24

に示したように、本開示の大抵の抗MS4A4A抗体は、ヒト初代マクロファージでの可溶性TREM2レベルを引き上げた。市販の抗MS4A4A抗体5C12、4H2、及び3F2では、本開示の多くの抗MS4A4A抗体で認められたレベルと比較して、可溶性TREM2レベルの有意な増大は認められず、また、5C12、4H2、及び3F2の効果は、アイソタイプコントロールと同等であった。

【表26-1】

表24

抗体	ドナー888	ドナー904
hIgG1アイソタイプ	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

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 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
mIgG1アイソタイプ	25.9	28.8
5C12	29.7	30.0
4H2	28.9	30.6
3F2	29.4	28.8

【0393】

以下の表 2 5 は、細胞表面（例えば、膜）での T R E M 2 レベルの変化に関する抗 M S 4 A 4 A 抗体の効果の結果を示す。表 2 5 では、細胞表面 T R E M 2 レベルを、フローサイトメトリー手順で測定した平均蛍光強度（M F I）として示す。表 2 5 に示したように、本発明の大抵の抗 M S 4 A 4 A 抗体は、ヒト初代マクロファージでの細胞表面 T R E M 2 レベルを引き上げた。市販の抗 M S 4 A 4 A 抗体 5 C 1 2、4 H 2、及び 3 F 2 では、本開示の多くの抗 M S 4 A 4 A 抗体で認められたレベルと比較して、細胞表面 T R E M 2 レベルの有意な増大は認められず、また、5 C 1 2、4 H 2、及び 3 F 2 の効果は、アイソタイプコントロールと同等であった。

【表 2 7】

表 2 5

抗体	ドナー 888	ドナー 904
hIgG1アイソタイプ	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
mIgG1アイソタイプ	2459.5	2690.5
5C12	2596	2683.5
4H2	2611.5	2780
3F2	2629	2629.5

【0394】

表 2 4 及び表 2 5 に示したように、膜 T R E M 2 レベル、及び可溶性 T R E M 2 レベルの双方が、本開示の抗 M S 4 A 4 A 抗体で処理するとアップレギュレーションされた。市販の抗 M S 4 A 4 A 抗体 5 C 1 2、4 H 2、及び 3 F 2 は、T R E M 2 の発現を、有意な程度にまで誘導しなかった。

【0395】

実施例 9：マクロファージ細胞表面マーカーに関する抗 M S 4 A 4 A 抗体の効果

様々な M 1 及び M 2 マクロファージ細胞表面マーカーに関する抗 M S 4 A 4 A 抗体の効果、以下のようにして調べた。ヒト初代マクロファージを、様々な抗 M S 4 A 4 A 抗体（10 μ g / ml）を含む完全 R P M I 1 6 4 0 で、48 時間、処理した。次いで、これらの細胞を回収し、そして、M 1 マーカー（C D 1 6、M H C クラス I I、C D 8 6）、

M2マーカー（CD200R、Dectin-1、CD163）、及び、汎マクロファージマーカーCD14に特異的な抗体を使用して、フローサイトメトリーに供した。

【0396】

これらの研究の結果を、以下の表26に示す。細胞表面マーカーの発現レベルを、フローサイトメトリーでアッセイし、そして、100%に設定したアイソタイプコントロール抗体で処理した細胞で得たレベルに正規化した。CD86やMHC-IIなどの特定のM1マーカーの細胞表面発現は変化しておらず、あるいは、抗MS4A4A抗体処理の影響をわずかに受けていた。対照的に、CD200R、CD163、及びDectin-1などの特定のM2マーカーの細胞表面発現は、抗MS4A4A抗体で処理すると顕著に抑制された。

【表28】

表26

抗体	CD200R (M2)	CD14 (Pan)	Dectin-1 (M2)	CD16 (M1)	CD163 (M2)	MHC-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

【0397】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、マクロファージ分極に影響を及ぼしており、M2表現型から離れた細胞に影響を及ぼすことを示した。これらの結果は、CNSにおいて、抗MS4A4A抗体治療が、神経変性疾患及び障害に関連する神経保護機能を強化、増大、または、回復することで、ミクログリア活性の有益な改善を提供し得ることを示唆した。健康状態での恒常性ミクログリアは、CD200R、CD163、及び、CD115などのM2マーカーをさらに発現するので、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、ミクログリア細胞の生理学的状態を、進行した炎症状態または活性化状態など、より保護的な表現型の状態への改変に影響を及ぼすことを示唆した。アルツハイマー病マウスモデル、及びヒトアルツハイマー病における疾患関連ミクログリア（DAM）は、炎症誘発性または活性化状態にあり、アルツハイマー病において有益であると考えられており、本開示の抗MS4A4A抗体は、アルツハイマー病及びその他の神経変性障害の治療において有用である。

【0398】

実施例10：抗MS4A4A抗体は、オステオポンチン及びゲルゾリンの発現を高める

MS4A遺伝子クラスターが関係するアルツハイマー病に関連する遺伝的バリエーション（SNP）が特定されている。それらのバリエーション対立遺伝子の1つは、rs1582763であり、これは、CSF sTREM2レベルの増大、アルツハイマー病のリスクの低下、及び発症年齢の遅延に関連している。（Deming et al, 2018, bioRxiv, doi: dx.doi.org/10.1101/352179）。このrs1582763対立遺伝子は、血中MS4A4AmRNAレベルを低下させる。これらの知見は、rs1582763対立遺伝子が、MS4A4Aレベルを低下させ、アルツハイマー病のリスクまたは重症度を潜在的に抑制することで、保護的な役割を果たしていることを示唆している。

【0399】

ヒトマクロファージでのこの保護対立遺伝子の効果を示すRNA発現プロファイルは、公開されたRNA発現データから導き出した。SPP1（オステオポンチン）及びGSN（ゲルゾリン）のmRNAは、倍率変化（「FC」）及びp値（表27の「rs1582

763」の下方にある列を参照されたい。また、表28にも同様に記載した)で示したように、発現の増加を示すその他のマーカー(図示せず)と比較して、最も有意な発現の高まりを示した。このデータは、SPP1とGSNが、rs158273対立遺伝子に関連する保護的生物活性の薬力学的マーカーであることを示した。

【0400】

親のMS4A4A抗体を、保護対立遺伝子を表現型模写する能力について試験した。ヒトPBM由来のマクロファージを、表27及び表28に示したように、抗MS4A4A抗体で、24時間処理した(最大で3回の反復)。RNAを抽出し、そして、RNAライブラリーを調製して配列を決定した後に、ゲノムマッピングと定量を行った。結果は、示したすべての親の抗MS4A4A抗体が、1つ(4A-220)を除いて、SPP1及びGSNの発現の増大に関して、保護rs1582763対立遺伝子表現型模写することを示した(表27及び表28)。これらの結果は、SPP1及びGSNの発現を高める上で有効な本開示のMS4A4A抗体が、保護対立遺伝子と同様に、アルツハイマー病のリスク及び/または重症度を抑制する点に関して、生物学的に活性であることを示唆した。

【表29】

表27

	rs1582763		4A-18		4A-18+4A-21		4A-25		4A-214	
遺伝子	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

【表30】

表28

	rs1582763		4A-220		4A-21		4A-202	
遺伝子	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

【0401】

実施例11:抗MS4A4A抗体によるiPSC由来ミクログリア細胞の誘導及び刺激

あらゆる組織に由来する成体細胞を、幹細胞に関連する転写因子の混合物を導入することで、人工多能性幹細胞(iPSC)に変換できる(<https://www.cell.com/iPSC>で入念に検討が行われている)。iPSCはいつまでも維持することができ、そして、適切な成長因子が与えられると、様々な成熟細胞型に向けて分化するように駆動することができる。iPSCからニューロンを誘導する方法は、かねてより確立されていた(Salimi et al., Mol. Bio. Rep. 2014; 41:1717-1721; Engle et al., Neuron 2018; 100:783-797)。最近では、iPSCを使用して、星状細胞(Julia et al., Stem Cell Report 2017; 9:600-614)、及びミクログリア(Pocock and Piers, Nat. Rev. Neurosci. 2018; 19:445-452で検討されている)を誘導している。これらの培養システムは、その他の方法では実現し得ない制御環境下において、これらの細胞の生物学的

研究と機能面での研究を可能にする。さらに、iPSCは、CRISPR遺伝子編集などの様々な方法で遺伝子操作することができ、それにより、これらの細胞型で目的の遺伝子の機能的関連性をさらに詳しく分析することができる。

【0402】

iPSCから誘導した後に、ミクログリアをインビトロで単独で培養を行い、そこで、本開示の抗MS4A4A抗体で刺激を与える。刺激を与えた後に、細胞生存率を、細胞内ATPレベルを定量して評価する。細胞表面でのTREM2発現の変化、または可溶性TREM2レベルの変化に関する効果は、上記したようにして測定する。これらの培養物から得た上清を、ELISA、Mesoscale Discoveryアッセイ(MSD, Rockville, MD, USA)、Legendplex(BioLegend, San Diego, CA, USA)、またはCBA(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)などの方法を使用して、抗MS4A4A抗体で処理して得られる、様々なサイトカインまたはケモカインの発現またはレベルの変化について分析する。抗MS4A4A抗体処理に起因するこれらのiPSCミクログリアでの食作用能力、オートファジー率、表面マーカー発現、及び遺伝子発現プロファイルの変化を測定し、そして、様々な方法、例えば、フローサイトメトリー、ウェスタンブロッティング、定時イメージング及びリアルタイムイメージング、及びRNAseq分析を使用して、抗MS4A4A抗体で処理した単球由来マクロファージで認められた変化と比較する。

【0403】

実施例12：マクロファージ細胞表面マーカーに関する抗MS4A4A抗体の効果

CNS及び末梢器官の双方での骨髄細胞は、表現型と機能が本質的に一定していない。このことは、M1型とM2型のマクロファージに分けることができるマクロファージによって、インビトロでモデル化することができ、多様な食作用と炎症の潜在性、表現型、及び活性を示す。末梢器官では、M1表現型に関連するマクロファージは、炎症誘発性が大きく、抗菌性であると考えられるが、M2様マクロファージは、恒常性が大きく、抗炎症性である。CNS内では、恒常性状態のミクログリアは、CD200R、CD163などのM2マーカーも発現しており、このことは、この細胞型での調節機能を示唆している。MS4A4Aの発現は、インビトロで、M2マクロファージにおいて上昇している。

【0404】

様々なM1及びM2マクロファージ細胞表面マーカーに関する抗MS4A4A抗体の効果を、以下のようにして調べる。ヒト初代マクロファージを、完全RPMI1640において、様々な抗MS4A4A抗体(例えば、10µg/ml)で48時間処理する。次に、これらの細胞を回収し、そして、M1マーカー(CD16、MHCクラスII、CD86など)、M2マーカー(CD200R、Dectin-1、CD163など)、及び汎マクロファージマーカー、例えば、CD14などに対して特異的な抗体を使用して、フローサイトメトリーに供する。

【0405】

実施例13：抗MS4A4A抗体の動態特徴決定

MS4A4A ECL1及びECL2ペプチドに対する精製した抗体の結合動態の特徴を、以下のようにして、独自のアレイ表面プラズモン共鳴(SPR)装置(MX-96)を使用して、Carterra(South San Francisco, CA)で決定した。Continuous Flow Microspotter(CFM)を使用して、抗体を、CMD500Dチップ(Xantec #SPMX CMD500D ロット番号SC CMD500D0117, a Exp31.12.18)に印刷した。まず、このチップを、100mM MES、pH5.5、100µL EDC(最終濃度133mM)、100µLのS-NHS(最終濃度33.3mM)を用いて、7分間かけて活性化した。抗マウスIgG-Fcのローン(Jackson ImmunoResearchカタログ番号115-005-071)を、15分間かけて注射して、10000~12000RUの表面密度を確立した後に、チップ表面を、1Mエタノールアミン、pH8.5で、10分間かけて不活性化した。対象となる抗MS4A4A抗体を、HBS-EP+緩衝

剤 (Teknova カタログ番号 H8022) で 2 : 1 に希釈し、次いで 20 分間と 5 分間かけて印刷して、同じ試料溶液から 2 つ組を印刷した。コントロール抗体は、印刷のために $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。

【0406】

動態分析を実行するために、対象となるペプチドを、 2000 nM 、 400 nM 、 80 nM 、 16 nM 、及び、 3.2 nM の最終アッセイ濃度で、 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ の BSA を含む HBS-EP + 緩衝剤で調製した。次に、これらを、チップに 5 分間かけて注入した後に、非再生的な動態シリーズで、毎秒 $8 \mu\text{L}$ で、7 分間の解離時間を設けた。再現性を確保するために、それぞれの抗 MS4A4A 抗体の 2 つ組を測定した。

【0407】

実施例 14 : 一過性かつネイティブに発現する細胞株に対する MS4A4A 抗体の親和性測定

精製した抗 MS4A4A 抗体を、様々な MS4A4A 発現細胞株に対する結合親和性について評価する。この細胞として、上記した実施例 8 に記載したトランスフェクト細胞、そして、MS4A4A を内因的に発現する骨髓細胞株及び初代細胞がある。試験する抗 MS4A4A 抗体は、ハイブリドーマ上清から精製したマウス IgG、または、Exp1293 細胞で組換え産生したヒト IgG1 Fc キメラのいずれかである。細胞に対する親和性結合は、以下のようにして決定する。簡潔に説明すると、細胞を回収し、洗浄し、そして、Aqua Live/Dead で標識して、生死を識別する。PBS で洗浄した後、 2×10^5 個の細胞を、96 ウェル U 底プレートのウェルごとに等分に分注し、そして、様々な濃度 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ から始める 3 倍希釈) の $50 \mu\text{L}$ の精製した抗 MS4A4A 抗体を含む FACS 緩衝剤 (PBS + 2% FBS + 1 mM EDTA) で、インキュベーションする。一次インキュベーションの後に、遠心分離で上清を除去し、 $150 \mu\text{L}$ の氷冷 FACS 緩衝剤で 2 回洗浄し、そして、適切な二次抗体と、氷上で、30 分間、インキュベーションした。二次インキュベーションの後に、これらの細胞を、再び氷冷 FACS 緩衝剤で 2 回洗浄し、そして、最終体積が $200 \mu\text{L}$ である FACS 緩衝剤に再懸濁した。フローサイトメトリー分析を、FACS Canto システム (BD Biosciences) で行う。結合データを、蛍光強度の中央値を使用して分析し、そして、曲線を、Prism (非線形回帰: 4 つのパラメーターを使用した log 阻害剤対用量反応) にあてはめて、EC50 値を決定した。

【0408】

実施例 15 : MS4A4A タンパク質のダウンレギュレーション

抗 MS4A4A 抗体が、様々な細胞株及び初代細胞における MS4A4A の細胞表面及び総細胞タンパク質のレベルを下げる能力を評価する。いずれかのコンパートメントでの MS4A4A タンパク質の減少は、それら細胞での MS4A4A 活性の低下を示す。

【0409】

細胞を、本開示の抗 MS4A4A 抗体と一緒に、様々な時間をかけてインキュベーションを行い、次いで、それら細胞に関連して残存している MS4A4A タンパク質のレベルを、FACS (細胞表面)、または、ウェスタンブロット (総タンパク質のレベル) のいずれかを使用してアッセイする。FACS アッセイについては、残存する MS4A4A の検出を、直接にアロフィコシアニン (APC) をコンジュケートした非競合抗体を使用して実行する。ウェスタンブロット検出については、 $50 \mu\text{L}$ の溶解緩衝剤 (RIPA 溶解緩衝剤 (ThermoFisher Scientific カタログ番号 89900) + 1 : 100 HALT プロテアーゼ阻害剤カクテル (ThermoFisher Scientific カタログ番号 87786) を加えて細胞を溶解し、 $14,000 \times g$ で、15 分間の遠心分離を行って、不溶性の細胞片を除去した。可溶性画分を、タンパク質定量のために、ピシンコニン酸 (BCA) 試薬でアッセイする。それぞれの試料から得た等量のタンパク質を、4 ~ 12% Bis-Tris Plus ポリアクリルアミドゲル (ThermoFisher Scientific NW04120) にロードし、電気泳動分離を行った後に、当該ゲルでのタンパク質を、iBlot2 (ThermoFisher

10

20

30

40

50

r Scientific IM21001)、及びTransfer Stacks (ThermoFisher Scientific IB24002)を使用して、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜に転写する。この膜を、1%ウシ血清アルブミン、または5%脱脂乳のいずれかでブロックして、非特異的結合を防ぐ。次に、この膜を、独自のまたは市販の検出抗体とインキュベーションし、洗浄し、HRP結合二次抗体(ウサギ、Abcam#205718、マウス、Abcam#205719)とインキュベーションする。SuperSignal West Pico Plus化学発光基質(ThermoFisher Scientific #34577)で現像して結合を視覚化し、そして、iBright FL1000 (ThermoFisher A32752)、または、その他の互換システムでデジタル記録する。

10

【0410】

MS4A4タンパク質のレベルのダウンレギュレーションは、例えば、アンチセンス方法論、遺伝子治療など、当業者に公知で、かつ利用可能な方法を使用して、MS4A4 A核酸発現またはレベルのダウンレギュレーションでも達成し得る。

【0411】

実施例16：老化、発作、脊髄損傷、網膜ジストロフィー、前頭側頭型認知症、及びアルツハイマー病の動物モデルを用いる抗MS4A4 A抗体の活性の特徴決定

前出の説明の通り、老化、発作、脊髄損傷、網膜ジストロフィー、前頭側頭型認知症、及びアルツハイマー病の動物モデルにおいて、抗MS4A4 A抗体の治療上の有用性も試験することができる(例えば、Beattie, M S 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, M J et al., (2008) *Laryngoscope* 118, 87-93; Nykjaer, A et al., (2004) *Nature* 427, 843-848; Harrington, A W et al., (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6226-6230; Teng, H K 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, Y J et al., (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2380-2390; Al-Shawi, R et al., (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2103-2114; 及び、Yano, H et al., (2009) *J. Neurosci.* 29, 14790-14802)。

20

30

40

【0412】

実施例17：腫瘍学用動物モデルを用いる抗MS4A4 A抗体の効果の特徴決定

骨髄細胞は、大抵の固形腫瘍に存在する免疫細胞の主成分である。腫瘍生物学におけるそれらの役割は、状況に依存する。つまり、それらは、腫瘍の根絶において重要な役割を果たす可能性があるが、それらは、大抵の場合、宿主腫瘍により吸収されて、腫瘍促進性の表現型の提供を補助する。このことは、例えば、骨髄細胞が、M2表現型へ分極することで達成される場合があり、これは、一般的には、免疫抑制性であるので、当該免疫系が、当該腫瘍を根絶することをブロックする。抗MS4A4 A抗体は、骨髄細胞の再分極を介して、この免疫抑制表現型を逆転させ、そして、抗腫瘍免疫応答を促し得る。

50

【0413】

数多くの動物腫瘍モデルが存在する。関連する動物モデルの例には、NSGマウス（Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine）など、マウスの免疫系を遺伝的に欠失したヒト化マウスモデルがある。これらのマウスは、ヒト免疫細胞の受容宿主として機能し、ヒトの適応性及び自然免疫細胞の生着をもたらす。次いで、これらの動物に対して、通常は、脇腹の皮下に腫瘍細胞を接種する。経時的な腫瘍サイズは、腫瘍細胞の成長と、宿主免疫系によるそれらの根絶との間のバランスを表す。期間全体を通して、これらの動物を抗MS4A4A抗体で処理すると、アイソタイプ処理動物と比較して、腫瘍の進行が修正される。処理期間の終わりに、腫瘍を抽出し、そして、様々な分析を行って、腫瘍細胞及び浸潤免疫細胞に対する抗MS4A4A抗体の効果を決定する。腫瘍を、切片にし、スライドに載置すると、顕微鏡下で組織学的変化を分析することができる。mRNAを、RT-PCR、RNASeq、またはマイクロアレイで分析して、遺伝子発現の変化を決定することができる。腫瘍及び浸潤性免疫細胞の単一細胞懸濁液を調製し、様々な細胞表面マーカーに対する抗体で染色し、そして、フローサイトメトリーで分析すると、特に、マクロファージ及びT細胞などの免疫細胞における細胞表面表現型の変化を表すことができる。これらの分析のいずれかにおいて、抗MS4A4A処理の結果として認められた変化は、これらの抗体の免疫調節機能を示す。

10

【0414】

実施例18：TREM2転写及びmRNAに関する抗MS4A4A抗体の効果

TREM2転写レベルとmRNAに関する抗MS4A4A抗体の効果は、以下のようにして評価する。培養細胞を、様々な濃度の本開示の抗MS4A4A抗体で、様々な時間をかけて処理する。その後、細胞内のTREM2 mRNAレベルの変化を、mRNAレベルを測定及び／または定量するための当業者に周知の標準的な方法論を使用して決定する。

20

【0415】

実施例19：TREM2の再利用及び分解に関する抗MS4A4A抗体の効果

増大したsTREM2及びmTREM2のレベルに関する抗MS4A4A抗体の効果の理解をさらに深めるために、TREM2の再利用及び／または分解を調べる以下の研究を行う。これらの研究では、抗MS4A4A抗体処理に関連する新たなTREM2合成をさらに防ぐために、細胞のシクロヘキシミド処理を使用する。抗MS4A4A抗体で処理した細胞と比較して、コントロール細胞におけるTREM2の再利用と分解を調べるために、当該技術分野で公知の様々な方法が利用可能である。

30

【0416】

実施例20：さらなる抗MS4A4A抗体

前出の実施例1に記載した通り、親抗体4A-21から2つのさらなる抗MS4A4A抗体をヒト化及び親和性成熟させて、抗MS4A4A抗体4A-450、及び抗MS4A4A抗体4A-419を得た。これらの抗体のそれぞれの可変重鎖及び可変軽鎖配列を、以下の表29に示しており、それらの対応するCDR（Kabatによる）に下線を付けた。重鎖CDR配列を、表30に示す；軽鎖CDR配列を、表31に示す。

40

50

【表 3 1】

表 2 9

抗体	重鎖可変	配列番号	軽鎖可変	配列番号
4A-450	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYAFTSYGL SWVRQAPGQGLEWMGW INTYSGVPTYAQGFTGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTMADY WGQGTLLTVSS	304	DVVMTQSPSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSAGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS LD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	305
4A-419	QVQLVQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYRFTSYGL SWVRQAPGQGLEWMGW INTYSGVPTYAQGFKGRF VFSLDTSVSTAYLQISLK AEDTAVYYCARTMADY WGQGTLLTVSS	306	DVVMTQSPSLPVTLGQPA SISCKSSRSLLYSAGKTYLS WFQQRPGQSPRRLIYLVS LD SGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCWQGI DFHQTFGGGTKVEIK	307

10

【表 3 2】

表 3 0

抗体	CDR-H1	配列番号	CDR-H2	配列番号	CDR-H3	配列番号
4A-450	SYGLS	308	WINTYSGVP TYAQGFTG	309	TMADY	310
4A-419	SYGLS	311	WINTYSGVP TYAQGFKG	312	TMADY	313

20

【表 3 3】

表 3 1

抗体	CDR-L1	配列番号	CDR-L2	配列番号	CDR-L3	配列番号
4A-450	KSSRSLLY SAGKTYL S	314	LVSKLD S	315	WQGIDFHQ T	316
4A-419	KSSRSLLY SAGKTYL S	317	LVSKLD S	318	WQGIDFHQ T	319

30

40

【0 4 1 7】

実施例 2 1：s T R E M レベルに関するインビボでの抗 M S 4 A 4 A 抗体の効果

血清及び脳脊髄液（C S F）での s T R E M レベルに関する本開示の抗 M S 4 A 4 A 抗体のインビボでの効果を調べるために、次のようにして研究を行った。

【0 4 1 8】

カニクイザルに対して、抗 M S 4 A 4 A 抗体 4 A - 2 0 2 またはアイソタイプコントロール（h u I g G 1）を、8 0 m g / m l の単回静脈内注入により投与した。血清試料は、抗体の投与前、投与から 0 . 5、4、1 0、2 4、4 8、9 6、1 9 2、3 1 2、4 8

50

0、及び648時間後に動物から回収した。CSF試料は、抗体の投与前、投与から48、96、192、及び336時間後に動物から回収した。

【0419】

血清及びCSFでのsTREMレベルは、次のようにして測定した。シングルスポット Meso Scale Discovery (MSD) プレート (Rockville, MD) を、捕捉抗体を含むPBSで、4℃で、一晚コーティングした。サルの血清及びCSF試料（ならびに、サルのTREM2-Fc標準）を結合緩衝剤で希釈し、室温で1時間かけてウェルに加えた。ビオチン化ヤギ抗ヒトTREM2ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を、結合緩衝剤で1:2,000に希釈して加え、室温で1時間インキュベーションした後に、スルホタグストレプトアビジン (MSD) で検出した。150µLの1×読取り緩衝剤 (Read Buffer) をプレートに加え、そして、これらのプレートを、Sector Imager (MSD) で分析した。

【0420】

血清では、抗MS4A4A抗体4A-202を投与した後に、sTREM2レベルが、ベースラインの約1.5倍高まっていた（ベースラインから約50%増えた）（図10A～10B）。カニクイザルに対して抗MS4A4A抗体4A-202を単回投与した後の血清sTREM2レベルは、少なくとも480時間（20日間）は上昇したレベルを維持していた（ベースラインレベルを上回っている）。

【0421】

CSFでは、抗MS4A4A抗体4A-202を投与した後に、sTREM2レベルが、ベースラインの約2～4倍高まっていた（ベースラインから約300%増えた）（図11A～11B）。カニクイザルに対して抗MS4A4A抗体4A-202を単回投与した後のCSF sTREM2レベルは、少なくとも96時間（4日間）上昇したレベルを維持していた（ベースラインレベルを上回っている）。

【0422】

これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、インビボで、血清及びCSFにおいて、sTREM2レベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0423】

実施例22：組換えMS4A4Aを過剰発現するU937細胞に対する抗MS4A4A抗体の結合

ヒト組換えMS4A4Aを発現するU937細胞に対する本開示の抗MS4A4A抗体の結合親和性について、評価を行った（これらの細胞の生成については、すでに説明している）。これらの細胞に対する抗MS4A4A抗体の結合親和性を、以下のようにして決定した。簡潔に説明すると、組換えヒトMS4A4Aを発現するU937細胞を回収し、洗浄し、そして、Aqua Live/Deadで標識して、生死を識別した。2×10⁴個の細胞を、PBSで洗浄した後に、96ウェルU底プレートのウェルごとに分注し、そして、様々な濃度の50µLの精製した抗MS4A4A抗体を含むFACS緩衝剤（PBS+2%FBS+1mMEDTA）で、インキュベーションした。この一次インキュベーションの後に、遠心分離で上清を除去し、150µLの氷冷FACS緩衝剤で細胞を2回洗浄し、そして、適切な二次抗体と、氷上で、15分間、インキュベーションした。この抗体の二次インキュベーションの後に、これらの細胞を、再び氷冷FACS緩衝剤で2回洗浄し、そして、最終体積が200µLであるFACS緩衝剤に再懸濁した。次いで、フローサイトメトリー分析を、FACSCantoシステム (BD Biosciences) で行った。結合データを、平均蛍光強度 (Mean Fluorescent Intensity) (MFI) として表した。フローサイトメーターで測定したMFI値を、Kuek, et al, 2016, Immunology and Cell Biology. 94: 11-23に基づいた次の方程式（または、同様の4パラメーターフィットを使用することができる）を使用して、Prism (Graphpad) ソフトウェアで測定した：

$$Y = ((F_{max} - B) / (n * (C / 6.02e23) / (V * 1e-6))) * [[($$

10

20

30

40

50

$$a p t K D + X + n * \left(\left(C / 6.02e23 \right) / \left(V * 1e-6 \right) \right) - S Q R T \left\{ \left(\left(a p t K D + X + n * \left(\left(C / 6.02e23 \right) / \left(V * 1e-6 \right) \right) \right) ^ 2 \right) - 4 * \left(n * \left(\left(C / 6.02e23 \right) / \left(V * 1e-6 \right) \right) * X \right) \right\} / 2 + B$$
 【0424】

これらの分析では、以下の数値を、実験条件に従って制約した：C＝細胞数／ウェル（20，000）；V＝マイクロリットル単位の染色する総体積；n＝細胞表面の受容体の数、細胞につき100，000個の受容体を推定している。これらの結合研究の結果を、図12に示す。

【0425】

図12に示したように、抗MS4A4A抗体4A-313 WT huIgG1は、U937細胞で発現した組換えヒトMS4A4Aに対して、約 $2.8e-10$ の結合親和性を示しており、一方で、抗MS4A4A抗体4A-450 WT huIgG1は、このアッセイで、 $3.8e-09$ の結合親和性を示した。

【0426】

実施例23：MS4A4A過剰発現細胞株の生成

組換えヒトMS4A4Aを発現する、安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞株を生成することの困難性を考慮して、その他のDNAベクター及び細胞株を調べて、組換えヒトMS4A4Aの発現により適合性があるかどうかを判定した。安定したトランスフェクションのために、MS4A4Aコード配列を、発現ベクターpD2533-G418またはpD3539-puro（Atum, Newark, CA, USA）に導入した。

【0427】

MS4A4Aは、インビボでは骨髄細胞にネイティブに発現している。したがって、上記した細胞を使用して認められた毒性を克服するために、幾つかの骨髄由来細胞株を、最小限の毒性を有する、または毒性が認められない組換えヒトMS4A4Aを発現する能力について試験した。これらの研究で使用した骨髄由来細胞株のパネルには、THP-1細胞（ATCC TIB202）、U937細胞（ATCC CRL-1593.2）、K562細胞（ATCC CCL243）、HL60細胞（ATCC CCL240）、及びKasumi-1細胞（ATCC CRL-2724）が含まれた。マウスpre-B細胞株である300.19細胞（Tufts University T000710）は、組換えタンパク質の発現目的で一般的に使用されているので、これらの細胞も試験した。選択効率及びトランスフェクション効率に関して、G418またはピューロマイシンの適切な用量を決定するために、これらの細胞株のそれぞれを、抗生物質感受性についてスクリーニングした。U937細胞、K562細胞、及び300.19細胞からのトランスフェクタントが、組換えヒトコードMS4A4A発現プラスミドトランスフェクション及び抗生物質選択の後も生存していることが認められた。限界希釈でこれらの細胞をクローニングした後に、個々のクローンが生成し、続いて、フローサイトメトリーを使用してヒトMS4A4Aタンパク質細胞表面発現についてスクリーニングした。

【0428】

実施例24：ヒト化した、及び親和性成熟した抗MS4A4A抗体は、初代ヒト骨髄細胞においてTREM2タンパク質を調節する

ヒト遺伝学研究でのデータは、MS4A4A、TREM2経路、及びアルツハイマー病（AD）感受性の間の関連性を特定している（Piccio et al., 2016, Acta Neuropathol, 131:925-933; doi:https://dx.doi.org/10.1101/352179）。例えば、AD保護MS4A4A対立遺伝子は、脳脊髄液でのsTREM2レベルの増大に関連している。これらの保護経路に関する理解を得るために、以下の研究を行った。ヒト初代マクロファージを、様々な濃度の本開示の抗MS4A4A抗体で、48時間処理した。これらの研究では、次の抗MS4A4A抗体を試験した：野生型huIgG1 Fc（WT）を有する4A-450、huIgG1 Fc N325S及びL328F（NSLF）を有する4A-450、huIgG1 Fc K322Aを有する4A-450、4A-313 WT huIgG1

、4A-313 NSLF huIgG1、及び4A-313 K322A huIgG1。次いで、細胞を、フルオロフォアとコンジュケートした抗TREM2抗体で染色した後に、TREM2の細胞表面（膜結合）発現を、フローサイトメトリーで測定した。Mesoscale Discoveryシステム（MSD, Rockville, MD, USA）を使用して、細胞の培養上清での可溶性TREM2レベルを測定した。

【0429】

図13及び14に示したように、膜TREM2レベルは、細胞に対して抗MS4A4A抗体を加えた後に、ヒト初代マクロファージにおいて用量依存的に高まった。異なるhuIgG1 Fc配列に関する抗MS4A4A抗体－野生型huIgG1、huIgG1でのN325S/L328Fアミノ酸置換、及びhuIgG1でのK322Aアミノ酸置換はすべて、膜TREM2発現レベルを引き上げることができた。以下の表32及び33は、膜結合TREM2レベルの変化について、抗MS4A4A処理細胞で認められたMFIの比率に関する数値を示しており、それぞれ、図13及び14から得た未処理のコントロール細胞で認められたものと比較している。

【0430】

図15及び16は、野生型huIgG1 Fc主鎖における抗MS4A4A抗体4A-450及び4A-313が（それぞれ）、初代ヒトマクロファージの上清において、可溶性TREM2レベルを用量依存的に高めたことを示す。以下の表34及び35は、抗MS4A4A処理細胞で認められた可溶性TREM2の倍数を示しており、それぞれ、図15及び16から得たプレートベースラインレベルとして測定したものと比べている。

【表34】

表32

抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	4A-450 WT			4A-450 NSLF			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

【表35】

表33

抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	4A-313 WT			4A-313 NSLF			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

【表 3 6】

表 3 4

4A-450 WT IgG1 (μg/ml)	sTREM2 (バックグラウンドプレート に対する倍数)
0.0256	0.250851509
0.064	0.337610359
0.16	0.453324666
0.4	0.60750507
1	0.838142928
2.5	1.452549482

10

20

【表 3 7】

表 3 5

4A-313 WT IgG1 (μg/ml)	sTREM2 (バックグラウンドプレートに対する倍数)
0.0256	0.690304672
0.064	0.942481014
0.16	1.64173901
0.4	1.690748748
1	1.687668894
2.5	1.52381547

30

40

【0 4 3 1】

これらの結果は、抗MS4A4A抗体4A-450 WT huIgG1 (2.5 μg/ml) が、未処理の細胞と比較して、初代ヒトマクロファージのsTREM2レベルを約1.4倍引き上げたことを示した。また、これらの結果は、抗MS4A4A抗体4A-31

50

3 WT huIgG1が、未処理の細胞と比較して、初代ヒトマクロファージのsTREMレベルを約1.5倍～約1.7倍引き上げたことを示した。これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、インビトロで、sTREMレベルを引き上げる上で有効であり、したがって、アルツハイマー病の発症を防御するMS4A4A対立遺伝子の効果を模倣して、インビボで、血漿及びCSFでのsTREMレベルを引き上げる効果的な手段を提供し得ることを示した。

【0432】

実施例25：細胞ATPレベルに関する抗MS4A4A抗体の効果

ヒト単球を、製造業者のプロトコルに従って、RosetteSepヒト単球濃縮カクテル (Stemcell Technologies)、及びFicoll遠心分離を使用して全血から分離した。ACK溶解緩衝剤で赤血球を溶解した後に、単球を完全培地 (RPMI、10% FBS、Pen/Strep、L-グルタミン、HEPES、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム) に再懸濁した。これらの単離した単球からマクロファージを得るために、100 ng/mlのヒトM-CSF、及び8% v/vのヒト血清を、5～7日間かけて細胞に加えた。次いで、細胞を、50,000個の細胞/ウェルを含む完全RPMI-1640でプレートに播種し、そして、様々な濃度の抗MS4A4A抗体 (4A-313 NSLF、4A-313 PS、4A-450 NSLF、及び4A-450 PS) の存在下または非存在下で2日間培養した、または様々な濃度のアイソタイプコントロール抗体を含む溶液で48時間培養した。次いで、製造業者のプロトコルに従って、CellTiter-Glo Luminescent細胞生死判別キット (Promega、カタログ番号G7571) を使用して、細胞内のATP含有量を定量した。

【0433】

図17に示したように、抗MS4A4A抗体4A-313 NSLF huIgG1、4A-313 PS huIgG1、4A-450 NSLF huIgG1、及び4A-450 PS huIgG1は、初代ヒトマクロファージのATPレベルを、用量依存的に高めた。FcγRIIIa結合を無効にするN325S/L328Fアミノ酸置換を含むhuIgG1 Fcを有する抗MS4A4A抗体 (Journal of Biological Chemistry 2014, 289:15309-15318)、または、C1q結合を無効にするP331Sアミノ酸置換を含むhuIgG1 Fcを有する抗MS4A4A抗体 (Journal of Immunology 2000, 164:4178-4184) は、両方とも、ヒトマクロファージのATPレベルを引き上げる上で効果的であった。ATPレベルが増大は、ヒトマクロファージの生存率の増大を示した。

【0434】

以下の表36は、これらの研究で決定した (図17に関連する) ATPレベルの数値を示しており、これらの数値は、未処理のマクロファージで認められた数値に正規化している。これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、用量依存的にヒトマクロファージのATPレベルを引き上げる上で有効であることを示した。ATPレベルは、抗MS4A4A抗体4A-450を使用した未処理細胞で認められたレベルの約1.2倍 (0.016 μg/mlの抗MS4A4A抗体を使用) から約1.4倍 (1.0 μg/mlの抗MS4A4A抗体を使用) 引き上げられた。ATPレベルは、抗MS4A4A抗体4A-313を使用した未処理細胞で認められたレベルの約1.3倍 (0.008 μg/mlの抗MS4A4A抗体を使用) から約1.7倍 (1.0 μg/mlの抗MS4A4A抗体を使用) 引き上げられた。

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 3 6

抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	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

【0 4 3 5】

実施例 2 6：マクロファージ細胞表面マーカーに関する抗 MS 4 A 4 A 抗体の効果

CNS 及び末梢器官の双方での骨髄細胞は、表現型と機能は本質的に一定していない。末梢器官では、M 1 様の表現型を有するマクロファージは、より炎症誘発性で、抗菌性があり、M 2 様の表現型を有するマクロファージは、恒常性が大きく、抗炎症性である。CNS 内では、恒常性状態のミクログリアは、CD 2 0 0 R、CD 1 6 3 などの M 2 様マーカーも発現する。MS 4 A 4 A の発現は、インビトロで、M 2 様マクロファージにおいて上昇しており、このことは、MS 4 A 4 A が、M 2 様マクロファージの新規の細胞表面マーカーであることを示唆している (Immunology and Cell Biology 2017, 95: 611-619)。

【0 4 3 6】

様々なマクロファージ細胞表面マーカーに関する本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体の効果を、以下のようにして調べた。ヒト初代マクロファージを、様々な濃度 ($10 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.1 \mu\text{g/ml}$) の抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A-313 NSLF hu Ig G 1 または 4 A-419 野生型 (WT) hu Ig G 1 を含む完全 RPMI 1640 で、48 時間処理した。次に、これらの細胞を回収し、そして、M 1 様マーカー (例えば、CD 1 6、MHC クラス II、CD 8 6)、M 2 様マーカー (例えば、CD 2 0 0 R、Dectin-1、CD 1 6 3)、及び汎マクロファージマーカー CD 1 4 に対して特異的な抗体を使用するフローサイトメトリーに供した。

【0 4 3 7】

図 1 8 A、1 8 B、及び 1 8 C に示したように、初代ヒトマクロファージに対して抗 MS 4 A 4 A 抗体を加えると、未処理細胞で認められたものと比較して、用量依存的に、CD 1 4 及び CD 1 6 3 細胞表面マーカーが抑制された (抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A-313 NSLF hu Ig G 1 Fc (それぞれのペアのグラフの右側の棒)、抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A-419 野生型 hu Ig G 1 Fc (WT) (それぞれのペアのグラフの左側の棒))。初代ヒトマクロファージに対して抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A-313 NSLF を加えると、未処理細胞で認められたレベルよりも低いレベルの CD 2 0 0 R 細胞表面マーカーが認められた。対照的に、初代ヒトマクロファージに対して抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A-419 を加えると、未処理細胞で認められたレベルよりも高いレベルの CD 2 0 0 R 細胞表面マーカーが認められた。この結果は、上記した抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A-313 NS

L Fで得た結果、及びC D 2 0 0 RなどのM 2 様細胞表面マーカーを抑制する本開示のその他の抗M S 4 A 4 A 抗体で得た結果を考慮すると、この特定の実験にあっては例外的なものと考えられる（上記実施例 9 及び表 2 6 を参照されたい）。以下の表 3 7 は、図 1 8 A、1 8 B、及び 1 8 C のグラフから得た細胞表面マーカーの倍数変化の（未処理細胞を超える）数値を示す。データは、2 名のドナーからのもので、3 つのウェルで平均化している。

【表 3 9】

表 3 7

抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	4A-419.WT	4A-313.NSLF
	CD14	
10	0.40	0.41
1	0.54	0.34
0.1	0.86	0.36
未処理	1.00	1.08
	CD163	
10	0.25	0.28
1	0.32	0.30
0.1	0.70	0.36
未処理	0.63	0.75
	CD200R	
10	1.17	0.75
1	1.20	0.56
0.1	1.24	0.41
未処理	0.80	0.96

【0 4 3 8】

これらの結果は、本開示の抗M S 4 A 4 A 抗体が、M 2 様マクロファージ細胞表面マーカーを抑制する上で有効であることを示した。

【0 4 3 9】

実施例 2 7：補体依存性細胞傷害性（CDC）アッセイでのヒトIgG1 Fcバリエーション
ヒトIgG1抗体のFcドメインは、例えば、C1q、Fcガンマ受容体、及び新生児

Fc受容体など、複数の下流エフェクター分子との相互作用によってエフェクター機能に影響を与える。補体沈着に影響を与えるバリエーション huIgG1 Fc領域を有する本開示の抗MS4A4A抗体の能力を、以下のようにして、C3b沈着／細胞死滅アッセイを使用して測定した。

【0440】

上記したようにして生成した組換えヒトMS4A4Aを過剰発現するU937細胞を、これらの研究の標的細胞として使用した。細胞を回収し、PBSで1回洗浄し、RPMI 1640培地で 2×10^6 個の細胞/mLに希釈した。丸底96ウェルプレート（Falcon #351177）に、ウェルあたり50 μ Lの標的細胞（ 1×10^5 個の細胞／ウェル）を分注した。これらの細胞に対して、同じ培地で調製した25 μ Lの抗MS4A4A抗体を、所定の濃度の4倍で加えた。細胞-抗体混合物を、37℃で、15分間インキュベーションし、次いで、プールした補体ヒト血清（Innovative Research, IPLA-CSE R）の25 μ Lを、補体供給源としてそれぞれのウェルに加え、そして、それらのプレートを、37℃で、さらに2時間インキュベーションした。その後、細胞を、FACS緩衝剤（PBS+2%FBS+1mMEDTA）で2回洗浄し、次いで、それぞれのウェルに、100 μ Lの1:50で希釈した抗C3b-APC抗体（Biolegend 846106）を加え、そして、氷上で30分間インキュベーションした。細胞を、FACS緩衝剤で2回洗浄し、そして、80 μ LのFACS緩衝剤+0.25 μ L／ウェルのヨウ化プロピジウム（Fischer Scientific, BD556463）に再懸濁してから、iQueフローサイトメーター（IntelliCyt）で分析した。補体活性は、CDCで媒介した細胞死の程度を特定する高PI（PI-high）細胞のパーセンテージ、またはC3b沈着を測定するAPCチャンネル内の細胞のMFIの2つの方法で測定した。

【0441】

図19は、様々なhuIgG1 Fcバリエーションを有する抗MS4A4A抗体4A-313で処理した組換えヒトMS4A4Aを発現するU937細胞でのPI（ヨウ化プロピジウム）取り込み%を示す。図19に示したように、野生型huIgG1を有する抗MS4A4A抗体4A-313は、細胞によるPI取り込みの増加として認められる、補体沈着及び標的発現細胞の死滅を促す能力に優れている。この効果は、用量依存的であった。Fc領域にhuIgG1 N325S／L328Fアミノ酸置換（C1q結合を大幅に弱める）を有する抗MS4A4A抗体4A-313、このアッセイでは、CDCはほぼ完全になくなっていた。加えて、Fc領域にhuIgG1 K322Aアミノ酸置換を有する抗MS4A4A抗体4A-313は、このアッセイでは、CDC活性が認められないとの同様の効果を示した。

【0442】

以下の表38は、図19に示すグラフに関連した数値を示す。

10

20

30

40

50

【表 40】

表 38

抗体 (ng/mL)	4A- 313.NSLF	4A- 313.K322A	4A- 313.IgG1	アイソタイプコ ントロールIgG1
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
3.0	8.96	4.95	3.63	9.13
0.0	7.58	5.49	7.09	9.29

【0443】

これらの結果は、野生型ヒトIgG1 Fc領域を有する抗MS4A4A抗体が、補体依存性細胞傷害性については有効であるのに対して、N325S/L328Fアミノ酸置換またはK322Aアミノ酸置換のいずれかのヒトIgG1 Fcバリエントを有する抗MS4A4A抗体が、補体依存性細胞傷害性については有効ではないことを示した。

【0444】

実施例28：抗体依存性細胞食作用（ADCP）におけるヒトIgG1 Fcバリエント
抗体依存性細胞食作用（ADCP）を媒介する本開示の抗MS4A4A抗体の能力を、ADCH Reporter Bioassayシステム（Promega #G9901）を使用して評価した。このシステムは、FcγRIIa受容体（H131バリエント）を安定して発現する遺伝子操作したJurkat T細胞株、及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答エレメントを利用している。このアッセイの活性は、エフェクター細胞（この事例では、骨髄細胞）によるADCP活性と相関している。本明細書で使用した標的細胞は、組換えヒトMS4A4Aを過剰発現するU937細胞、または単球に由来しており、かつ、hIL-4（20 ng/mL）及びデキサメタゾン（20 nM）で極性化した初代ヒトマクロファージのいずれかであった。

【0445】

細胞を、アッセイ緩衝剤（RPMI + 4%低IgG血清）で、 1.2×10^6 / mLの濃度に希釈し、そして、25 μLの細胞（30,000個/ウェル）を、96ウェルホワイトアッセイプレート（Costar 3922）の内部ウェルに分注した。プレートの外側のウェルを、細胞や抗体を含まない75 μLのアッセイ緩衝剤で満たした。細胞を含むウェルに対して、アッセイ緩衝剤で希釈も行った所望の最終濃度の3倍の濃度の25 μLの抗MS4A4A抗体を加えた。標的細胞に抗体を加えた後に、このアッセイシステムで提供したエフェクター細胞（ 2×10^7 / mLで凍結したもの）を、37℃で解凍し、そして、630 μLを、3.6 mLの予め温めておいた（37℃）アッセイ緩衝剤に加え、そして、ゆっくりと混合した。25 μLのエフェクター細胞（75,000個/ウェル、2.5のE:T比）を、標的細胞と抗体を含むウェルに直ちに加えた。次いで、このプ

プレート、37℃及び5%CO₂で、6時間インキュベーションして、受容体細胞の活性化と、ルシフェラーゼの発現を可能にした。このインキュベーションの後に、このプレートを、室温に平衡化させ（15分）、その後、75μLのルシフェラーゼアッセイ試薬を、それぞれのウェルに加えた。次いで、このプレートを、プレートシェーカーで、20分間、インキュベーションし、そして、BioTekプレートリーダーで発光を測定した。

【0446】

図20に示したように、野生型huIgG1（Iso Ctrl IgG1）は、このアッセイで、ルシフェラーゼ活性を強力に駆動しており、これは、FcγRIIa-H131の活性化を示している。N325S/L328Fアミノ酸置換を有するhuIgG1 Fcを含む抗MS4A4A抗体4A-313は、Iso Ctrl IgG1で認められたものと比較して、FcγRIIa-H131活性化の実質的な喪失を示した；K322Aアミノ酸置換を有するhuIgG1 Fcを含む抗MS4A4A抗体4A-313は、このアッセイにおいて、同様の効果を有した。

【0447】

以下の表39は、図20に示すグラフに関連した数値を示す。

【表41】

表39

抗体 (ng/mL)	4A- 313.NSLF	4A- 313.K322A	4A- 313.IgG1	アイソタイプコントロールIgG1
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

【0448】

これらの結果は、野生型ヒトIgG1 Fc領域を有する抗MS4A4A抗体が、抗体依存性細胞食作用に有効であることを示した。加えて、これらの結果は、N325S/L328Fアミノ酸置換、またはK322Aアミノ酸置換のいずれかのヒトIgG1 Fcバリエーションを有する抗MS4A4A抗体も、程度は低くなるものの、抗体依存性細胞食作用において有効であることを示した。

【0449】

実施例29：抗体依存性細胞傷害（ADCC）でのヒトIgG1 Fcバリエーション

標的細胞に結合した抗体は、主に、ナチュラルキラー細胞に関するFcγRIIaの活性化により駆動すると考えられている活性であるADCCを媒介することができる。本開示の抗MS4A4A抗体が、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を引き起こす能力を、ADCC Reporter Bioassayシステム（Promega #G7010）

を使用して評価した。このアッセイシステムは、FcγRIIIa受容体（V158バリエーション）を安定して発現する遺伝子操作したJurkat T細胞株、及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答エレメントを利用している。本明細書で使用した標的細胞は、組換えヒトMS4A4Aを過剰発現するU937細胞、または単球に由来しており、かつ、hIL-4（20 ng/mL）及びデキサメタゾン（20 nM）で極性化した初代ヒトマクロファージのいずれかであった。標的細胞を、アッセイ緩衝剤（RPMI + 4%低IgG血清）で、 1.2×10^6 /mLの濃度に希釈し、そして、25 μLの細胞（30,000個/ウェル）を、96ウェルホワイトアッセイプレート（Costar 3922）の内部ウェルに分注した。プレートの外側のウェルを、細胞や抗体を含まない75 μLのアッセイ緩衝剤で満たした。細胞を含むウェルに対して、アッセイ緩衝剤で希釈も行った、所望の最終濃度の3倍の濃度の25 μLの抗体を加えた。標的細胞に抗体を加えた後に、提供したエフェクター細胞（ 2×10^7 /mLで凍結したもの）を、37°Cで解凍し、そして、630 μLを、3.6 mLの予め温めておいた（37°C）アッセイ緩衝剤に加え、ゆっくりと混合を行い、そして、25 μLのエフェクター細胞（75,000個/ウェル、2.5のE:T比）を、標的細胞と抗体を含むウェルに直ちに加えた。次いで、このプレートを、37°C及び5%CO₂で、6時間インキュベーションして、受容体細胞の活性化と、ルシフェラーゼの発現を可能にした。このインキュベーションの後に、このプレートを、室温に平衡化させ（15分）、その後、75 μLのルシフェラーゼアッセイ試薬を、それぞれのウェルに加えた。次いで、このプレートを、プレートシェーカーで20分間インキュベーションし、そして、BioTekプレートリーダーで発光を測定した。

【0450】

図21に示したように、野生型hu IgG1（Iso Ctrl IgG1）は、このアッセイで、ルシフェラーゼ活性を強力に駆動しており、このことは、FcγRIIIa-V158の活性化を示している。N325S/L328Fアミノ酸置換を有するhu IgG1 Fcを含む抗MS4A4A抗体4A-313は、Iso Ctrl IgG1で認められたものと比較して、FcγRIIIa-H131活性化の実質的な喪失を示した；K322Aアミノ酸置換を有するhu IgG1 Fcを含む抗MS4A4A抗体4A-313は、このアッセイにおいて、同様の効果を有した。

【0451】

以下の表40は、図21に示すグラフに関連した数値を示す。

10

20

30

40

50

【表 4 2】

表 4 0

抗体 (ng/mL)	4A- 313.NSLF	4A- 313.K322A	4A-313.IgG1	アイソタイプコン トロール IgG1
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

【 0 4 5 2 】

これらの結果は、野生型ヒト I g G 1 F c 領域を有する抗 M S 4 A 4 A 抗体が、抗体依存性細胞傷害に有効であるが、その一方で、N 3 2 5 S / L 3 2 8 F アミノ酸置換、または K 3 2 2 A アミノ酸置換のいずれかのヒト I g G 1 F c バリエーションを有する抗 M S 4 A 4 A 抗体は、抗体依存性細胞傷害において有効でないことを示した。

【 0 4 5 3 】

実施例 3 0：初代ヒトマクロファージでの膜及び可溶性 T R E M 2 レベルに関する M S 4 A 4 A ノックアウトの効果

マクロファージにおける M S 4 A 4 A ノックアウトが膜及び可溶性 T R E M 2 レベルに及ぼす効果を、次のようにして調べた。C R I S P R 技術を使用して、初代ヒトマクロファージにおける M S 4 A 4 A の発現をノックアウトした。簡潔に説明すると、ノックアウトマクロファージを、C a s 9 タンパク質 (I D T) を用いたエレクトロポレーションで生成しており、当該タンパク質は、t r a c r R N A (I D T) にアニーリングした遺伝子座特異的 c r R N A (I D T ; N T 1、I D T ネガティブコントロール c r R N A # 1 及び # 2 ; N T 2, G T A G G C G C G C C G C T C T C T A C (配列番号 3 4 5) 及び A A C C C C T G A T T G T A T C C G C A (配列番号 3 4 6) ; M S 4 A 4 A # 1, A A T T G T G T A C C C G A T A T A C A (配列番号 3 4 7) ; M S 4 A 4 A # 2, A A C C A T G C A A G G A A T G G A A C (配列番号 3 4 8) ; M S 4 A 4 A # 3, T A T T C A T T C C T A G A C T A C C T (配列番号 3 4 9) ; M S 4 A 4 A # 4, G C T C T G T A C T G G C T G C A T C A (配列番号 3 5 0)) からなる非標的 (N T) または M S 4 A 4 A 特異的 g R N A と複合体を形成した。M S 4 A 4 A ノックアウト効率を、フローサイトメトリー分析で評価を行ったところ、9 0 % 超であった (データは示さず) 。

【 0 4 5 4 】

図 2 2 A 及び 2 2 B は、膜 T R E M 2 (m T R E M 2) レベル、及び可溶性 T R E M 2 (s T R E M 2) レベルに関する M S 4 A 4 A ノックアウトの効果を示す。図 2 2 A 及び 2 2 B では、N T 1 及び N T 2 は、非標的 C R I S P R コントロールである ; g R N A 2 + 3 と g R N A 1 + 4 とは、M S 4 A 4 A をノックアウトするために使用する異なるガイドのことを指す。

【0455】

図22A及び22Bに示したように、初代ヒトマクロファージにおけるMS4A4Aのノックアウトは、mTREM2及びsTREM2レベルを引き上げた。MS4A4Aノックアウトの際に認められたmTREM2及びsTREM2のレベルの増大は、NT1及びNT2コントロール細胞に対して抗MS4A4A抗体4A-313を加えた時のmTREM2及びsTREM2レベルの増大に匹敵していた。MS4A4Aノックアウト初代ヒトマクロファージを抗MS4A4A抗体で処理しても、mTREM2またはsTREM2レベルのさらなる増大は認められず、このことは、ヒトマクロファージに対して本開示の抗MS4A4A抗体を加えた際に認められたmTREM2及びsTREM2レベルの増大が、細胞のMS4A4Aに対して結合する抗MS4A4A抗体によるものであることを示唆している。

10

【0456】

実施例31：抗MS4A4A抗体による膜及び可溶性TREM2調節の動態

TREM2タンパク質の細胞表面発現は、原形質膜に対する、及び原形質膜からのTREM2のエンドサイトーシス／エキソサイトーシスで調節しており、また、膜結合プロテアーゼによるTREM2の調節された開裂で調節している(Thornton et al., 2017, EMBO Mol. Med. 9:1366-1378; doi:10.15252/emmm.201707673)。先の実施例で説明したように、本開示の抗MS4A4A抗体で、ヒトマクロファージを処理すると、膜及び可溶性TREM2レベルの両方が増大した。以下の研究は、膜及び可溶性TREM2のレベルの変化の動態の理解をさらに深めるために実施した。

20

【0457】

可溶性TREM2(sTREM2)レベルの変化を評価するために、初代ヒトマクロファージを、24ウェルまたは96ウェルプレートのいずれかに播種し、続いて、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-450.NSLF、またはアイソタイプコントロール抗体(すべて、1µg/ml)を加えた。抗体の存在下、細胞培養の0.5、1、4、24、及び48時間後に上清を回収し、そして、Meso Scale Discoveryを使用して、sTREM2レベルを決定した。

【0458】

本開示の抗MS4A4A抗体を加えた後の初代ヒトマクロファージでの膜TREM2(mTREM2)レベルの増加の動態は、以下のようにして評価した。初代ヒトマクロファージを、分析の3日前(Tマイナス72時間)に、96ウェルU底プレートに、100,000個の細胞/ウェルで播種した。様々な時点(Tマイナス48時間、Tマイナス24時間、Tマイナス4時間、Tマイナス1時間)で、アイソタイプコントロール抗体(IsoControl.NSLF)、及び抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFなどの抗体を、播種した細胞に対して加えた。播種して72時間後に、TREM2の細胞表面(膜結合)発現レベルを、フルオロフォアとコンジュケートした抗TREM2抗体で細胞を染色した後に、フローサイトメトリーで測定した。

30

【0459】

図23Aに示したように、本開示の抗MS4A4A抗体は、様々なドナーから得た培養した初代ヒトマクロファージの上清でのsTREM2のレベルを急速に引き上げた。抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFは、アイソタイプコントロール抗体で処理した細胞で認められたレベルの約0.5倍、sTREM2レベルを引き上げた(約50%の増加)。抗MS4A4A抗体4A-450.NSLFは、アイソタイプコントロール抗体で処理した細胞で認められたレベルの約2.5倍、sTREM2レベルを引き上げた(約250%の増加)。

40

【0460】

図23Bに示したように、初代ヒトマクロファージに対して抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFを加えて1時間及び4時間後の膜TREM2レベルは、アイソタイプコントロール抗体を加えた後に認められたレベルと比較して低下していた。図23Bにおい

50

て、点線は、アイソタイプコントロール抗体で処理した細胞でのmTREM2のレベルを表す。抗MS4A4A抗体4A-313・NSLFを加えて24時間及び48時間後のmTREM2のレベルは、アイソタイプコントロール抗体で処理した細胞で認められたレベルを超えて増大していた。膜TREM2の初期の減少は、図23Aに示したように、試験した全時点でのTREM2のシェディングの拡大と一致している。

【0461】

本開示の抗MS4A4A抗体は、初代ヒトマクロファージにおけるTREM2タンパク質のレベルを引き上げたので、以下の実験を実施して、抗MS4A4A抗体を加えた後のTREM2 mRNAレベルに及ぶ影響について調べた。初代ヒトマクロファージを、24ウェルプレートまたは96ウェルプレートのいずれかに播種し、そして、抗MS4A4A抗体4A-313・NSLF及びアイソタイプ(1µg/ml)を含む完全RPMIで処理した。0.5、1、4、24、及び48時間のインキュベーション後に、細胞ペレットを回収し、そして、定量PCR分析(qPCR)を使用して、TREM2 mRNAレベルを決定した。簡潔に説明すると、RNAを、RNease Mini Kit (Qiagen)を使用して抽出し、cDNAを、Quantinova Reverse Transcription Kit (Qiagen)を使用して全RNAから調製した。遺伝子発現レベルは、TREM2 (Hs00219132_m1) 及びGAPDH (Hs027886624_g1) のTaqManアッセイを使用して、リアルタイムPCRで分析した。それぞれの試料のCT値を、ハウスキーピング遺伝子GAPDHのCT値に対して正規化した。

【0462】

図23Cに示したように、抗MS4A4A抗体4A-313・NSLFは、様々なドナーから得た培養ヒト初代マクロファージのTREM2 mRNAレベルに影響を与えなかった；mRNAレベルのわずかな変化が認められた(アイソタイプコントロールで認められたレベルの0.5倍未満)。これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、培養ヒト初代マクロファージでのTREM2 mRNAレベルに影響を与えずに、TREM2タンパク質のレベルを高めたことを示した。

【0463】

実施例32：抗MS4A4A抗体は、初代ヒトマクロファージでのSPP1及びIL1RN分泌を増やす

初代ヒトマクロファージでのオステオポンチン(SPP1)、及びインターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL1RN)の分泌レベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体の効果を調べ、そして、以下のようにして、MS4A4A発現をノックアウトするように遺伝子操作して改変した初代ヒトマクロファージで認められたものと比較した。

【0464】

初代ヒトマクロファージでのMS4A4A遺伝子ノックアウトを、Cas9タンパク質を用いたエレクトロポレーションで生成した。このタンパク質は、単一のgRNA分子またはgRNA二重鎖のいずれかの形態のガイドRNA(gRNA)と複合体を形成しており、当該ガイドRNAは、標準的な方法を使用して、tracrRNAにアニーリングしたcrRNA：非標的NT1(IDTネガティブコントロールRNA#1及び#2)；NT2(GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC [配列番号345] 及びAACCCCTGATTGTATCCGCA [配列番号346])；MS4A4A#1(AATTGTGTACCCGATATACA [配列番号347])；MS4A4A#2(AACCATGCAAGGAATGGAAC [配列番号348])；MS4A4A#3(TATTCA TTCCTAGACTACCT [配列番号349])；MS4A4A#4(GCTCTGTACTGGCTGCATCA [配列番号350]) (すべて、IDT, Coralville, Iowa, USAから得た) からなる。次に、細胞を、50,000個の細胞/ウェルで、完全RPMI-1640に播種し、そして、抗MS4A4A抗体4A-313・NSLF(0.1µg/ml)、抗MS4A4A抗体4A-450・NSLF(0.1µg/ml)、またはアイソタイプコントロール抗体の存在下で、48時間培養した。細

胞から上清を回収し、そして、IL1RN及びSPP1のレベルを、R&D DuoSet ELISAキット（IL1RNカタログ番号DY280、SPP1カタログ番号DY1433）を使用して分析した。

【0465】

NTコントロール細胞を、抗MS4A4A抗体4A-313、NSLFまたは4A-450、NSLFのいずれかで処理すると、分泌したSPP1のレベルが高まった。これらの細胞でのMS4A4Aの遺伝子ノックアウトも、MS4A4A抗体治療で認められるものに匹敵する分泌SPP1レベルの増大をもたらした。これらの研究でのSPP1のレベルは：NTコントロール細胞にアイソタイプコントロール抗体を加えた後での約100 ng/ml；NTコントロール細胞に抗MS4A4A抗体4A-313、NSLFを加えた後での約200 ng/ml；NTコントロール細胞に抗MS4A4A抗体4A-450、NSLFを加えた後での約275 ng/ml；及びMS4A4Aノックアウト細胞での約225 ng/mlであった。本開示のいずれかの抗MS4A4A抗体を加えた後での分泌したSPP1レベルの増大は、MS4A4A発現を遺伝的にノックアウトした細胞で認められたものと同等であった。

10

【0466】

NTコントロール細胞を、抗MS4A4A抗体4A-313、NSLFまたは4A-450、NSLFのいずれかで処理すると、分泌したIL1RNのレベルが高まった。これらの細胞でのMS4A4Aの遺伝子ノックアウトも、MS4A4A抗体治療で認められるものに匹敵する分泌IL1RNレベルの増大をもたらした。これらの研究でのIL1RNのレベルは：NTコントロール細胞にアイソタイプコントロール抗体を加えた後での約8 ng/ml；NTコントロール細胞に抗MS4A4A抗体4A-313、NSLFを加えた後での約12 ng/ml；NTコントロール細胞に抗MS4A4A抗体4A-450、NSLFを加えた後での約16 ng/ml；及びMS4A4Aノックアウト細胞での約14 ng/mlであった。本開示のいずれかの抗MS4A4A抗体を加えた後での分泌したIL1RNレベルの増大は、MS4A4A発現を遺伝的にノックアウトした細胞で認められたものと同等であった。

20

【0467】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、初代ヒトマクロファージにおけるSPP1及びIL1RNの分泌レベルを引き上げる上で有効であることを示した。加えて、これらの結果は、分泌したSPP1及びIL1RNのレベルの増大に関する本開示の抗MS4A4A抗体の効果が、MS4A4Aの発現を遺伝的にノックアウトしたときに認められたものと類似していることを示しており、このことは、本開示の抗MS4A4A抗体が、これらの細胞におけるMS4A4Aの活性を抑制またはブロックし、その結果、SPP1及びIL1RNレベルの増大が認められたことを示唆している。

30

【0468】

実施例33：ヒトマクロファージでの抗MS4A4A抗体誘導性生存率は、TREM2非依存性である

上記したように、本開示の抗MS4A4A抗体は、抗MS4A4A抗体を加えた後の初代ヒトマクロファージの生存率（総細胞ATPの増加について測定する）を高める上で有効であった。加えて、上記したように、本開示の抗MS4A4A抗体は、細胞での膜TREM2レベルを引き上げた。本開示の抗MS4A4A抗体が、膜TREM2レベルを高め、そして、抗MS4A4A抗体が、細胞生存率を高めたので、一連の実験を実施して、抗MS4A4A抗体添加に応答して認められた細胞生存率の増大が、少なくとも部分的には、TREM2に依存しているかどうかを調べた。このことを調査するために、CRISPR技術を使用して、ヒト初代マクロファージでTREM2を遺伝的にノックアウトして、TREM2発現を遺伝的に欠失している初代ヒトマクロファージの細胞生存率に関する、本開示の抗MS4A4A抗体の効果を調べた。

40

【0469】

TREM2ノックアウトマクロファージは、Cas9タンパク質を利用したエレクトロ

50

ポレーションによって生成した。このタンパク質は、単一の gRNA 分子または gRNA 二重鎖のいずれかの形態のガイド RNA (gRNA) と複合体を形成しており、当該ガイド RNA は、tracrRNA にアニーリングした crRNA：非標的 NT1 (NT1) (IDT ネガティブコントロール crRNA #1 及び #2)；NT2 (GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC [配列番号 345] 及び AACCCCTGATTGTATCCGCA [配列番号 346])；TREM2 #1 (GCCATCACAGACGATACCT [配列番号 351])；TREM2 #2 (ATAGGGGCAAGACACCTGCA [配列番号 352])；TREM2 #3 (CAGCATCCCGGTGATCCAGG [配列番号 353])；TREM2 #4, TGGAGATCTCTGGTTCCCCG [配列番号 354]) (すべて、IDT, Coralville, Iowa, USA から得た) からなる。

10

【0470】

次に、細胞を、50,000 個の細胞／ウェルで、完全 RPMI-1640 に播種し、そして、抗 MS4A4A 抗体 (4A-313NSLF、4A-450NSLF)、またはアイソタイプコントロール抗体 (すべて、0.1 µg/ml) を含む溶液の存在下で、48 時間培養した。次いで、製造業者のプロトコルに従って、CellTiter-Glo Luminescent 細胞生死判別キット (Promega, カタログ番号 G7571) を使用して、細胞内の ATP 含有量を定量した。

【0471】

抗 MS4A4A 抗体 4A-313.NSLF または抗 MS4A4A 抗体 4A-450.NSLF を加えると、アイソタイプコントロール抗体で認められたレベルと比較して、NT コントロール細胞の ATP レベルを約 20% 引き上げた。加えて、TREM2 ノックアウト細胞に対して抗 MS4A4A 抗体を加えると、アイソタイプコントロール抗体で認められたレベルよりも ATP レベルが約 15%~20% 引き上げた。まとめると、これらの結果は、本開示の抗 MS4A4A 抗体は、少なくとも部分的には、TREM2 に依存せずに、細胞 ATP レベル (したがって、細胞生存率) を高めることを示した。

20

【0472】

実施例 34: MS4A4A の siRNA ノックダウンは、初代ヒトマクロファージでの膜及び可溶性 TREM2 レベルを引き上げる

上記したように、CRISPR 技術を使用して MS4A4A 発現の遺伝子を除去すると、ヒトマクロファージでの膜及び可溶性 TREM2 レベルが増大した。これらの知見をさらに裏付けるために、独立した実験的手法を使用して、TREM2 レベルに関して MS4A4A 発現の喪失が及ぼす影響を評価した。これらの研究では、初代ヒトマクロファージでの MS4A4A の siRNA ノックダウンを実施して、膜及び可溶性 TREM2 レベルに及ぼすその影響を測定した。

30

【0473】

MS4A4A ノックダウンマクロファージを、N-TER Nanoparticle siRNA Transfection System (Millipore Sigma) を使用して、コントロール (Millipore Sigma, SIC001)、及び MS4A4A 標的 siRNA (Millipore Sigma, SASI_Hs01_00150955) をトランスフェクトして生成した。MS4A4A ノックアウト効率は、フローサイトメトリー分析で評価した (データ示さず)。TREM2 の細胞表面 (膜結合) 発現は、フルオロフォアとコンジュゲートした抗 TREM2 抗体で細胞を染色した後、フローサイトメトリーで測定した。

40

【0474】

図 24A 及び図 24B に示したように、MS4A4A 発現の siRNA ノックダウンは、膜 TREM2 レベル及び可溶性 TREM2 レベルをそれぞれを引き上げた。図 24A 及び図 24B では、つなぎ合わせたドットのそれぞれのセットは、siRNA ノックダウンが有る場合とない場合での 1 名の個々のドナー (合計で 6 名のドナー) での平均結果を表す。これらのデータは、上記した遺伝子操作した MS4A4A ノックアウト細胞での mT

50

REM2及びsTREM2レベルの増大を示す同様の結果と一致している。まとめると、これらの結果は、MS4A4Aの発現または活性を欠失させると、初代ヒトマクロファージでの可溶性TREM2レベルと膜TREM2レベルの両方を引き上げることを示した。

【0475】

実施例35：mTREM2、sTREM2、及びATPレベルの増大に関する抗MS4A4A抗体のインビトロでの効力

mTREM2、sTREM2、及びATPレベルの増大に関する本開示の抗MS4A4A抗体の（上記した実施例24及び25で説明した）効果を、3名の別々のドナーから得た初代ヒトマクロファージでさらに調べた。初代ヒトマクロファージを、様々な濃度の抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF及び4A-450.NSLFで、48時間処理した。次いで、mTREM2、sTREM2、及びATPのレベルの変化を測定した。

【0476】

図25A、図25B、及び図25Cに示したように、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF及び抗MS4A4A抗体4A-450.NSLFは、それぞれ3名の異なるドナーから得た初代ヒトマクロファージにおいて、用量依存的にmTREM2のレベルを引き上げた。図25A、図25B、及び図25Cのデータは、アイソタイプコントロール抗体を使用して認められたレベルに対するmTREM2のレベルの増加倍数として表されている（x軸は、抗体濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示しており、y軸は、1.0に設定したコントロールを超える増加倍数を示す）。これらのグラフのデータを分析して、EC50値と最大応答を決定した；これらの結果を、以下の表41に示す（平均+/-SEMとして示した）。

【表43】

表41

抗体	EC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	mTREM2最大応答 (アイソタイプコントロールに対する増加倍数)
4A-313.NSLF	0.028 +/- 0.013	2.45 +/- 0.23
4A-450.NSLF	0.039 +/- 0.014	2.36 +/- 0.27

【0477】

図26A、図26B、及び図26Cに示したように、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF及び抗MS4A4A抗体4A-450.NSLFは、それぞれ3名の異なるドナーから得た初代ヒトマクロファージにおいて、用量依存的にsTREM2のレベルを引き上げた。図26A、図26B、及び図26Cのデータは、アイソタイプコントロール抗体を使用して認められたレベルに対するsTREM2のレベルの増加倍数として表されている（x軸は、抗体濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示しており、y軸は、1.0に設定したコントロールを超える増加倍数を示す）。これらのグラフのデータを分析して、EC50値と最大応答を決定した；これらの結果を、以下の表42に示す（平均+/-SEMとして示した）。

10

20

30

40

50

【表 4 4】

表 4 2

抗体	EC50 (μg/ml)	sTREM2最大応答 (アイソタイプコントロールに 対する増加倍数)
4A-313.NSLF	0.025 +/- 0.007	6.17 +/- 1.90
4A-450.NSLF	0.069 +/- 0.006	5.74 +/- 1.65

10

【0 4 7 8】

図 2 7 A、図 2 7 B、及び図 2 7 C に示したように、抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A - 3 1 3 . N S L F 及び抗 MS 4 A 4 A 抗体 4 A - 4 5 0 . N S L F は、それぞれ 3 名の異なるドナーから得た初代ヒトマクロファージにおいて、用量依存的に細胞 ATP のレベルを引き上げた。図 2 7 A、図 2 7 B、及び図 2 7 C のデータは、アイソタイプコントロール抗体を使用して認められたレベルに対する細胞 ATP のレベルの増加倍数として表されている（x 軸は、抗体濃度（μg/ml）を示しており、y 軸は、1.0 に設定したコントロールを超える増加倍数を示す）。これらのグラフのデータを分析して、EC50 値と最大応答を決定した；これらの結果を、以下の表 4 3 に示す（平均 + / - S E M として示した）。

20

【表 4 5】

表 4 3

抗体	EC50 (μg/ml)	細胞ATP最大応答 (アイソタイプコントロールに対 する増加倍数)
4A-313.NSLF	0.010 +/- 0.001	1.76 +/- 0.10
4A-450.NSLF	0.021 +/- 0.006	1.43 +/- 0.10

30

【0 4 7 9】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を加えた後の m T R E M 2、s T R E M 2、及び細胞 ATP のレベルが増大していることから明らかなように、当該抗体が、初代ヒトマクロファージの機能的変化を誘発したことを示した。

【0 4 8 0】

実施例 3 6：抗 MS 4 A 4 A 抗体は、C S F 1 R 阻害によって誘導する細胞死を救済する

C S F 1 R 阻害後のヒトマクロファージの生存を維持する MS 4 A 4 A の能力を評価するために、本開示の抗 MS 4 A 4 A 抗体を、C S F 1 R 阻害剤、P L X 3 3 9 7 の存在下で細胞生存を高める当該抗体の能力について研究した（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 を参照されたい）。

40

【0 4 8 1】

RosetteSep Human Monocyte Enrichment Protocol (Stem Cell Technologies) を使用して、全血からヒト単球を分離した。ヒト単球由来のマクロファージを調製するために、単球を計数し、そして、完全 RPMI 培地（Glutamax、ペニシリン／ストレプトマイシン、非必須ア

50

ミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、及び10%熱不活化ウシ胎児血清を補充したRPMI)、及び50ng/mlのMCSF (Pepro tech) に接種した。6日後に、分化した単球 (マクロファージ) を回収し、そして、50ng/mlのMCSFを含む完全RPMI培地において、 0.1×10^6 個の細胞/ウェルの密度で、96ウェルプレートに播種した。マクロファージを、一晩かけて、回復させた。7日目に、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF及び4A-450.NSLFを、PLX3397 (1µM) を含む、または含まない培養マクロファージに対して加えた。すべての抗体を、1µg/mlの最終濃度で加えた。細胞生存率を、死滅細胞を標識するDNA色素であるCytotox red試薬 (Essen Bioscience) を使用して決定した。Cytotox red試薬のレベルを、Incucyte Live Cellイメージングシステム (Essen Bioscience) を使用して、数日間にわたって蛍光シグナルを測定して決定した。

10

【0482】

図28Aに示したように、PLX3397及び抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFで処理したヒトマクロファージのCytotox red計数は、PLX3397とアイソタイプコントロール抗体とで処理した細胞で認められた計数よりも少なかった。図28Aのデータは、平均±SEMとしてグラフ化している；N=3名のヒトドナーの3。

【0483】

図28Bに示したように、PLX3397及び抗MS4A4A抗体4A-450.NSLFで処理したヒトマクロファージのCytotox red計数は、PLX3397とアイソタイプコントロール抗体とで処理した細胞で認められた計数よりも少なかった。図28Bのデータは、平均±SEMとしてグラフ化している；N=3名のヒトドナーの3。

20

【0484】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、CSF1R阻害後のヒトマクロファージの細胞死を抑制し、その生存を持続させることを示した。したがって、本開示の抗MS4A4A抗体は、ALSPまたはHDL SなどのCSF1R欠損疾患または障害を有する個体を治療する上で有用である。

【0485】

実施例37：カニクイザル血清での抗MS4A4A抗体の薬物動態

血清での本開示の抗MS4A4A抗体の薬物動態 (PK) をインビボで調べるために、以下の研究を行った。

30

【0486】

カニクイザル (cyno) に対して、抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT、またはアイソタイプコントロール (huIgG1) を、80mg/kgの用量で、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの動物群に、合計で5回の投与を行った：1回目と2回目の投与は28日の間隔を設け、残りの4回の投与は、それぞれの投与間隔を7日間とした。

【0487】

血清試料は、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した。

40

【0488】

カニクイザル血清での抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、及び4A-18.WTのレベルを、捕捉試薬であるビオチン標識ヤギ抗ヒトIgG (カタログ番号NBP1-74983; Novus Biologicals)、及び検出試薬であるAlexa fluor (登録商標) 647標識抗ヒトIgG (カタログ番号2049-31; Southern Biotech) を用いた段階的サンドウィッチ方式に基づいたカスタムGyrolabアッセイを使用して測定した。標準、品質コントロール、及

50

び試料を、Rexxip HN緩衝剤（カタログ番号P0004996, Gyrolab）で希釈した。試料に存在する抗MS4A4A抗体を、gyrolab bioaffy 200CDのストレプトアビジンでコーティングしたアフィニティーカラムに結合したビオチン化抗ヒトIgGで捕捉した。捕捉した抗MS4A4A抗体を、蛍光標識した抗ヒトIgG抗体で検出した。生成した蛍光シグナルの強度は、試料に存在する抗MS4A4A抗体の量に比例していた。Gyrolab xPとExcelを使用してデータを分析した。

【0489】

動物に対して80mg/kgの用量を投与した後に、血清での抗MS4A4A抗体濃度は、認められた平均最大濃度（ C_{max} ）に達した後に着実に低下しており、投与1日目（初回投与日）の後での平均半減期（ $t_{1/2}$ ）値（平均±SD）は、抗MS4A4A抗体4A-21.WTでは140±54.5時間、抗MS4A4A抗体4A-25.WTでは269±114時間、そして、抗MS4A4A抗体4A-18.WTでは193±26.8時間であった。クリアランス（CL）は $t_{1/2}$ に反比例しており、1日目の平均CL（平均±SD）は、抗体4A-21.WTでは0.625±0.107mL/時間/kg、抗体4A-25.WTでは0.124±0.025mL/時間/kg、そして、抗体4A-18.WTでは0.402±0.09mL/時間/kgであった。1日目の定常状態の分布体積（ V_{ss} ）値は、抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT群では、それぞれ、30.8~51.4mL/kg、22.6~41.7mL/kg、及び24.9~41.3mL/kgの範囲であった。

【0490】

曝露を、 C_{max} と、投与後0~168時間の濃度-時間曲線下の面積（ AUC_{0-168} ）で評価した。1日目に、抗体4A-25.WTの平均 C_{max} が最も高く（ 6.26×10^6 ng/mL）、次いで、抗体4A-18.WT（ 4.81×10^6 ng/mL）が続いた。抗MS4A4A抗体4A-21.WT（ 3.53×10^6 ng/mL）は、試験対象の中で最も低い C_{max} を示した。

【0491】

抗MS4A4A抗体4A-25.WT、及び4A-18.WTは、同様の AUC_{0-168} （それぞれ、 3.47×10^8 ng*時間/mL、及び 3.35×10^8 ng*時間/mL）を示しており、この数値は、抗体4A-21のもの（ 1.15×10^8 ng*時間/mL）よりも有意に大きかった。

【0492】

実施例38：抗MS4A4A抗体は、インビボで、血清及びCSF sTREM2レベルを引き上げる

血清及び脳脊髄液（CSF）でのsTREM2レベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体の効果をインビボで調べるために、以下の研究を行った。

【0493】

カニクイザルに対して、抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT、またはアイソタイプコントロール（huIgG1）を、80mg/kgの用量で、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で5回の投与を行った：1回目と2回目の投与は28日の間隔を設け、残りの4回の投与は、それぞれの投与間隔を7日間とした。

【0494】

血清試料は、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した。CSF試料も、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した。

【0495】

血清では、抗MS4A4A抗体4A-25.WT、4A-18.WT、及び4A-21.WTを投与すると、sTREM2レベルは、ベースラインの2倍超引き上げられており、第1の抗体を投与して48～96時間後に、それぞれ、投与前のベースラインレベルの232%、261%、及び287%のピークレベルを示した。さらに、29、36、43、及び50日目に抗MS4A4A抗体を、毎週反復投与すると、血清でのsTREM2のレベルは上昇を続け、平均sTREM2レベルは、投与前のベースラインレベルで認められたレベルの約2倍であった（214%、4A-25.WT；226%、4A-18.WT；199%、4A-21.WT）。アイソタイプコントロールは、投与期間を通して投与前のレベル（ベースラインの107%）をほぼ保っていた。

10

【0496】

CSFでは、アイソタイプコントロール処理動物で認められたレベルと比較して、それぞれ抗MS4A4A抗体4A.21.WT（ $p=0.0008$ 、二元配置分散分析）及び4A-25.WT（ $p=0.004$ 、二元配置分散分析）の投与から24時間及び96時間後でのsTREM2レベルが有意に上昇した。4A-18.WTで処理した群でのsTREM2レベルは、アイソタイプコントロール群で認められたレベルと同様のままであった。

【0497】

20

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、インビボで、血清及びCSFの両方において、sTREM2レベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0498】

実施例39：抗MS4A4A抗体は、インビボで、CSFオステオポンチンレベルを引き上げる

CSFでのオステオポンチンレベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体の効果をインビボで調べるために、以下の研究を行った。

【0499】

カニクイザルに対して、抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT、またはアイソタイプコントロール（huIgG1）を、 80mg/kg の用量で、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で5回の投与を行った：1回目と2回目の投与は28日の間隔を設け、残りの4回の投与は、それぞれの投与間隔を7日間とした。CSF試料を、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した。

30

【0500】

抗MS4A4A抗体4A-25.WT、4A-18.WT、及び4A-21.WTは、アイソタイプコントロール抗体で認められたレベルと比較して、CSFでのオステオポンチンレベルを有意に高めた。抗MS4A4A抗体4A-21.WTを反復投与すると、アイソタイプコントロールと比較して、初回投与の12時間後にピークに達したCSFオステオポンチンレベルを、約 280ng/ml （ $p<0.0001$ 、二元配置分散分析）にまで大きく引き上げ、続く投与後の12～24時間、ピークレベルを示し続けた。抗MS4A4A抗体4A25.WT及び抗体4A-18.WTを反復投与すると、アイソタイプコントロールと比較して、各投与の12～24時間後、CSFオステオポンチンレベルが（約 $50\sim 80\text{ng/ml}$ のレベルまで）上昇する傾向が示された。

40

【0501】

これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、インビボで、CSFでのオステオポンチンレベルを引き上げる上で有効であることを示した。

50

【0502】

実施例40：抗MS4A4A抗体は、インビボで、様々な脳領域のオステオポンチンレベルを引き上げる

カニクイザルの前頭葉及び海馬でのオステオポンチンレベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体の効果をインビボで調べるために、以下の研究を行った

【0503】

カニクイザルに対して、抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT、またはアイソタイプコントロール(huIgG1)を、80mg/mlの用量で、静脈内ボーラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で5回の投与を行った：1回目と2回目の投与は28日の間隔を設け、残りの4回の投与は、それぞれの投与間隔を7日間とした。これらの動物を、5回目の投与の48時間後に安楽死させ、そして、前頭葉と海馬を取り出して凍結した。

【0504】

脳組織でのオステオポンチンレベルを、次のようにして測定した。凍結した脳試料を、N-Per Neuronal Protein Extraction Reagent (カタログ番号87792、Thermo Scientific)、及びHalt Protease阻害剤(カタログ番号1861278)を使用して、製造業者の指示に従って、氷上で、20分間かけて溶解した。試料を遠心分離し、そして、上清を新しいチューブに移し、さらなる分析に供するまで-80℃で保存した。それぞれの試料の総タンパク質濃度を、製造業者の指示に従って、BCAタンパク質分析キット(カタログ番号23225、Thermo Scientific)で測定した。タンパク質濃度値は、脳組織で測定した分析物濃度を正規化するために使用した。

【0505】

カニクイザルの脳組織でのオステオポンチンレベルは、抗MS4A4A抗体4A-21.WTで処理した後に上昇していた。抗MS4A4A抗体4A-21.WTを、カニクイザルに対して反復投与すると、アイソタイプコントロール抗体で認められたレベルと比較して、カニクイザルの前頭葉でのオステオポンチンレベルが有意に上昇した(それぞれ、 $p < 0.035$ 及び $p = 0.0003$ ；一元配置分散分析)。特に、抗体を投与した後の前頭葉で測定した平均オステオポンチンレベルは次の通りであった：約0.6 ng/mg (アイソタイプコントロール抗体)；約1.2 ng/mg (4A-21.WT)；約0.7 ng/mg (4A-25.WT及び4A-18.WT)。抗MS4A4A抗体を反復投与すると、アイソタイプコントロール抗体で認められたレベルと比較して、カニクイザルの海馬でのオステオポンチンレベルが上昇する傾向が認められた。特に、抗体を投与した後に海馬で測定した平均オステオポンチンレベルは次の通りであった：約1.3 ng/mg (アイソタイプコントロール抗体)；約1.8 ng/mg (4A-21.WT及び4A-18.WT)；及び約2.4 ng/mg (4A-25.WT)。これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類の前頭葉及び海馬でのオステオポンチンレベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0506】

実施例41：CSFタンパク質バイオマーカーに関する抗MS4A4A抗体の効果

抗MS4A4A抗体4A-21.WT(80mg/kg)を末梢注射で投与したカニクイザルから得た脳脊髄液を、タンパク質バイオマーカー発現の変化について、インビボで、さらに分析した。これらの研究では、抗体注射の24時間後に動物から得たCSF試料に対してSomalogic Somascan 1.3kアッセイを用いて、CSFでのタンパク質発現レベルの変化の測定を行った。

【0507】

抗MS4A4A抗体4A-21.WTをカニクイザルに投与した後に、CSFでのタンパク質変化が認められた。図29は、抗MS4A4A抗体4A-21.WT(80mg/kg)を末梢注射した後のカニクイザルから得た3つのCSF試料でのプロテオームワイドの効果を示すボルケーノプロットである。このボルケーノプロットでのそれぞれのドッ

トは、1つのタンパク質を表している。測定したそれぞれのタンパク質について、x軸の値は、抗体処理動物とコントロール動物との間のCSFでのタンパク質のレベルの倍率変化の差を表している；y軸の値は、認められたこれらの差異の有意性を表しており、分散分析（ANOVA）で評価した差次的発現のp値のマイナスlog10として表している。図29のタンパク質記号は、p値が、 $<1E-3$ である抗体処理動物とコントロール動物において差次的に発現するタンパク質を示す。

【0508】

図29に示したように、オステオポンチン（SSP1）及びIL1RN（2つのマイクログリアマーカー）のCSFレベルの増大が、抗MS4A4A抗体を投与した動物で認められた。まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類のCSF及び血清の両方において、IL1RN及びオステオポンチンタンパク質のレベルを高めたことを示した。

【0509】

実施例42：抗MS4A4A抗体は、インビボで、血清sTREM2レベルを引き上げる血清及び脳脊髄液（CSF）でのsTREM2レベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体のインビボでの効果を、非ヒト霊長類で実施した別の一連の実験でさらに調べた。

【0510】

カニクイザルに対して、 $80\text{mg}/\text{ml}$ の用量の抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT、及び4A-450.NSLF、 $250\text{mg}/\text{ml}$ の用量の抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、またはビヒクルコントロールを、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で4回の投与を行った：1回目と2回目の投与は7日の間隔を設け、2回目と3回目の投与は14日の間隔を設け、そして、3回目と4回目の投与は28日の間隔を設けた。

【0511】

血清試料は、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した；CSF試料も、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した。

【0512】

血清でのsTREM2レベルを、次のようにして測定した。Single spot Mesoscale Discovery (MSD) プレート (Rockville, MD) を、捕捉抗体を含むPBSで、 4°C で、一晚コーティングした。サル血清試料（ならびに、サルTREM2-Fc標準）を、結合緩衝剤で希釈し、そして、室温で、1時間かけて、ウェルに加えた。ビオチン化ヤギ抗ヒトTREM2ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を、結合緩衝剤で1:2,000に希釈したものを加え、そして、室温で1時間インキュベーションした後に、スルホタグストレプトアビジン (MSD) で検出した。150 μl の1×読取り緩衝剤 (Read Buffer) をプレートに加え、そして、プレートを分析した。

【0513】

これらの研究の結果を図30に示す。血清でのsTREM2レベルは、 $80\text{mg}/\text{kg}$ の抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFを投与して24時間後に、ベースラインで認められたレベルの約1.5倍（投与前のベースラインレベルの約150%）上昇した。sTREM2のレベルは、時間の経過とともに上昇を続け、 $80\text{mg}/\text{kg}$ で複数回投与した後では、ベースラインで認められたレベルの3倍の最大レベル（投与前のベースライ

10

20

30

40

50

ンレベルの約300%)に達した。

【0514】

血清sTREM2レベルは、250mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFを投与して24時間後に、ベースラインで認められたレベルの約1.5倍上昇し、また、時間の経過とともに上昇を続け、250mg/kgで複数回投与した後では、ベースラインで認められたレベルの4.8倍の最大レベルに達した。

【0515】

80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-313.WTを投与して24時間後から、血清sTREM2レベルは、ベースラインで認められたレベルの約1.5倍上昇した。80mg/kgの4A-313.WTの反復投与では、血清sTREM2レベルは、ベース

10

【0516】

80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-450.NSLFを投与して24時間後に、血清sTREM2レベルは、ベースラインで認められたレベルの約2倍上昇し、また、時間の経過とともに上昇を続け、80mg/kgの4A-450.NSLFで複数回投与した後では、ベースラインで認められたレベルの3倍の最大レベルに達した。

【0517】

まとめると、これらの結果は、本発明の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類の血清でのsTREM2レベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0518】

実施例43：抗MS4A4A抗体は、インビボで、CSFオステオポンチンレベルを引き上げる

20

脳脊髄液(CSF)でのオステオポンチンレベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体のインビボでの効果を調べるために、以下の研究を行った。

【0519】

カニクイザルに対して、80mg/mlの用量の抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT、4A-450.NSLF、250mg/mlの用量の4A-313.NSLF、またはビヒクルコントロールを、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で4回の投与を行った：1回目と2回目の投与は7日の間隔を設け、2回目と3回目の投与は14日の間隔を設け、そして、3回目と4回目の投与は28日の間隔を設けた。

30

【0520】

CSF試料を、抗体の投与前、抗体を投与して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、及び1224時間後に動物から回収した。

【0521】

CSFでのオステオポンチンレベルを、次のようにして測定した。Single spot Meso Scale Discovery (MSD) プレート(Rockville, MD)を、捕捉抗体を含むPBSで、4℃で、一晩コーティングした。サルCSF試料を、結合緩衝剤で希釈し、そして、室温で、1時間かけて、ウェルに加えた。ビオチン化ヤギ抗ヒトオステオポンチンポリクローナル抗体(R&D Systems)を、結合緩衝剤で1:2,000に希釈したものを加え、そして、室温で1時間インキュベーションした後に、スルホタグストレプトアビジン(MSD)で検出した。150μlの1×読取り緩衝剤(Read Buffer)をプレートに加え、そして、プレートを、Sector Imager(MSD)で分析した。

40

【0522】

カニクイザルのCSFでのオステオポンチンレベルは、本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後に増大した。80mg/kg及び250mg/kgの用量の抗MS4A4A抗

50

体4A-313. NSLFを投与した後に、CSFオステオポンチンレベルは、初回投与の24時間後に、それぞれ、平均で、ベースラインで認められたものの約1.3倍及び6倍のピークに達しており、その後に、ベースラインレベルの1.5倍にまで低下した(図31A及び31B)。80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-313. NSLFを反復投与すると、CSFオステオポンチンレベルは、各投与の10~24時間後にピークに達しており、ベースラインレベルで認められたものの3倍~5倍のピークレベルに達した(図31A)。250mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-313. NSLFを反復投与すると、CSFオステオポンチンレベルは増加して、2回目の投与の168時間後には、ベースラインで認められたものの1.4倍のピークレベルに達しており(図31B)、続く投与の24~48時間後には、ベースラインで認められたものの4倍~5倍のピークレベルに達した(図31B)。

10

【0523】

80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-450. NSLFを投与した後に、CSFオステオポンチンレベルは、初回投与の24時間後に、ベースラインで認められたものの約1.3倍のピークに達し、その後、ベースラインレベルにまで低下した(図31C及び31D)。80mg/kgの4A-450. NSLFを反復投与すると、CSFオステオポンチンレベルは、各投与の24時間後にピークに達し、ベースラインレベルで認められたものの6倍~9倍のピークレベルに達した(図31C)。

【0524】

80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-313. WTを反復投与した後に、CSFオステオポンチンレベルは、各投与の24時間後に、ベースラインで認められたものの約1.5倍のピークに達し、その後、ベースラインレベルにまで低下した(図31D)。

20

【0525】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類のCSFでのオステオポンチンレベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0526】

実施例44：抗MS4A4A抗体は、インビボで、様々な脳領域のオステオポンチンレベルを引き上げる

前頭葉及び海馬でのオステオポンチンレベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体のインビボでの効果を調べるために、以下の研究を行った。

30

【0527】

カニクイザルに対して、80mg/kgの用量の抗MS4A4A抗体4A-313. NSLF、4A-313. WT、及び4A-450. NSLF、ならびに250mg/kgの用量の抗MS4A4A抗体4A-313. NSLF、またはビヒクルコントロールを、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で4回の投与を行った：1回目と2回目の投与は7日の間隔を設け、2回目と3回目の投与は14日の間隔を設け、そして、3回目と4回目の投与は28日の間隔を設けた。これらの動物を、4回目の投与の48時間後に安楽死させ、そして、前頭葉と海馬を取り出して凍結した。

【0528】

脳組織でのオステオポンチンレベルを、次のようにして測定した。凍結した脳試料を、N-Per Neuronal Protein Extraction Reagent (カタログ番号87792、Thermo Scientific)、及びHalt Protease阻害剤(カタログ番号1861278)を使用して、製造業者の指示に従って、氷上で、20分間かけて溶解した。試料を遠心分離し、そして、上清を新しいチューブに移し、さらなる分析に供するまで-80℃で保存した。それぞれの試料の総タンパク質濃度を、製造業者の指示に従って、BCAタンパク質分析キット(カタログ番号23225、Thermo Scientific)で測定した。タンパク質濃度値は、脳組織で測定した分析物濃度を正規化するために使用した。

40

【0529】

カニクイザルの脳組織でのオステオポンチンレベルは、抗MS4A4A抗体4A-45

50

0. NSLFの投与後に上昇した。80mg/kgの抗体4A-450. NSLFを反復投与すると、コントロール動物で認められたレベルと比較して、カニクイザルの前頭葉でのオステオポンチンレベルが有意に上昇した ($p=0.027$; t-検定) (図32A)。同様に、80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-450. NSLFを反復投与すると、コントロール処理動物で認められたレベルと比較して、カニクイザルの海馬でのオステオポンチンレベルが有意に上昇した ($p=0.027$; t-検定) (図32B)。

【0530】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類の脳組織 (例えば、前頭葉及び海馬) でのオステオポンチンレベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0531】

実施例45：抗MS4A4A抗体は、インビボで、様々な脳領域のCSF1Rレベルを引き上げる

前頭葉及び海馬でのコロニー刺激因子1受容体 (CSF1R) レベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体のインビボでの効果を調べるために、以下の研究を行った。

【0532】

カニクイザルに対して、80mg/kgの用量の抗MS4A4A抗体4A-313. NSLF、4A-313. WT、及び4A-450. NSLF、250mg/kgの用量の抗MS4A4A抗体4A-313. NSLF、またはビヒクルコントロールを、静脈内注射して投与した。それぞれの群に、合計で4回の投与を行った：1回目と2回目の投与は7日の間隔を設け、2回目と3回目の投与は14日の間隔を設け、そして、3回目と4回目の投与は28日の間隔を設けた。これらの動物を、4回目の投与の48時間後に安楽死させ、そして、前頭葉と海馬を取り出して凍結した。

【0533】

脳組織でのCSF1Rレベルを、次のようにして測定した。凍結した脳試料を、N-P er Neuronal Protein Extraction Reagent (カタログ番号87792、Thermo Scientific)、及びHalt Protease阻害剤 (カタログ番号1861278) を使用して、製造業者の指示に従って、氷上で、20分間かけて溶解した。試料を遠心分離し、そして、上清を新しいチューブに移し、さらなる分析に供するまで-80℃で保存した。それぞれの試料の総タンパク質濃度を、製造業者の指示に従って、BCAタンパク質分析キット (カタログ番号23225、Thermo Scientific) で測定した。タンパク質濃度値は、脳組織で測定した分析物濃度を正規化するために使用した。

【0534】

カニクイザルの脳組織でのCSF1Rレベルは、抗MS4A4A抗体4A-313. NSLFの投与後に上昇した。250mg/kgの抗体4A-313. NSLFを反復投与すると、コントロール処理動物で認められたレベルと比較して、カニクイザルの前頭葉でのCSF1Rレベルが有意に上昇した ($p=0.046$; t-検定) (図33A)。同様に、80mg/kgの抗MS4A4A抗体4A-450. NSLFを反復投与すると、コントロール動物で認められたレベルと比較して、カニクイザルの海馬でのCSF1Rレベルが有意に上昇した ($p=0.013$; t-検定) (図33B)。

【0535】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類の脳組織 (例えば、前頭葉及び海馬) でのCSF1Rレベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0536】

実施例46：抗MS4A4A抗体は、インビボで、様々な脳領域の総TREM2レベルを引き上げる

前頭葉及び海馬での可溶性TREM2及び膜TREM2 (総TREM2) レベルに関する本開示の抗MS4A4A抗体のインビボでの効果を調べるために、以下の研究を行った。

【0537】

カニクイザルに対して、80mg/kgの用量の抗MS4A4A抗体、4A-313.NSLF、4A-313.WT、4A-450.NSLF、250mg/kgの用量の4A-313.NSLF、またはビヒクルコントロールを、静脈内ボラス注射して投与した。それぞれの群に、合計で4回の投与を行った：1回目と2回目の投与は7日の間隔を設け、2回目と3回目の投与は14日の間隔を設け、そして、3回目と4回目の投与は28日の間隔を設けた。これらの動物を、4回目の投与の48時間後に安楽死させ、そして、前頭葉と海馬を取り出して凍結した。総TREM2レベルを、これらの脳領域で測定した。

【0538】

カニクイザルの脳組織での総TREM2レベルは、抗MS4A4A抗体、4A-313.NSLF、4A-313.WT、及び4A-450.NSLFで処理した後に上昇した。250mg/kgの抗体4A-313.NSLFを反復投与すると、コントロール処理動物で認められたレベルと比較して、カニクイザルの海馬での総TREM2レベルが統計的に有意に上昇した（ $p=0.014$ ；一元配置分散分析）（図34A）。250mg/kgの抗体4A-313.NSLF、及び80mg/kgの抗体4A-313.WTを反復投与すると、コントロール処理動物で認められたレベルと比較して、カニクイザルの前頭葉でのTREM2レベルが上昇する傾向が示された（図34B）。

【0539】

まとめると、これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、非ヒト霊長類の脳組織（例えば、前頭葉及び海馬）でのTREM2レベルを引き上げる上で有効であることを示した。

【0540】

実施例47：ミクログリアでの遺伝子発現プロファイルに関する抗MS4A4A抗体のインビボでの効果

上記したようにして、カニクイザルに対して本開示の抗MS4A4A抗体を投与した後のミクログリアRNAseq分析で測定する遺伝子発現の変化を、以下のように行った。抗MS4A4A抗体には、抗体4A-313.WT（80mg/kg）、4A-313.NSLF（80mg/kg及び250mg/kg）、及び4A-450.NSLF（80mg/kg）が含まれた。動物に終末期処置（terminal take down）を施した後に、容易な手作業の解離プロトコルに沿って前頭葉試料を解離させ、続いて、Percoll勾配分離を行って細片を除去した。細胞ペレットを、Cd11b抗体で20分間染色し、洗浄し、DAPIで標識し、そして、ミクログリアのFACS分離のために処理した。DAPI⁻：Cd11b⁺細胞を、350ulまたはRLTプラス緩衝剤（Qiagen）に直接選別し、そして、RNA分離のために細胞を直ちに処理した。RNAの品質を、テープステーションを使用して決定し、そして、Lexogen QuantSeqの低入力プロトコルに若干の変更を加えたものを使用してライブラリーを作成した。ライブラリーを、テープステーションを使用して定量し、そして、NextSeqを使用して配列決定した。配列決定したデータを、Lexogen多重エラー訂正ツールを使用して逆多重化し、分析した。

【0541】

図35A、35B、及び35Cに示したように、カニクイザルに本開示の抗MS4A4A抗体を末梢注射すると、これらの非ヒト霊長類の前頭葉から単離したFACS選別ミクログリアでのRNAseq分析で測定したミクログリアでの遺伝子発現の変化がもたらされた。ミクログリアにおける抗MS4A4A抗体処置による強力な誘導を示す遺伝子として、ミクログリア活性化のマーカー（C型レクチンドメインファミリー7メンバーA、CLEC7A）、ミクログリア遊走（イノシトール1,4,5-三リン酸受容体2、ITPR2）、及びミクログリア増殖（抗原KI-67（MKI67））がある（図35A）。ミクログリア活性化のさらなるマーカーの変化も認められており、図35B、図35Cに示したように、ミクログリア活性化マーカーIL1RN、SPP1、及び1-ホスファチ

10

20

30

40

50

ジルイノシトール-4, 5-ビスホスフェートホスホジエステラーゼガンマー2 (PLCG2) がある。2つの恒常性ミクログリアマーカー (プリン作動性受容体P2RY12、及びCX3Cケモカイン受容体1 (CX3CR1)) に関する本開示の抗MS4A4A抗体の効果を、図35Cに示しており、それによると、これら2つの恒常性ミクログリアマーカーの発現レベルは、抗MS4A4A抗体処理の後に低下した。図35A、35B、及び35Cのデータは、log2スケールの平均として示しており、エラーバーはSEMであり、そして、実験グループ及び時点あたりN=5である。

【0542】

まとめると、これらの結果は、ミクログリアの活性化、遊走、及び増殖に関連するタンパク質の様々なmRNAレベルの増大；及びミクログリアの恒常性に関連するタンパク質の様々なmRNAレベルの低下により証明されるように、本開示の抗MS4A4A抗体が、ミクログリアをインビボで活性化する上で有効であることを示した。

【0543】

実施例48：抗MS4A4A抗体は、U937細胞でのHA-シュノーケル (Snorkel) タグが付いたMS4A4Aの表面発現を抑制する

U937細胞 (ATCC CRL-1593, 2) を、シュノーケルタグ (膜貫通ドメインと、それに続いて、HAタグを、ヒトMS4A4Aの細胞質C末端に結合させたもの) でタグ付けしたヒトMS4A4Aをコードする発現プラスミドでトランスフェクトした。このようにして、タグを、細胞外に出現させるが、膜タンパク質から構造的に分離されている。トランスフェクトしたU937細胞は、プラスミドトランスフェクションと抗生物質の選択を経ても生存していた。次いで、フローサイトメトリーを使用して、細胞をヒトMS4A4Aタンパク質細胞表面発現に関してスクリーニングし、そして、次の研究で使用するために、最も陽性度が顕著な5%の細胞だけを回収した。

【0544】

上記したようにして生成した組換えヒトMS4A4A-シュノーケルを過剰発現するU937細胞を、これらの研究での標的細胞として使用した。細胞を、PMA (25 ng/ml) で24時間前処理した後に、回収し、そして、PMA及び抗MS4A4A抗体、ならびにアイソタイプコントロール抗体を、0.01、0.1、及び1 µg/mlの最終濃度で含むRPMI 1640完全培地が入った丸底96ウェルプレートに、100,000個の細胞/ウェルで播種した。細胞を、48時間インキュベーションした。細胞を、冷FACS緩衝剤 (PBS+2% FBS) で洗浄し、そして、1ウェルあたり50 µLの1:200に希釈した抗HAタグモノクローナル抗体 (ThermoFisher, A-21287) を加え、そして、氷上で30分間インキュベーションし、生死判別のためにAqua Live/Deadで標識した。細胞を、冷FACS緩衝剤で2回洗浄し、そして、200 µLのFACS緩衝剤に再懸濁した。フローサイトメトリー分析は、FACSCantoシステム (BD Biosciences) で行った。結合データを、蛍光強度の中央値を使用して分析した。

【0545】

図36に示したように、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、及び4A-450.NSLFは、ヒトMS4A4A-シュノーケルタグが付いたタンパク質を用量に関連した方法で発現するU937細胞での原形質膜MS4A4Aのレベルを抑制した。1 µg/mlの最大の抗MS4A4A抗体濃度では、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF及び4A-450.NSLFは、アイソタイプコントロール抗体で処理した細胞で認められたレベルと比較して、表面MS4A4Aレベルを約50%減少させた。これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、組換えヒトMS4A4A-シュノーケルを発現するU937細胞での細胞表面MS4A4Aレベルを抑制またはダウンレギュレーションしたことを示した。

【0546】

実施例49：抗MS4A4A抗体は、初代ヒト骨髓細胞での糖タンパク質非転移性黒色腫タンパク質B (GPNMB) タンパク質のレベルを調節する

GPNMBは、組織マクロファージやミクログリアなどの複数の細胞型で発現する表面糖タンパク質である。幾つかの遺伝的バリエーションが、パーキンソン病（PD）のリスクに関連している。GPNMBタンパク質のレベルは、PD患者の黒質で上昇しており、また、GPNMBレベルは、リソソームストレスを受けた後に上昇する（Moloney et al., 2018, Neurobio Dis. 120:1-11）。加えて、GPNMBの発現の増大は、SNP rs199347に関連しており、このリスクSNPは、GPNMB遺伝子内に位置している（Murthy et al., 2017, 18:121-133）。MS4A4Aが、GPNMBの発現レベルを調節し得るか否かを決定するために、2名のドナー（ドナー#1117及び#1118）から得たヒト初代マクロファージを、様々な濃度の抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFで、48時間処理した。細胞表面（膜結合）GPNMBは、細胞をフルオロフォアとコンジュケートした抗GPNMB抗体で染色した後に、フローサイトメトリーで測定した。

【0547】

図37に示したように、抗MS4A4A抗体4A-313.NSLFを細胞に加えた後に、膜GPNMBレベルは、ヒト初代マクロファージにおいて低下した。抗MS4A4A抗体処理に応答したGPNMBレベルの低下は、用量依存的であった。これらの結果は、本開示の抗MS4A4A抗体が、骨髄細胞、例えば、マクロファージでのGPNMBの細胞表面発現レベルを下げる上で有効であることを示した。

【0548】

野生型huIgG1、または野生型huIgG1のFcバリエーションを有する例示的な抗MS4A4A抗体重鎖アミノ酸配列：

4A-450（huIgG1重鎖）（配列番号320）

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

4A-450（C末端Kを持たないhuIgG1重鎖）（配列番号321）

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

4A-450（hIgG1重鎖；P331S）（配列番号322）

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY

10

20

30

40

50

LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

10

4A-450 (C末端Kを持たないhIgG1重鎖P331S) (配列番号323)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

20

4A-450 (huIgG1重鎖N325S/L328F) (配列番号324)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SSKAFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

30

4A-450 (C末端Kを持たないhIgG1重鎖N325S/L328F) (配列番号325)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SSKAFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

40

50

4A-450 (huIgG1重鎖K322A) (配列番号326)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTRGFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

10

4A-450 (C末端Kを持たないhuIgG1重鎖K322A) (配列番号327)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYAFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTRGFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

20

4A-419 (huIgG1重鎖) (配列番号328)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFVKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

30

4A-419 (C末端Kを持たないhuIgG1重鎖) (配列番号329)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFVKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV

40

50

SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

4A-419 (hIgG1重鎖P331S) (配列番号330)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

10

4A-419 (C末端Kを持たないhIgG1重鎖P331S) (配列番号331)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

20

4A-419 (huIgG1重鎖N325S/L328F) (配列番号332)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SSKAFFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

30

40

4A-419 (C末端Kを持たないhIgG1重鎖N325S/L328F) (配列番号333)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF

50

PPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SSKAFAPAEIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

4A-419 (huIgG1重鎖K322A) (配列番号334)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPAEIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

10

4A-419 (C末端Kを持たないhuIgG1重鎖K322A) (配列番号335)

QVQLVQSGSELEKKPGASVKVSCKASGYRFTSYGLSWVRQA
PGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPAEIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

20

30

4A-313 (huIgG1重鎖定常領域) (配列番号336)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPAEIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

40

4A-313 (C末端Kを持たないhuIgG1重鎖定常領域) (配列番号337)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPAEIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

50

L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G

4 A - 3 1 3 (h I g G 1 重鎖定常領域 P 3 3 1 S) (配列番号 3 3 8)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

10

4 A - 3 1 3 (C 末端 K を持たない h I g G 1 重鎖定常領域 P 3 3 1 S) (配列番号 3 3 9)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G

20

4 A - 3 1 3 (h u I g G 1 重鎖定常領域 N 3 2 5 S / L 3 2 8 F) (配列番号 3 4 0)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S S K A F P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

30

4 A - 3 1 3 (C 末端 K を持たない h I g G 1 重鎖定常領域 N 3 2 5 S / L 3 2 8 F) (配列番号 3 4 1)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S S K A F P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G

40

4 A - 3 1 3 (h u I g G 1 重鎖定常領域 K 3 2 2 A) (配列番号 3 4 2)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W

50

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

4A-313 (C末端Kを持たないh u I g G 1重鎖定常領域K322A) (配列番号343)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGS FFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

ヒトI g G 1軽鎖定常領域 (配列番号344)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【化1】

4A-313 (h u I g G 1重鎖) (配列番号355)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【化2】

4A-313 (C末端Kを持たないh u I g G 1重鎖) (配列番号356)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

【化 3】

4A-313 (h I g G 1 重鎖 P 3 3 1 S) (配列番号 3 5 7)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【化 4】

4A-313 (C末端Kを持たないh I g G 1 重鎖 P 3 3 1 S) (配列番号 3 5 8)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

【化 5】

4A-313 (h u I g G 1 重鎖 N 3 2 5 S / L 3 2 8 F) (配列番号 3 5 9)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【化 6】

4A-313 (C末端Kを持たないh I g G 1 重鎖 N 3 2 5 S / L 3 2 8 F) (配列番号 3 6 0)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

50

【化 7】

4A-313 (h u I g G 1 重鎖K 3 2 2 A) (配列番号 3 6 1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【化 8】

4A-313 (C末端Kを持たないh u I g G 1 重鎖K 3 2 2 A) (配列番号 3 6 2)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHG
DTRYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWG
RGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

【化 9】

4A-450-全長軽鎖 (配列番号 3 6 3)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【化 1 0】

4A-419-全長軽鎖 (配列番号 3 6 4)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGIDFHQTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

【化 1 1】

4A-313-全長軽鎖 (配列番号 3 6 5)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGVSRMNWYQQKPGQAPRLLIYGASNQGS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

50

【図面】

【図 1】

MHQYTSRHCREESTFSAAMTTMQGMEQAMPGAGPGVPQLGNMAVHSHLWKGLQEKFLKGEP
KVLGVVQILTALMSLSMGITMMCMASNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIISGSLSLAAGIRITKG
LVRGSLGMNITSSVLAASGILINTSLAFYSFHHPYCNYYGNSNNCHGTM~~SLMGLDGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFGCKVLCTPGGVVLLLPSSHMAETASPTPLNEY~~

【図 2】

A



B

1P68 (配列番号 181)

MYGKLN~~DLLEDLQEV~~LKNLHKNWHGGK~~DNLDHVDNHLQNVIEDIHDFMQGGSGGK~~LQ
MMKEFQOVL~~DELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR~~

C

1M6T (配列番号 182)

ADLEDN~~WETLNDNLK~~VIEKADNAAQVK~~DALTKMRAAALDAQKATPPKLEDKSPD~~PEMKD
FRHGF~~DILVGQIDDALKLANEGKVKEAQA~~AAEQ~~LKTRNAYIQKYL~~

【図 3 A】

JS1 (配列番号 172)

MGWSCIILFLVATATGVHSMYGKLN~~DLLEDLQEV~~LKNLHKN~~CMASNTYGSNPISK~~DNLDH
VDNHLQNVIEDIHDFMQGGSGGKLQEMMKEFQQL~~DELNNHSFHHPYCNYYGNSNNCH~~
GTMSHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHRHHHHHHHHGGGLNDIFE~~AOKIEWHE~~

JS5 (配列番号 173)

MGWSCIILFLVATATGVH~~SADLEDN~~WETLNDNLKVIE~~CMASNTYGSNPIS~~AAQVKDALTKM
RAAALDAQKATPPKLEDKSPDPEMKDFR~~HGFDILVGQIDDALKLAN~~SFHHPYCNYYGNSN
NCHGTM~~SVKEAQA~~AAEQ~~LKTRNAYIQKYL~~HHHHHHHHGGGLNDIFE~~AOKIEWHE~~

JS6 (配列番号 174)

MGWSCIILFLVATATGVH~~SADLEDN~~WETLNDNLKVIEG~~PCMASNTYGSNPIS~~AAQVKDAL~~T~~
KMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDPEMKDFR~~HGFDILVGQIDDALKLAN~~SFHHPYCNYYG
NSNNCHGTM~~SVKEAQA~~AAEQ~~LKTRNAYIQKYL~~HHHHHHHHGGGLNDIFE~~AOKIEWHE~~

【図 3 B】

JS4 (配列番号 175)

MGWSCIILFLVATATGVHSMYGKLN~~DLLEDLQEV~~LKNLHKNWHGGK~~DNLDHVDNHLQNV~~
EDIHDFMQGGSGGKLQEMMKEFQQL~~DELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR~~
HHHHHHHHGGGLNDIFE~~AOKIEWHE~~

JS10 (配列番号 176)

MGWSCIILFLVATATGVH~~SADLEDN~~WETLNDNLKVIEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQ
KATPPKLEDKSPDPEMKDFR~~HGFDILVGQIDDALKLANEGKVKEAQA~~AAEQ~~LKTRNAYIQ~~
KYLHHHHHHHHGGGLNDIFE~~AOKIEWHE~~

10

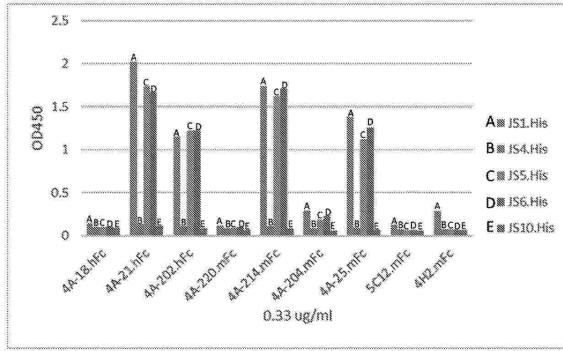
20

30

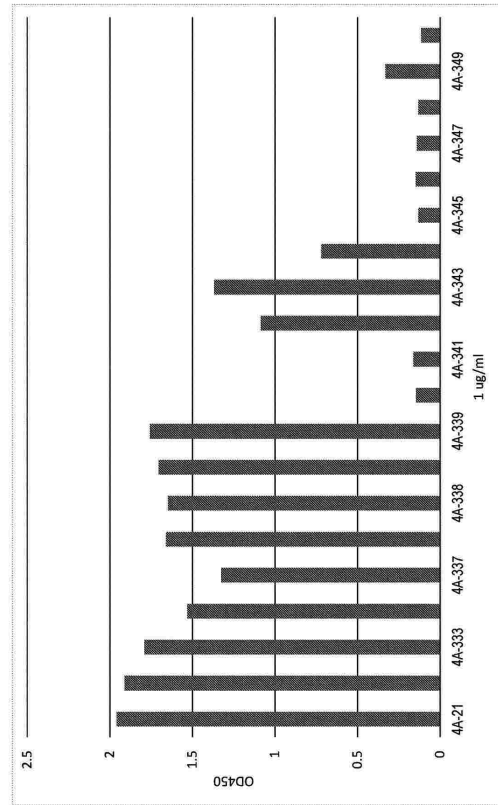
40

50

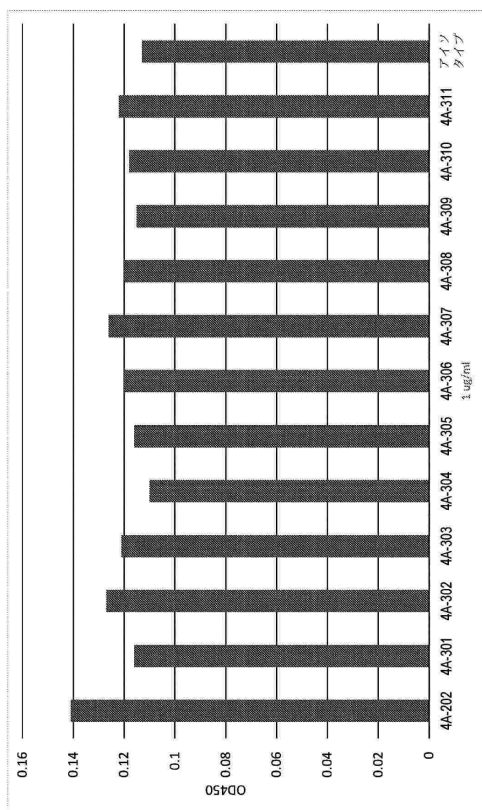
【図 4】



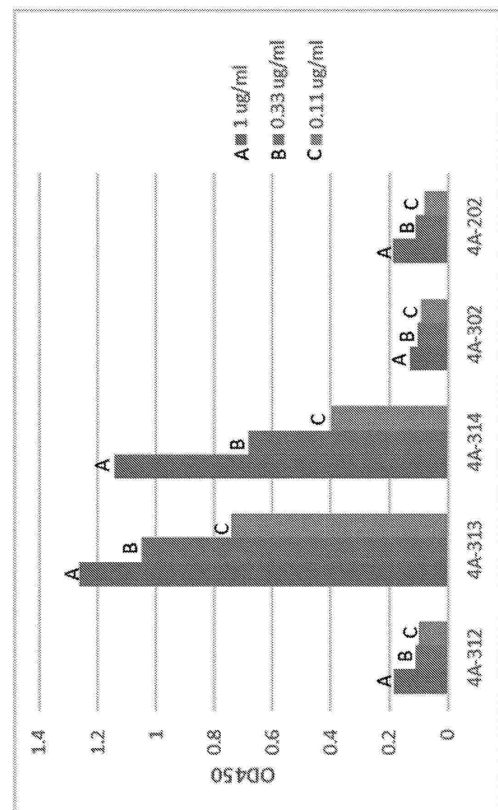
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

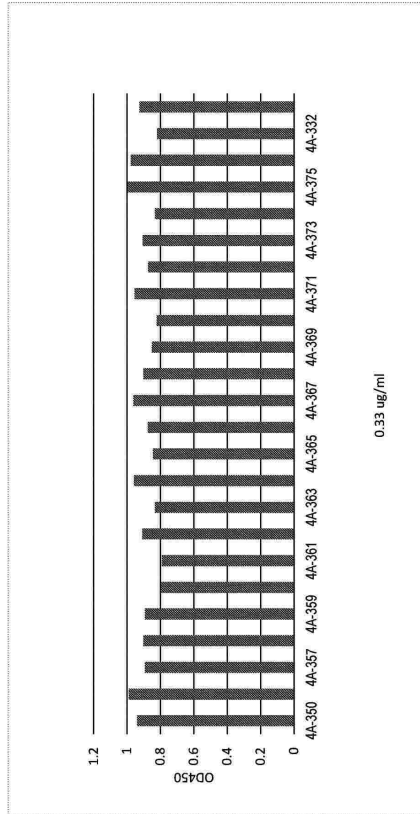
20

30

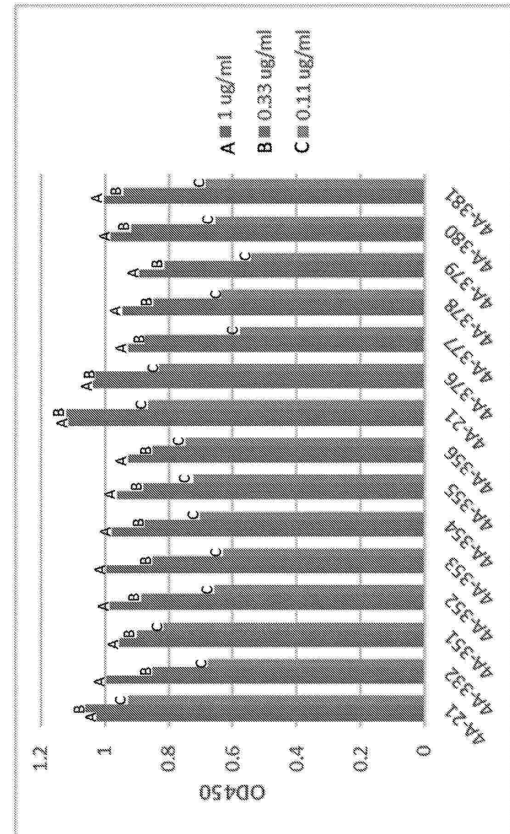
40

50

【図 8】

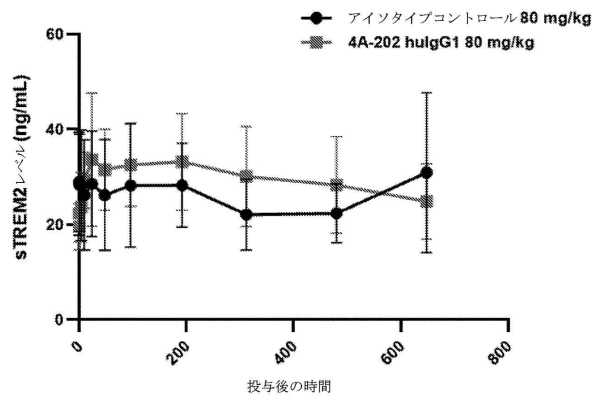


【図 9】



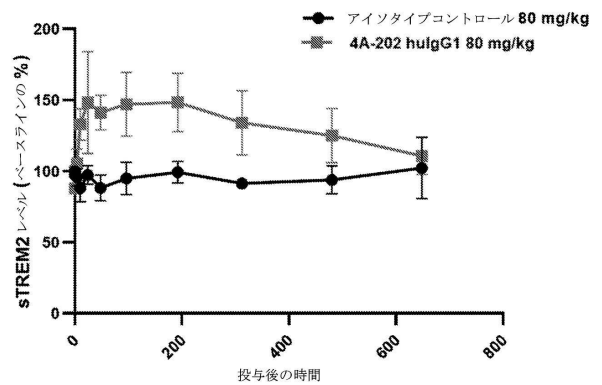
【図 10 A】

カニクイザル血清 sTREM2 レベル



【図 10 B】

正規化したカニクイザル血清 sTREM2
レベル (ベースラインの%)



10

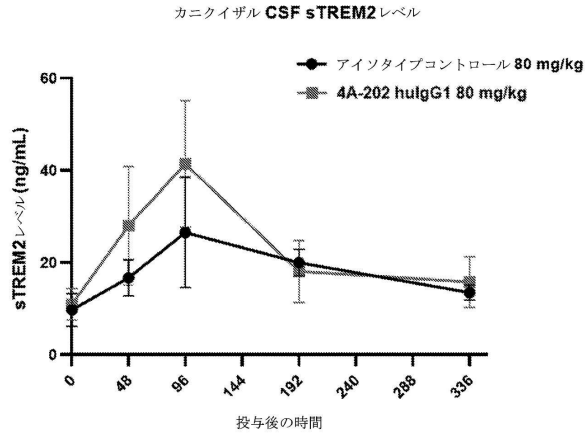
20

30

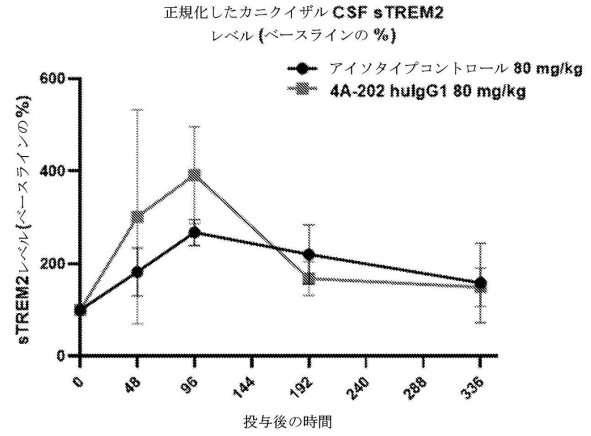
40

50

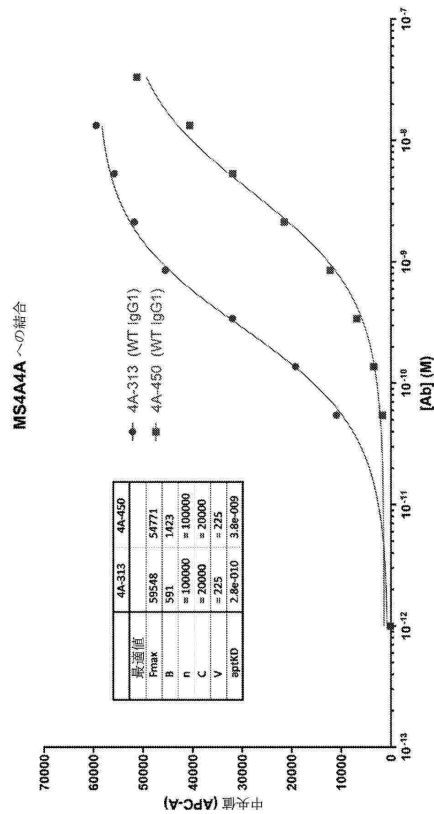
【図 1 1 A】



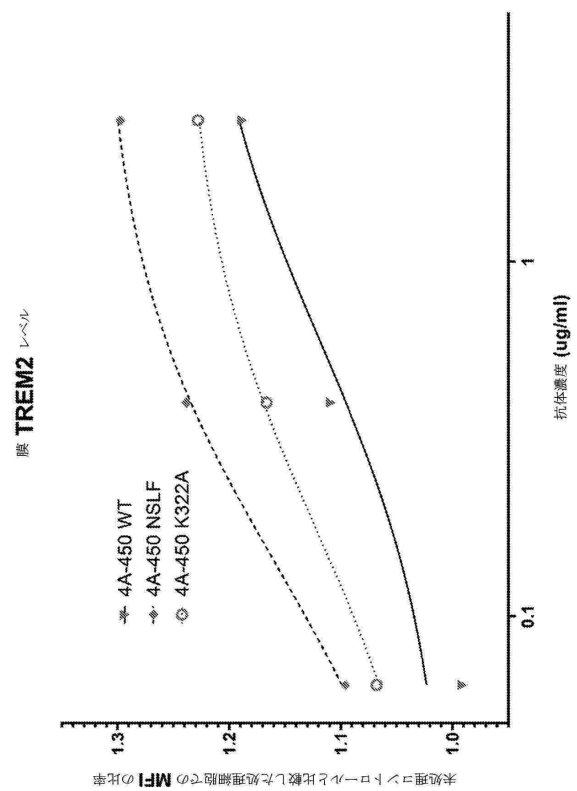
【図 1 1 B】



【図 1 2】



【図 1 3】



10

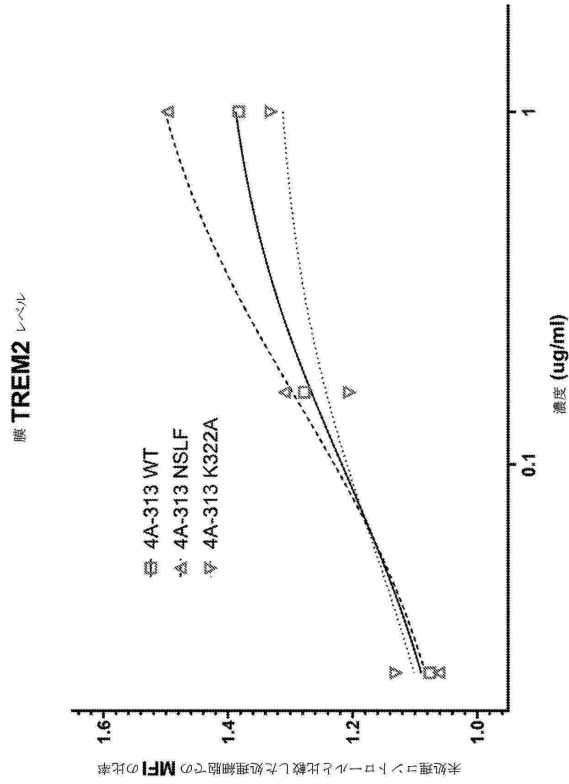
20

30

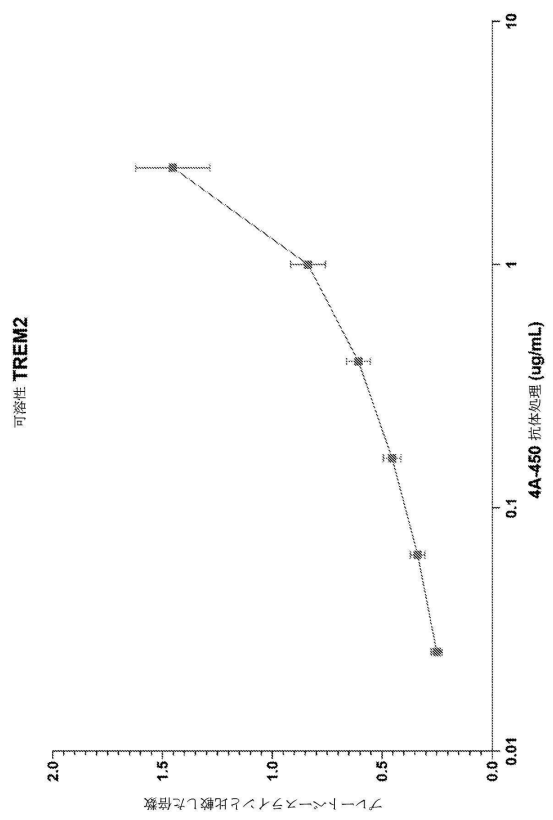
40

50

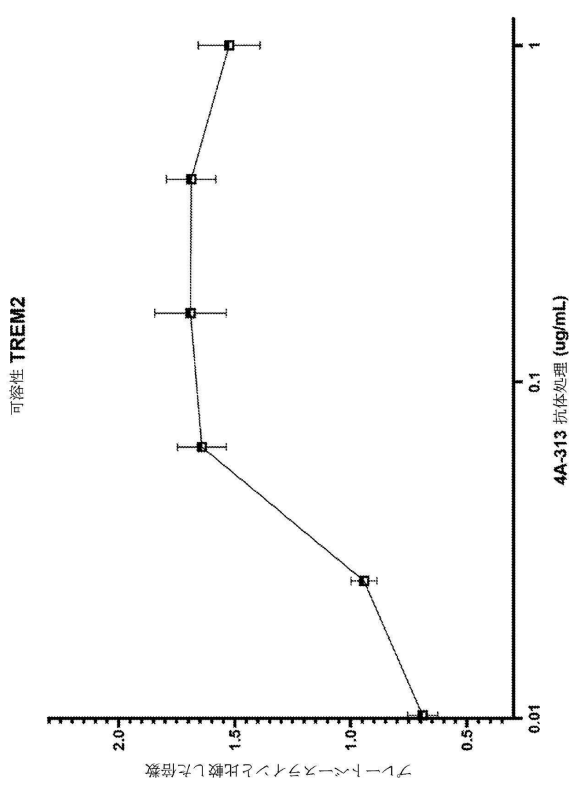
【図 1 4】



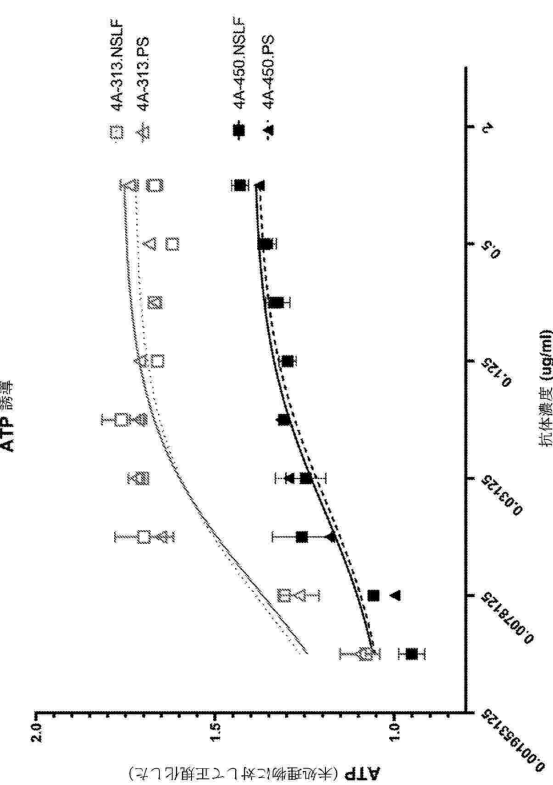
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



10

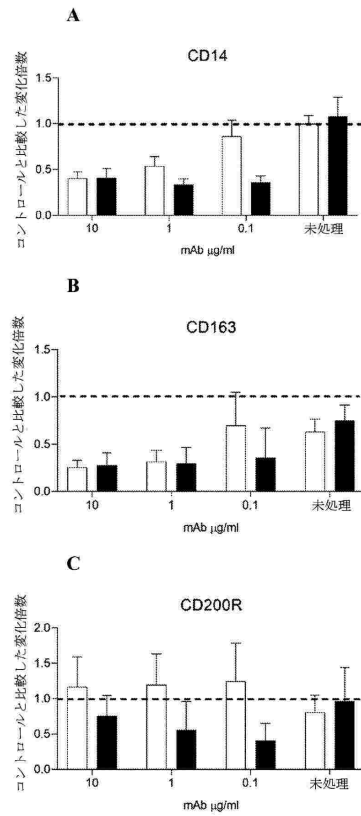
20

30

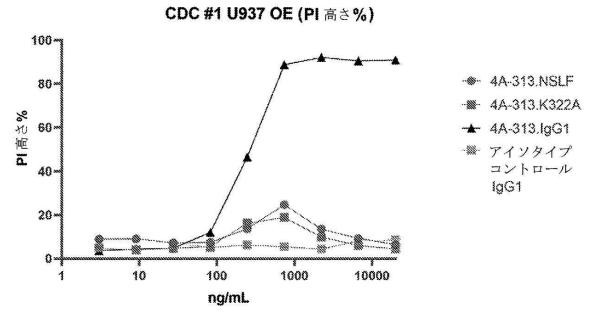
40

50

【図 18】



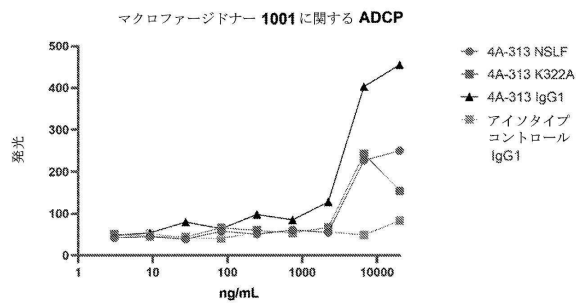
【図 19】



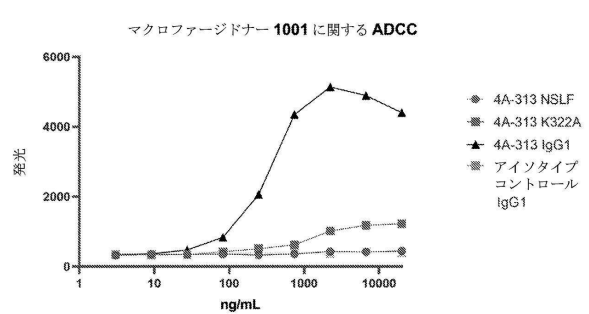
10

20

【図 20】



【図 21】

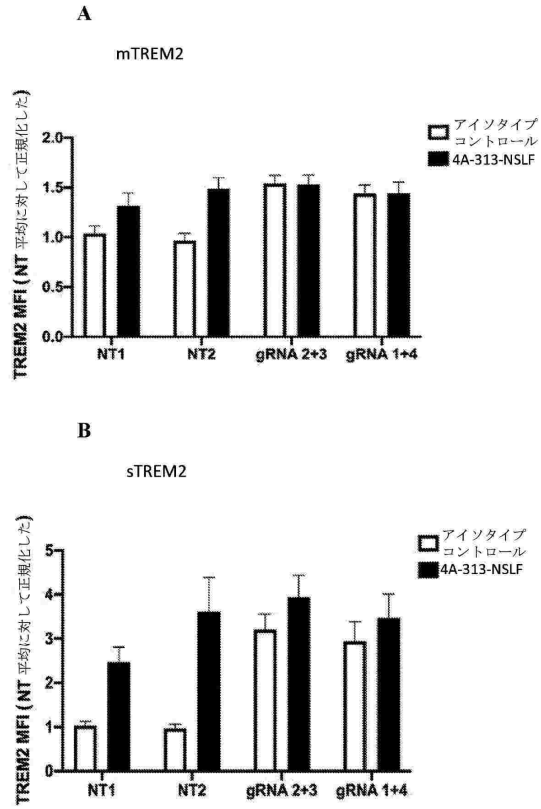


30

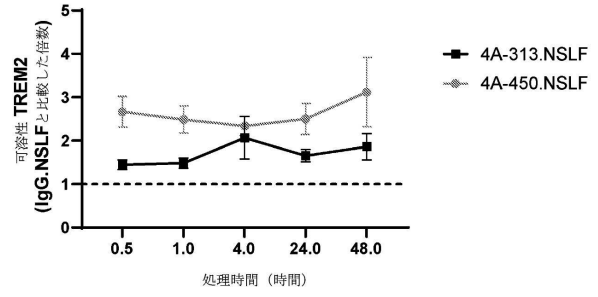
40

50

【図 2 2】

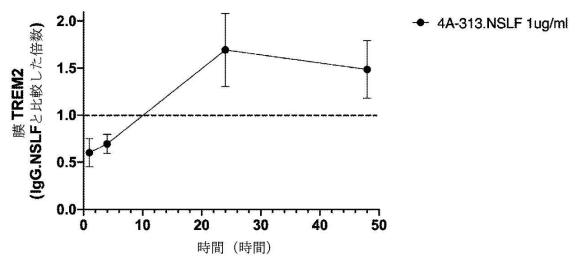


【図 2 3 A】

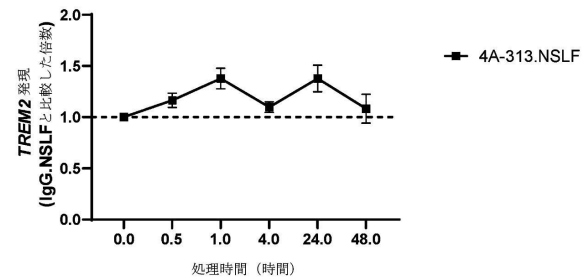


10

【図 2 3 B】



【図 2 3 C】

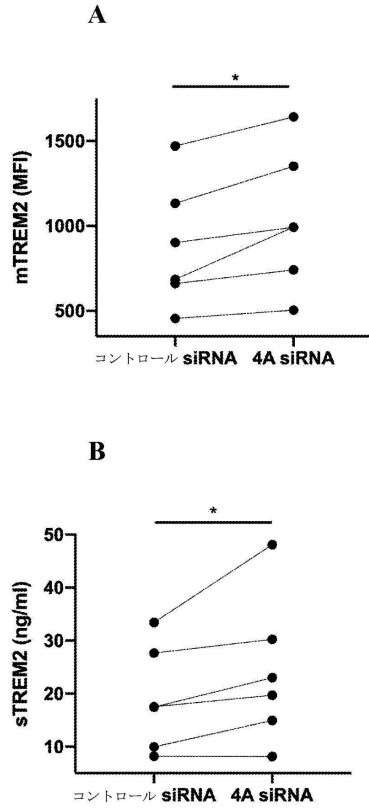


30

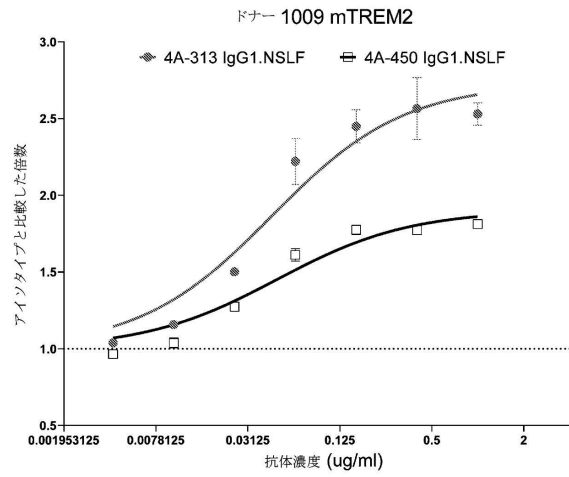
40

50

【図 2 4】



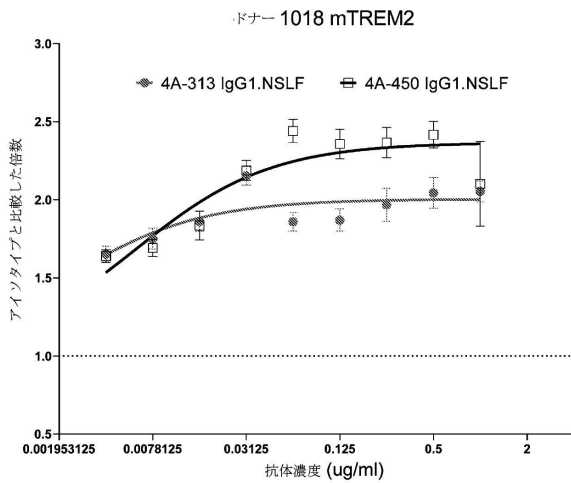
【図 2 5 A】



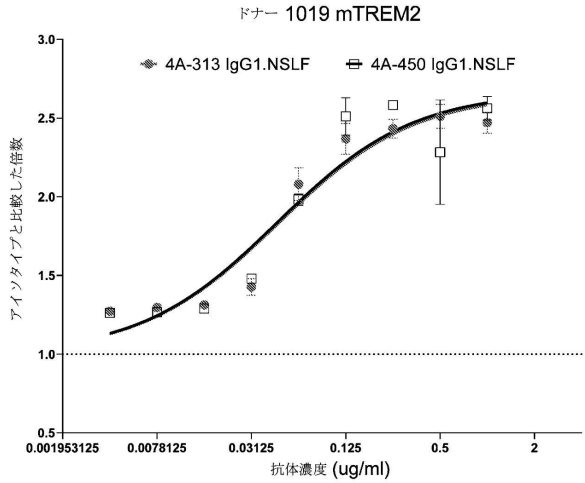
10

20

【図 2 5 B】



【図 2 5 C】

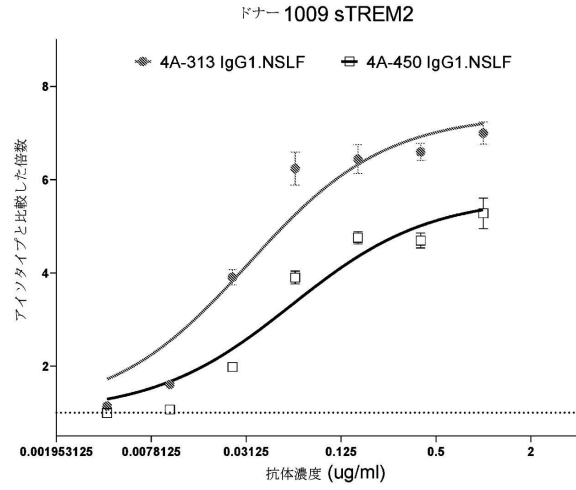


30

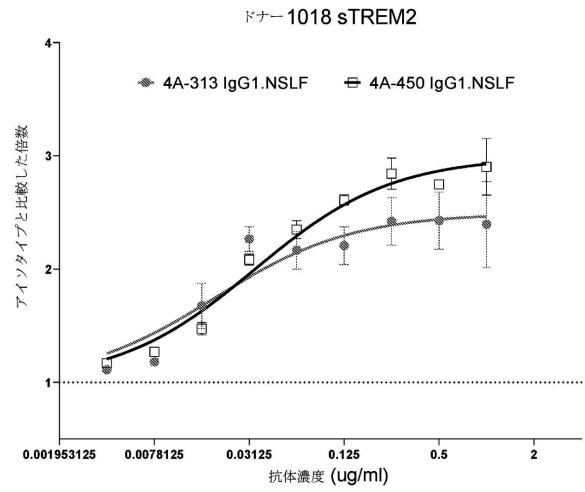
40

50

【図 2 6 A】

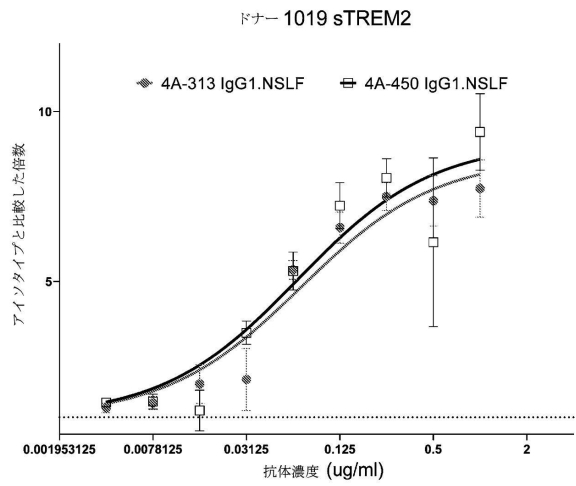


【図 2 6 B】

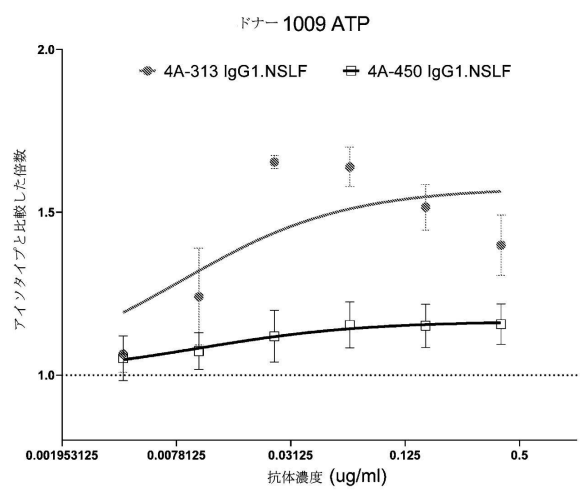


10

【図 2 6 C】



【図 2 7 A】



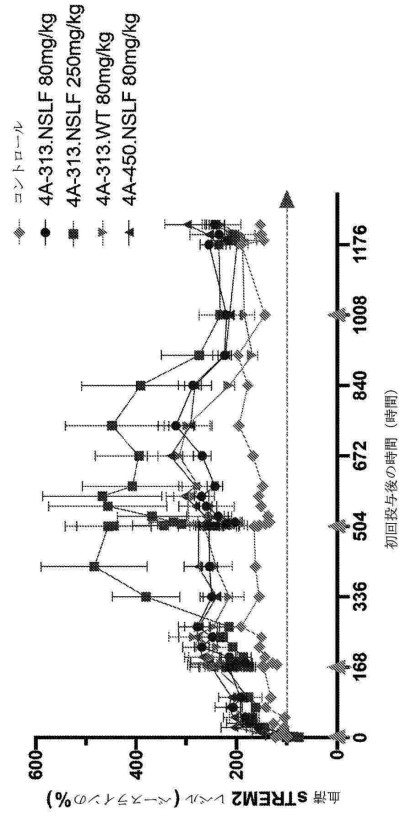
20

30

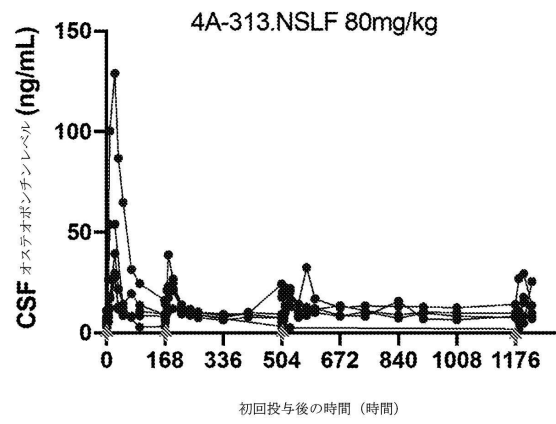
40

50

【図 3 0】



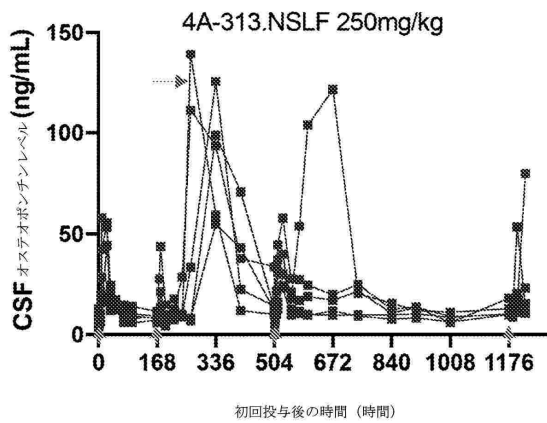
【図 3 1 A】



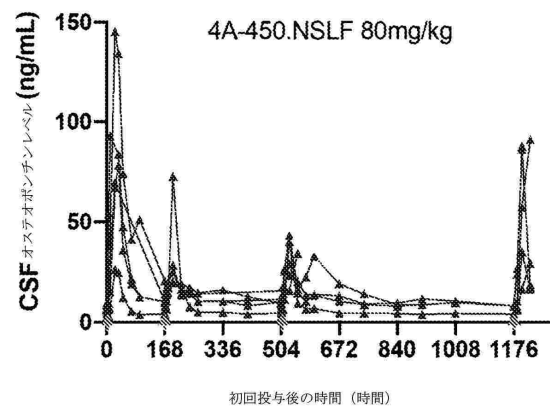
10

20

【図 3 1 B】



【図 3 1 C】

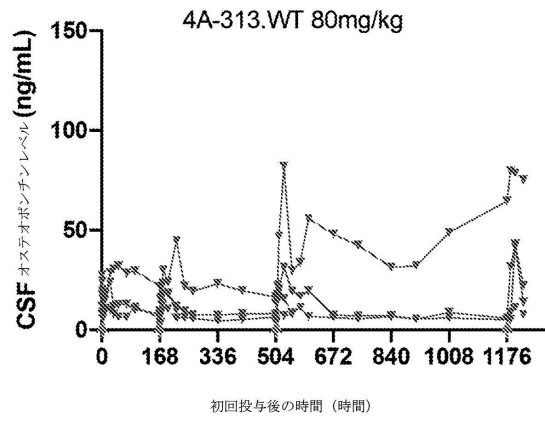


30

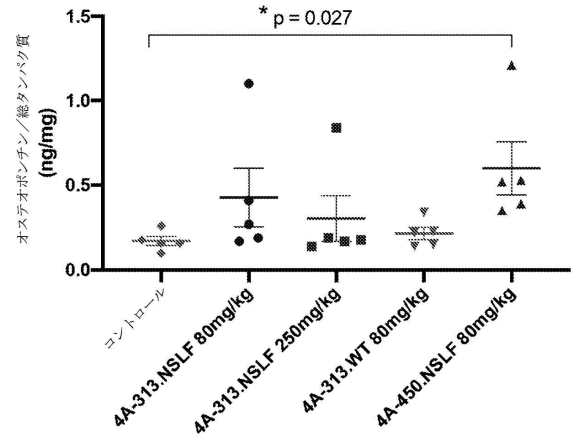
40

50

【図 3 1 D】

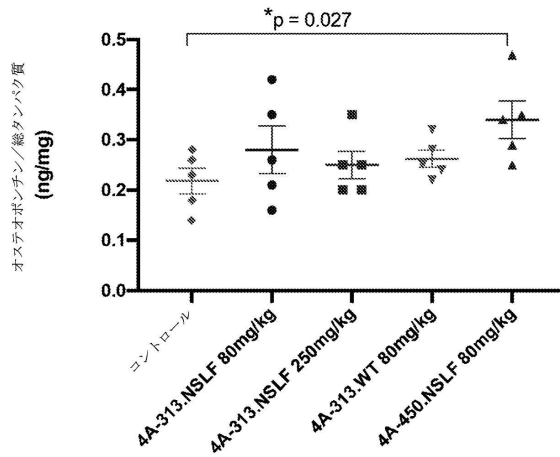


【図 3 2 A】

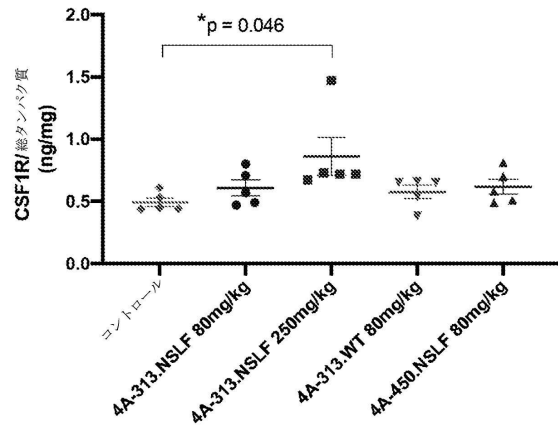


10

【図 3 2 B】



【図 3 3 A】



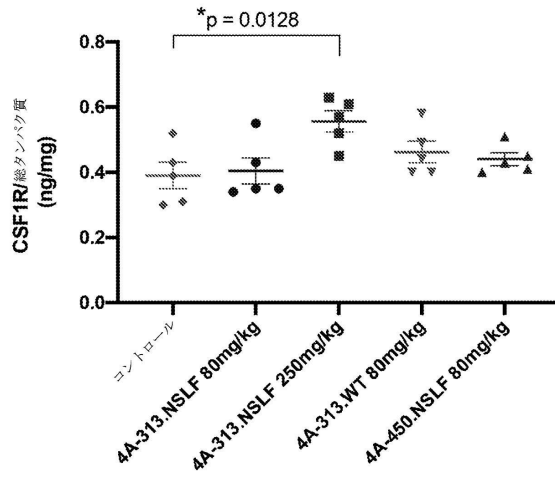
20

30

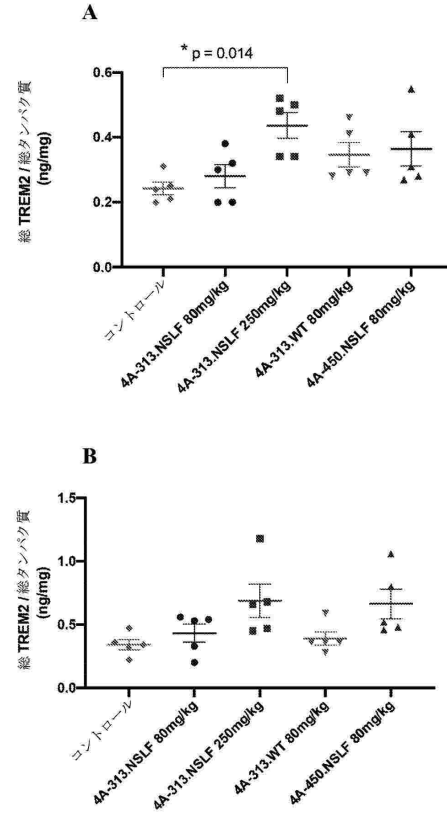
40

50

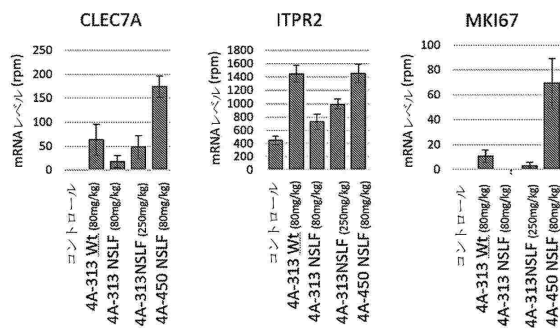
【図 3 3 B】



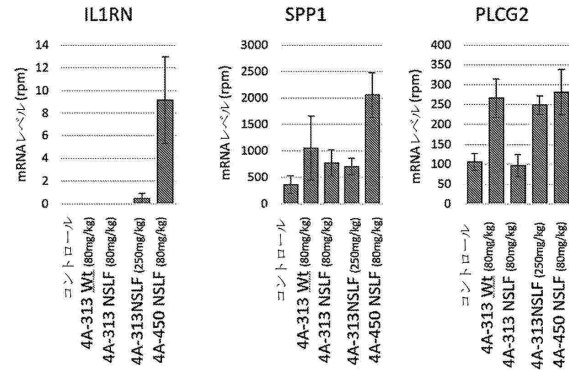
【図 3 4】



【図 3 5 A】



【図 3 5 B】



10

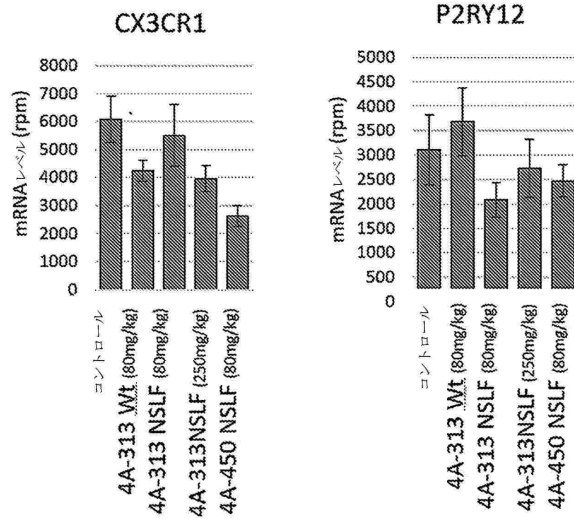
20

30

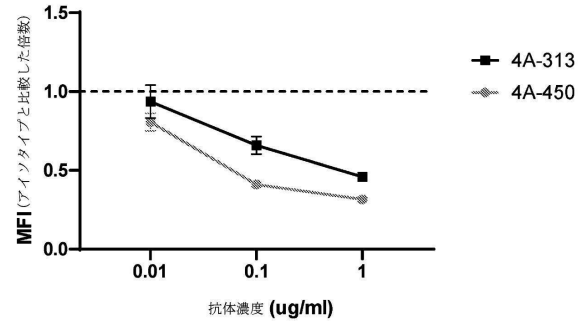
40

50

【図 3 5 C】

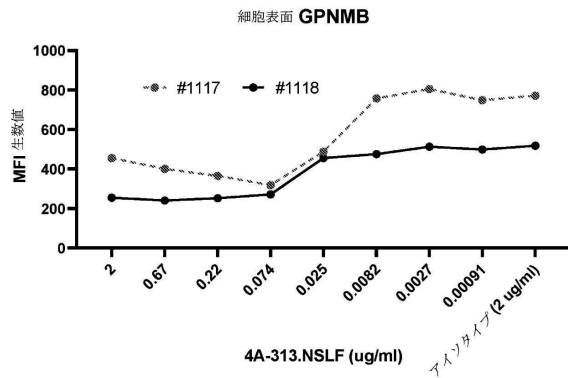


【図 3 6】



10

【図 3 7】



20

【配列表】

0007612658000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/947,449

(32)優先日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/960,606

(32)優先日 令和2年1月13日(2020.1.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/057,142

(32)優先日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スン, ジョンフン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付

(72)発明者 ホ, ウェーシェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付

(72)発明者 アルハワグリ, ムハンマド エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付

(72)発明者 コン, フィリップ リン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付

(72)発明者 リン, エルヴェ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント

- ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 ロン, ファ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 スリニバサン, カルパガム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 ミトラ, アナンヤ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 バーミンガム, ダニエル ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 ヘーガー, クラウスーディーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 サラザー, サンティアゴ ビベロス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 チグナレッタ, フランチェスカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 タッシ, イラリア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 シュワープ, ティナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 イー, アンジー グレース
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
(72)発明者 ローゼンタール, アーノン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
ブルバード 131, スイート 600, アレクトル エルエルシー 気付
審査官 田ノ上 拓自
(56)参考文献 Immunology and Cell Biology, 2017年, Vol.95, pp.611-619, doi:10.1038/icb.2017.18
membrane-spanning 4-domains subfamily A member 4A isoform 1 [Homo sapiens], NCBI
Reference Sequence: NP_683876.1, NCBI, 2019年05月02日, pp.1-3, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/23110995?sat=47&satkey=82929062> [検索日: 2024/07/01]
Immunology and Cell Biology, 2015年, pp.1-13, DOI: 10.1038/icb.2015.48
(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
C12P 21/08
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
A61K 39/395
A61P 25/28

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)