



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119954954 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 09

(21) 申请号 202411885372.7

(22) 申请日 2020.07.30

(30) 优先权数据

62/881,187 2019.07.31 US

62/892,467 2019.08.27 US

62/947,449 2019.12.12 US

62/960,606 2020.01.13 US

63/057,142 2020.07.27 US

(62) 分案原申请数据

202080062076.0 2020.07.30

(71) 申请人 艾莱克特有限责任公司

地址 美国

(72) 发明人 宣廷勋 何维贤

M·A·阿尔哈瓦格里 P·L·孔

H·莱茵 H·龙 K·斯利尼瓦桑

A·米特拉 D·P·贝尔明哈姆

K-D·赫格尔 S·V·萨拉扎尔

F·希格纳莱拉 I·塔斯

T·施瓦贝 A·G·伊

A·罗森斯奥

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 张小勇

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书154页
序列表(电子公布) 附图43页

(54) 发明名称

抗MS4A4A抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开总体上涉及包括特异性地结合MS4A4A多肽例如哺乳动物MS4A4A或人MS4A4A的抗体例如单克隆抗体、人源化抗体和抗体片段的组合物,以及此类组合物在预防、降低风险或治疗有需要的个体中的用途。

MHQYSRHCPEESTFSAAMTTMQGMEQAMPGAGPGVYPLGNMAVTHSHLWKGLQEKFLKGEF
KVLGVVQILTALMSLSMGITMMCMASNTYGSNPISYIYGYTIWGSVMFHSGLSLAAGIRITKG
LVRGSLGMVITSSVLAASGILINTESLAFYFHHYPYCNYYGNSNCHGTMSILMGLDGMVLLL
SVLEFCIAVSLSAFGCKVLCCTPGGVVLLPSSHMAETASPTPLNEV

1. 一种结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含选自由SEQ ID NO:94、108、116、146、147、308和311组成的组的氨基酸序列;HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309和312组成的组的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:102、100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310和313组成的组的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:104、103、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314和317组成的组的氨基酸序列;HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105、106、114、139、140、141、142、143、159、160、161、315和318组成的组的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:107、115、144、145、163、316和319组成的组的氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96-99组成的组的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:102、100和101组成的组的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:104和103组成的组的氨基酸序列;HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105-106组成的组的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:110-111组成的组的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:118-122组成的组的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:123-129组成的组的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:130-138组成的组的氨基酸序列;HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:139-143组成的组的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:144-145组成的组的氨基酸序列。

5. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含选自由SEQ ID NO:146-147组成的组的氨基酸序列;HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:149-153组成的组的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:156-158组成的组的氨基酸序列;HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:159-161组成的组的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列。

6. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

7. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重

链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:308的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:309的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含SEQ ID NO:310的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:314的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:315的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:316的氨基酸序列。

8. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:311的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:312的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含SEQ ID NO:313的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:317的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:318的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:319的氨基酸序列。

9. 一种结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含抗体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或4A-450的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。

10. 一种结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区包含抗体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或4A-450的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。

抗MS4A4A抗体及其使用方法

[0001] 本申请是CN202080062076.0的分案申请。

[0002] 以ASCII文本文件提交序列表

[0003] 以ASCII文本文件提交的以下内容是以引用的整体方式并入本文：计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名称:4503_008PC06_Seqlisting_ST25.TXT;创建日期:2020年7月28日;大小:289,448个字节)。

技术领域

[0004] 本公开涉及抗MS4A4A抗体和此类抗体的治疗用途。

背景技术

[0005] 跨膜4结构域亚家族A (MS4A) 基因簇存在于染色体11q12上并且包括18个基因。MS4A基因家族编码通常具有四跨拓扑结构的膜蛋白质(Ishibashi等人,2001, *Gene*, 265: 87-93;Liang和Tedder,2001, *Genomics*, 72:119-127;Efthymiou和Goate,2017, *Molecular Neurodegeneration*, 12:43)。跨膜结构域由一个细胞内环和两个细胞外环互连,其中N和C末端均位于胞质液内。大多数MS4A蛋白与MS4A1 (CD20) 共有氨基酸序列同源性(20-30%相似度),其中最高程度的序列同一性存在于前三个跨膜结构域中。这些跨膜区域内跨越不同MS4A蛋白高度保守的基序表明跨膜结构域在MS4A蛋白功能中具有重要的一般性作用。MS4A蛋白之间变化最大的区域存在于其N和C末端胞质结构域和推定的第二细胞外环内(Ishibashi等人,2001, *Gene*, 265:87-93),这表明这些区域赋予独特的功能性质。

[0006] 尽管存在这种多样性,但MS4A结构域具有一些共享元件。例如,在MS4A蛋白(MS4A8B和MS4A12除外)中保守的一个显著特征是在推定的第二细胞外环中的可形成二硫键的两个半胱氨酸残基的保守性。MS4A蛋白的N和C末端结构域还富含脯氨酸残基,但其功能意义仍待阐明(Hulett等人,2001, *Genomics*, 72:119-127)。然而,富含脯氨酸的区域通常参与各种细胞过程,诸如细胞骨架重排、转录起始、信号传导级联以及与SH3结构域缔合作为衔接系统的一部分以促进蛋白质-蛋白质相互作用(Kay等人,2000, *FASEB J*, 14:231-241)。

[0007] MS4A蛋白家族在功能上相对未表征,一些重要的例外:MS4A1 (CD20) 仅在B淋巴细胞中表达,在此所述蛋白质通过B细胞抗原受体和钙流入具有信号传导功能。CD20是用以使慢性淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、自体免疫疾病和实体器官移植中的致病性B细胞耗竭的免疫治疗抗体的靶标。MS4A2 (Fc ϵ R β) 是肥大细胞上的高亲和力IgE受体 (Fc ϵ RI) 和低亲和力IgG受体 (Fc ϵ RIII) 的信号传导亚基,其在过敏性和过敏反应中具有关键作用。MS4A2是ITAM结构域蛋白质,其通过4蛋白质高亲和力IgE受体复合物放大信号。MS4A3 (Htm4) 在淋巴样和髓系细胞的细胞内膜上表达,并且在细胞周期调控中起衔接蛋白的作用。

[0008] 尽管大多数MS4A家族成员未表征,但有报导表明MS4A蛋白充当多种外源性和内源性配体(包括脂肪酸、肽和硫酸化类固醇)的化学感测器和化学受体,并且参与介导钙流入、调控胞吞作用、运输,并可充当信号转导复合物的衔接子(Cruse等人,2015, *Mol Biol*

Cell, 26:1711-1727; Greer等人, 2016, Cell, 165:1734-1748; Eon Kuek等人, 2016, Cell, 165:1734-1748; Koslowski等人, 2008, Cancer Res, 68:3458-3466; Bubien等人, 1993; J Cell Biol, 121:1121-1132)。

[0009] 某些MS4A基因已在遗传学上与各种病症和疾病、尤其神经退行性病症相关。例如, 全基因组显著性关联分析已鉴定出位于染色体11q12上的MS4A基因簇, 其为最显著的阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)基因座之一。一个所鉴定出的尤为受关注基因是MS4A4A (Lambert等人, 2013, Nat Genet, 45:1452-1458; Hollingworth等人, 2011, Nat Genet, 43:429-435; Naj等人, 2011, Nat Genet, 43:436-441)。

[0010] 因此, 需要靶向MS4A4A的疗法, 包括特异性地结合至MS4A4A的抗体, 和/或能够调节(例如抑制或降低; 活化或增强)MS4A4A活性的疗法, 诸如通过降低或提高MS4A4A蛋白水平或活性, 以便治疗与MS4A4A活性相关的各种疾病、病症和疾患。

[0011] 本文所引用的所有参考文献(包括专利申请和公布)均在此以引用的方式整体并入。

发明内容

[0012] 本公开总体上涉及抗MS4A4A抗体和使用此类抗体的方法。本文所提供的方法可用于预防、降低风险或治疗患有神经退行性疾病、病症或疾患的个体。在一些实施方案中, 本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有选自阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病、痴呆和认知损害的神经退行性疾病、病症或疾患的个体的方法, 所述方法包括向有需要的所述个体投与治疗有效量的抗MS4A4A抗体。在一些实施方案中, 本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有与MS4A4A的表达或活性增加相关的疾病、病症或疾患的个体的方法, 所述方法包括向有需要的所述个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。

[0013] 在一个方面, 本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的分离抗体, 其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包括:HVR-H1, 其包括选自SEQ ID NO:94、108、116、146、147、308和311的氨基酸序列; HVR-H2, 其包括选自SEQ ID NO:96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309和312的氨基酸序列; 以及HVR-H3, 其包括选自SEQ ID NO:100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310和313的氨基酸序列; 并且所述轻链可变区包括:HVR-L1, 其包括选自SEQ ID NO:103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314和317的氨基酸序列; HVR-L2, 其包括选自SEQ ID NO:105、106、114、139、140、141、142、143、159、160、161、315和318的氨基酸序列; 以及HVR-L3, 其包括选自SEQ ID NO:107、115、144、145、163、316和319的氨基酸序列。

[0014] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中, 本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体, 其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区, 其中所述重链可变区包括:HVR-H1, 其包括SEQ ID NO:94的氨基酸序列; HVR-H2, 其包括选自SEQ ID NO:96-99的氨基酸序列; 以及HVR-H3, 其包括选自SEQ ID NO:100-102的氨基酸序列; 并且所述轻链可变区包括:HVR-L1, 其包括选自SEQ ID NO:103-104的氨基酸序列; HVR-L2, 其包括选自SEQ ID NO:105-106的氨基酸序列; 以及HVR-L3, 其包括SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

[0015] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括:HVR-H1,其包括SEQ ID NO:308的氨基酸序列;HVR-H2,其包括SEQ ID NO:309的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包括SEQ ID NO:310的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包括:HVR-L1,其包括SEQ ID NO:314的氨基酸序列;HVR-L2,其包括SEQ ID NO:315的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包括SEQ ID NO:316的氨基酸序列。

[0016] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括:HVR-H1,其包括SEQ ID NO:311的氨基酸序列;HVR-H2,其包括SEQ ID NO:312的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包括SEQ ID NO:313的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包括:HVR-L1,其包括SEQ ID NO:317的氨基酸序列;HVR-L2,其包括SEQ ID NO:318的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包括SEQ ID NO:319的氨基酸序列。

[0017] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括:HVR-H1,其包括SEQ ID NO:108的氨基酸序列;HVR-H2,其包括选自SEQ ID NO:110-111的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包括SEQ ID NO:112的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包括:HVR-L1,其包括SEQ ID NO:113的氨基酸序列;HVR-L2,其包括SEQ ID NO:114的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包括SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

[0018] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括:HVR-H1,其包括SEQ ID NO:116的氨基酸序列;HVR-H2,其包括选自SEQ ID NO:118-122的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包括选自SEQ ID NO:123-129的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包括:HVR-L1,其包括选自SEQ ID NO:130-138的氨基酸序列;HVR-L2,其包括选自SEQ ID NO:139-143的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包括选自SEQ ID NO:144-145的氨基酸序列。

[0019] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括:HVR-H1,其包括选自SEQ ID NO:146-147的氨基酸序列;HVR-H2,其包括选自SEQ ID NO:149-153的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包括SEQ ID NO:154的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包括:HVR-L1,其包括选自SEQ ID NO:156-158的氨基酸序列;HVR-L2,其包括选自SEQ ID NO:159-161的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包括SEQ ID NO:163的氨基酸序列。

[0020] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:5-15、304和306的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:24-30的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:

40-53的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:76-84的氨基酸序列。

[0021] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括轻链可变区,其中所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:17-22、305和307的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括轻链可变区,其中所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:32-36的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括轻链可变区,其中所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:55-74的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括轻链可变区,其中所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:86-93的氨基酸序列。

[0022] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:5-15、304和306的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:17-22、305和307的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:24-30的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:32-36的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:40-53的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:55-74的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括选自SEQ ID NO:76-84的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包括选自SEQ ID NO:86-93的氨基酸序列。

[0023] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包括重链和轻链,其中所述重链包括选自SEQ ID NO:320-343的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述重链包括选自SEQ ID NO:336-343的氨基酸序列(任选地其中所述轻链包含有包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区,此外任选地其中所述轻链还包含有包含SEQ ID NO:344的氨基酸序列的恒定区)。在一些实施方案中,所述重链包括选自SEQ ID NO:320-327的氨基酸序列(任选地其中所述轻链包含有包含SEQ ID NO:304的氨基酸序列的轻链可变区,此外任选地其中所述轻链还包含有包含SEQ ID NO:344的氨基酸序列的恒定区)。在一些实施方案中,所述重链包括选自SEQ ID NO:328-335的氨基酸序列(任选地其中所述轻链包含有包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列的轻链可变区,此外任选地其中所述轻链还包含有包含SEQ ID NO:344的氨基酸序列的恒定区)。

[0024] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体

是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含有包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列的HVR-H1、包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列的HVR-H2、以及包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列的HVR-H3;并且所述轻链可变区包含有包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列的HVR-L1、包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列的HVR-L2、以及包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列的HVR-L3。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:359或360的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:365的氨基酸序列。

[0025] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:308的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:309的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包括SEQ ID NO:310的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:314的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:315的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:316的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:304的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:324或325的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:363的氨基酸序列。

[0026] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:311的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:312的氨基酸序列;以及HVR-H3,其包含SEQ ID NO:313的氨基酸序列;并且所述轻链可变区包含:HVR-L1,其包含SEQ ID NO:317的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:318的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:319的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:306的氨基酸序列,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:307的氨基酸序列。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:332或333的氨基酸序列,并且所述轻链包含SEQ ID NO:364的氨基酸序列。

[0027] 在一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体竞争性地抑制如本文实施方案中的任一项所述的抗体中的一种或多种针对结合至MS4A4A的结合。

[0028] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体与如本文实施方案中的任一项所述的抗体结合MS4A4A上的基本上相同或重叠的表位。

[0029] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体结合至人MS4A4A的细胞外结构域1。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体结合至SEQ ID NO:1的氨基酸序列CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:177) 内的一个或多个氨基酸残基。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体结合至人MS4A4A的细胞外结构域2。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体结合至SEQ ID NO:1的氨基酸序列SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) 内的一个或多个氨基酸残基。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体结合至SEQ ID NO:1的氨基酸序列SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) 内的一个或多个氨基酸残基,并且进一步其中所述抗体不结合至SEQ ID NO:1的氨基酸残基脯氨酸163 (P163)。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗MS4A4A抗体是人抗MS4A4A抗体或人源化抗MS4A4A抗体。

[0030] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体降低MS4A4A的细胞表面水平或降低MS4A4A的细胞内水平。

[0031] 在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,MS4A4A蛋白是哺乳动物蛋白质或人蛋白质。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,MS4A4A蛋白是野生型蛋白质。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,MS4A4A蛋白是天然变体。

[0032] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加髓系细胞中的可溶性TREM2水平、增加膜TREM2水平、或增加可溶性TREM2并增加膜TREM2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加可溶性TREM2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加膜TREM2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加可溶性TREM2水平和膜TRME2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内增加可溶性TREM2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内增加血清中的可溶性TREM2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内增加脑脊液 (CSF) 中的可溶性TREM2水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内增加血清和CSF中的可溶性TREM2水平。

[0033] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体降低髓系细胞上M2细胞表面标记物 (例如受体) 的表达。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体减少或降低髓系细胞 (例如巨噬细胞) 中的M2细胞表面标记物的水平。

[0034] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体降低髓系细胞上CD200R、Dectin-1或CD163的表达。在可与本文实施方案中的任一项组合的

一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体减少或降低髓系细胞(例如巨噬细胞)中的CD200R、Dectin-1和/或CD163的细胞表面水平。

[0035] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加髓系细胞上凝溶胶蛋白和/或骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质表达。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加髓系细胞上IL1RN的mRNA和/或蛋白质水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加髓系细胞上CSF1R的mRNA和/或蛋白质水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体降低髓系细胞上嘌呤能受体P2RY12和/或CX3C趋化因子受体1(CX3CR1)的mRNA和/或蛋白质水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加髓系细胞上1-磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸磷酸二酯酶 γ -2(PLCG2)、C型凝集素结构域家族7成员A(CLEC7A)、肌醇1,4,5-三磷酸受体2(ITPR2)和/或抗原KI-67(MK167)的mRNA和/或蛋白质水平。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体降低髓系细胞上跨膜糖蛋白NMB(GPNMB)的mRNA和/或蛋白质水平。

[0036] 在一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的分离抗体,其中所述抗体增加髓系细胞上凝溶胶蛋白和/或骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质表达。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,髓系细胞是人巨噬细胞。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,结合至MS4A4A蛋白的分离抗体是人或人源化的。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,结合至MS4A4A蛋白的分离抗体是人抗体、人源化抗体、双特异性抗体、单克隆抗体、多价抗体、缀合抗体或嵌合抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,结合至MS4A4A蛋白的分离抗体与选自4A-18、4A-25、4A-214、4A-21和4A-202的抗体结合至相同的表位。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,结合至MS4A4A蛋白的分离抗体降低髓系细胞上M2标记物的表达。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,髓系细胞是人巨噬细胞。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,M2标记物是CD200R、Dectin-1和/或CD163。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,结合至MS4A4A蛋白的分离抗体使人巨噬细胞上的质膜或细胞表面TREM2增加至少50%、90%、100%、150%、200%或250%。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,结合至MS4A4A蛋白的分离抗体使人巨噬细胞上清液中的可溶性TREM2增加至少15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%或70%。

[0037] 在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,抗MS4A4A抗体是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,所述第一抗原是MS4A4A并且所述第二抗原是促进跨血脑屏障转运的抗原。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,所述第二抗原选自MS4A4A;转铁蛋白受体(TR);胰岛素受体(HIR);胰岛素样生长因子受体(IGFR);低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和LPR-2);白喉毒素受体CRM197;美洲驼单一结构域抗体TMEM 30(A);蛋白质转导结构域TAT、Syn-B、穿膜肽(penetratin);聚精氨酸肽;血管肽、基础免疫球蛋白、Glut1和CD98hc;以及ANG1005。

[0038] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体是单克隆抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗体是人抗

体。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗体是人源化抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗体是双特异性抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗体是多价抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。

[0039] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体为IgG类、IgM类或IgA类。在一些实施方案中,所述抗体为IgG类并具有IgG1、IgG2或IgG4同种型。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,所述抗体是抗体片段。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,抗体是结合至包括人MS4A4A或哺乳动物MS4A4A蛋白上的氨基酸残基的表位的抗体片段。在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,所述抗体片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

[0040] 在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述抗体是识别第一抗原和第二抗原的双特异性抗体。在可与本文实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,所述第一抗原是MS4A4A并且所述第二抗原是:

[0041] (a) 促进跨血脑屏障转运的抗原;

[0042] (b) 选自以下的促进跨血脑屏障转运的抗原:转铁蛋白受体(TR);胰岛素受体(HIR);胰岛素样生长因子受体(IGFR);低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和LPR-2);白喉毒素受体CRM197;美洲驼单一结构域抗体TMEM 30(A);蛋白质转导结构域TAT、Syn-B、穿膜肽;聚精氨酸肽;血管肽;和ANG1005;

[0043] (c) 选自致病性肽或蛋白质或致病性核酸的致病剂,其中所述致病性核酸是反义GGCCCC(G2C4)重复序列扩增RNA,所述致病性蛋白质选自淀粉样 β 、寡聚淀粉样 β 、淀粉样 β 斑块、淀粉样前体蛋白质或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72(9号染色体开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白(huntingtin)、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易氏体(Lewy body)、心房利钠因子、胰岛淀粉样多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样A、medin、催乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、胱抑素、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关的非ATG(RAN)翻译产物、二肽重复序列(DPR)肽、甘氨酸-丙氨酸(GA)重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸(GP)重复序列肽、甘氨酸-精氨酸(GR)重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸(PA)重复序列肽、泛素和脯氨酸-精氨酸(PR)重复序列肽;

[0044] (d) 在免疫细胞上表达的配体和/或蛋白质,其中所述配体和/或蛋白质选自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和磷脂酰丝氨酸;或

[0045] (e) 在一种或多种肿瘤细胞上表达的蛋白质、脂质、多糖或糖脂。

[0046] 在另一个方面,本公开涉及分离核酸,其包括编码如前述实施方案中的任一项所述的抗体的核酸序列。在一些实施方案中,本公开涉及载体,其包括前述实施方案中的任一项所述的核酸。在一些实施方案中,本公开涉及分离的宿主细胞,其包括如前述实施方案中的任一项所述的载体。

[0047] 在另一个方面,本公开涉及产生结合至人MS4A4A的抗体的方法,其包括培养如前述实施方案中的任一项所述的宿主细胞,使得产生抗MS4A4A抗体。在某些实施方案中,所述

方法还包括回收由细胞产生的抗MS4A4A抗体。

[0048] 在另一个方面,本公开涉及药物组合物,其包括如前述实施方案中的任一项所述的抗体和药学上可接受的载剂。

[0049] 在一个方面,本公开涉及预防、降低风险或治疗患有选自阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病和认知损害的疾病、病症或损伤的个体的方法,所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的如前述实施方案中的任一项所述的抗体。在另一个方面,本公开涉及预防、降低风险或治疗患有由MS4A4A的过表达或活性增加引起或与其相关的疾病、病症、疾患或损伤的个体的方法,所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的如前述实施方案中的任一项所述的抗体。在本公开的一些实施方案中,所述方法还包括在施用抗体之前和/或之后检测骨桥蛋白、凝溶胶蛋白、质膜或细胞表面TREM2和/或可溶性TREM2的水平。

[0050] 在一个方面,本公开涉及预防、降低风险或治疗患有CSF1R缺乏疾病或病症的个体的方法,所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的如前述实施方案中的任一项所述的抗体。在一些实施方案中,所述CSF1R缺乏疾病或病症是成人发作型白质脑病伴轴突球样变和色素性胶质细胞(ALSP)或遗传性弥漫性白质脑病(HDLS)。

[0051] 本公开的其他方面涉及由如实施方案中的任一项所述的方法所产生的分离的抗MS4A4A抗体。本公开的其他方面涉及药物组合物,其包括如述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体和药学上可接受的载剂。

[0052] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括抗体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或4A-450的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3(如表1、表5、表30和表31中所示)。

[0053] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区包括抗体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或4A-450的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表1、表5、表30和表31中所示)。

[0054] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括有包括HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的重链可变区和包括HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的轻链可变区,其中所述抗体包括抗体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或4A-450的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表1、表5、表30和表31中所示)。

[0055] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括抗体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或4A-331的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3(如表2和表6中所示)。

[0056] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区包括抗体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或4A-331的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表2和表6中所示)。

[0057] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括有包括

HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的重链可变区和包括HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的轻链可变区,其中所述抗体包括抗体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或4A-331的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表2和表6中所示)。

[0058] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括抗体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-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或4A-381的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3(如表3和表7中所示)。

[0059] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区包括抗体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-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或4A-381的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表3和表7中所示)。

[0060] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括有包括HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的重链可变区和包括HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的轻链可变区,其中所述抗体包括抗体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-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或4A-381的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表3和表7中所示)。

[0061] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区包括抗体4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389或4A-390的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3(如表4和表8中所示)。

[0062] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区包括抗体4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389或4A-390的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表4和表8中所示)。

[0063] 在另一个方面,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体包括有包括HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的重链可变区和包括HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的轻链可变区,其中所述抗体包括抗体4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389或4A-390的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3(如表4和表8中所示)。

[0064] 在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,本公开涉及结合至MS4A4A蛋白的抗体,其中所述抗体增加髓系细胞上凝溶胶蛋白和/或骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质表达。在一些实施方案中,髓系细胞是巨噬细胞。

[0065] 在可与本文实施方案中的任一项组合的某些实施方案中,抗MS4A4A抗体特异性地结合至人MS4A4A、小鼠MS4A4A、食蟹猴MS4A4A或其组合。

[0066] 应理解,本文所述多种实施方案的性质中的一个、一些或全部可组合以形成本公开的其他实施方案。本公开的这些和其他方面对本领域技术人员将变得显而易见。本公开的这些和其他实施方案通过下面的实施方式部分进一步描述。

附图说明

[0067] 本专利或申请文件含有至少一个有色绘制的图。在要求并支付必要费用之后,专利局将提供本专利或专利申请公布带彩图的副本。

[0068] 图1示出了人MS4A4A的一级氨基酸序列。细胞内结构域为斜体,跨膜结构域加下划线,细胞外环为粗斜体。

[0069] 图2A示出了从RCSB蛋白质数据库获得的可溶性四螺旋束支架(PDB_ID:1P68)的结构示意图,所述支架具有在结构中示出为螺旋带的四个跨膜结构域。图2B和图2C分别示出了可溶性四螺旋束支架PDB- ID:1P68和PDB_ID:1M6T的一级氨基酸序列;所述四个跨膜结构域在氨基酸序列中加下划线。

[0070] 图3A示出了可溶性四螺旋束支架JS1、JS5和JS6的一级氨基酸序列,其中添加有人MS4A4A的两个细胞外环(示出为粗体加下划线)。图3B示出了用作阴性对照变体的可溶性四螺旋束支架JS4和JS10的一级氨基酸序列。

[0071] 图4示出了通过ELISA的本公开的某些抗MS4A4A抗体与重组MS4A4A可溶性环状接枝多肽JS1、JS4、JS5、JS6和JS10的结合。

[0072] 图5示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-21的某些人源化抗MS4A4A抗体变体与重组MS4A4A可溶性环状接枝多肽JS1的结合。

[0073] 图6示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-202的某些人源化抗MS4A4A抗体变体与重组MS4A4A可溶性环状接枝多肽JS1的结合。

[0074] 图7示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-202的某些人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体变体与重组MS4A4A可溶性环状接枝多肽JS5的结合。

[0075] 图8示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-21的某些人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体变体与重组MS4A4A可溶性环状接枝多肽JS5的结合。

[0076] 图9示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-21的某些人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体变体与重组MS4A4A可溶性环状接枝多肽JS5的结合。

[0077] 图10A至图10B示出了抗MS4A4A抗体4A-202对食蟹猴血清中的sTREM2水平的影响。图10A提供了在均以80mg/kg的剂量施用抗MS4A4A抗体4A-202或同种型对照抗体(huIgG1)后,在指定时间(小时)食蟹猴血清中sTREM2的水平(ng/mL)。图10B提供了在均以80mg/kg的剂量施用抗MS4A4A抗体4A-202或同种型对照抗体(huIgG1)后,在指定时间(小时)食蟹猴血清中sTREM2的水平(基线的百分比)。

[0078] 图11A至图11B示出了抗MS4A4A抗体4A-202对食蟹猴脑脊液(CSF)中的sTREM2水平的影响。图11A提供了在均以80mg/kg的剂量施用抗MS4A4A抗体4A-202或同种型对照抗体(huIgG1)后,在指定时间(小时)食蟹猴CSF中sTREM2的水平(ng/mL)。图11B提供了在均以80mg/kg的剂量施用抗MS4A4A抗体4A-202或同种型对照抗体(huIgG1)后,在指定时间(小

时)食蟹猴CSF中sTREM2的水平(基线百分比)。

[0079] 图12列出了显示出抗MS4A4A抗体4A-313野生型(WT)huIgG1和4A-450WT huIgG1与表达重组人MS4A4A的U937细胞的结合曲线的数据。

[0080] 图13列出了显示出用抗MS4A4A抗体4A-450WT huIgG1、4A-450NSLF huIgG1和4A-450K322A huIgG1处理的原代人巨噬细胞中的膜TREM2水平的数据。

[0081] 图14列出了显示出用抗MS4A4A抗体4A-313WT huIgG1、4A-313NSLF huIgG1和4A-313K322A huIgG1处理的原代人巨噬细胞中的膜TREM2水平的数据。

[0082] 图15列出了显示出在用抗MS4A4A抗体4A-450huIgG1处理的原代人巨噬细胞的上清液中可溶性TREM2水平增加的数据。

[0083] 图16列出了显示出在用抗MS4A4A抗体4A-313huIgG1处理的原代人巨噬细胞的上清液中可溶性TREM2水平增加的数据。

[0084] 图17列出了显示出在用抗MS4A4A抗体4S-313NSLF huIgG1、4A-313PS huIgG1、4A-450NSLF huIgG1和4A-450PS huIgG1处理的原代人巨噬细胞中ATP水平增加的数据。

[0085] 图18A、图18B和图18C列出了显示出在用抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1和4A-419WT huIgG1处理的原代人巨噬细胞中CD14、CD163和CD200R水平的变化(分别)的数据。

[0086] 图19列出了显示出如通过碘化丙啶摄取所测量,抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1、4A-313K322A huIgG1和4A-313WT huIgG1在表达重组人MS4A4A的U937细胞中的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性的数据。

[0087] 图20列出了显示出如通过FcyRIIIa活化所测量,抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1、4A-313K322A huIgG1和4A-313WT huIgG1在原代人巨噬细胞中的ADCP活性的数据。

[0088] 图21列出了显示出如通过FcyRIIIa活化所测量,抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1、4A-313K322A huIgG1和4A-313WT huIgG1在原代人巨噬细胞中的ADCC活性的数据。

[0089] 图22A和图22B列出了显示出MS4A4A敲除对原代人巨噬细胞中的膜TREM2(图22A)和可溶性TREM2(图22B)的影响的数据。

[0090] 图23A、图23B和图23C列出了分别显示出在用本公开的抗MS4A4A抗体处理的人巨噬细胞中,可溶性TREM2蛋白水平、膜TREM2蛋白水平和TREM2 mRNA水平变化的动力学的的数据。

[0091] 图24A和图24B列出了显示出MS4A4A的siRNA敲减增加人巨噬细胞中的膜TREM2和可溶性TREM2水平的数据。

[0092] 图25A、图25B和图25C列出了显示出在添加本公开的抗MS4A4A抗体后,来自三个不同供体的原代人巨噬细胞中膜TREM2水平的剂量依赖性增加的数据。

[0093] 图26A、图26B和图26C列出了显示出在添加本公开的抗MS4A4A抗体后,来自三个不同供体的原代人巨噬细胞中可溶性TREM2水平的剂量依赖性增加的数据。

[0094] 图27A、图27B和图27C列出了显示出在添加本公开的抗MS4A4A抗体后,来自三个不同供体的原代人巨噬细胞中ATP水平的剂量依赖性增加的数据。

[0095] 图28A和图28B列出了显示出本公开的抗MS4A4A抗体有效挽救CSF1R抑制诱导的细胞死亡的数据。

[0096] 图29示出了在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴CSF中的全蛋白质组影响的火山图。

[0097] 图30列出了显示出在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴血清中sTREM2水平增加的数据。

[0098] 图31A、图31B、图31C和图31D列出了显示出在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴CSF中骨桥蛋白水平增加的数据。

[0099] 图32A和图32B列出了显示出在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴脑中的额叶皮质和海马体中骨桥蛋白水平分别增加的数据。

[0100] 图33A和图33B列出了显示出在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴脑中的额叶皮质和海马体中CSF1R水平分别增加的数据。

[0101] 图34A和图34B列出了显示出在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴脑中的额叶皮质和海马体中总TREM2蛋白水平分别增加的数据。

[0102] 图35A、图35B和图35C列出了显示出在从施用本公开的抗MS4A4A抗体的食蟹猴脑分离而来的小神经胶质细胞中,小神经胶质细胞活化、迁移和增殖的标记物中mRNA水平的变化的数据。

[0103] 图36列出了显示出本公开的抗MS4A4A抗体减少在U937细胞中重组表达的带HA-Snorkel标签的MS4A4A蛋白的细胞表面表达的数据。

[0104] 图37列出了显示出本公开的抗MS4A4A抗体降低原代人巨噬细胞中的GPNMB细胞表面表达的数据。

具体实施方式

[0105] 本公开涉及抗MS4A4A抗体(例如单克隆抗体);制备和使用此类抗体的方法;包含此类抗体的药物组合物;编码此类抗体的核酸;和包含编码此类抗体的核酸的宿主细胞。

[0106] 本领域技术人员通常充分理解本文所述或提及的技术和程序并且常使用常规方法对其加以采用,所述方法是诸如例如所广泛利用的方法,诸如描述于以下参考文献中的那些方法:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑(2003);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000)。

[0107] I. 定义

[0108] 除非另外指定,否则术语“MS4A4A”或“MS4A4A多肽”在本文中可互换使用,在本文中是指来自任何脊椎动物来源的任何天然MS4A4A,所述脊椎动物来源包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如人和食蟹猴)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,所述术语涵盖野生型序列和天然变体序列(例如剪接变体或等位基因变体)两者。在一些实施方案中,所述术语涵盖未加工的“全长”MS4A4A以及因在细胞加工所产生的MS4A4A的任何形式。在一些实施方案中,MS4A4A是人MS4A4A。在一些实施方案中,示例性MS4A4A的氨基酸序列是截至2001年12月1日的Uniprot登录号Q96JQ5。在一些实施方案中,示例性人MS4A4A的氨基酸序列是SEQ ID NO:1。

[0109] 术语“抗MS4A4A抗体”、“结合至MS4A4A的抗体”和“特异性地结合MS4A4A的抗体”是指能够以足够亲和力结合MS4A4A,使得所述抗体可用作靶向MS4A4A的诊断和/或治疗剂的抗体。在一个实施方案中,如(例如)通过放射性免疫测定(RIA)所测量,抗MS4A4A抗体与无

关非MS4A4A多肽的结合程度小于所述抗体与MS4A4A的结合的约10%。在某些实施方案中,结合至MS4A4A的抗体具有 $<1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<0.01\text{nM}$ 或 $<0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(KD)。在某些实施方案中,抗MS4A4A抗体结合至在来自不同物种的MS4A4A中保守的MS4A4A的表位。

[0110] 关于抗体与靶分子的结合,术语“特异性结合”或“特异性地结合”或“特异性针对”特定多肽或特定多肽靶标上的表位意指可测量地不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可(例如)通过测定与对照分子的结合相比分子的结合来测量。例如,特异性结合可通过与类似于靶标(例如过量的未标记靶标)的对照分子进行竞争来测定。在这种情况下,如果标记靶标与探针的结合被过量未标记的靶标竞争性地抑制,则表明特异性结合。如本文所用的术语“特异性结合”或“特异性地结合至”或“特异性针对”特定多肽或特定多肽靶标上的表位可通过(例如)对靶标的KD为约 10^{-4}M 或更低、 10^{-5}M 或更低、 10^{-6}M 或更低、 10^{-7}M 或更低、 10^{-8}M 或更低、 10^{-9}M 或更低、 10^{-10}M 或更低、 10^{-11}M 或更低、 10^{-12}M 或更低中的任一个或KD在 10^{-4}M 至 10^{-6}M 或 10^{-6}M 至 10^{-10}M 或 10^{-7}M 至 10^{-9}M 范围内的分子来表现。如本领域技术人员将理解,亲和力和KD值是逆相关的。对于抗原的高亲和力通过低KD值来测量。在一个实施方案中,术语“特异性结合”是指其中分子结合至特定多肽或特定多肽上的表位而基本上不与任何其他多肽或多肽表位结合的结合。

[0111] 术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。本文中的术语“抗体”是以最广泛意义使用并且具体而言涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)(包括自至少两种完整抗体形成的那些多特异性抗体)和抗体片段,只要其表现出期望生物活性即可。

[0112] “天然抗体”通常为约150,000道尔顿(Dalton)的异四聚体糖蛋白,其由两条相同轻(“L”)链和两条相同重(“H”)链构成。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而在不同免疫球蛋白同种型的重链中二硫键联的数目各不相同。每条重链和轻链还具有规则地间隔开的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),之后为多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L)并且在其另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。特定氨基酸残基被认为在轻链与重链可变结构域之间形成界面。

[0113] 关于不同类别抗体的结构和性质,参见(例如)Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites、Abba I.Terr和Tristram G.Parslow(编辑),Appleton&Lange, Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。

[0114] 基于来自任何脊椎动物物种的轻链恒定结构域的氨基酸序列,可将轻链指派为两种明显不同类型(称为卡帕(“ κ ”)和拉姆达(“ λ ”))之一。根据免疫球蛋白重链(CH)恒定结构域的氨基酸序列,可将其指派为不同类别或同种型。存在五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其重链分别指定为阿尔法(“ α ”)、德尔塔(“ δ ”)、伊蒲赛龙(“ ϵ ”)、伽马(“ γ ”)和缪(“ μ ”)。基于CH序列和功能的相对较小差异将 γ 和 α 类别进一步划分成亚类(同种型),例如,人类表达以下亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构形众所周知,并且通常描述于(例如)Abbas等人,Cellular and Molecular Immunology,第4版(W.B.SaundersCo.,2000)中。

[0115] 抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)的“可变区”或“可变结构域”是指所述抗体的

重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别称为“V_H”和“V_L”。这些结构域通常是抗体的最可变部分(相对于相同类别的其他抗体)并含有抗原结合位点。

[0116] 术语“可变”是指如下事实:抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)之间可变结构域的某些区段的序列差异极大。可变结构域介导抗原结合并定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,可变性在整个可变结构域跨度中并非均匀分布。相反,其在轻链和重链可变结构域两者中均集中于三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个由三个HVR连结的FR区,其主要采用 β 折叠构形,所述HVR形成连结 β 折叠结构的环并在一些情况下形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的HVR通过FR区保持紧密靠近在一起,并且与来自另一条链的HVR一起促进形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第5版,National Institute of Health,Bethesda,MD(1991))。恒定结构域并不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,诸如使抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0117] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同源的抗体群体获得的抗体(诸如本公开的单克隆抗MS4A4A抗体),即,除可以极少量存在的可能的天然突变和/或翻译后修饰(例如,异构化、酰胺化等)以外,构成所述群体的个别抗体均相同。单克隆抗体具有高度特异性,其针对单一抗原位点。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相比,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除特异性以外,单克隆抗体的优势还在于其通过杂交瘤培养物合成,不受其他免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体的特征在于从基本上同源的抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法来产生所述抗体。例如,根据本公开使用的单克隆抗体可通过多种技术制得,包括(例如)杂交瘤方法、重组DNA方法和用于在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中产生人抗体或人样抗体的技术。

[0118] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用以指与抗体片段相对的呈其基本上完整形式的抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)。具体地说,全抗体包括具有重链和轻链且包括Fc区的那些抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可具有一种或多种效应子功能。

[0119] “抗体片段”是指与完整抗体不同的包含完整抗体的一部分的分子,所述部分结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利5641870,实施例2;Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0120] 抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)的木瓜蛋白酶消化产生两个相同抗原结合片段(称为“Fab”片段)和一个残余“Fc”片段,其命名反映容易结晶的能力。Fab片段由整个轻链以及重链的可变区结构域(V_H)和一条重链的第一恒定结构域(C_H1)组成。每个Fab片段就抗原结合而言均是单价的,即其具有单一抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单一大F(ab')₂片段,所述片段大致对应于两个二硫键连接的具有不同抗原结合活性的Fab片段,并且仍然能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在C_H1结构域的羧基末端具有几个额外残基,所述残基包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。在本文中,Fab'-SH是恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基带有游离硫醇基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生的。还已知抗体片段的其他化学偶

联。

[0121] Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两条重链的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列确定,所述区域也被某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0122] 抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)的“功能片段”包含完整抗体的一部分,所述部分通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区或抗体中保留或具有改进的FcR结合能力的Fc区。抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0123] 术语“双抗体”是指通过以下方式制备的小抗体片段:用 V_H 与 V_L 结构域之间的短接头(约5-10个残基)构建sFv片段(参见前述段落),使得实现可变结构域的链间而非链内配对,因此产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的 V_H 和 V_L 结构域存在于不同多肽链上。

[0124] 如本文所用,“嵌合抗体”是指其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而所述链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源的抗体(免疫球蛋白)(诸如本公开的嵌合抗MS4A4A抗体),以及此类抗体的片段,只要其展现期望生物活性即可。本文所关注的嵌合抗体包括PRIMATIZED[®]抗体,其中抗体的抗原结合区是来源于通过(例如)用所关注抗原对猕猴实施免疫所产生的抗体。如本文所用,“人源化抗体”是作为“嵌合抗体”的子集使用。

[0125] 非人(例如鼠类)抗体的“人源化”形式(诸如本公开的抗MS4A4A抗体的人源化形式)是包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、并且通常两个可变结构域,其中全部或基本上全部的每个HVR(例如CDR)对应于非人抗体的那些HVR(例如CDR),并且全部或基本上全部的每个FR对应于人抗体的那些FR。人源化抗体任选地可包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经历人源化的抗体。

[0126] “人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或使用如本文所公开的用于制备人抗体的技术中的任一种制备的抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)。人抗体的此定义明确地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的各种技术来产生,所述技术包括噬菌体展示文库和酵母展示文库。人抗体可通过将抗原施用于转基因动物(例如免疫的异种小鼠(xenomice))来制备,所述动物已被修饰以响应抗原攻击产生此类抗体,但其内源性基因座已失能,以及经由人B细胞杂交瘤技术来产生。

[0127] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在本文中使用时是指抗体可变结构域(诸如本公开的抗MS4A4A抗体的可变结构域)中在序列上超变和/或形成结构上所定义环的区。通常,抗体包含六个HVR;三个在 V_H 中(H1、H2、H3),并且三个在 V_L 中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3展示六个HVR的大部分多样性,并且据信尤其H3在赋予抗体良好特异性方面具有独特作用。仅由重链组成的天然骆驼科动物抗体在不存在轻链的情况下具有功能性且稳定。

[0128] 本文使用并且涵盖诸多对HVR的描述。在一些实施方案中,HVR可以是基于序列可变性的Kabat互补决定区(CDR)并且最为常用(Kabat等人,同上)。在一些实施方案中,HVR可以是Chothia CDR。而Chothia是指结构性环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。在一些实施方案中,HVR可以是AbM HVR。AbM HVR代表Kabat CDR与Chothia结

构性环之间的折衷,并且用于Oxford Molecular的AbM抗体建模软件中。在一些实施方案中,HVR可以是“接触”HVR。“接触”HVR是基于对可获得的复杂晶体结构的分析。来自这些HVR中的每一个的残基如下所示。

	环	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
[0129]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0130] HVR可包含如下“延伸HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3)以及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(优选实施方案)(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些延伸HVR定义中的每一个,根据Kabat等人(同上)对可变结构域残基进行编号。

[0131] “框架”或“FR”残基是除如本文所定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0132] 如本文所用的“受者人框架”是包含来源于人免疫球蛋白框架或人共有框架的V_L或V_H框架的氨基酸序列的框架。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受者人框架可包含其相同氨基酸序列,或其可包含先前存在的氨基酸序列变化。在一些实施方案中,先前存在的氨基酸变化的数目为10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小或2或更小。在VH中存在先前存在的氨基酸变化时,那些变化优选仅发生在位置71H、73H和78H中的三个、两个或一个处;例如,那些位置处的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一个实施方案中,VL受者人框架的序列与V_L人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0133] “人共有框架”是代表在人免疫球蛋白V_L或V_H框架序列的选择中最常见氨基酸残基的框架。通常,人类免疫球蛋白V_L或V_H框架序列的选择是来自可变结构域序列的亚组。通常,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中的亚组。实例包括,对于V_L而言,亚组可以是如Kabat等人(同上)中的亚组κI、κII、κIII或κIV。另外,对于V_H而言,亚组可以是如Kabat等人(同上)中的亚组I、亚组II或亚组III。

[0134] 在(例如)本公开的抗MS4A4A抗体的指定位置处的“氨基酸修饰”是指指定残基的取代或缺失,或邻近指定残基的至少一个氨基酸残基的插入。“邻近”指定残基意指在其一至两个残基内插入。插入可在指定残基的N末端或C末端进行。本文的优选氨基酸修饰是取代。

[0135] “亲和力成熟”抗体(诸如本公开的亲和力成熟的抗MS4A4A抗体)是在其一个或多个HVR中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲代抗体相比,所述改变使得所述抗体对抗原的亲和力有所改善。在一个实施方案中,亲和力成熟抗体对靶抗原具有纳摩尔级或甚至皮摩尔级亲和力。亲和力成熟抗体是通过本领域已知的程序产生的。例如,Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992)描述通过V_H和V_L结构域改组的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变描述于(例如):Barbas等人,Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:

3809-3813 (1994); Schier等人, Gene 169:147-155 (1995); Yelton等人, J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson等人, J. Immunol. 154 (7): 3310-9 (1995); 和Hawkins等人, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

[0136] “Fv”是包含完全抗原识别和结合位点的最小抗体片段。此片段由一个重链可变区结构域与一个轻链可变区结构域呈紧密非共价缔合形式的二聚体组成。从这两个结构域的折叠产生6个超变环(从H链和L链各自产生3个环),所述超变环贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个对抗原具有特异性的HVR)具有识别并结合抗原的能力,但其亲和力低于整个结合位点。

[0137] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,其是包含连结成单一多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽还包含在V_H与V_L结构域之间的多肽接头,其使sFv能够形成所期望的抗原结合结构。

[0138] 抗体“效应子功能”是指可归因于抗体Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性,并且其随抗体同种型而变化。

[0139] 术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,其包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能有所变化,但通常将人IgG重链Fc区定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸至其羧基末端。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可在(例如)抗体的产生或纯化期间或通过重组工程改造编码抗体重链的核酸来去除。因此,完整抗体的组成可包含去除全部K447残基的抗体群体、未去除K447残基的抗体群体和具有含有和不含K447残基的抗体混合物的抗体群体。用于本公开的抗体中的合适天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

[0140] “天然序列Fc区”包含与自然界中所发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A和A异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然变体。

[0141] “变体Fc区”包含因至少一个氨基酸修饰、优选地一个或多个氨基酸取代而与天然序列Fc区不同的氨基酸序列。优选地,变体Fc区与天然序列Fc区相比或与亲代多肽的Fc区相比具有至少一个氨基酸取代,例如天然序列Fc区或亲代多肽的Fc区中的约一个至约十个氨基酸取代,并且优选地约一个至约五个氨基酸取代。本文中的变体Fc区优选将与天然序列Fc区和/或与亲代多肽的Fc区具有至少约80%同源性,并且最优选与其具有至少约90%同源性,更优选与其具有至少约95%同源性。

[0142] “Fc受体”或“FcR”描述结合至抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体)并包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,其包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式,Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“活化性受体”)和Fc γ RIIB(“抑制性受体”),两者具有主要在其细胞质结构域上有所不同的类似氨基酸序列。活化性受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(“ITAM”)。抑制性受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(“ITIM”)。本文的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括在将来鉴定的那些FcR。FcR还可延长抗体的血清半衰期。

[0143] 如本文所用,关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”是指在比对序列并引入空位(若需要)以实现最大序列同一性百分比后,并且不将任何

保守性取代视为序列同一性的一部分,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的,比对可以本领域技术范围内的各种方式来实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括本领域已知的在所比较序列的全长范围内实现最大比对所需要的任何算法。

[0144] 术语“竞争”在竞争相同表位的抗体(例如中和性抗体)的情形下使用时意指如通过测定所确定的抗体之间的竞争,在所述测定中所测试抗体防止或抑制(例如降低)参考分子(例如配体或参考抗体)与常见抗原(例如MS4A4A或其片段)的特异性结合。可使用多种类型的竞争性结合测定来确定抗体是否彼此竞争,例如:固相直接或间接放射性免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心式竞争测定(参见例如Stahli等人,1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Kirkland等人,1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619);固相直接标记的测定、固相直接标记的夹心式测定(参见例如Harlow和Lane,1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见例如Morel等人,1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Cheung等人,1990, *Virology* 176:546-552);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82)。典型地,此类分析涉及使用结合至载有这些未经标记的测试抗体和标记的参考抗体中的任一种的固体表面或细胞的纯化抗原。通过测定在测试抗体存在的情况下结合至固体表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗体过量存在。通过竞争测定鉴定的抗体(竞争性抗体)包括与参考抗体结合至相同的表位的抗体和因出现位阻而结合至与参考抗体所结合表位足够接近的邻近表位的抗体。关于测定竞争性结合的方法的其他细节提供于本文实例中。通常,当竞争性抗体过量存在时,其将使参考抗体与常见抗原的特异性结合抑制(例如降低)至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97.5%和/或接近100%。

[0145] 如本文所用,MS4A4A多肽与第二多肽之间的“相互作用”涵盖(但不限于)蛋白质-蛋白质相互作用、物理相互作用、化学相互作用、结合、共价结合和离子结合。如本文所用,当抗体破坏、降低或完全消除两种多肽之间的相互作用时,所述抗体“抑制所述两种多肽之间的相互作用”。当本公开的抗体结合至两种多肽之一时,所述抗体“抑制所述两种多肽之间的相互作用”。在一些实施方案中,可使相互作用抑制至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97.5%和/或接近100%中的任一个。

[0146] 术语“表位”包括能够由抗体结合的任一决定簇。表位是抗原中由靶向所述抗原的抗体结合的区域,并且当抗原是多肽时,其包括直接接触抗体的特定氨基酸。大多数情况下,表位位于多肽上,但在一些情况下可位于其他种类的分子(诸如核酸)上。表位决定簇可包括分子的化学活性表面基团(诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基),并且可具有特定三维结构特征和/或特定电荷特征。通常,对特定靶抗原具有特异性的抗体将优先识别多肽和/或大分子的复杂混合物中的靶抗原上的表位。

[0147] “激动剂”抗体或“活化性”抗体是如下抗体:在所述抗体结合抗原后诱导(例如增加)抗原的一种或多种活性或功能。

[0148] “拮抗剂”抗体或“阻断性”抗体或“抑制性”抗体是如下抗体:在所述抗体结合抗原

后降低、抑制和/或消除(例如减少)抗原与一种或多种配体的结合和/或在所述抗体结合抗原后降低、抑制和/或消除(例如减少)抗原的一种或多种活性或功能。在一些实施方案中,拮抗剂抗体或阻断性抗体或抑制性抗体基本上或完全抑制抗原与一种或多种配体的结合和/或抗原的一种或多种活性或功能。

[0149] “分离”抗体(诸如本公开的分离的抗MS4A4A抗体)是已从其产生环境的组分(例如天然或重组)鉴定、分离和/或回收而来的抗体。优选地,分离抗体不与来自其产生环境的所有其他污染性组分缔合。来自分离抗体产生环境的污染性组分(诸如由重组转染细胞产生的那些组分)是通常将干扰抗体的研究、诊断或治疗用途的材料,并且可包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质性溶质。在优选实施方案中,将抗体纯化至以下程度:(1)如通过(例如)Lowry方法所测定按重量计大于95%的抗体,并且在一些实施方案中按重量计大于99%;(2)通过使用转杯式测序仪足以获得至少15个N末端或内部氨基酸序列残基的程度,或(3)通过SDS-PAGE在非还原或还原条件下使用考马斯蓝(Coomassie blue)或优选银染色的均质性。分离抗体包括重组T细胞内的原位抗体,因为抗体天然环境中的至少一种组分将不存在。然而,分离多肽或抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0150] 编码抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)的“分离”核酸分子是从其产生环境中通常与其缔合的至少一种污染性核酸分子鉴定并分离的核酸分子。优选地,分离核酸不与同产生环境相关的所有组分缔合。编码本文多肽和抗体的分离核酸分子的形式不同于其在自然界中所发现的形式或设置。因此,分离核酸分子区别于天然存在于细胞中的编码本文多肽和抗体的核酸。

[0151] 如本文所用的术语“载体”意图指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”,其是指其中可连接额外DNA区段的环形双链DNA。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体,其中可将额外DNA区段连接至病毒基因组中。某些载体能够在已引入其的宿主细胞中进行自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如非附加型哺乳动物载体)可在引入至宿主细胞中时整合至所述宿主细胞的基因组中,并且因此随宿主基因组一同复制。此外,某些载体能够引导与其可操作连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简称“表达载体”。一般而言,在重组DNA技术中有用的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中,“质粒”与“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。

[0152] 如本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物或任何可通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应掺入至聚合物中的底物。

[0153] “宿主细胞”包括可成为或已成为载体接受者的个别细胞或细胞培养物,所述载体用于掺入多核苷酸插入物。宿主细胞包括单一宿主细胞的子代,并且子代可由于天然、偶然或特意突变而未必与原始亲代细胞完全相同(在形态上或在基因组DNA互补上)。宿主细胞包括在体内经本公开的多核苷酸转染的细胞。

[0154] 如本文所用的术语“膜TREM2”、“质膜TREM2”和“细胞表面TREM2”可互换使用。

[0155] 如本文所用的“载剂”包括在所采用剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。

[0156] 如本文所用,术语“预防”包括提供关于个体的特定疾病、病症或疾患的发生或复

发的预防。个体可倾向于、易于患特定疾病、病症或疾患,或处于发展出此类疾病、病症或疾患的风险下,但尚未诊断出患有所述疾病、病症或疾患。

[0157] 如本文所用,处于发展出特定疾病、病症或疾患“风险下”的个体可患有或不患有可检测到的疾病或疾病症状,并且可在本文所述的治疗方法之前可能已展示或可能尚未展示可检测到的疾病或疾病症状。如本领域所已知,“处于风险下”表示个体具有一种或多种风险因素,所述风险因素是与特定疾病、病症或疾患的发展相关的可测量参数。具有所述风险因素中的一种或多种的个体发展出特定疾病、病症或疾患的概率高于不具有所述风险因素中的一种或多种的个体。

[0158] 如本文所用,术语“治疗”是指设计来改变所治疗个体在临床病理进程期间的自然进程的临床干预。期望治疗效果包括降低特定疾病、病症或疾患的进展速率、改善或减轻其病理状态和缓解或改善其预后。例如,如果一种或多种与特定疾病、病症或疾患相关的症状得到缓和或消除,则个体被成功地“治疗”。

[0159] “有效量”是指至少在所需剂量下和在所需时间段内有效实现期望治疗或预防结果的量。有效量可以一次或多次施用来提供。本文的有效量可根据诸如以下的因素而有所变化:疾病状态、个体的年龄、性别和体重以及治疗在个体内引发期望反应的能力。有效量也是治疗有益效果胜过治疗的任何毒性或有害效果的量。对于预防性使用而言,有益或期望结果包括诸如消除或降低疾病的风险、减轻其严重程度或延迟其发作的结果,所述疾病包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、在疾病发展期间呈现的其并发症和中间病理表型。对于治疗性使用而言,有益或期望结果包括诸如以下的临床结果:诸如经由靶向、延迟疾病的进展和/或延长存活来减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患病者的生活品质、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量、增强另一种药物的效果。药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接地实现预防性或治疗性治疗的量。如在临床情形下所理解,药物、化合物或药物组合物的有效量可与另一种药物、化合物或药物组合物联合实现或可不与其联合实现。因此,可认为“有效量”是在施用一种或多种治疗剂的情形下进行,并且如果联合一种或多种其他剂可实现或实现期望结果,则可认为单一剂以有效量给予。

[0160] 出于治疗、预防或降低风险目的的“个体”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人类、家养和农场动物以及动物园动物、竞技动物或宠物,诸如狗、马、兔、牛、猪、仓鼠、沙鼠、小鼠、雪貂、大鼠、猫等。在一些实施方案中,个体是人。

[0161] 如本文所用,与另一种化合物或组合物“联合”施用包括同时施用和/或在不同时间施用。联合施用还涵盖作为共制剂施用或作为分开的组合物施用,包括以不同给药频率或间隔和使用相同施用途径或不同施用途径施用。在一些实施方案中,联合施用是作为相同治疗方案的一部分的施用。

[0162] 如本文所用的术语“约”是指本领域技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。在本文中提及“约”一个值或参数包括(并描述)涉及所述值或参数本身的实施方案。

[0163] 除非上下文另外明确地指定,否则如本文和所附权利要求中所用,单数形式“(a、an)”和“所述(the)”包括复数指示物。例如,对“抗体”的提及是对一个至许多个抗体的提及,诸如摩尔量,并且包括本领域技术人员已知的其等效量等。

[0164] 应理解,本文所述的本公开的方面和实施方案包括“包含”方面和实施方案、“由其组成”和“基本上由其组成”。

[0165] II. 抗MS4A4A抗体

[0166] 本文提供抗MS4A4A抗体。本文所提供的抗体可用于(例如)诊断或治疗MS4A4A相关的病症。

[0167] 在一个方面,本公开提供结合至本公开的MS4A4A蛋白内的表位的分离(例如单克隆)抗体。本公开的MS4A4A蛋白包括(但不限于)哺乳动物MS4A4A蛋白、人MS4A4A蛋白、小鼠MS4A4A蛋白和食蟹猴MS4A4A蛋白。本公开的MS4A4A蛋白包括MS4A4A的天然变体。

[0168] 人MS4A4A是编码膜糖蛋白的239个氨基酸的蛋白质。人MS4A4A的氨基酸序列示于SEQ ID NO:1中:

[0169] MHQTYSRHCRPEESTFSAAMTTMQGMEQAMPGAGPGVPLGNMAVIHSHLWKGLQEKFLKGEPKVLGVV
QILTALMSLSMGITMMCMASNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIIISGSLAAGIRTTKGLVRGSLGMNITSSVLAAS
GILINTFSLAFYSFHHPYCNYYGNSNNCHGTMSILMGLDGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFGCKVLCCTPGGVVLIILPS
HSHMAETASPTPLNEV

[0170] 另外,小鼠MS4A4A的氨基酸序列示于SEQ ID NO:2中:

[0171] MLVIQGTQSALEAGYGAQQNGQPLYVNSHSHWKRMTKFLKGEPKILGIVQIVIAIMNLSIGIMMIAT
VSTGEIPPSSVYIGYPIWGSVMFIIISGFSIVAGRRTKGLVRSSLGGLNITSSVFAFSGIVISSLSPGIYSFHVYYC
TYRGSSEGCMTLSILMGLDIVVVVLSVLEFCIGVSLSAFGCRMCCNPGGVMIMPSPNPKAETANPVTLSGLMP
PEHQERNVPENMH

[0172] 另外,食蟹猴(cynomolgus, cyno)MS4A4A的氨基酸序列示于SEQ ID NO:3中:

[0173] HQTYYRHRPEESTFSAAMTTMQGMEQATPGAGPGVPLGNMAVVHSHLWKGLQEKFLKGEPKVLGVVQ
ILIALMSLSMGITMMCVAFSAYGHYPISVYIGYTIWGSVMFIIISGSLAAGIRTTKGLVRGSLGMNITSSVLAUSA
ILINTISLTIYSFYHRYCNYYGNPNCHGTVSILMGMGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFGCKAICCTPGGVVLIIPSN
SHMAEAAPLTPPLNEV

[0174] 在一些实施方案中,MS4A4A在细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在髓系细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在脑细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在星形胶质细胞,包括(但不限于)成熟星形胶质细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在少突胶质细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在小神经胶质细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在免疫细胞中表达,所述免疫细胞包括(但不限于)巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞和T细胞。在一些实施方案中,MS4A4A在嗅细胞中表达。在一些实施方案中,MS4A4A在细胞表面上表达。

[0175] 本公开的MS4A4A蛋白包括若干个结构域,包括(但不限于)细胞质结构域(人MS4A4A的氨基酸残基1-64;参见SEQ ID NO:1);跨膜结构域(人MS4A4A的氨基酸残基65-85);细胞外结构域(细胞外结构域1;ECL1),其对应于人MS4A4A的氨基酸残基86-98;跨膜结构域(人MS4A4A的氨基酸残基99-119);细胞质结构域(人MS4A4A的氨基酸残基120-137);跨膜结构域(人MS4A4A的氨基酸残基138-158);细胞外结构域(细胞外结构域2;ECL2),其对应于氨基酸残基159-179;跨膜结构域(人MS4A4A的氨基酸残基180-200);和细胞质结构域(人MS4A4A的氨基酸残基201-239)。另外,本公开的MS4A4A蛋白在多种组织和细胞中表达,包括(但不限于)脑、神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、血管周细胞、周细胞等。

[0176] MS4A4A在巨噬细胞和小神经胶质细胞功能中的作用

[0177] 中枢神经系统(CNS)的巨噬细胞和髓系细胞(诸如小神经胶质细胞)在其表型和功

能中具有固有的可塑性。可将体外巨噬细胞划分成M1巨噬细胞和M2巨噬细胞,其具有不同的吞噬和炎症潜能、表型和活性。例如,在外周器官中,认为具有M1表型的巨噬细胞具有促炎性和抗微生物表型和功能,而认为具有M2表型的巨噬细胞处于更稳定的状态,具有抗炎性表型和功能。

[0178] 与M1标记物(例如CD16、II类MHC、CD86)相比,与健康稳态状况相关的小神经胶质细胞在其细胞表面表达更多的M2标记物(例如CD200R、CD163和CD115)(Ginhoux和Prinz, 2015, Cold Spring Harb Perspect Biol, 7:a020537)。然而,在阿尔茨海默氏病小鼠模型和人阿尔茨海默氏病两者中,疾病相关的小神经胶质细胞(DAM)均处于促炎性或活化状态。处于促炎性或活化状态的疾病相关的小神经胶质细胞由于在减少与阿尔茨海默氏病和其他神经退行性病症相关的病理中发挥积极作用而视为有益的。

[0179] MS4A4A表达在体外M2巨噬细胞中升高,并且已表明MS4A4A是M2巨噬细胞的新型细胞表面标记物。另外,也已证明MS4A4A在肥大细胞上调cKit的细胞表面转运,这表明MS4A4A在调节肥大细胞脱粒和存活中的作用(Cruse等人, 2015, Molecular Biol Cell, 26: 1711-1727)。综上所述,这些所报导的发现表明,靶向MS4A4A可影响与M1和M2巨噬细胞表型相关的各种巨噬细胞表面受体的再循环、表达和/或降解,因此影响其功能和活性。

[0180] 本公开的抗MS4A4A抗体影响M2巨噬细胞表面标记物的表达。特定而言,本公开的抗MS4A4A抗体降低巨噬细胞中CD200R、Dectin-1和CD163的细胞表面表达,此表明抗MS4A4A抗体通过降低M2巨噬细胞表面受体的表达而调节巨噬细胞极化、功能和/或活性。本公开的抗MS4A4A抗体减少M2巨噬细胞表面受体,这表明本公开的抗MS4A4A抗体有效地将小神经胶质细胞的生理状态改变成更具保护性表型的生理状态,诸如改变成更具促炎性或更活化的状态(例如改变成更偏M1的表型)。因此,本公开的抗MS4A4A抗体部分地通过将巨噬细胞和小神经胶质细胞的表型改变成促炎性和活化状态而可用于治疗阿尔茨海默氏病和其他神经退行性病症。

[0181] 本公开的抗MS4A4A抗体影响小神经胶质细胞的活化状态。本公开的抗MS4A4A抗体在体内增加与小神经胶质细胞活化(例如C型凝集素结构域家族7成员A(CLEC7A))、小神经胶质细胞迁移(例如肌醇1,4,5-三磷酸受体2(ITPR2))和小神经胶质细胞增殖(例如抗原KI-67(MKI67))相关的蛋白质的mRNA水平。另外,本公开的抗MS4A4A抗体增加小神经胶质细胞活化标记物IL1RN、SPP1和PLCG2的mRNA水平。本公开的抗MS4A4A抗体还减少稳态小神经胶质细胞标记物嘌呤能受体P2RY12和CX3C趋化因子受体1(CX3CR1)的mRNA水平。因此,如通过与小神经胶质细胞活化、迁移和增殖相关的蛋白质的各种mRNA水平增加和与小神经胶质细胞稳态相关的蛋白质的各种mRNA水平减少所证明,本公开的抗MS4A4A抗体在体内有效地使小神经胶质细胞活化。

[0182] MS4A4A和TREM2表达

[0183] 神经退行性疾病的特征部分地在于中枢神经系统(CNS)中的免疫功能缺陷。例如,认为CNS髓系细胞区室(包括但不限于小神经胶质细胞)的活力和功能的降低导致对诸如阿尔茨海默氏病的神经退行性病症的易感性。提高髓系细胞的活力和/或功能的药理学介入将提供有效治疗以改善此类神经退行性病症和病症的发作、严重程度或进展。

[0184] 在髓系细胞上表达的触发受体-2(TREM2)是主要在髓系细胞上表达的免疫球蛋白样受体,所述髓系细胞是诸如巨噬细胞、树突细胞、单核细胞、皮肤的朗格汉斯细胞

(Langerhans cell)、库普弗细胞(Kupffer cell)、破骨细胞和小神经胶质细胞。在实验性自体免疫脑脊髓炎和阿尔茨海默氏病期间,TREM2在CNS中的小神经胶质细胞和浸润性巨噬细胞上高度表达(Piccio等人,2007,Eur J Immunol,37:1290-1301;Wang,2015,Cell,160:1061-1071)。TREM2通路视为CNS髓系细胞活力和功能的关键调节剂。

[0185] 来自人类遗传学研究的数据已表明MS4A4A与TREM2之间和与阿尔茨海默氏病易感性的密切遗传关联(Piccio等人,2016,Acta Neuropathol,131:925-9330)。具体地说,对于阿尔茨海默氏病有保护性的MS4A4A等位基因与患者脑脊液中的sTREM2水平增加相关。

[0186] 本发明的抗MS4A4A抗体增加巨噬细胞中的细胞ATP水平,这表明抗MA4A4A抗体有效增加、保持或增强细胞(例如巨噬细胞、髓系细胞、小神经胶质细胞)活力和功能。另外,与先前报导的可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12降低所培养人巨噬细胞上清液中的sTREM2水平相比,本发明的抗MS4A4A抗体增加巨噬细胞中的sTREM2和mTREM2水平(Deming等人,2018,bioRxiv,doi:dx doi org/10.1101/352179)。由于针对阿尔茨海默氏病的MS4A4A保护性等位基因与增加的sTREM2水平相关,因此本文所提供的结果表明,本发明的抗MS4A4A抗体通过增加sTREM2和mTREM2水平在诸如阿尔茨海默氏病的神经退行性疾病和病症中模拟或复制保护性表型。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中TREM2的细胞表面表达增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少75%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%或至少250%。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中的可溶性TREM2水平增加至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。

[0187] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体以约0.028 μ g/ml至约0.039 μ g/ml的EC50增加髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中的mTREM蛋白水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体以约0.025 μ g/ml至约0.069 μ g/ml的EC50增加髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中的sTREM蛋白水平。在其他实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体以约0.010 μ g/ml至约0.021 μ g/ml的EC50增加髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中的ATP水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中的ATP水平增加至在不存在抗MS4A4A抗体的情况下此类细胞中的ATP水平的约1.2倍、约1.4倍或约1.7倍。

[0188] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内(例如在非人灵长类动物中或人中)增加可溶性TREM2水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平从在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的基线可溶性TREM2水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少75%、至少90%、至少100%、至少125%或至少150%。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平从在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的基线可溶性TREM2水平增加约50%。

[0189] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平增加至在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的可溶性TREM2水平的至少1.1倍、至少1.2倍、至少1.3倍、至少1.4倍、至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍或至少2倍。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平增

加至在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的可溶性TREM2水平的约1.5倍。

[0190] 在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15、至少16天、至少17天、至少18天、至少19天或至少20天。在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少20天。在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少24小时、至少48小时、至少72小时、至少96小时、至少120小时、至少144小时、至少168小时、至少192小时、至少216小时、至少240小时、至少264小时、至少288小时、至少312小时、至少336小时、至少360小时、至少384小时、至少408小时、至少432小时、至少456小时或至少480小时。在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内血清中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内血清中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少480小时。

[0191] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平从在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的基线可溶性TREM2水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少75%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%、至少225%、至少250%、至少275%、至少300%、至少325%、至少350%、至少375%或至少400%。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平从在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的基线可溶性TREM2水平增加约300%。

[0192] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平增加至在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的可溶性TREM2水平的至少1.4倍、至少1.6倍、至少1.8倍、至少2.0倍、至少2.2倍、至少2.4倍、至少2.6倍、至少2.8倍、至少3.0倍、至少3.2倍、至少3.4倍、至少3.6倍、至少3.8倍或至少4.0倍。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平增加至在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的可溶性TREM2水平的约2倍至约4倍。

[0193] 在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少1天、至少2天、至少3天或至少4天。在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少4天。在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少24小时、至少48小时、至少72小时或至少96小时。在一些实施方案中,与在施用本公开的抗MS4A4A抗体之前体内CSF中的可溶性TREM2水平相比,本公开的抗MS4A4A抗体使体内CSF中的可溶性TREM2水平增加并且持续至少96小时。

[0194] 本文所提供的证据展示,本公开的抗MS4A4A抗体影响TREM2,但不排除经由其他通路起作用的抗体。

[0195] 拮抗剂抗体

[0196] 在一些实施方案中,结合MS4A4A蛋白的抗体可包括结合MS4A4A并且通过防止MS4A4A与其配体之间的相互作用或通过防止MS4A4A的信号在存在配体的情况下转导至细胞质中而抑制一种或多种MS4A4A活性的拮抗剂抗体。在一些实施方案中,本公开的拮抗剂抗体可具有本公开的激动剂抗体的表位特异性,但具有不能够结合Fc γ 受体的Fc结构域,因此无法(例如)使MS4A4A受体聚集。

[0197] 在一些实施方案中,本公开的抗体是拮抗剂抗体。在一些实施方案中,拮抗剂抗体抑制一种或多种MS4A4A活性。在一些实施方案中,拮抗剂抗体降低一种或多种MS4A4A依赖性基因的活性。在一些实施方案中,拮抗剂抗体抑制MS4A4A与一种或多种MS4A4A配体之间的相互作用。在一些实施方案中,拮抗剂抗体抑制MS4A4A信号转导。在一些实施方案中,拮抗剂抗体抑制MS4A4A与一种或多种MS4A4A配体之间的相互作用并抑制MS4A4A信号转导。

[0198] 在一些实施方案中,通过下调或降低细胞中的MS4A4A蛋白水平的抗MS4A4A抗体实现MS4A4A蛋白水平的下调或降低MS4A4A活性。在一些实施方案中,使用本领域技术人员已知且可获得的方法,通过下调MS4A4A核酸表达或水平(例如通过使用反义方法、基因疗法等)实现MS4A4A蛋白水平的下调或降低MS4A4A活性。因此,在一些实施方案中,利用本公开的抗MS4A4A抗体或通过降低MS4A4A核酸(例如mRNA)表达或水平实现降低MS4A4A蛋白水平或活性。

[0199] 在一些实施方案中,激动剂抗体功能需要抗体交联。抗体交联可通过在体外结合至二级抗体或通过体内结合至Fc受体而发生。例如,拮抗性抗体可在体外经由生物素/链霉抗生物素蛋白交联或二级抗体结合转化成激动性抗体(参见例如Gravestein等人,1996, *J. Exp. Med.* 184:675-685; Gravestein等人,1994, *International Immunol*, 7:551-557)。激动性抗体可通过模拟受体配体的生物活性或通过增强受体聚集来发挥其活性,因此使受体信号传导活化。在一些实施方案中,拮抗性抗体需要不存在抗体交联。拮抗性抗体可通过阻断受体-配体相互作用来发挥其活性。

[0200] 凝溶胶蛋白、骨桥蛋白和阿尔茨海默氏病保护性等位基因的表型模拟

[0201] MS4A基因簇中有三个SNP与迟发型阿尔茨海默氏病的风险增加相关。这些SNP包括MS4A4A中的rs4938933、MS4A4E中的rs670139和MS4A6A中的rs610932(Hollingworth等人,2011, *Nat Genetics*, 43:429-435; Naj等人,2011, *Nature Genetics*, 43:436-441; Antunez等人,2011, *Genome Medicine*, 3, 文章33)。另外,MS4A4A基因座SNP(rs2304933和rs2304935)与较高水平的MS4A4A和增加的阿尔茨海默氏病风险,包括迟发型阿尔茨海默氏病(LOAD)相关(Allen等人,2012, *Neurology*, 79:221-228)。

[0202] 已鉴定出与MS4A基因簇相关的阿尔茨海默氏病相关遗传变体(SNP)。那些变体等位基因之一是rs1582763,其与CSF sTREM2水平升高和阿尔茨海默氏病风险降低以及发病年龄延迟相关,并且因此视为保护性等位基因。(Deming等人,2018, bioRxiv, doi:dx.doi.org/10.1101/352179)。rs1582763保护性等位基因与血液中MS4A4AmRNA水平降低相关。所述发现进一步表明,rs1582763等位基因通过降低MS4A4A水平和减少阿尔茨海默氏病风险或严重程度起保护性作用。保护性rs1582763还与骨桥蛋白的表达水平增加和凝溶胶蛋白的水平增加相关。本发明的抗MS4A4A抗体至少就减少MS4A4A表达、增加骨桥蛋白表达、增加凝溶胶蛋白表达和/或增加sTREM水平而言有效地表型模拟保护性等位基因的所述方面。在本公开的一些方面,提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体表型模拟与阿尔茨海默氏病风险降

低和/或阿尔茨海默氏病的发病年龄延迟相关的MS4A4A的一个或多个等位基因。

[0203] 本公开的抗MS4A4A抗体增加人类外周血单核细胞源性巨噬细胞中的骨桥蛋白(SPP1)的mRNA水平并增加凝溶胶蛋白(GSN)的mRNA水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加凝溶胶蛋白的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%或至少250%。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞(例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞)中凝溶胶蛋白的mRNA和/或蛋白质水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%或至少250%。

[0204] 本公开的抗MS4A4A抗体增加非人灵长类动物中的骨桥蛋白(SSP1)水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内(例如在非人灵长类动物中或人中)增加骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加血清中和/或CSF中骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使血清中和/或CSF中骨桥蛋白的mRNA和/或蛋白质水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%或至少250%。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加脑中骨桥蛋白的蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加额叶皮质中和/或海马体中骨桥蛋白的蛋白质水平。

[0205] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体就增加骨桥蛋白和凝溶胶蛋白的表达而言表型模拟保护性rs1582763等位基因。在其他方面中,本公开的抗MS4A4A抗体有效地增加骨桥蛋白、凝溶胶蛋白和/或sTREM2的表达且在降低阿尔茨海默氏病风险和/或严重程度方面具有生物活性,此与保护性rs1582763等位基因类似。所述数据指示,SPP1和GSN是与rs158273等位基因相关的保护性生物活性的药效学标记物。

[0206] CSFR1和IL1RN表达

[0207] 本公开的抗MS4A4A抗体增加非人灵长类动物中的CSF1R水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体在体内(例如在非人灵长类动物中或人中)增加CSF1R的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加血清中和/或CSF中CSF1R的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体使血清中和/或CSF中CSF1R的mRNA和/或蛋白质水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%或至少250%。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加脑中CSF1R的蛋白质水平。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体增加额叶皮质中和/或海马体中CSF1R的蛋白质水平。

[0208] CSF1R缺乏会对脑中小神经胶质细胞的发育产生负面影响(Swerdlow等人(2000) *Neurology*, 111:300-311; Baba等人(2006) *Acta Neuropath*, 111:300-311),并且最近研究已将CSF1R基因中的突变与各种病症相关联,包括成人发作型脑白质病变伴轴突球样变和

色素性胶质细胞 (ALSP) 和遗传性弥漫性脑白质病变伴球样变 (HDLS) (Oosterhof 等人 (2019) *Am J Hum Genet*, 104:936-947; Rademaker 等人 (2011) *Nat Genet*, 44:200-205; Nicholson 等人 (2013) *Neurology*, 80:1033-1040)。本公开的抗MS4A4A抗体降低细胞死亡并在CSF1R抑制后维持人类巨噬细胞的存活。因此, 在一些实施方案中, 本公开的抗MS4A4A抗体可用于治疗患有诸如ALSP或HDLS的CSF1R缺乏疾病或病症的个体。

[0209] 本公开的抗MS4A4A抗体增加人外周血单核细胞源性巨噬细胞中的IL1RN水平。在一些实施方案中, 本公开的抗MS4A4A抗体增加IL1RN的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中, 本公开的抗MS4A4A抗体增加IL1RN的mRNA和/或蛋白质水平。在一些实施方案中, 本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞 (例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞) 中IL1RN的mRNA和/或蛋白质水平增加至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少100%、至少125%、至少150%、至少200%或至少250%。

[0210] GPNMB表达

[0211] GPNMB (糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B) 是在多种细胞类型 (包括组织巨噬细胞和小神经胶质细胞) 中表达的 表面糖蛋白。若干种遗传变体与帕金森氏病 (Parkinson's disease, PD) 风险相关。PD患者黑质中的GPNMB蛋白质水平升高, 并且在溶酶体应激后GPNMB水平增加 (Moloney 等人, 2018, *Neurobio Dis.* 120:1-11)。另外, GPNMB的表达增加与SNP rs199347相关, 此风险SNP位于GPNMB基因内 (Murthy 等人, *Neurogenetics*, 2017, 18:121-133)。

[0212] 本公开的抗MS4A4A抗体降低人原代巨噬细胞中的GPNMB细胞表面蛋白水平。在一些实施方案中, 本公开的抗MS4A4A抗体使髓系细胞 (例如巨噬细胞、人巨噬细胞、小神经胶质细胞) 中的GPNMB细胞表面蛋白水平降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%。由于GPNMB水平的增加与PD的风险等位基因相关, 因此添加抗MS4A4A抗体后GPNMB的减少可提供治疗PD的方式。

[0213] A. 示例性抗体和某些其他抗体实施方案

[0214] 在一些实施方案中, 本文提供抗MS4A4A抗体, 其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR: (a) HVR-H1, 其包含选自由SEQ ID NO:94、108、116、146、147、308和311组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:94、108、116、146、147、308和311组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸; (b) HVR-H2, 其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309和312组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309和312组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸; (c) HVR-H3, 其包含选自由SEQ ID NO:100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310和313组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310和313组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸; (d) HVR-L1, 其包含选自由SEQ ID NO:103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314和317组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314和317组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸; (e) HVR-L2, 其包含选自由SEQ ID NO:105、106、114、139、140、141、

142、143、160、161、315和318组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:105、106、114、139、140、141、142、143、160、161、315和318组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸；和(f)HVR-L3,其包含选自自由SEQ ID NO:107、115、144、145、163、316和319组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:107、115、144、145、163、316和319组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸。

[0215] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含选自自由SEQ ID NO:94和308组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:94和308组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸;(b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:96、97、98、99和309组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:96、97、98、99和309组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(c)HVR-H3,其包含选自自由SEQ ID NO:100、101、102和310组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:100、101、102和310组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(d)HVR-L1,其包含选自自由SEQ ID NO:103、104和314组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:103、104和314组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(e)HVR-L2,其包含选自自由SEQ ID NO:105、106和315组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:105、106和315组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;和(f)HVR-L3,其包含选自自由SEQ ID NO:107和316组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:107和316组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0216] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列或与SEQ ID NO:108的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列或与SEQ ID NO:112的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列或与SEQ ID NO:113的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列或与SEQ ID NO:114的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列或与SEQ ID NO:115的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸。

[0217] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列或与SEQ ID NO:116的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(c)HVR-H3,其包含选自自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(d)HVR-L1,其包含选自自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(e)HVR-L2,其包含选自自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨

氨酸具有至少约95%同源性的氨基酸;和(f)HVR-L3,其包含选自自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸。

[0218] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含选自自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列或与SEQ ID NO:154的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(d)HVR-L1,其包含选自自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;(e)HVR-L2,其包含选自自由SEQ ID NO:159、160和161组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:159、160和161组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸;和(f)HVR-L3,其包含选自自由SEQ ID NO:163组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:163组成的组的氨基酸具有至少约95%同源性的氨基酸。

[0219] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:97的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:103的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:106的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:96的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:102的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列;或(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:105的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列。

[0220] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:308的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:309的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:310的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:314的氨基酸序列;(e)HVR-

L2,其包含SEQ ID NO:315的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:316的氨基酸序列;或(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:311的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:312的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:313的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:317的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:318的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:319的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:110的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列;或(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:111的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

[0222] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:119的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:121的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:132的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:139的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:144的氨基酸序列;(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:118的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:133

ID NO:154的氨基酸序列；(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:158的氨基酸序列；(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:159的氨基酸序列；和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列。

[0224] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列或与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；(b)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98和99组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:96、97、98和99组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；和(c)HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:100、101和102组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:100、101和102组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0225] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:308的氨基酸序列或与SEQ ID NO:308的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:309的氨基酸序列或与SEQ ID NO:309的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:310的氨基酸序列或与SEQ ID NO:310的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:311的氨基酸序列或与SEQ ID NO:311的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:312的氨基酸序列或与SEQ ID No:312的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:313的氨基酸序列或与SEQ ID NO:313的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0227] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(a)HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:103和104组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:103和104组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；(b)HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105和106组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:105和106组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列或与SEQ ID NO:107的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0228] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(a)HVR-L1,其包含选自SEQ ID NO:314的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:314的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:315的氨基酸序列或与SEQ ID NO:315的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:316的氨基酸序列或与SEQ ID NO:316的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0229] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(a)HVR-L1,其包含选自SEQ ID NO:317的氨基酸序列或与选自SEQ ID NO:317的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:318的氨基酸序列或与SEQ ID NO:318的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列；和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:319的氨基酸序列或与SEQ ID NO:319的氨基酸序

列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列或与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii) HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98和99组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:96、97、98和99组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii) HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:100、101和102组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:100、101和102组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(i) HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:103和104组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:103和104组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii) HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105和106组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:105和106组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列或与SEQ ID NO:107的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0231] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:308的氨基酸序列或与SEQ ID NO:308的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:309的氨基酸或与SEQ ID NO:309的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:310的氨基酸序列或与SEQ ID NO:310的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(i) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:314的氨基酸序列或与SEQ ID NO:314的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:315的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:315的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:316的氨基酸序列或与SEQ ID NO:316的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0232] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(i) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:311的氨基酸序列或与SEQ ID NO:311的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:312的氨基酸或与SEQ ID NO:312的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:313的氨基酸序列或与SEQ ID NO:313的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(i) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:317的氨基酸序列或与SEQ ID NO:317的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:318的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:318的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:316的氨基酸序列或与SEQ ID NO:316的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0233] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(a) HVR-H1,其包含选自由SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30组成的组的氨基酸

序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; (b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列或与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0234] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列或与SEQ ID NO:113的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列或与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列或与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0235] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列或与SEQ ID NO:108的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列或与SEQ ID NO:112的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列或与SEQ ID NO:113的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列或与SEQ ID NO:114的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列或与SEQ ID NO:115的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0236] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列或与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(c)HVR-H3,其包含选自自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0237] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列:(a)HVR-L1,其包含选自自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含选自自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含选自自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0238] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,其包含至少一

个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列: (i) HVR-H1, 其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列或与SEQ ID NO:116的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, (ii) HVR-H2, 其包含选自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 和(iii) HVR-H3, 其包含选自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; 和(b) V_L 结构域, 其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列: (i) HVR-L1, 其包含选自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, (ii) HVR-L2, 其包含选自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 和(iii) HVR-L3, 其包含选自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0239] 在一些实施方案中, 本文提供抗MS4A4A抗体, 其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列: (a) HVR-H1, 其包含选自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; (b) HVR-H2, 其包含选自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; 和(c) HVR-H3, 其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列或与SEQ ID NO:154的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0240] 在一些实施方案中, 本文提供抗MS4A4A抗体, 其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列: (a) HVR-L1, 其包含选自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; (b) HVR-L2, 其包含选自由SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; 和(c) HVR-L3, 其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列或与SEQ ID NO:163的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0241] 在一些实施方案中, 本文提供抗MS4A4A抗体, 其包含(a) V_H 结构域, 其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_H HVR序列: (i) HVR-H1, 其包含选自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, (ii) HVR-H2, 其包含选自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, 和(iii) HVR-H3, 其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列或与SEQ ID NO:154的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列; 和(b) V_L 结构域, 其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下的 V_L HVR序列: (i) HVR-L1, 其包含选自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列或与选自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列, (ii) HVR-L2, 其包含选

自由SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列或与选自自由SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列或与SEQ ID NO:163的氨基酸序列具有至少约95%同源性的氨基酸序列。

[0242] 在另一个方面,抗MS4A4A抗体包含与选自自由SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、24、25、26、27、28、29、30、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、76、77、78、79、80、81、82、83、84、304和306组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(V_H)序列。在某些实施方案中,与选自自由SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、24、25、26、27、28、29、30、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、76、77、78、79、80、81、82、83、84、304和306组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_H 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、24、25、26、27、28、29、30、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、76、77、78、79、80、81、82、83、84、304或306中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、24、25、26、27、28、29、30、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、76、77、78、79、80、81、82、83、84、304或306中,总计1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、24、25、26、27、28、29、30、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、76、77、78、79、80、81、82、83、84、304或306的 V_H 序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中, V_H 包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含选自自由SEQ ID NO:94、108、116、146、147和308以及311组成的组的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含选自自由SEQ ID NO:96、97、98、99、110、111、118、119、120、121、122、149、150、151、152、153、309和312组成的组的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含选自自由SEQ ID NO:100、101、102、112、123、124、125、126、127、128、129、154、310和313组成的组的氨基酸序列。

[0243] 在另一个方面,提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体包含与选自自由SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、32、33、34、35、36、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、86、87、88、89、90、91、92、93、305和307组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(V_L)。在某些实施方案中,与选自自由SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、32、33、34、35、36、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、86、87、88、89、90、91、92、93、305和307组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_L 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、32、33、34、35、36、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、86、87、88、89、90、91、92、93、305或307中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、32、33、34、35、36、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、86、87、88、89、90、91、92、93、305或307中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺

失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、32、33、34、35、36、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、86、87、88、89、90、91、92、93、305或307的V_L序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中,V_L包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a)HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:103、104、113、130、131、132、133、134、135、136、137、138、156、157、158、314和317组成的组的氨基酸序列,(b)HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105、106、114、139、140、141、142、143、160、161、315和318组成的组的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:107、115、144、145、163、316和319组成的组的氨基酸序列。

[0244] 在一些实施方案中,提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体包含如上文所提供任一实施方案中的V_H和如上文所提供任一实施方案中的V_L。在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体包含如上文所提供任一实施方案中的V_H和如上文所提供任一实施方案中的V_L。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:5-15和SEQ ID NO:17-22中的V_H和V_L序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:24-30和SEQ ID NO:32-36中的V_H和V_L序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:40-53和SEQ ID NO:55-74中的V_H和V_L序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:76-84和SEQ ID NO:86-93中的V_H和V_L序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:304和SEQ ID NO:305中的V_H和V_L序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:306和SEQ ID NO:307中的V_H和V_L序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0245] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L),其中所述V_H和所述V_L选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:122的氨基酸序列的V_L;包含SEQ ID NO:304的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:305的氨基酸序列的V_L;以及包含SEQ ID NO:306的氨基酸序列的V_H和包含SEQ ID NO:307的氨基酸序列的V_L。

[0246] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L),其中所述V_H和所述V_L选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:24的氨基酸序

列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的 V_L ;以及包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的 V_L 。

[0247] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L),其中所述 V_H 和所述 V_L 选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:57的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:60的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:46的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:61的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:63的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:68的

氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:70的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:72的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:48的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:69的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:55的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:49的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:73的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:52的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:64的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列的 V_L ;以及包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的 V_L 。

[0248] 在一些实施方案中,本文提供抗MS4A4A抗体,其包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L),其中所述 V_H 和所述 V_L 选自由以下组成的组:包含SEQ ID NO:76的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:88的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:90的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:81的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的 V_L ;包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列的 V_L ;以及包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列的 V_H 和包含SEQ ID NO:93的氨基酸序列的 V_L 。

[0249] 在另一个方面,抗MS4A4A抗体包含与选自由SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304和306组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(V_H)序列。在某些实施方案中,与选自由SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304和306组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_H 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304或

306中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304或306中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、304或306的V_H序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中,V_H包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a) HVR-H1,其包含选自由SEQ ID NO:94和308组成的组的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98、99和309组成的组的氨基酸序列,和(c) HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:100、101、102和310组成的组的氨基酸序列。

[0250] 在另一个方面,提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体包含与选自由SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、305和307组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(V_L)。在某些实施方案中,与选自由SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、305和307组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的V_L序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、305或307中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、305或307中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:17、18、19、20、21、22、305或307的V_L序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中,V_L包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a) HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:103、104和314组成的组的氨基酸序列,(b) HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105、106和315组成的组的氨基酸序列,和(c) HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:107和316组成的组的氨基酸序列。

[0251] 在另一个方面,抗MS4A4A抗体包含与选自由SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(V_H)序列。在某些实施方案中,与选自由SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29和30组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的V_H序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29或30中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29或30中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:24、25、26、27、28、29或30的V_H序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中,V_H包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列,(b) HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列,和(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列。

[0252] 在另一个方面,提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体包含与选自由SEQ ID NO:32、33、34、35和36组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(V_L)。在某些实施方案中,与选自由

SEQ ID NO:32、33、34、35和36组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_L 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:32、33、34、35或36中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:32、33、34、35或36中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:32、33、34、35或36的 V_L 序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中, V_L 包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列,(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列。

[0253] 在另一个方面,抗MS4A4A抗体包含与选自由SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52和53组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(V_H)序列。在某些实施方案中,与选自由SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52和53组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_H 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52或53的 V_H 序列,包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中, V_H 包含一个、两个或三个选自以下的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列。

[0254] 在另一个方面,提供抗MS4A4A抗体,其中所述抗体包含与选自由SEQ ID NO:55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73和74组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(V_L)。在某些实施方案中,与选自由SEQ ID NO:55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73和74组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_L 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在一些实施方案中,在SEQ ID NO:55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73或74中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73或74中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73或74的 V_L 序列,包括所述序列的翻译后修

饰。在特定实施方案中， V_L 包含一个、两个或三个选自以下的HVR：(a)HVR-L1，其包含选自自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列，(b)HVR-L2，其包含选自自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列，和(c)HVR-L3，其包含选自自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列。

[0255] 在另一个方面，抗MS4A4A抗体包含与选自自由SEQ ID NO:76、77、78、79、80、81、82、83和84组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的重链可变结构域(V_H)序列。在某些实施方案中，与选自自由SEQ ID NO:76、77、78、79、80、81、82、83和84组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_H 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:76、77、78、79、80、81、82、83或84中，总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:76、77、78、79、80、81、82、83或84中，总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中，取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地，所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:76、77、78、79、80、81、82、83或84的 V_H 序列，包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中， V_H 包含一个、两个或三个选自以下的HVR：(a)HVR-H1，其包含选自自由SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列，(b)HVR-H2，其包含选自自由SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列，和(c)HVR-H3，其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列。

[0256] 在另一个方面，提供抗MS4A4A抗体，其中所述抗体包含与选自自由SEQ ID NO:86、87、88、89、90、91、92和93组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的轻链可变结构域(V_L)。在某些实施方案中，与选自自由SEQ ID NO:86、87、88、89、90、91、92和93组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的 V_L 序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在一些实施方案中，在SEQ ID NO:86、87、88、89、90、91、92或93中，总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:86、87、88、89、90、91、92或93中，总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中，取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地，所述抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:86、87、88、89、90、91、92或93的 V_L 序列，包括所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中， V_L 包含一个、两个或三个选自以下的HVR：(a)HVR-L1，其包含选自自由SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列，(b)HVR-L2，其包含选自自由SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列，和(c)HVR-L3，其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列。

[0257] 在另一个方面，抗MS4A4A抗体包含与选自自由SEQ ID NO:320-335和355-362组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的全长重链氨基酸序列。在某些实施方案中，与选自自由SEQ ID NO:320-335和355-362组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的全长重链氨基酸序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失，但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中，在SEQ ID NO:320-335和355-362中，总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺

失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:320-335和355-362中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。

[0258] 在另一个方面,抗MS4A4A抗体包含与选自SEQ ID NO:363-365组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的全长轻链氨基酸序列。在某些实施方案中,与选自SEQ ID NO:363-365组成的组的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的全长重链氨基酸序列相对于参考序列含有取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含所述序列的抗MS4A4A抗体保留结合至MS4A4A的能力。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:363-365中,总共1至10个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,在SEQ ID NO:363-365中,总共1至5个氨基酸已被取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在LVR以外的区域中(即在FR中)。

[0259] 在一些实施方案中,抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:355-362的全长重链氨基酸序列和SEQ ID NO:365的全长轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:320-327的全长重链氨基酸序列和SEQ ID NO:363的全长轻链氨基酸序列。在一些实施方案中,抗MS4A4A抗体包含SEQ ID NO:328-335的全长重链氨基酸序列和SEQ ID NO:364的全长轻链氨基酸序列。

[0260] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制选自以下的至少一种参考抗体的结合: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和4A-450。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制选自以下的至少一种参考抗体的结合: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和4A-331。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制选自以下的至少一种参考抗体的结合: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和4A-381。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制选自以下的至少一种参考抗体的结合:4A-25、4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389、4A-390。

[0261] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体结合至人MS4A4A的表位,所述表位与至少一种选自以下的参考抗体所结合的MS4A4A表位相同或重叠: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和4A-450。用于定位抗体所结合的表位的详细示例性方法提供于Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology,第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。

[0262] 在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制至少一种选自以下的参考抗体的结合: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和4A-450以及它们的任何组合。在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制至少一种选自以下的参考抗体的结合: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和4A-331以及它们的任何组合。在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制至少一种选自以下的参考抗体的结合: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和4A-381以及它们的任何组合。在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体竞争性地抑制至少一种选自以下的参考抗体的结合:4A-25、4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389或4A-390及它们的任何组合。

[0263] 在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体具有MS4A4A上与至少一种选自以下的参考抗体相同或重叠的表位: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和4A-450以及它们的任何组合。在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体具有MS4A4A上与至少一种选自以下的参考抗体相同或重叠的表位: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和4A-331以及它们的任何组合。在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体具有MS4A4A上与至少一种选自以下的参考抗体相同或重叠的表位: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和4A-381以及它们的任何组合。在一些实施方案中,针对与MS4A4A的结合,本公开的抗MS4A4A抗体具有MS4A4A上与至少一种选自以下的参考抗体相同或重叠的表位:4A-25、4A-382、4A-383、4A-384、4A-385、4A-386、4A-387、4A-388、4A-389和4A-390以及它们的任何组合。

[0264] 在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体结合至MS4A4A的细胞外结构域1(ECL1)。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体结合至SEQ ID NO:1的氨基酸序列

CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:177) 内的一个或多个氨基酸。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体结合至MS4A4A的细胞外结构域2 (ECL2)。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体结合至SEQ ID NO:1的氨基酸序列SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) 内的一个或多个氨基酸。

[0265] 可利用本领域已知的任何合适竞争测定或MS4A4A结合测定(诸如BIAcore分析、ELISA分析或流式细胞术)来测定抗MS4A4A抗体是否与一种或多种选自以下的参考抗体竞争与MS4A4A的结合(或竞争性地抑制其结合):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和4A-450以及它们的任何组合。在示例性竞争测定中,将固定的MS4A4A或在细胞表面上表达MS4A4A的细胞在包含第一标记抗体(其结合至MS4A4A(例如人或非人灵长类动物))和第二未标记抗体(正在测试其与第一抗体竞争结合至MS4A4A的能力)的溶液中孵育。所述第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的MS4A4A或表达MS4A4A的细胞在包含第一标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在允许第一抗体与MS4A4A结合的条件下孵育后,去除过量未结合抗体,并且测量与固定的MS4A4A或表达MS4A4A的细胞缔合的标记的量。如果与固定的MS4A4A或表达MS4A4A的细胞缔合的标记的量在测试样品中相对于对照样品中实质上减少,则表明第二抗体正在与第一抗体竞争与MS4A4A的结合。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0266] 本文进一步提供竞争性地抑制抗MS4A4A抗体的结合和/或与抗MS4A4A抗体竞争结合的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含选自由SEQ ID NO:94和308组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98、99和309组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:100、101、102和310组成的组的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:103、104和314组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105、106和315组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:107和316组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:5-15和304以及SEQ ID NO:17-22和305中的 V_H 和 V_L 序列。

[0267] 本文提供抗结合至与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同或重叠的人MS4A4A的表位的MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含选自由SEQ ID NO:94和308组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:96、97、98、99和309组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:100、101、102和310组成的组的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:

103、104和314组成的组的氨基酸序列, (ii)HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:105、106和315组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:107和316组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:5-15和304以及SEQ ID NO:17-22和305中的 V_H 和 V_L 序列。在一些实施方案中,人MS4A4A的表位与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同。

[0268] 本文进一步提供竞争性地抑制抗MS4A4A抗体的结合和/或与抗MS4A4A抗体竞争结合的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列, (ii)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列, (ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:24-30和SEQ ID NO:32-36中的 V_H 和 V_L 序列。

[0269] 本文提供结合至与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同或重叠的人MS4A4A的表位的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:108的氨基酸序列, (ii)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:110和111组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:112的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:113的氨基酸序列, (ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:114的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:115的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:24-30和SEQ ID NO:32-36中的 V_H 和 V_L 序列。在一些实施方案中,人MS4A4A的表位与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同。

[0270] 本文进一步提供竞争性地抑制抗MS4A4A抗体的结合和/或与抗MS4A4A抗体竞争结合的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列, (ii)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列, (ii)HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:40-53和SEQ ID NO:55-74中的 V_H 和 V_L 序列。

[0271] 本文提供结合至与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同或重叠的人MS4A4A的表位的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:116的氨基酸序列, (ii)HVR-H2,其包含选自由SEQ ID NO:118、119、120、121和122组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含选自由SEQ ID NO:123、124、125、126、127、128和129组成的组的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含选自由SEQ ID NO:130、131、132、133、134、135、136、137和138组成的组的氨基酸序列, (ii)HVR-L2,其包含选自由SEQ ID NO:139、140、141、142和143组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含选自由SEQ ID NO:144和145组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:40-53和SEQ ID NO:55-74中的 V_H 和 V_L 序列。在一些实施方案中,人MS4A4A的表位与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同。

[0272] 本文进一步提供竞争性地抑制抗MS4A4A抗体的结合和/或与抗MS4A4A抗体竞争结合的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含选自SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含选自SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含选自SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含选自SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别SEQ ID NO:76-84和SEQ ID NO:86-93中的 V_H 和 V_L 序列。

[0273] 本文提供结合至与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同或重叠的人MS4A4A的表位的抗MS4A4A抗体,其包含(a) V_H 结构域,所述结构域包含(i)HVR-H1,其包含选自SEQ ID NO:146和147组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-H2,其包含选自SEQ ID NO:149、150、151、152和153组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:154的氨基酸序列;和(b) V_L 结构域,所述结构域包含(i)HVR-L1,其包含选自SEQ ID NO:156、157和158组成的组的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含选自SEQ ID NO:160和161组成的组的氨基酸序列,和(iii)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:163的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含分别在SEQ ID NO:76-84和SEQ ID NO:86-93中的 V_H 和 V_L 序列。在一些实施方案中,人MS4A4A的表位与抗MS4A4A抗体所结合的表位相同。

[0274] 在一些实施方案中,根据上文实施方案中任一项所述的抗MS4A4A抗体是单克隆抗体,包括人源化和/或人抗体。在一些实施方案中,抗MS4A4A抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在一些实施方案中,抗MS4A4A抗体是实质上全长抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同种型。

[0275] 在一些实施方案中,根据上文实施案中任一项所述的抗MS4A4A抗体可单一地或组合地并入如下文1至7条中所描述的任何特征:

[0276] (1) 抗MS4A4A抗体结合亲和力

[0277] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体具有如下解离常数(Kd): $<1\mu\text{M}$ 、 $<100\text{nM}$ 、 $<10\text{nM}$ 、 $<1\text{nM}$ 、 $<0.1\text{nM}$ 、 $<0.01\text{nM}$ 或 $<0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。解离常数可通过任何分析技术来测定,包括任何生物化学或生物物理学技术,诸如ELISA、表面等离子共振(SPR)、生物层干涉(参见例如Octet系统(ForteBio))、等温滴定量热法(ITC)、差示扫描量热法(DSC)、圆二色性(CD)、停流分析和比色或荧光蛋白熔融分析。在一个实施方案中,通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)测量Kd。在一些实施方案中,利用所关注抗体的Fab形式及其抗原进行RIA,例如如Chen等人, J.Mol.Biol.293:865-881(1999)中所描述。在一些实施方案中,使用BIACORE表面等离子共振测定来测量Kd,例如,在25°C下利用固定抗原CM5芯片以约10个反应单位(RU)进行使用BIACORE-2000或BIACORE-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定。在一些实施方案中,使用单价抗体(例如Fab)或全长抗体来测定 K_D 。在一些实施方案中,使用呈单价形式的全长抗体来测定 K_D 。

[0278] (2) 抗体片段

[0279] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体是抗体片段。抗体片段包括(但不限于)Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下文所描述的其他片段。

关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,例如参见WO 93/16185;和美国专利号5571894和5587458。关于包含补救受体结合表位残基并具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5869046。

[0280] 双抗体是具有两个抗原结合位点的可以是二价或双特异性的抗体片段。参见例如EP404097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中还描述三价抗体和四价抗体。单一结构域抗体是包含抗体中重链可变结构域的全部或一部分或轻链可变结构域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单一结构域抗体是人单一结构域抗体(参见例如美国专利号6248516)。

[0281] 如本文所述,抗体片段可通过各种技术制得,所述技术包括(但不限于)蛋白水解消化完整抗体以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E.coli)或噬菌体)产生。

[0282] (3) 嵌合和人源化抗体

[0283] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于(例如)美国专利号4816567中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体是其中类别或亚类已从亲代抗体的类别或亚类发生变化的“类别切换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0284] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体是人源化抗体。典型地,使非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲代非人抗体的特异性和亲和力。在某些实施方案中,人源化抗体在人类中为实质上非免疫原性的。在某些实施方案中,人源化抗体与所述人源化抗体所来源于的来自另一物种的抗体对靶标具有基本上相同的亲和力。参见例如美国专利号5530101;5693761;5693762;和5585089。在某些实施方案中,鉴定抗体可变结构域中可被修饰而不会减小抗原结合结构域的天然亲和力同时降低其免疫原性的氨基酸。参见例如美国专利号5766886和5869619。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(或其部分)来源于非人抗体,并且FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的对应残基取代,以例如恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0285] 人源化抗体及其制备方法综述于(例如)Almagro等人,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步描述于(例如)美国专利号5821337、7527791、6982321和7087409中。可用于人源化的人框架区包括(但不限于):使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993));来源于轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体共有序列的框架区(参见例如Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285(1992);和Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)框架区或人生殖系框架区(参见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和来源于筛选FR文库的框架区(参见例如Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0286] (4) 人抗体

[0287] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体是人抗体。人抗体可使用本领域已知的各种技术来产生。人抗体概述于van Dijk等人,Curr.Opin.Pharmacol.5:

368-74(2001)和Lonberg *Curr.Opin.Immunol.*20:450-459(2008)中。

[0288] 可通过向转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述转基因动物已被改进以响应抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。可利用人Ig基因座的较大片段对小鼠抗体产生有缺陷的小鼠品系进行工程改造,预期此类小鼠在不产生小鼠抗体的情况下将产生人抗体。较大人Ig片段可保持较大可变基因多样性以及对抗体产生和表达的适当调控。通过利用用于抗体多样化和选择的小鼠机器(machinery)以及对人蛋白质的免疫耐受性的缺乏,在这些小鼠品系中复制的人抗体谱可产生针对任何所关注抗原(包括人抗原)的高亲和力全人抗体。使用杂交瘤技术,可产生并选择具有期望特异性的抗原特异性人MAb。某些示例性方法描述于美国专利号5545807、EP 546073和EP 546073中。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6075181和6150584;描述HUMAB®技术的美国专利号5770429;描述K-MOUSE®技术的美国专利号7041870和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公布号US2007/0061900。可(例如)通过与不同人恒定区进行组合来进一步修饰来自此类动物产生的完整抗体的人可变区。

[0289] 人抗体还可通过基于杂交瘤的方法来制得。已描述用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见例如Kozbor *J.Immunol.*133:3001(1984)和Boerner等人,*J.Immunol.*147:86(1991))。经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体还描述于Li等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,103:3557-3562(2006)中。其他方法包括(例如)描述于美国专利号7189826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)中的那些方法。人杂交瘤技术(三源杂交瘤(Trioma)技术)还描述于Vollmers等人,*Histology and Histopathology* 20(3):927-937(2005)和Vollmers等人,*Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(3):185-91(2005)中。还可通过分离选自人源性噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后可将此类可变结构域序列与期望的人恒定结构域组合。从抗体文库选择人抗体的技术描述于下文中。

[0290] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体是通过体外方法和/或在组合文库中筛选具有一种或多种期望活性的抗体而分离出的人抗体。合适实例包括(但不限于)噬菌体展示(CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion(以前的Proliferon)、Affimed)、核糖体展示(CAT)、酵母展示(Adimab)等。在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链式反应(PCR)来单独克隆VH和VL基因的谱并将其随机重组于噬菌体文库中,然后可如Winter等人,*Ann.Rev.Immunol.*12:433-455(1994)中所描述筛选抗原结合噬菌体。例如,本领域已知多种用于产生噬菌体展示文库和在此类文库中筛选具有期望结合特征的抗体的方法。还参见Sidhu等人,*J.Mol.Biol.*338(2):299-310,2004;Lee等人,*J.Mol.Biol.*340(5):1073-1093,2004;Fellouse *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,*J.Immunol.Methods*284(-2):119-132(2004)。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或Fab片段的形式展示抗体片段。来自免疫来源的文库无需构建杂交瘤即可提供针对免疫原的高亲和力抗体。可选地,如Griffiths等人,*EMBO J.*12:725-734(1993)中所描述,可对天然谱进行克隆(例如从人)以不经任何免疫即提供针对众多种非自体抗原以及自体抗原的单一抗体来源。最后,还可如Hoogenboom等人,*J.Mol.Biol.*,227:381-388,1992中所描述通过以下方式合成制备天然文库:从干细胞克隆未重排V-基因区段,并且使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变HVR3区并在体外实现重排。描述人抗体

噬菌体文库的专利公布包括(例如):美国专利号5750373和美国专利公布号2007/0292936和2009/0002360。从人抗体文库分离而来的抗体在本文中视为人抗体或人抗体片段。

[0291] (5) 包括Fc区的恒定区

[0292] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体包含Fc。在一些实施方案中,所述Fc是人IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4同种型。在一些实施方案中,抗体是IgG类、IgM类或IgA类。

[0293] 在本文所提供的抗体中的任一种的某些实施方案中,抗体具有IgG2同种型。在一些实施方案中,抗体含有人IgG2恒定区。在一些实施方案中,人IgG2恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,抗体诱导一种或多种MS4A4A活性或独立地结合至Fc受体。在一些实施方案中,抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施方案中,抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

[0294] 在本文所提供的抗体中的任一种的某些实施方案中,抗体具有IgG1同种型。在一些实施方案中,抗体含有小鼠IgG1恒定区。在一些实施方案中,抗体含有人IgG1恒定区。在一些实施方案中,人IgG1恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,人IgG1轻链恒定区包含SEQ ID NO:344的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施方案中,抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

[0295] 在本文所提供的抗体中的任一种的某些实施方案中,抗体具有IgG4同种型。在一些实施方案中,抗体含有人IgG4恒定区。在一些实施方案中,人IgG4恒定区包括Fc区。在一些实施方案中,抗体结合抑制性Fc受体。在某些实施方案中,抑制性Fc受体是抑制性Fc- γ 受体IIB(Fc γ IIB)。

[0296] 在本文所提供的抗体中的任一种的某些实施方案中,抗体具有杂合IgG2/4同种型。在一些实施方案中,抗体包括包含根据人IgG2的EU编号氨基酸118至260和根据人IgG4的EU编号氨基酸261至447的氨基酸序列(WO 1997/11971;WO 2007/106585)。

[0297] 在一些实施方案中,与包含有不包含氨基酸取代的Fc区的对应抗体相比,Fc区使聚集增加而不使补体活化。在一些实施方案中,抗体诱导所述抗体所特异性结合的靶标的一种或多种活性。在一些实施方案中,抗体结合至MS4A4A。

[0298] 还可期望修饰本公开的抗MS4A4A抗体以改进效应子功能和/或延长所述抗体的血清半衰期。例如,恒定区上的Fc受体结合位点可修饰或突变以去除或降低与某些Fc受体(诸如Fc γ RI、Fc γ RII和/或Fc γ RIII)的结合亲和力,以降低抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。在一些实施方案中,通过去除抗体Fc区(例如在IgG的CH2结构域中)的N-糖基化来削弱效应子功能。在一些实施方案中,如WO 99/58572和Armour等人,Molecular Immunology 40:585-593(2003);Reddy等人,J. Immunology 164:1925-1933(2000)中所描述,通过修饰诸如人IgG的233-236、297和/或327-331的区域来削弱效应子功能。在其他实施方案中,还可期望修饰本公开的抗MS4A4A抗体以改进效应子功能,从而增加对含有ITIM的Fc γ RIIb(CD32b)的发现选择性以增加MS4A4A抗体在邻近细胞上的聚集而不使体液反应(包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性和抗体依赖性细胞吞噬作用)活化。

[0299] 为延长抗体的血清半衰期,如(例如)美国专利5739277中所描述,可将补救受体结合表位掺入至抗体(尤其抗体片段)中。如本文所用,术语“补救受体结合表位”是指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)的Fc区的表位,其负责延长IgG分子的体内血清半衰期。其他

氨基酸序列修饰。

[0300] (6) 多特异性抗体

[0301] 多特异性抗体是对至少两种不同的表位具有结合特异性的抗体,所述表位包括在同一或另一多肽(例如本公开的一种或多种MS4A4A多肽)上的那些表位。在一些实施方案中,多特异性抗体可以是双特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体可以是三特异性抗体。在一些实施方案中,多特异性抗体可以是四特异性抗体。此类抗体可来源于全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。在一些实施方案中,多特异性抗体包含结合至MS4A4A上的第一位点的第一抗原结合区并包含结合至MS4A4A上的第二位点的第二抗原结合区。在一些实施方案中,多特异性抗体包含结合至MS4A4A的第一抗原结合区和结合至第二多肽的第二抗原结合区。

[0302] 本文提供多特异性抗体,其包含结合至MS4A4A的第一抗原结合区,其中所述第一抗原结合区包含本文所述抗体的六个HVR;和结合至第二多肽的第二抗原结合区。在一些实施方案中,第一抗原结合区包含本文所述抗体的V_H或V_L。

[0303] 在多特异性抗体中的任一种的一些实施方案中,第二多肽是a) 促进跨血脑屏障转运的抗原; (b) 选自以下的促进跨血脑屏障转运的抗原:转铁蛋白受体(TR);胰岛素受体(HIR);胰岛素样生长因子受体(IGFR);低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和LPR-2);白喉毒素受体CRM197;美洲驼单一结构域抗体TMEM 30(A);蛋白质转导结构域TAT、Syn-B、穿膜肽;聚精氨酸肽;血管肽和ANG1005; (c) 致病性蛋白质,其选自淀粉样 β 、寡聚淀粉样 β 、淀粉样 β 斑块、淀粉样前体蛋白质或其片段、Tau、IAPP、 α -突触核蛋白、TDP-43、FUS蛋白、C9orf72(9号染色体开放阅读框72)、c9RAN蛋白、朊病毒蛋白、PrPSc、亨廷顿蛋白、降血钙素、超氧化物歧化酶、共济失调蛋白、共济失调蛋白1、共济失调蛋白2、共济失调蛋白3、共济失调蛋白7、共济失调蛋白8、共济失调蛋白10、路易氏体、心房利钠因子、胰岛淀粉样多肽、胰岛素、载脂蛋白AI、血清淀粉样A、medin、催乳素、转甲状腺素蛋白、溶菌酶、 β 2微球蛋白、凝溶胶蛋白、角膜上皮蛋白、胱抑素、免疫球蛋白轻链AL、S-IBM蛋白、重复序列相关的非ATG(RAN)翻译产物、二肽重复序列(DPR)肽、甘氨酸-丙氨酸(GA)重复序列肽、甘氨酸-脯氨酸(GP)重复序列肽、甘氨酸-精氨酸(GR)重复序列肽、脯氨酸-丙氨酸(PA)重复序列肽、泛素和脯氨酸-精氨酸(PR)重复序列肽; (d) 在免疫细胞上表达的配体和/或蛋白质,其中所述配体和/或蛋白质选自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和磷脂酰丝氨酸;和/或(e) 在一种或多种肿瘤细胞上表达的蛋白质、脂质、多糖或糖脂和它们的任何组合。

[0304] 本领域已知多种促进跨血脑屏障转运的抗原(参见例如Gabathuler R. Neurobiol. Dis. 37:48-57(2010))。此类第二抗原包括(但不限于)转铁蛋白受体(TR)、胰岛素受体(HIR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)、低密度脂蛋白受体相关蛋白1和2(LPR-1和LPR-2)、白喉毒素受体(包括CRM197(白喉毒素的无毒突变体))、美洲驼单一结构域抗体(诸如TMEM 30(A)(翻转酶(Flippase)))、蛋白质转导结构域(诸如TAT、Syn-B或穿膜肽)、聚精氨酸或通常带正电的肽、血管肽(诸如ANG1005)(参见例如Gabathuler, 2010)和在血脑屏障内皮细胞上富集的其他细胞表面蛋白(参见例如Daneman等人, PLoS One 5(10):e13741(2010))。

[0305] 多价抗体可识别MS4A4A抗原以及不限于以下的其他抗原: $A\beta$ 肽、抗原或 α -突触核

蛋白抗原或Tau蛋白抗原或TDP-43蛋白抗原或朊病毒蛋白抗原或亨廷顿蛋白抗原或RAN、翻译产物抗原,包括由甘氨酸-丙氨酸(GA)、甘氨酸-脯氨酸(GP)、甘氨酸-精氨酸(GR)、脯氨酸-丙氨酸(PA)或脯氨酸-精氨酸(PR)构成的二肽重复序列(DPR肽)、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体、转铁蛋白受体或促进抗体跨血脑屏障转移的任何其他抗原。在一些实施方案中,第二多肽是转铁蛋白。在一些实施方案中,第二多肽是Tau。在一些实施方案中,第二多肽是A β 。在一些实施方案中,第二多肽是TREM2。在一些实施方案中,第二多肽是 α -突触核蛋白。

[0306] 多价抗体含有至少一条多肽链(并且优选两条多肽链),其中所述一条或多条多肽链包含两个或更多个可变结构域。例如,所述一条或多条多肽链可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中VD1是第一可变结构域,VD2是第二可变结构域,Fc是Fc区的一条多肽链,X1和X2代表氨基酸或多肽,并且n是0或1。类似地,所述一条或多条多肽链可包含V_H-C_H1-柔性接头-V_H-C_H1-Fc区链;或V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc区链。本文的多价抗体优选地还包含至少两种(并且优选四种)轻链可变结构域多肽。本文的多价抗体可(例如)包含约两种至约八种轻链可变结构域多肽。此处涵盖的轻链可变结构域多肽包含轻链可变结构域,并且任选地还包含CL结构域。

[0307] 制备多特异性抗体的技术包括(但不限于)重组共表达两个具有不同特异性的免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuellar,Nature305:537(1983))、WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991))和“杵臼结构”工程改造(参见例如美国专利号5731168)。还参见WO 2013/026833(CrossMab)。还可通过以下方式来制备多特异性抗体:工程改造静电转向效应以供制备抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004A1);使两种或更多种抗体交联(参见例如美国专利号4676980);使用亮氨酸;使用“双抗体”技术以供制备双特异性抗体片段(参见例如Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(scFv)二聚体(参见例如Gruber等人,J.Immunol.152:5368(1994));和如(例如)Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)中所描述制备三特异性抗体。

[0308] 本文还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程改造抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US2006/0025576)。本文抗体还包括“双重作用的Fab”或“DAF”,其包含结合至多个MS4A4A的抗原结合位点(参见例如US2008/0069820)。

[0309] (7) 抗体变体

[0310] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,涵盖抗体的氨基酸序列变体。例如,可期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学性质。

[0311] (i) 取代、插入和缺失变体

[0312] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。抗体的氨基酸序列变体可通过将适当修饰引入至编码所述抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备。此类修饰包括(例如)抗体的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。

[0313] 表A:氨基酸取代

原始残基	示例性取代	优选取代
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;正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸;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;正亮氨酸	Leu

[0315] 对抗体生物学性质的实质性修饰是通过选择在保持以下性质的作用方面显著不同的取代来实现：(a) 取代区域中多肽主链的结构，例如呈折叠或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c) 侧链的体积 (bulk of the side chain)。基于常见侧链性质将天然残基分为以下各组：

[0316] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0317] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0318] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0319] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0320] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；和

[0321] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0322] 例如，非保守性取代可涉及将这些类别中的一个的成员换成另一类别的成员。可将此类取代残基引入至（例如）与非人抗体同源的人抗体的区域中，或引入至所述分子的非同源区中。

[0323] 根据某些实施方案，在对本文所述的多肽或抗体进行改变时，可涵盖氨基酸的亲疏水性指数 (hydropathic index)。已基于每种氨基酸的疏水性和电荷特征为其指派亲疏水性指数。所述亲疏水性指数为：异亮氨酸 (+4.5)；缬氨酸 (+4.2)；亮氨酸 (+3.8)；苯丙氨酸 (+2.8)；半胱氨酸/胱氨酸 (+2.5)；蛋氨酸 (+1.9)；丙氨酸 (+1.8)；甘氨酸 (-0.4)；苏氨酸 (-0.7)；丝氨酸 (-0.8)；色氨酸 (-0.9)；酪氨酸 (-1.3)；脯氨酸 (-1.6)；组氨酸 (-3.2)；谷氨酸盐 (-3.5)；谷氨酰胺 (-3.5)；天冬氨酸盐 (-3.5)；天冬酰胺 (-3.5)；赖氨酸 (-3.9)；和精氨酸 (-4.5)。

[0324] 本领域理解亲疏水性氨基酸指数在赋予蛋白质交互生物学功能中的重要性。Kyte

等人, *J.Mol.Biol.*, 157:105-131 (1982)。已知某些氨基酸可取代具有类似亲疏水性指数或评分的其他氨基酸并且仍保留类似生物活性。在基于亲疏水性指数进行改变时,在某些实施方案中,包括亲疏水性指数在 ± 2 以内的氨基酸的取代。在某些实施方案中,包括在 ± 1 以内的那些氨基酸的取代,并且在某些实施方案中,包括在 ± 0.5 以内的那些氨基酸的取代。

[0325] 本领域还理解,可基于亲水性有效地进行相似氨基酸的取代,尤其是在由此产生的生物功能性蛋白质或肽意图用于免疫实施方案的情形中,如本发明的情形。在某些实施方案中,蛋白质的最大局部平均亲水性(如由其邻近氨基酸的亲水性管控)与其免疫原性和抗原性(即,蛋白质的生物学性质)相关。

[0326] 已将以下亲水性值指派给所述氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0 \pm 1);天冬氨酸盐(+3.0 \pm 1);谷氨酸盐(+3.0 \pm 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 \pm 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);蛋氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5)和色氨酸(-3.4)。在基于类似亲水性值进行改变时,在某些实施方案中,包括亲水性值在 ± 2 以内的氨基酸的取代,在某些实施方案中,包括在 ± 1 以内的那些氨基酸的取代,并且在某些实施方案中,包括在 ± 0.5 以内的那些氨基酸的取代。还可基于亲水性从一级氨基酸序列鉴定表位。这些区域也称为“表位核心区”。

[0327] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变不会实质上降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可对HVR作出不会实质上降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文所提供的保守性取代)。此类改变可(例如)在HVR中的抗原接触残基外部。在上文所提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR未被改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0328] 氨基酸序列插入包括氨基末端和/或羧基末端融合物(长度在一个残基至包含上百个或更多个残基的多肽范围内)以及单一或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如用于ADEPT的酶)或延长抗体血清半衰期的多肽的融合物。

[0329] 不参与保持抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基通常也可被丝氨酸取代,以改善分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反,可将一个或多个半胱氨酸键添加至抗体以改善其稳定性(尤其是在抗体是抗体片段(诸如Fv片段)的情况下)。

[0330] (ii) 糖基化变体

[0331] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,改变抗体以增加或减少所述抗体糖基化的程度。可通过改变氨基酸序列使得产生或去除一个或多个糖基化位点便捷地实现抗体中糖基化位点的增加或缺失。

[0332] 抗体的糖基化通常是N连接或O连接的。N连接是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促连接的识别序列。因此,多肽中存在这些三肽序列中的任一个均可产生潜在糖基化位点。O连接的糖基化是指糖N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种与羟基氨基酸(最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸)的连接。

[0333] 将糖基化位点添加至抗体可通过改变氨基酸序列使得其含有上述三肽序列中的

一种或多种便捷地实现(对于N连接的糖基化位点而言)。还可通过向原始抗体的序列中添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基进行取代来达成所述改变(对于O连接的糖基化位点而言)。

[0334] 当抗体包含Fc区时,可改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链的双触角寡糖,其通常通过N键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297(根据Kabat编号)。所述寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸以及连接至双触角寡糖结构的“茎”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可对本公开抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善性质的抗体变体。

[0335] 在一个实施方案中,提供具有缺少(直接或间接地)连接至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。参见例如美国专利公布号2003/0157108和2004/0093621。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”抗体变体相关的出版物的实例包括:US2003/0157108;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Led 3CHO细胞(Ripka等人,Arc h.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US2003/0157108),和敲除细胞系(诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞)(参见例如Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)和Kan da等人,Biotechnol.Bioeng.94(4):680-688(2006))。

[0336] (iii) 修饰的恒定区

[0337] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体Fc是抗体Fc同种型和/或修饰形式。在一些实施方案中,抗体Fc同种型和/或修饰形式能够结合至Fc γ 受体。

[0338] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,修饰的抗体Fc是IgG1修饰的Fc。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含一种或多种修饰。例如,在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含一个或多个氨基酸取代(例如相对于相同同种型的野生型Fc区)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自N297A(Bolt S等人,(1993)Eur J Immunol 23:403-411)、D265A(Shields等人,(2001)R.J.Biol.Chem.276,6591-6604)、L234A、L235A(Hutchins等人,(1995)Proc Natl Acad Sci USA,92:11980-11984;Alegre等人,(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、G237A(Alegre等人,(1994)Transplantation 57:1537-1543.31;Xu等人,(2000)Cell Immunol,200:16-26)、C226S、C229S、E233P、L234V、L234F、L235E(McEarchern等人,(2007)Blood,109:1185-1192)、P331S(Sazinsky等人,(2008)Proc Natl Acad Sci USA 2008,105:20167-20172)、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T和/或T256E,其中氨基酸位置根据EU编号约定。

[0339] 在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的N297A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的D265A和N297A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的N297A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的K322A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的N297A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的P331S突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实

实施方案中,Fc包含根据EU编号的D270A突变。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号的L234A和L235A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的L234A和G237A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的L234A、L235A和G237A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的P238D、L328E、E233、G237D、H268D、P271G和A330R突变中的一种或多种(包括全部)。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的S267E/L328F突变中的一种或多种。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的N325S和L328F突变(N325S/L328F)。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的P238D、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的P238D、L328E、G237D、H268D、P271G和A330R突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的P238D、S267E、L328E、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的P238D、S267E、L328E、G237D、H268D、P271G和A330R突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的C226S、C229S、E233P、L234V和L235A突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的L234F、L235E和P331S突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的S267E和L328F突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的S267E突变。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含用具有κ轻链的IgG2的恒定重链1(CH1)和铰链区(根据EU编号,IgG2的氨基酸118-230)取代IgG1的CH1和铰链区。

[0340] 在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,与具有不包括两个或更多个氨基酸取代的Fc区的对应抗体相比,所述Fc包括两个或更多个使抗体聚集增加而不使补体活化的氨基酸取代。因此,在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG1修饰的Fc是包含Fc区的抗体,其中所述抗体包含根据EU编号在位置E430G处的氨基酸取代和一个或多个选自以下的Fc区中残基位置处的氨基酸取代:L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S和它们的任何组合。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G、L234A、L235A和P331S处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置L234A、L235A和P331S处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G和P331S处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G和K322A处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G、A330S和P331S处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G、K322A、A330S和P331S处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G、K322A和A330S处的氨基酸取代。在一些实施方案中,IgG1修饰的Fc包含根据EU编号在位置E430G、K322A和P331S处的氨基酸取代。

[0341] 在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG1修饰的Fc可在本文中还包括根据EU编号约定的A330L突变(Lazar等人,Proc Natl Acad Sci USA,103:4005-4010(2006)),或L234F、L235E和/或P331S突变中的一种或多种(Sazinsky等人,Proc Natl Acad Sci USA,105:20167-20172(2008)),以消除补体活化。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG1修饰的Fc还可包含根据EU编号的A330L、A330S、L234F、L235E和/或P331S

中的一种或多种。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG1修饰的Fc还可包含一个或多个突变以延长人类血清中的抗体半衰期(例如根据EU编号约定,M252Y、S254T和T256E突变中的一种或多种(包括全部))。在IgG1修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG1修饰的Fc还可包含根据EU编号的E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、S440Y和/或S440W中的一种或多种。

[0342] 本公开的其他方面涉及具有修饰的恒定区(即Fc区)的抗体。如果对依赖于结合至FcγR受体以使被靶向受体活化的抗体进行工程改造以消除FcγR结合,则可丧失其激动剂活性(参见例如Wilson等人,Cancer Cell 19:101-113(2011);Armour等人,Immunology 40:585-593(2003);和White等人,Cancer Cell 27:138-148(2015))。因此,当具有正确表位特异性的本公开的抗MS4A4A抗体具有来自人IgG2同种型的Fc结构域(CH1和铰链区)或能够优先结合抑制性FcγRIIB r受体的另一类Fc结构域或其变化形式时,认为所述抗体可使靶抗原活化且不良作用最低。

[0343] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,修饰的抗体Fc是IgG2修饰的Fc。在一些实施方案中,IgG2修饰的Fc包含一种或多种修饰。例如,在一些实施方案中,IgG2修饰的Fc包含一个或多个氨基酸取代(例如相对于相同同种型的野生型Fc区)。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自根据EU编号约定的V234A(Alegre等人,Transplantation57:1537-1543(1994);Xu等人,Cell Immunol,200:16-26(2000));G237A(Cole等人,Transplantation,68:563-571(1999));H268Q、V309L、A330S、P331S(US2007/0148167;Armour等人,Eur J Immunol 29:2613-2624(1999);Armour等人,The Haematology Journal 1(增刊1):27(2000);Armour等人,The Haematology Journal 1(增刊1):27(2000))、C219S和/或C220S(White等人,Cancer Cell 27,138-148(2015));S267E、L328F(Chu等人,Mol Immunol,45:3926-3933(2008));和M252Y、S254T和/或T256E。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置V234A和G237A处的氨基酸取代。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置C219S或C220S处的氨基酸取代。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置A330S和P331S处的氨基酸取代。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置S267E和L328F处的氨基酸取代。

[0344] 在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号约定的C127S氨基酸取代(White等人,(2015)Cancer Cell 27,138-148;Lightle等人,Protein Sci.19:753-762(2010);和WO 2008/079246)。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,抗体具有κ轻链恒定结构域包含根据EU编号约定的C214S氨基酸取代的IgG2同种型(White等人,Cancer Cell 27:138-148(2015);Lightle等人,Protein Sci.19:753-762(2010);和WO 2008/079246)。

[0345] 在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号约定的C220S氨基酸取代。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,抗体具有κ轻链恒定结构域包含根据EU编号约定的C214S氨基酸取代的IgG2同种型。

[0346] 在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号约定的C219S氨基酸取代。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,抗体具有κ轻链恒定结构域包含根据EU编号约定的C214S氨基酸取代的IgG2同种型。

[0347] 在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包括IgG2同种型重链恒定结构域1(CH1)和铰链区(White等人,Cancer Cell127:138-148(2015))。在IgG2修饰的Fc中的任一种的某些实施方案中,IgG2同种型CH1和铰链区包含根据EU编号118-230的氨基酸序列。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,抗体Fc区包含根据EU编号约定的S267E氨基酸取代、L328F氨基酸取代或两者和/或N297A或N297Q氨基酸取代。

[0348] 在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc还包含根据EU编号在以下位置处的一个或多个氨基酸取代:E430G、E430S、E430F、E430T、E345K、E345Q、E345R、E345Y、S440Y和S440W。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc还可包含一个或多个突变以延长人类血清中的抗体半衰期(例如根据EU编号约定,M252Y、S254T和T256E突变中的一种或多种(包括全部))。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc还可包含A330S和P331S。

[0349] 在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc是IgG2/4杂合Fc。在一些实施方案中,IgG2/4杂合Fc包含IgG2 aa 118至260和IgG4 aa 261至447。在IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置H268Q、V309L、A330S和P331S处的一个或多个氨基酸取代。

[0350] 在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含一个或多个选自根据EU编号A330L、L234F、L235E或P331S和它们的任何组合的额外氨基酸取代。

[0351] 在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的某些实施方案中,Fc包含根据EU编号在选自以下残基位置处的一个或多个氨基酸取代:C127S、L234A、L234F、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、A330S、P331S、E345R、E430G、S440Y和它们的任何组合。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G、L243A、L235A和P331S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G和P331S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G和K322A处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G、A330S和P331S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G、K322A和A330S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G、K322A和A330S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G、K322A和P331S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置S267E和L328F处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置C127S处的氨基酸取代。在IgG1和/或IgG2修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E345R、E430G和S440Y处的氨基酸取代。

[0352] 在本文所提供的抗体中的任一种的一些实施方案中,修饰的抗体Fc是IgG4修饰的Fc。在一些实施方案中,IgG4修饰的Fc包含一种或多种修饰。例如,在一些实施方案中,IgG4修饰的Fc包含一个或多个氨基酸取代(例如相对于相同同种型的野生型Fc区)。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代选自根据EU编号约定的L235A、G237A、S229P、L236E(Reddy等人,J Immunol 164:1925-1933(2000))、S267E、E318A、

L328F、M252Y、S254T和/或T256E。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc还可包含根据EU编号约定的L235A、G237A和E318A。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc还可包含根据EU编号约定的S228P和L235E。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG4修饰的Fc还可包含根据EU编号约定的S267E和L328F。

[0353] 在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG4修饰的Fc可与根据EU编号约定的S228P突变组合(Angal等人,Mol Immunol. 30:105-108(1993))和/或与(Peters等人,J Biol Chem.287(29):24525-33(2012))中所描述的一个或多个突变组合以增强抗体稳定。

[0354] 在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,IgG4修饰的Fc还可包含一个或多个突变以延长人类血清中的抗体半衰期(例如根据EU编号约定,M252Y、S254T和T256E突变中的一种或多种(包括全部))。

[0355] 在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的L235E。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的S228P突变。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号的S267E和L328F突变。在IgG4修饰的Fc中的任一种的某些实施方案中,Fc包含根据EU编号在选自以下残基位置处的一个或多个氨基酸取代:C127S、F234A、L235A、L235E、S267E、K322A、L328F、E345R、E430G、S440Y和它们的任何组合。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G、L243A、L235A和P331S处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G和P331S处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430G和K322A处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E430处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc区包含根据EU编号在位置E430G和K322A处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置S267E和L328F处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置C127S处的氨基酸取代。在IgG4修饰的Fc中的任一种的一些实施方案中,Fc包含根据EU编号在位置E345R、E430G和S440Y处的氨基酸取代。

[0356] 在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:336的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:328的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:320的氨基酸序列的重链。

[0357] 在一些实施方案中,抗体具有不含C末端赖氨酸的人IgG1重链。在一些实施方案中,抗体具有含有P331S突变的人IgG1重链。在一些实施方案中,抗体具有含有P331S突变且不含C末端赖氨酸的人IgG1重链。在一些实施方案中,抗体具有含有N325S和L328F突变(N325S/L328F)的人IgG1重链。在一些实施方案中,抗体具有含有N325S/L328F突变且不含C末端赖氨酸的人IgG1重链。在一些实施方案中,抗体具有含有K322A突变的人IgG1重链。在一些实施方案中,抗体具有含有K322A突变且不含C末端赖氨酸的人IgG1重链。在前述实施方案中,突变根据EU编号表示。

[0358] 在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:337的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:338的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:339的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:340的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:341

的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:342的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:343的氨基酸序列的重链。

[0359] 在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:329的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:330的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:331的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:332的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:333的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:334的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:335的氨基酸序列的重链。

[0360] 在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:321的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:322的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:323的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:324的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:325的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:326的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,抗体包含有包含SEQ ID NO:327的氨基酸序列的重链。

[0361] (8) 其他抗体修饰

[0362] 在抗体中的任一种的一些实施方案中,抗体是衍生物。术语“衍生物”是指包括除氨基酸(或核酸)的插入、缺失或取代以外的化学修饰的分子。在某些实施方案中,衍生物包含共价修饰,包括(但不限于)与聚合物、脂质或其他有机或无机部分的化学键合。在某些实施方案中,化学修饰的抗原结合蛋白可比未经化学修饰的抗原结合蛋白具有更长的循环半衰期。在某些实施方案中,化学修饰的抗原结合蛋白可具有改善的对期望细胞、组织和/或器官的靶向能力。在一些实施方案中,衍生物抗原结合蛋白被共价修饰以包括一种或多种水溶性聚合物连接物,包括(但不限于)聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。参见例如美国专利号4640835、4496689、4301144、4670417、4791192和4179337。在某些实施方案中,衍生物抗原结合蛋白包含一种或多种聚合物,包括(但不限于)单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纤维素、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)和聚乙烯醇以及此类聚合物的混合物。

[0363] 在某些实施方案中,衍生物经聚乙二醇(PEG)亚基共价修饰。在某些实施方案中,一种或多种水溶性聚合物在衍生物的一个或多个特定位置处(例如在氨基末端处)键合。在某些实施方案中,一种或多种水溶性聚合物随机连接至衍生物的一条或多条侧链。在某些实施方案中,使用PEG来改善抗原结合蛋白的治疗能力。在某些实施方案中,使用PEG来改善人源化抗体的治疗能力。某些此类方法在(例如)美国专利号6133426中进行讨论,所述专利出于任何目的在此以引用的方式并入。

[0364] 肽类似物在药物行业中常用作非肽药物,其性质类似于模板肽的那些性质。这些类型的非肽化合物称作“肽模拟物(peptide mimetic或peptidomimetic)”。Fauchere, J. Adv. Drug Res., 15:29(1986);和Evans等人, J. Med. Chem., 30:1229(1987),所述文献出于任何目的以引用的方式并入本文。此类化合物通常是在计算机化分子建模的帮助下开发出的。可使用在结构上类似于治疗可用肽的肽模拟物来产生类似的治疗性或预防性作用。

通常,肽模拟物在结构上类似于范例多肽(即具有生物化学性质或药理学活性的多肽),诸如人抗体,但其一个或多个肽键任选地通过本领域众所周知的方法由选自以下的键联接替换: $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。在某些实施方案中,用相同类型的D-氨基酸系统性取代共有序列的一个或多个氨基酸(例如D-赖氨酸代替L-赖氨酸)可用于产生更稳定的肽。另外,包含共有序列或实质上相同的共有序列变化形式的限制性肽可通过本领域已知的方法来产生(Rizo和Gierasch, *Ann.Rev.Biochem.*, 61:387(1992),其出于任何目的以引用的方式并入本文);例如,通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫键的内部半胱氨酸残基。

[0365] 药物缀合涉及使生物活性细胞毒性(抗癌)有效载荷或药物与特异性靶向某一肿瘤标记物(例如理想地仅发现于肿瘤细胞中或肿瘤细胞上的多肽)的抗体偶联。抗体在体内追踪这些蛋白质并且将自身附着至癌细胞表面。抗体与靶蛋白(抗原)之间的生物化学反应在肿瘤细胞中触发信号,然后所述肿瘤细胞将抗体与细胞毒素一起吸收或内化。在ADC内化后,释放细胞毒性药物并杀伤癌症。由于这种靶向,因此药物理想地具有较低的副作用并给出比其他化学治疗剂更宽的治疗窗。缀合所公开抗体的技术是本领域已知的(参见例如 Jane de Lartigue, *OncLive* 2012年7月5日;ADC Review on antibody-drug conjugates; 和Ducry等人, *Bioconjugate Chemistry* 21(1):5-13(2010))。

[0366] III. 核酸、载体和宿主细胞

[0367] 本公开的抗MS4A4A抗体可使用(例如)如美国专利号4816567中所描述的重组方法和组合物来产生。在一些实施方案中,提供分离核酸,其具有编码本公开的抗MS4A4A抗体中的任一种的核苷酸序列。此类核酸可编码构成抗MS4A4A抗体的 V_L 的氨基酸序列和/或构成抗MS4A4A抗体的 V_H 的氨基酸序列(例如所述抗体的轻链和/或重链)。在一些实施方案中,提供一个或多个包含此类核酸的载体(例如表达载体)。在一些实施方案中,还提供包含此核酸的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包含如下载体(例如已用如下载体转导):(1) 包含如下核酸的载体:其编码构成抗体的 V_L 的氨基酸序列和构成抗体的 V_H 的氨基酸序列,或(2) 第一载体,其包含编码构成抗体的 V_L 的氨基酸序列的核酸,和第二载体,其包含编码构成抗体的 V_H 的氨基酸序列的核酸。在一些实施方案中,宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如, Y0、NS0、Sp20细胞)。本公开的宿主细胞还包括(但不限于)分离细胞、体外培养细胞和离体培养细胞。

[0368] 提供制备本公开的抗MS4A4A抗体的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在适合于表达抗MS4A4A抗体的条件下培养包含编码所述抗体的核酸的本公开的宿主细胞。在一些实施方案中,所述抗体随后从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收。

[0369] 为重组产生本公开的抗MS4A4A抗体,将编码所述抗MS4A4A抗体的核酸分离并插入至一个或多个载体中以便在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此核酸可使用常规程序容易地分离并测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0370] 包含编码本公开的抗MS4A4A抗体中的任一种或本文所述多肽(包括抗体)的细胞表面表达片段或多肽的核酸序列的合适载体包括(但不限于)克隆载体和表达载体。合适克隆载体可根据标准技术来构建,或可选自本领域可获得的大量克隆载体。虽然所选择的克隆载体可根据意图使用的宿主细胞而有所变化,但可用的克隆载体通常具有自复制的能

力,可具有特定限制性核酸内切酶的单一靶标,和/或可携带可用于选择包含所述载体的克隆的标记物的基因。合适的实例包括质粒和细菌病毒,例如pUC18、pUC19、Bluescript(例如pBS SK+)及其衍生物、mpl8、mpl9、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、噬菌体DNA和穿梭载体(诸如pSA3和pAT28)。这些和许多其他克隆载体可从商业供应商获得,诸如BioRad、Stratagene和Invitrogen。

[0371] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适宿主细胞包括原核或真核细胞。例如,本公开的抗MS4A4A抗体可在细菌中产生,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达(例如美国专利号5648237、5789199和5840523)。表达后,可从细菌细胞团以可溶性部分形式分离出抗体并且可进一步纯化。

[0372] 除原核生物以外,真核微生物(诸如丝状真菌或酵母)也是适用于抗体编码载体的克隆或表达宿主,包括糖基化通路已“人源化”从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体的真菌和酵母菌株(例如,Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004); 和Li等人, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006))。

[0373] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞还可来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定出可联合昆虫细胞使用、尤其用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的多种杆状病毒株。也可利用植物细胞培养物作为宿主(例如美国专利号5959177、6040498、6420548、7125978和6417429,其描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0374] 也可使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,可使用适于悬浮液中生长的哺乳动物细胞系。可用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7);人胚肾细胞系(293或293细胞,如(例如)Graham等人, J. Gen. Virol. 36:59 (1977)中所描述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(TM4细胞,如(例如)Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)中所描述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人子宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;布法罗大鼠(buffalo rat)肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如(例如)Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)中所描述;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他可用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980));和骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适合于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见(例如)Yazaki和Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C.Lo编辑, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0375] IV. 药物组合物/制剂

[0376] 本文提供包含本公开的抗MS4A4A抗体和药学上可接受的载剂的药物组合物和/或药物制剂。

[0377] 在一些实施方案中,药学上可接受的载剂在所采用的剂量和浓度下优选对接受者无毒。可将本文所述的抗体配制成呈固体、半固体、液体或气态形式的制剂。此类制剂的实例包括(但不限于)片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏剂、溶液、栓剂、注射液、吸入剂、凝胶、微球和气雾剂。根据于期望的制剂而定,药学上可接受的载剂可包括药学上可接受、无毒的稀释剂载剂,其是常用于配制用于动物或人类施用的药物组合物的媒介物。在某些实施方案中,

药物组合物可包含用于修改、维持或保持(例如)组合物的pH、渗透性、粘度、透明度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸附或渗透的制剂材料。

[0378] 在某些实施方案中,药学上可接受的载剂包括(但不限于)氨基酸(诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(诸如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(诸如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);增量剂(诸如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(诸如乙二胺四乙酸(EDTA));复合剂(诸如咖啡因、聚乙烯基吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其他碳水化合物(诸如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水性聚合物(诸如聚乙烯基吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐反离子(诸如钠);防腐剂(诸如苯扎氯铵(benzalkoniumchloride)、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞(thimerosal)、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、盐酸氯己定(chlorhexidine)、山梨酸或过氧化氢);溶剂(诸如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(诸如甘露醇或山梨醇);助悬剂;表面活性剂或润湿剂(诸如普郎尼克(pluronic)、PEG、山梨糖醇酯、聚山梨醇酯(诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)、曲拉通(triton)、氨丁三醇(tromethamine)、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapol));稳定性增强剂(诸如蔗糖或山梨醇);张力增强剂(诸如碱金属卤化物、优选氯化钠或氯化钾、甘露醇、山梨醇);递送媒介物;稀释剂;赋形剂和/或药物佐剂。适用于各种施用类型的制剂的其他实例可在Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, 第22版(2013)中找到。关于药物递送方法的简短综述,参见Langer, Science 249:1527-1533(1990)。

[0379] 适用于胃肠外施用的制剂包括水性和非水性等渗无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和可使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;和水性和非水性无菌悬液,其可包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂。

[0380] 可优化制剂以在大脑或中枢神经系统中保留且稳定。当将剂施用至颅隔室中时,期望所述剂保留在所述隔室中,并且不扩散或以其他方式穿过血脑屏障。稳定技术包括交联、多聚化或连接至诸如聚乙二醇、聚丙烯酰胺、中性蛋白质载剂等的基团以实现分子量的增加。

[0381] 用于延长保留的其他策略包括将抗体(诸如本公开的抗MS4A4A抗体)包埋在可生物降解或可生物降解的植入物中。治疗活性剂的释放速率受通过聚合基质的转运速率和植入物的生物降解控制。植入物可以是颗粒、薄片、贴片、斑块、纤维、微胶囊等,并且可具有与所选插入位点相容的任何大小或形状。可采用的可生物降解的聚合组合物可以是有机酯或醚,其在降解时产生生理学上可接受的降解产物,包括单体。可使用酸酐、酰胺、原酸酯等自身或与其他单体的组合。聚合物将是缩合聚合物。聚合物可交联或不交联。尤其受关注的是羟基脂肪族羧酸的聚合物(均聚物或共聚物)和多糖。所关注的聚酯包括D-乳酸、L-乳酸、外消旋乳酸、乙醇酸、聚己内酯和它们的组合的聚合物。所关注的多糖是海藻酸钙和官能化纤维素、特别是特征在于水不溶性、分子量为约5kD至500kD等的羧甲基纤维素酯。本公开的植入物中也可采用可生物降解的水凝胶。水凝胶通常是特征在于能够吸收液体的共聚物材料。

[0382] V. 治疗用途

[0383] 如本文所公开,本公开的抗MS4A4A抗体可用于预防疾病和病症、降低其风险或对

其进行治疗。在一些实施方案中,本公开的抗MS4A4A抗体有效预防阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病和认知损害、降低其风险或对其进行治疗。

[0384] 作为疾病靶标的MS4A4A

[0385] 全基因组关联研究已鉴定出MS4A家族中与阿尔茨海默氏病相关的各个成员。这些成员是MS4A2、MS4A3、MS4A4A、MS4A4E、MS4A6A和MS4A6E。相关的SNP在MS4A6A的3' UTR (rs610932) 和MS4A4E与MS4A6A之间的基因间隔区 (rs670139) 中发现。MS4A基因簇中有三个SNP与迟发型阿尔茨海默氏病的风险增加相关。这些SNP包括MS4A4A中的rs4938933、MS4A4E中的rs670139和MS4A6A中的rs610932 (Hollingworth等人, 2011, Nat Genetics, 43:429-435; Naj等人, 2011, Nature Genetics, 43:436-441; Antunez等人, 2011, Genome Medicine, 3, 文章33)。另外, MS4A4A基因座SNP (rs2304933和rs2304935) 与较高的MS4A4A水平和阿尔茨海默氏病、包括迟发型阿尔茨海默氏病 (LOAD) 风险增加相关 (Allen等人, 2012, Neurology, 79:221-228)。

[0386] 本文所提供的方法可用于预防、降低风险或治疗患有神经退行性疾病、病症或疾患的个体。在一些实施方案中,本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有神经退行性病症的个体的方法,所述方法包括向有需要的所述个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。

[0387] 在一些实施方案中,本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有阿尔茨海默氏病的个体的方法,所述方法包括向有需要的所述个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。

[0388] 在一些实施方案中,本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有迟发型阿尔茨海默氏病的个体的方法,所述方法包括向有需要的所述个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。

[0389] 在一些实施方案中,本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有轻度认知损害的个体的方法,所述方法包括向有需要的所述个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。

[0390] 在一些实施方案中,本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有与MS4A4A的过表达或活性增加相关的疾病、病症或疾患的个体的方法,所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。

[0391] 在一些实施方案中,本公开提供用于预防、降低风险或治疗患有CSF1R缺乏疾病或病症的个体的方法,所述方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的抗MS4A4A抗体。在一些实施方案中,CSF1R缺乏疾病或病症是成人发作型脑白质病变伴轴突球样变和色素性胶质细胞 (ALSP) 或遗传性弥漫性脑白质病变伴球样变 (HDLS)。

[0392] 本公开的其他方面涉及预防、降低风险或治疗患有选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的个体的方法:额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、轻度认知损害、血管型痴呆、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、创伤性脑损伤、脊髓损伤、长期抑郁、动脉粥样硬化血管疾病、正常衰老的不期望症状、痴呆、混合型痴呆、克雅病 (Creutzfeldt-Jakob disease)、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、tau蛋白病变病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病 (Behcet's disease)、帕金森氏病、路易氏体型痴呆 (dementia with Lewy bodies)、多系统萎缩、退行性椎间盘疾病、夏伊-德雷格综合征 (Shy-Drager syndrome)、进行性核上性麻痹、皮质基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、衰老疾病、年龄相关

性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身性感染、炎性疾病、关节炎、多发性硬化症、代谢病症、肥胖症、胰岛素抗性、2型糖尿病、组织或血管损伤、损伤、炎性细胞碎片或蛋白质聚集体、异常循环髓系细胞、不健康衰老、年龄相关性认知损害、年龄相关性脑萎缩、年龄相关性特质(包括但不限于)炎症、神经元丢失和认知缺陷,诸如在不存在已知脑病情况下的认知缺陷,包括年老个体的额叶大脑皮层的认知缺陷和正常衰老的一种或多种不期望症状),所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体。本公开的其他方面涉及前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体,其用于预防、降低风险或治疗患有选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的个体:额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、创伤性脑损伤、脊髓损伤、长期抑郁、动脉粥样硬化血管疾病、正常衰老的不期望症状、痴呆、混合型痴呆、克雅病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病变病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病、帕金森氏病、路易氏体型痴呆、多系统萎缩、退行性椎间盘疾病、夏伊-德雷格综合征、进行性核上性麻痹、皮质基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、衰老疾病、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身性感染、炎性疾病、关节炎、多发性硬化症、代谢病症、肥胖症、胰岛素抗性、2型糖尿病、组织或血管损伤、损伤、炎性细胞碎片或蛋白质聚集体、异常循环髓系细胞、不健康衰老、年龄相关性认知损害、年龄相关性脑萎缩、年龄相关性特质(包括但不限于)炎症、神经元丢失和认知缺陷,诸如在不存在已知脑病情况下的认知缺陷,包括年老个体的额叶大脑皮层的认知缺陷和正常衰老的一种或多种不期望症状)。本公开的其他方面涉及前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体,其用于预防或降低转移。本公开的其他方面涉及前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体,其用于预防、降低风险或治疗患有癌症的个体。

[0393] 本公开的其他方面涉及前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体的用途,其用于制造用于预防、降低风险或治疗患有选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的个体的药物:额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病、轻度认知损害、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、创伤性脑损伤、脊髓损伤、长期抑郁、动脉粥样硬化血管疾病、正常衰老的不期望症状、痴呆、混合型痴呆、克雅病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病变病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病、帕金森氏病、路易氏体型痴呆、多系统萎缩、退行性椎间盘疾病、夏伊-德雷格综合征、进行性核上性麻痹、皮质基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、衰老疾病、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身性感染、炎性疾病、关节炎、多发性硬化症、代谢病症、肥胖症、胰岛素抗性、2型糖尿病、组织或血管损伤、损伤、炎性细胞碎片或蛋白质聚集体、异常循环髓系细胞、不健康衰老、年龄相关性认知损害、年龄相关性脑萎缩、年龄相关性特质(包括但不限于)炎症、神经元丢失和认知缺陷,诸如在不存在已知脑病情况下的认知缺陷,包括年老个体的额叶大脑皮层的认知缺陷和正常衰老的一种或多种不期望症状)。本公开的其他方面涉及预防、降低风险或治疗患有选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的个体的方法:额颞叶痴呆、进行

性核上性麻痹、阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病、轻度认知损害、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、肌萎缩性侧索硬化症、创伤性脑损伤、脊髓损伤、痴呆、中风、帕金森氏病、急性播散性脑脊髓炎、视网膜变性、年龄相关性黄斑变性、青光眼、多发性硬化症、败血性休克、细菌感染、关节炎和骨关节炎，所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体。本公开的其他方面涉及前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体，其用于预防、降低风险或治疗患有选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的个体：额颞叶痴呆、进行性核上性麻痹、阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病、轻度认知损害、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、肌萎缩性侧索硬化症、创伤性脑损伤、脊髓损伤、痴呆、中风、帕金森氏病、急性播散性脑脊髓炎、视网膜变性、年龄相关性黄斑变性、青光眼、多发性硬化症、败血性休克、细菌感染、关节炎和骨关节炎。本公开的其他方面涉及前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体的用途，其用于制造用于预防、降低风险或治疗患有选自以下组成的组的疾病、病症或损伤的个体的药剂：额颞叶痴呆、进行性核上性麻痹、阿尔茨海默氏病、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、肌萎缩性侧索硬化症、创伤性脑损伤、脊髓损伤、痴呆、中风、帕金森氏病、急性播散性脑脊髓炎、视网膜变性、年龄相关性黄斑变性、青光眼、多发性硬化症、败血性休克、细菌感染、关节炎和骨关节炎。

[0394] 在一些实施方案中，受试者或个体是哺乳动物。哺乳动物包括(但不限于)家养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人和非人灵长类动物，诸如猴)、兔和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，受试者或个体是人。

[0395] 本文所提供的抗体(和任何额外治疗剂)可通过任何合适方式来施用，包括胃肠外、肺内、鼻内、病灶内施用、脑脊髓内、颅内、脊椎内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。胃肠外输注包括肌内、以弹丸形式或通过在规定时间内连续输注静脉内施用、动脉内、关节内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中，施用是静脉内施用。在一些实施方案中，施用是皮下的。可通过任何合适途径(例如通过注射，诸如静脉内或皮下注射)给药，这部分地取决于施用是短期还是长期的。本文涵盖各种给药时间表，包括(但不限于)在各个时间点单次或多次施用、弹丸施用和脉冲输注。

[0396] 本文所提供的抗体将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。本文中需考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个别患者的临床状况、病症原因、剂的递送部位、施用方法、施用时间安排和开业医师已知的其他因素。抗体无需但任选地与一种或多种当前用于预防或治疗所讨论病症的剂一起配制。此类其他剂的有效量取决于制剂中所存在抗体的量、病症或治疗的类型以及上文所讨论的其他因素。这些剂通常以相同剂量和如本文所述的施用途径来使用，或以本文所述剂量的约1%至99%来使用，或以凭经验/临床确定为适当的任何剂量和任何途径来使用。

[0397] 对于疾病的预防或治疗，本公开抗体的适当剂量(在单独使用或与一种或多种其他额外治疗剂组合使用时)将取决于要治疗疾病的类型、抗体类型、疾病的严重程度和病程、施用抗体是用于预防目的还是治疗目的、先前疗法、患者的临床病史和对抗体的反应以及主治医师的判断。抗体适合一次性或在一系列治疗中施用于患者。

[0398] 根据疾病的类型和严重程度，不论(例如)通过一次或多次分开施用还是通过连续输注，约1 μ g/kg至100mg/kg的抗体可以是施用于患者的初始候选剂量。根据上文所提及的

因素而定,一种典型日剂量可在约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更高范围内。对于几天或更长时间的重复施用而言,根据疾患而定,通常将持续治疗直至出现对疾病症状的期望阻抑为止。一个示例性抗体剂量将在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $150\text{mg}/\text{kg}$ 范围内,其可间歇性地施用于患者,例如每周或每三周(例如使得患者接受约两个至约二十个,或例如约六个剂量的抗体)。在某些实施方案中,给药频率为每天三次、每天两次、每天一次、每隔一天一次、每周一次、每两周一次、每四周一次、每五周一次、每六周一次、每七周一次、每八周一次、每九周一次、每十周一次或每月一次、每两个月一次、每三个月一次或更久。可在开始时施用较高负荷剂量,之后施用一个或多个较低剂量。然而,可使用其他剂量方案。通过常规技术和测定容易地监测这种疗法的进展。

[0399] VI. 诊断用途

[0400] 在抗体中的任一种的一些实施方案中,本文所提供的抗MS4A4A抗体中的任一种可用于检测样品或个体中MS4A4A的存在。如本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。本文提供出于诊断性目的使用本公开的抗体的方法,诸如检测个体中或来源于个体的组织样品中的MS4A4A。在一些实施方案中,个体是人。

[0401] 检测方法可涉及对抗原结合抗体的量化。生物样品中的抗体检测可利用本领域已知的任何方法来进行,包括免疫荧光显微术、免疫细胞化学、免疫组织化学、ELISA、FACS分析、免疫沉淀或微型正电子发射断层摄影术。在某些实施方案中,抗体被放射性标记(例如用 ^{18}F),并且随后利用微型正电子发射断层摄影术分析进行检测。抗体结合还可通过非侵入性技术在患者中进行量化,所述技术是诸如正电子发射断层摄影术(PET)、X射线计算机断层摄影术、单光子发射计算机断层摄影术(SPECT)、计算机断层摄影术(CT)和计算机轴向断层摄影术(CAT)。

[0402] VII. 制品

[0403] 本文提供包含本文所述抗MS4A4A抗体的制品(例如药盒)。制品可包括一个或多个包含本文所述抗体的容器。容器可以是任何合适包装,包括(但不限于)小瓶、瓶、广口瓶、柔性包装(例如密封Mylar或塑料袋)等。容器可以是单位剂量、散装包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。

[0404] 在一些实施方案中,药盒还可包括第二剂。在一些实施方案中,第二剂是药学上可接受的缓冲剂或稀释剂,包括(但不限于)诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液。在一些实施方案中,第二剂是药物活性剂。

[0405] 在制品中的任一种的一些实施方案中,制品还包括根据本公开的方法使用的说明书。说明书通常包括关于用于预期治疗的剂量、给药时间表和施用途径的信息。在一些实施方案中,这些说明书包含对施用本公开的分离抗体(例如本文所述的抗MS4A4A抗体)以预防、降低风险或治疗患有选自以下的疾病、病症或损伤的个体的说明:额颞叶痴呆、阿尔茨海默氏病、迟发型阿尔茨海默氏病、认知衰退或受损、轻度认知损害、血管型痴呆、血管型痴呆、癫痫发作、视网膜营养不良、创伤性脑损伤、脊髓损伤、长期抑郁、动脉粥样硬化血管疾病、正常衰老的不期望症状、痴呆、混合型痴呆、克雅病、正常压力脑积水、肌萎缩性侧索硬化症、亨廷顿氏病、tau蛋白病变病、中风、急性创伤、慢性创伤、狼疮、急性和慢性结肠炎、克罗恩氏病、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、疟疾、特发性震颤、中枢神经系统狼疮、白塞氏病、帕金森氏病、路易氏体型痴呆、多系统萎缩、退行性椎间盘疾病、夏伊-德雷格综合征、进行性

核上性麻痹、皮质基底神经节变性、急性播散性脑脊髓炎、肉芽肿病症、结节病、衰老疾病、年龄相关性黄斑变性、青光眼、色素性视网膜炎、视网膜变性、呼吸道感染、败血症、眼部感染、全身性感染、炎性病症、关节炎、多发性硬化症、代谢病症、肥胖症、胰岛素抗性、2型糖尿病、组织或血管损伤、损伤、炎性细胞碎片或蛋白质聚集体、异常循环髓系细胞、不健康衰老、年龄相关性认知损害、年龄相关性脑萎缩、年龄相关性特质(包括但不限于)炎症、神经元丢失和认知缺陷,诸如在不存在已知脑病情况下的认知缺陷,包括年老个体的额叶大脑皮层的认知缺陷和正常衰老的一种或多种不期望症状),其包含向所述个体施用治疗有效量的前述实施方案中的任一项所述的抗MS4A4A抗体。

[0406] 在一些实施方案中,说明书包括抗MS4A4A抗体和第二剂(例如第二药物活性剂)的使用说明。

[0407] 通过参考以下实施例将更全面地理解本公开。然而,不应将所述实施例解释为限制本公开的范围。整个本公开中的所有引用均在此以引用的方式明确并入。

[0408] 实施例

[0409] 实施例1:鼠类抗MS4A4A小鼠抗体的人源化

[0410] 本实施例的目的是产生国际专利申请序列号PCT/US2019/016156中所公开的某些亲代小鼠抗MS4A4A抗体的人源化变体。

[0411] 亲代小鼠抗MS4A4A抗体4A-202含有包含以下氨基酸序列的重链可变区:QVQLQQS GAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQVVKRPGQGLEWIGATHPGHGDTRYTQKFKGKATLSADKSSSTAYMQL SNLASEDSAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDVWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:164),和包含以下氨基酸序列的轻链可变区:DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGVFSMNFQKPGQPPKLLIYGASNQGSQVPRFSGSGSTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:165)。

[0412] 亲代小鼠抗MS4A4A 4A-18含有包含以下氨基酸序列的重链可变区:QVQLQQPGTEL VKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKRPGQGLEWIGNINPTNGGTNYNERFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARAYYYGSSLFAYWQGTLTVSS (SEQ ID NO:166),和包含以下氨基酸序列的轻链可变区:DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWSQQKPGQSPKLLIYSASYRHTGVPDRFTGSGSGTDF TLTITNMQSEDLADYFCQQYSTYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:167)。

[0413] 亲代小鼠抗MS4A4A抗体4A-21含有包含以下氨基酸序列的重链可变区:QIQLVQSG PELKKPGETVKISCKASGYIFTSYGLSWVKQTPGKGLKWMGWINTYSGVPTYANDFKGRFAFSLETSASTTYLRIN NLKNDTATYFCARSLVDYWGQGTPLTVSS (SEQ ID NO:168),和包含以下氨基酸序列的轻链可变区:DVVMTQTPFTLSVTIGQSASISCKSSQLLYSDGKTYLSWLLQRPQSPKRLIYLVS KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGIDFHQTFGGGK LEIK (SEQ ID NO:169)。

[0414] 亲代小鼠抗MS4A4A抗体4A-25含有包含以下氨基酸序列的重链可变区:QVTLKESG PGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSDMGVGVV RQPSGEGLEWLADIWDDNKYYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKI TSVDTADTATYYCARRANYGNLFDYWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO:170),和包含以下氨基酸序列的轻链可变区:DIVMTQSLKFMS TSVGDRVSITCKASQNVRSVAWAYQQKPGQSPKVL IYWASNRHT GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYLTFGSGT KLEIK (SEQ ID NO:171)。

[0415] 一种使非人抗体人源化的方法是将来自非人(例如鼠类)抗体的CDR移植到人抗体受者框架上。此CDR移植可能由于人源化抗体框架的扰动而导致所述抗体对其靶标的亲和力减弱或完全丧失。因此,人框架中的某些氨基酸残基可能需要用来自鼠类抗体框架的对

应位置的氨基酸残基替换(回复突变)以恢复减弱或丧失的亲合力。因此,必须确定在所选人抗体种系受者框架的情形下要替换的氨基酸残基,使得人源化抗体实质上保留功能和互补位。另外,对于良好可制造性和下游开发,期望保留或改善的热稳定性和溶解性。

[0416] 因此,利用MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canada) 的BioMOE模块将基于结构的抗体建模应用于使小鼠抗MS4A4A单克隆抗体4A-202、4A-18、4A-21和4A-25人源化的过程中。简而言之,将待人源化的小鼠单克隆抗体的VH和VL氨基酸序列与从IMGT (<http://www.imgt.org/>) 获取的人VL、VH、LJ、HJ功能性种系氨基酸序列进行比较。分析中不包括假基因和ORF。每一种小鼠单克隆抗体(询问),选择五个最类似的VL和五个最类似的VH种系氨基酸序列并且将其与最类似的VJ和HJ基因组合,从而产生25个人源化氨基酸序列。根据AbM定义 (<http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrdef>) 对要移植到人框架上的CDR进行定义。

[0417] 使用MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canada) 的BioMOE模块或Antibody Modeler模块,使用询问和25个人源化氨基酸序列来创建Fv同源性模型。在整个抗体同源性建模过程中,使用AMBER10:EHT力场分析以达到能量最小化。基于所获得的Fv同源性模型,通过MOE所提供的评分度量对诸如VL与VH之间的相互作用能、基于座标的等电点(3D pI)、疏水性区片和带电表面区域的分子描述符进行计算、分析和分类。利用所述分子描述符对人源化单克隆抗体进行优先顺序排序以用于下游实验程序,包括蛋白质表达、纯化、结合亲和力研究和功能测定。

[0418] MOE的BioMOE模块提供工具Mutation Site Properties,以使回复突变的潜在残基可视化并对其进行分类。在本文中,回复突变定义为回复至原始询问氨基酸序列从而替换人源化氨基酸序列的氨基酸取代。使用此工具,针对一级氨基酸序列和3D Fv同源性模型的3D结构两者,对原始询问(参考)与所選人源化变体进行单独比较。

[0419] 基于氨基酸类型差异、与CDR残基的相互作用电势、VL/VH配对的冲击电势以及CDR中和CDR附近的疏水性且带电表面区域的电势变化,对参考(即亲代)抗体与人源化变体之间的变化进行分类。

[0420] 对具有显著电荷差异或含有强H键相互作用的CDR或VL/VH界面附近的突变进行单独评估,并且使显著破坏性突变回复至原始询问残基。因此,人源化氨基酸序列可含有至多五个回复突变。下文表1至表4中提供可变重链和可变轻链询问小鼠单克隆抗体(小鼠抗MS4A4A抗体4A-202、小鼠抗MS4A4A抗体4A-18、小鼠抗MS4A4A抗体4A-21和小鼠抗MS4A4A抗体4A-25)和具有或不具回复突变的人源化单克隆抗体的氨基酸序列。在表1至表4中,CDR序列(Kabat)加下划线。

[0421] 表1

[0422]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-202	QVQLQQSGAELARPGAS VKLSCKASGYTFTNYWM	4	DIVLTQSPASLAVSL GQRATISCRASESVD	16

[0423]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
	<u>QWVKQRPGQGLEWIGAT</u> <u>HPGHGDTRYTQKFKGKA</u> TLSADKSSSTAYMQLSNL ASEDSAVYYCAREEVYY <u>GFRSYWYFDVWGRGTL</u> VTVSS		<u>NYGVSEFMNWFQQK</u> <u>PGQPPKLLIYGASNQ</u> <u>GSGVPARFSGSGSGT</u> DFSLNIHPMEEDDTA <u>MYFCQQSKEVPPTF</u> GGGTKLEIK	
4A-301	<u>QVQLVQSGAEVKKPGAS</u> <u>VKVSKASGYTFTNYW</u> <u>MQWVRQAPGQGLEWM</u> <u>GATHPGHGDTRYAQKFQ</u> <u>GRVTMTRDTSTSTVYME</u> LSSLRSEDVAVYYCAREE <u>VYYGFRSYWYFDVWGR</u> GTLVTVSS	5	DIVMTQSPDSLAVSL <u>GERATINCRASESVD</u> <u>NYGVSEFMNWFQQK</u> <u>PGQPPKLLIYGASNQ</u> <u>GSGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYCQQSKEVPPTF</u> GGGTKVEIK	17
4A-302	<u>QVQLVQSGAEVKKPGAS</u> <u>VKVSKASGYTFTNYW</u> <u>MQWVRQAPGQGLEWM</u> <u>GATHPGHGDTRYAQKFQ</u> <u>GRVTMTRDTSTSTVYME</u> LSSLRSEDVAVYYCAREE <u>VYYGFRSYWYFDVWGR</u> GTLVTVSS	5	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASESVD <u>NYGVSEFMNWFQQK</u> <u>PGQAPRLLIYGASNQ</u> <u>GSGIPARFSGSGSGT</u> DFTLTISSLEPEDFAV <u>YYCQQSKEVPPTFG</u> GGTKVEIK	18
4A-303	<u>EVQLVQSGAEVKKPGES</u> <u>LKISCKGSGYTFTNYWM</u> <u>QWVRQMPGKGLEWMG</u> <u>ATHPGHGDTRYSPSQG</u> QVTISADKSISTAYLQWS SLKASDTAMYYCAREEV <u>YYGFRSYWYFDVWGRG</u> TLVTVSS	6	DIVMTQSPDSLAVSL <u>GERATINCRASESVD</u> <u>NYGVSEFMNWFQQK</u> <u>PGQPPKLLIYGASNQ</u> <u>GSGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYCQQSKEVPPTF</u> GGGTKVEIK	17
4A-304	<u>QVQLVQSGAEVKKPGAS</u> <u>VKVSKASGYTFTNYW</u> <u>MQWVRQAPGQGLEWM</u> <u>GATHPGHGDTRYAQKFQ</u> <u>GRVTMTRDTSTSTVYME</u> LSSLRSEDVAVYYCAREE <u>VYYGFRSYWYFDVWGR</u> GTLVTVSS	5	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSCRASESVD <u>NYGVSEFMNWFQQK</u> <u>PGQAPRLLIYGASNQ</u> <u>GSGIPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISRLEPEDFA <u>VYYCQQSKEVPPTF</u> GGGTKVEIK	19
4A-305	<u>EVQLVQSGAEVKKPGAT</u> <u>VKISCKVSGYTFTNYWM</u> <u>QWVQQAPGKGLEWMGA</u> <u>THPGHGDTRYAEKFQGR</u> VTITADTSTDTAYMELSS LRSEDVAVYYCAREEVY <u>YGFRSYWYFDVWGRGT</u> LTVSS	7	DIVMTQSPDSLAVSL <u>GERATINCRASESVD</u> <u>NYGVSEFMNWFQQK</u> <u>PGQPPKLLIYGASNQ</u> <u>GSGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYCQQSKEVPPTF</u> GGGTKVEIK	17
4A-306	<u>QVQLVQSGAEVKKPGAS</u>	5	DIQMTQSPSSLSASV	20

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
	<u>VKV</u> SCKASGYTFTNYW <u>MQW</u> VVRQAPGQGLEWM <u>GATH</u> PGHGDTRYAQKFQ <u>GRVT</u> MTRDTSTSTVYME <u>LSSL</u> RSED ^T AVYYCAREE <u>VYYG</u> FRSYWYFDVWGR GTLVTVSS		GDRVTITCRASESVD <u>NYGV</u> SFMN ^{WY} QQK <u>PGK</u> APKLLIYGASN <u>QGS</u> GVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFA <u>TYYC</u> QQSKEVPPTF GGGTKVEIK	
4A-307	<u>QVQL</u> VQSGAEVKKPGAS <u>VKV</u> SCKASGYTFTNYW <u>MQW</u> VVRQAPGQGLEWM <u>GATH</u> PGHGDTRYAQKFQ <u>GRVT</u> MTADKSTSTVYME <u>LSSL</u> RSED ^T AVYYCAREE <u>VYYG</u> FRSYWYFDVWGR GTLVTVSS	8	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCRASESVD <u>NYGV</u> SFMN ^{WY} QQK <u>PGQ</u> PPKLLIYGASNQ <u>GSG</u> VPDFRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYC</u> QQSKEVPPTF GGGTKVEIK	17
4A-308	<u>QVQL</u> VQSGAEVKKPGAS <u>VKV</u> SCKASGYTFTNYW <u>MQW</u> VVRQAPGQGLEWM <u>GATH</u> PGHGDTRYAQKFQ <u>GRVT</u> MTADKSTSTAYME <u>LSSL</u> RSED ^T AVYYCAREE <u>VYYG</u> FRSYWYFDVWGR GTLVTVSS	9	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCRASESVD <u>NYGV</u> SFMN ^{WY} QQK <u>PGQ</u> PPKLLIYGASNQ <u>GSG</u> VPDFRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYC</u> QQSKEVPPTF GGGTKVEIK	17
4A-309	<u>QVQL</u> VQSGAEVKKPGAS <u>VKV</u> SCKASGYTFTNYW <u>MQW</u> VVRQAPGQGLEWM <u>GATH</u> PGHGDTRYAQKFQ <u>GRVT</u> LTADKSISTAYMEL <u>SRLR</u> SDDTVVYYCAREE <u>VYYG</u> FRSYWYFDVWGR GTLVTVSS	10	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLS ^{CR} ASESVD <u>NYGV</u> SFMN ^{WY} QQK <u>PGQ</u> APRLLIYGASNQ <u>GSG</u> IPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAV <u>YYC</u> QQSKEVPPTFG GGTKVEIK	18
4A-310	<u>EVQL</u> VQSGAEVKKPGES <u>LKIS</u> CKGSGYTFTNYWM <u>QWVR</u> QMPGKGLEWMG <u>ATH</u> PGHGDTRYSPSFQG <u>QVTI</u> SADKSSSTAYLQWS <u>SLKA</u> SDTAMYCAREEV <u>YYG</u> FRSYWYFDVWGRG TLVTVSS	11	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCRASESVD <u>NYGV</u> SFMN ^{WY} QQK <u>PGQ</u> PPKLLIYGASNQ <u>GSG</u> VPDFRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYC</u> QQSKEVPPTF GGGTKVEIK	17
4A-311	<u>EVQL</u> VQSGAEVKKPGAT <u>VKIS</u> CKVSGYTFTNYWM <u>QWV</u> QQAPGKGLEWMGA <u>THP</u> GHGDTRYAEKFQGR <u>VTIT</u> ADKSTSTAYMELSS <u>LRSE</u> DTAVYYCAREEVY <u>YG</u> FRSYWYFDVWGRGT LTVTVSS	12	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCRASESVD <u>NYGV</u> SFMN ^{WY} QQK <u>PGQ</u> PPKLLIYGASNQ <u>GSG</u> VPDFRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVA <u>VYYC</u> QQSKEVPPTF GGGTKVEIK	17

[0424]

[0425]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-312	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSC <u>KASGYTFTNYW</u> MQWVRQAPGQGLEWM GATHPGHGDTRYA <u>QKFQ</u> GRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED <u>AVYYCAREE</u> VDYGFRSYWYFDVWGR GTLVTVSS	13	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCR <u>ASESVD</u> NYGV <u>SFMN</u> WYQOK PGQAPRLLIYGAS <u>NQ</u> QSGIPARFSGSGSGT DFTLTISSELPEDFAV YYCQOSKEVPPTFG GGTKVEIK	21
4A-313	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSC <u>KASGYTFTNYW</u> MQWVRQAPGQGLEWM GATHPGHGDTRYA <u>QKFQ</u> GRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED <u>AVYYCAREE</u> VYYGFRSYWYFDLWGR GTLVTVSS	14	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCR <u>ASESVD</u> NYGVSRMNWYQOK PGQAPRLLIYGAS <u>NQ</u> GSGIPARFSGSGSGT DFTLTISSELPEDFAV YYCQOSKEVPPTFG GGTKVEIK	22
4A-314	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSC <u>KASGYTFTNYW</u> MQWVRQAPGQGLEWM GTTLP <u>GHGDTRYA</u> QKFQ GRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED <u>AVYYCAREE</u> VYYGFRSYWYFDVWGR GTLVTVSS	15	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCR <u>ASESVD</u> NYGVSRMNWYQOK PGQAPRLLIYGAS <u>NQ</u> GSGIPARFSGSGSGT DFTLTISSELPEDFAV YYCQOSKEVPPTFG GGTKVEIK	22

[0426] 表2

[0427]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-18	QVQLQQPGTELVKPGASV KLSC <u>KASGYTFTSYWIHW</u> VKQRPGQGLEWIGNINPTN GGTNYNERFKSKATLTVD KSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARAYYYGSSLFAYW GQGTLVTVSS	23	DIVMTQSQKFMSTT VGDRVSITC <u>KASQNV</u> GTAVAW <u>SQKPGQS</u> PKLLIY <u>SAS</u> YRHTGV PDRFTGSGSGTDFTL TITNMQSEDLADYFC QQYSTYPWTFGGGT KLEIK	31
4A-315	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSC <u>KASGYTFTSYWIHW</u> VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYA <u>QKFQGRVTMTR</u> DTSTSTVYME <u>LSSLRSED</u> AVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	24	DIVMTQSPSFLSASV GDRVTITC <u>KASQNV</u> GTAVAWYQOKPGK APKLLIY <u>SAS</u> YRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32

[0428]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-31 6	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTMT VDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARAYYYGSSLFA YWGQGTLLTVSS	25	DIQLTQSPSFLSASVG DRVTITCKASQNVGT AVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRHTGVP SRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ YSTYPWTFGGGTKV EIKR	33
4A-31 7	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTMT VDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARAYYYGSSLFA YWGQGTLLTVSS	25	DIVMTQSPSFLSASV GDRVTITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32
4A-31 8	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTMT VDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAYYYGSSLFA YWGQGTLLTVSS	26	DIQLTQSPSFLSASVG DRVTITCKASQNVGT AVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRHTGVP SRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ YSTYPWTFGGGTKV EIKR	33
4A-31 9	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTMT VDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAYYYGSSLFA YWGQGTLLTVSS	26	DIVMTQSPSFLSASV GDRVTITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32
4A-32 0	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTSTR DTSISTAYMELSRLRSDDT VYYCARAYYYGSSLFA YWGQGTLLTVSS	27	DIVMTQSPSFLSASV GDRVTITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32

[0429]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-32 1	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTSTR DTSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	27	DIVMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPEK APKSLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	34
4A-32 2	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTSTV DKSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	28	DIQLTQSPSFLSASV DRVITITCKASQNVGT AVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRHTGVP SRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ YSTYPWTFGGGTKV EIKR	33
4A-32 3	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTSTV DKSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	28	DIVMTQSPSFLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32
4A-32 4	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTSTV DKSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPEK APKSLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	35
4A-32 5	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQGLEWMGNINPT NGGTNYAQKFQGRVTSTV DKSISTAYMELSRLRSDDT VVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	28	DIVMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPEK APKSLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	34

[0430]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-32 6	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQRLEWMGNINPT NGGTNYSQKFQGRVTITRD TSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAYYYGSSLFAYW GQGTLVTVSS	29	DIVMTQSPSFLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32
4A-32 7	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQRLEWMGNINPT NGGTNYSQKFQGRVTITRD TSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARAYYYGSSLFAYW GQGTLVTVSS	29	AIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	36
4A-32 8	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQRLEWMGNINPT NGGTNYSQKFQGRVTITV DKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAY WGQTLVTVSS	30	DIQLTQSPSFLSASV DRVITITCKASQNVGT AVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRHTGVP SRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ YSTYPWTFGGGTKV EIK	37
4A-32 9	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQRLEWMGNINPT NGGTNYSQKFQGRVTITV DKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAY WGQTLVTVSS	30	DIVMTQSPSFLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPWTFGGGT KVEIK	32
4A-33 0	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQRLEWMGNINPT NGGTNYSQKFQGRVTITV DKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAY WGQTLVTVSS	30	AIQLTQSPSSLSASV DRVITITCKASQNVGT AVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRHTGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQ YSTYPWTFGGGTKV EIK	38

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0431] 4A-33 1	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYWIHW VRQAPGQRLEWMGNINPT NGGTNYSQKFQGRVTITV DKSASTAYMELSSLRSED AVYYCARAYYYGSSLFAY WGQGTLVTVSS	30	AIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQNV GTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYRHTG VPSRFGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYC QQYSTYPTWTFGGGT KVEIK	36

[0432] 表3

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0433] 4A-2 1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYIFTSYGLSWVKQ TPGKGLKWMGWINTYSGV PTYANDFKGRFAFSLETS STTYLRINNLKNDDTATYF CARSLVDYWGQGTPLTVS S	39	DVVMQTPTPLSVTI GQSASISCKSSQSL YSDGKTYLSWLLQR PGQSPKRLIYLVSKL DSGVPDRFTGSGSG TDFTLKISRVEAEDL GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKLEIK	54
[0433] 4A-3 32	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGTPLTV VSS	40	DVVMQTSPSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	55
[0433] 4A-3 33	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTTYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGTPLTV VSS	41	DVVMQTSPSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	55
[0433] 4A-3 34	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGTPLTV VSS	40	DIVMTQTPPLSSPVT GQPASISCKSSQSL YSDGKTYLSWLQQR PGQPPRLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGAG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	56

[0434]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 35	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	40	DVVMQTPLSSPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWLQQ RPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGA GTDFTLKISRVEAED VGVYYCWQGIDFH QTFGGGTKVEIK	57
4A-3 36	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	40	DVVMQTPLSSPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWLQQ RPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGA GTDFTLKISRVEAED VGVYYCWQGIDFH QTFGGGTKVEIK	58
4A-3 37	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTTYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	41	DIVMTQTPLSSPVT GQPASISCKSSQSL YSDGKTYLSWLQQR PGQPPRLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGAG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	56
4A-3 38	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTTYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	41	DVVMQTPLSSPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWLQQ RPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGA GTDFTLKISRVEAED VGVYYCWQGIDFH QTFGGGTKVEIK	57
4A-3 39	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTTYLQISSLKAEDTAV YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	41	DVVMQTPLSSPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWLQQ RPGQPPRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGA GTDFTLKISRVEAED VGVYYCWQGIDFH QTFGGGTKVEIK	58

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 40	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQRLEWMGWINTYS GVPTYSQKFQGRVTITLDT SASTTYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	42	DVVMQTPLSLSVT PGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWYLQ KPGQPPQLLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	59
4A-3 41	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQRLEWMGWINTYS GVPTYSQKFQGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	43	DVVMQTPLSLSVT PGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWYLQ KPGQPPQLLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	59
4A-3 42	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFTSYGLSWVR QAPGQGLEWMGWINTYSG VPTYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	44	DVVMQTPLSLSVT PGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWYLQ KPGQPPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	60
4A-3 43	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFTSYGLSWVR QAPGQGLEWMGWINTYSG VPTYAQKFQGRVTMTLDT STSTTYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	45	DVVMQTPLSLSVT PGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWYLQ KPGQPPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	60
4A-3 44	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSLVDYWGQGLV TVSS	46	DVVMQTPLSLSVT PGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWYLQ KPGQPPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	60

[0435]

[0436]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 45	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQRLEWMGWINTYS GVPTYSQKFQGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	43	DIVMTQTPLSLSVTP GQPASISCKSSQSLL YSDGKTYLSWYLQK PGQPPQLLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	61
4A-3 46	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQKFQGRVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSLVDYWGQGLTV TVSS	46	DIVMTQTPLSLSVTP GQPASISCKSSQSLL YSDGKTYLSWYLQK PGQPPQLLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	61
4A-3 47	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQRLEWMGWINTYS GVPTYSQKFQGRVTITLDT SASTTYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	42	DIVMTQTPLSLSVTP GQPASISCKSSQSLL YSDGKTYLSWYLQK PGQPPQLLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	61
4A-3 48	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFTSYGLSWVR QAPGQGLEWMGWINTYSG VPTYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	44	DIVMTQTPLSLSVTP GQPASISCKSSQSLL YSDGKTYLSWYLQK PGQPPQLLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	61
4A-3 49	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFTSYGLSWVR QAPGQGLEWMGWINTYSG VPTYAQKFQGRVTMTLDT STSTTYMELSSLRSEDTA YYCARSLVDYWGQGLVT VSS	45	DIVMTQTPLSLSVTP GQPASISCKSSQSLL YSDGKTYLSWYLQK PGQPPQLLIYLVSKL DSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVG VYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	61

[0437]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 50	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	55
4A-3 51	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	62
4A-3 52	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSGGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	63
4A-3 53	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSEGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	64
4A-3 54	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSAGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	65

[0438]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 55	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGLVT VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSSGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	66
4A-3 56	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGLVT VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSQGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	67
4A-3 57	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGLVT VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYEVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	68
4A-3 58	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGLVT VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIRFHQT FGGGTKVEIK	69
4A-3 59	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGLVT VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKASQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG ADFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	70

[0439]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 60	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSGQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSRL LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	71
4A-3 61	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LESGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	72
4A-3 62	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSRL LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	73
4A-3 63	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLADYWGQGTLLV VSS	47	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LSSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	74
4A-3 64	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTMVDYWGQGTLLV TVSS	48	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKASQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG ADFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	70

[0440]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 65	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTMVDYWGQGTLV TVSS	48	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LSSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	74
4A-3 66	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTMVDYWGQGTLV TVSS	48	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	62
4A-3 67	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTMVDYWGQGTLV TVSS	48	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	55
4A-3 68	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTMVDYWGQGTLV TVSS	48	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LESGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	72
4A-3 69	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTMVDYWGQGTLV TVSS	48	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIRFHQT FGGGTKVEIK	69

[0441]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 70	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLGDYWGQGT LV T VSS	49	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSGQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSR LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	71
4A-3 71	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLGDYWGQGT LV T VSS	49	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	55
4A-3 72	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLGDYWGQGT LV T VSS	49	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSQSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSR LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	73
4A-3 73	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLVDYWGQGT LV T VSS	50	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	62
4A-3 74	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFAGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARTLVDYWGQGT LV T VSS	51	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL VSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	62

[0442]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-3 75	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSLADYWGQGLVT VSS	52	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL V SK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	62
4A-3 76	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSMADYWGQGLV TVSS	53	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSDGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL V SK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	62
4A-3 77	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSMADYWGQGLV TVSS	53	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSGGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL V SK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	63
4A-3 78	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSMADYWGQGLV TVSS	53	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSEGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL V SK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	64
4A-3 79	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSMADYWGQGLV TVSS	53	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSAGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYL V SK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	65

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0443] 4A-380	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSMADYWGQGLV TVSS	53	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSSGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	66
4A-381	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARSMADYWGQGLV TVSS	53	DVVMTQSPSLPVT LGQPASISCKSSRSL LYSQGKTYLSWFQQ RPGQSPRRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEADV GVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	67

[0444] 表4

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0445] 4A-25	QVTLKESGPGILQPSQTLST TCSFSGFSLRTSDMGVGVW RQPSGEGLEWLADIWDD NKYYNPSLKSRLTISKDTSS NQVFLKITSVDTADTATYY CARRANYGNLFDYWGQGT AVTVSS	75	DIVMTQSLKFMSTS VGDRVSITCKASQN VRSAAVWYQQKPG QSPKVLIIYWASNRH TGVPDRFTGSGSGT DFTLTISNVQSEDLA DYFCLQHWNYLTFG SGTKLEIK	85
4A-382	QVTLKESGPALVQPTQTLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPPGEALEWLALIWWDD NKYYSTSLKTRLTISKDTSS NQVVLMTNMDPVDTATY YCARRANYGNLFDYWGQ GTAVTVSS	76	DIVLTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQNV RSALAWYQQKPGQ APKVLIIYWASNRHS GVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATY YCQQHWNYLTFGG GTKVEIK	86
4A-383	QVTLKESGPTLVQPTQTLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPPGKALEWLALIWWDD DNKYYSPLKSRLTISKDTSS SNQVVLMTNMDPVDTAT YYCARRANYGNLFDYWG QGLTVTVSS	77	DIVLTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQNV RSALAWYQQKPGQ APKLLIYWASNRHS GVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATY YCQQHWNYLTFGG GTKVEIK	87

[0446]

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
4A-38 4	QVTLRESGPALVQPTQTLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPPGEALEWLALIWWDD NKYYSTSLKTRLTISKDTSS NQVVLMTNMDPVDATY YCARRANYGNLFDYWGQ GTLVTVSS	78	DIVMTQSPSSMSASV GDRVITITCQASQNV RSAVAWYQQKPGK APKLLIYWASNRHT GVPSRFSGSGSGTDF TFTISSLQPEDIATYY CQQHWNLYLTFGGG TKVEIK	88
4A-38 5	QVTLKESGPTLVKPTQTLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPPGKALEWLALIWWDD DNKYYSPLKSRITITKDTSS SNQVVLMTNMDPVDAT YYCARRANYGNLFDYWG QGTLVTVSS	79	DIVMTQSPSSLSTSV GDRVITITCRASQNV RSALAWYQQKPEKA PKSLIYWASNRHSG VPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYY CQQHWNLYLTFGGG TKVEIK	89
4A-38 6	QVTLKESGPVLVQPTETLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPPGKALEWLAHIWWDD DNKSYSTSLKSRITITKDTSS SNQVVLMTNMDPVDAT YYCARRANYGNLFDYWG QGTLVTVSS	80	DIVMTQSPSSLASV GDRVITITCRASQNV RSALAWYQQKPEQA PKSLIYWASNRHSG VPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYY CQQHWNLYLTFGGG TKVEIK	90
4A-38 7	QVTLKESGPVLVQPTETLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPSGKALEWLAHIWWDD DNKSYSTSLKSRITITKDTSS KNQVVLMTNMDPVDAT YYCARRANYGNLFDYWG QGTLVTVSS	81	DIVMTQSPSSLASV GDRVITITCQASQNV RSALNWFYQQKPGK APKLLIYWASNRHT GVPSRFSGSGSGTDF TFTISSLQSEDIATYY CQQHWNLYLTFGGG TKVEIK	91
4A-38 8	QVTLKESGPVLVQPTETLT LTCTFSGFSLRTSDMGVSW IRQPSGEGLEWLAHIWWDD DNKSYSTSLKSRITITKDTSS KNQVVLMTNMDPVDAT YYCARRANYGNLFDYWG QGTLVTVSS	82	DIVMTQSPSSLASV GDRVITITCQASQNV RSALNWFYQQKPGK APKLLIYWASNRHT GVPSRFSGSGSGTDF TFTISSLQSEDIATYY CQQHWNLYLTFGGG TKVEIK	91

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0447] 4A-389	QVTLQESGPGLVKPSETLS LTC AVSGFSLRTSDMGVG WIRQPPGEGLEWIGSIWWD DNKYYNPSLKSRTISKDT SKNQVSLKLSSVDAADTA VYYCARRANYGNLFDYW QGTLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQNV RSALAWYQKPEQA PKSLIYWASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISNRHPEDFATYYC QQHWNYLTFGGGT KVEIK	92
[0448] 4A-390	QVQLQESGPGLVQPSETLS LTC AVSGFSLRTSDMGVG WIRQPPGKGLEWIGSIWYD DNKYYNPSLKSRTISKDT SSNQFSLKLSSVTAADTAV YYCARRANYGNLFDYWG QGTLVTVSS	84	DIQMTQSPSSLSTSV GDRVTITCQASQNV RSALNWFYQKPGK APKLLIYWASNRHT GVPSRFSGSGSGTDF TFTISSLQSEDIATYY CQQHWNYLTFGGG TKVEIK	93

[0448] 本公开的抗MS4A4A抗体的根据Kabat的CDR序列提供于表5至表8中。

[0449]

表 5

抗体	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-202	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYTQK FKG	95	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-301	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-302	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-303	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYSPS FQG	97	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-304	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-305	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAEK FQG	98	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-306	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-307	NYWMQ	94	ATHPGHG	96	EEVYYG	100	RASESVD	103	GASNQG	105	QQSKEV	107

[0450]

抗体	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
			DTRYAQK FQG		FRSYWY FDV		NYGVSF MN		S		PPT	
4A-308	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASEVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-309	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASEVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-310	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYSPS FQG	97	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASEVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-311	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAEK FQG	98	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASEVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-312	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVDYG FRSYWY FDV	101	RASEVD NYGVSF MN	103	GASNQG S	106	QQSKEV PPT	107
4A-313	NYWMQ	94	ATHPGHG DTRYAQK FQG	96	EEVYYG FRSYWY FDL	102	RASEVD NYGVSR MN	104	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107
4A-314	NYWMQ	94	TTLPGHG DTRYAQK FQG	99	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASEVD NYGVSR MN	104	GASNQG S	105	QQSKEV PPT	107

[0451]

表 6

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L 1	SEQ ID NO:	CDR-L 2	SEQ ID NO:	CDR-L 3	SEQ ID NO:
4A-18	SYWIH	108	NINPTNG GTNYNER FKS	109	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-315	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-316	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-317	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-318	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-319	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-320	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-321	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115

[0452]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L 1	SEQ ID NO:	CDR-L 2	SEQ ID NO:	CDR-L 3	SEQ ID NO:
4A-322	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-323	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-324	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-325	SYWIH	108	NINPTNG GTNYAQK FQG	110	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-326	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-327	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-328	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-329	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115
4A-330	SYWIH	108	NINPTNG GTNYSQK	111	AYYYG SSLFAY	112	KASQN VGTAV	113	SASYR HT	114	QQYST YPWT	115

[0453]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L 1	SEQ ID NO:	CDR-L 2	SEQ ID NO:	CDR-L 3	SEQ ID NO:
4A-331	SYWIH	108	FQG NINPTNG GTNYSQK FQG	111	AYYYG SSLFAY	112	A KASQN VGTAV A	113	SASYR HT	114	QQYST YPWWT	115

表 7

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H 3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-21	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAND FKG	117	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-332	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-333	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-334	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-335	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144

[0454]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H 3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-336	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-337	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-338	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-339	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-340	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-341	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-342	SYGLS	116	INTYSGV PTYAQKF QG	120	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-343	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-344	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK	121	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144

[0455]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H 3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-345	SYGLS	116	FQG WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KTYLS KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-346	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-347	SYGLS	116	WINTYSG VPTYSQK FQG	119	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-348	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-349	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQK FQG	121	SLVDY	123	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-350	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-351	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSRSL LYSDG KTYLS	131	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-352	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSRSL LYSGG KTYLS	132	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-353	SYGLS	116	WINTYSG	118	TLADY	124	KSSRSL	133	LVSKLD	139	WQGIDFHQT	144

[0456]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H 3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
			VPTYAQQ FTG				LYSEG KTYLS		S			
4A-354	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSRSL LYSAG KTYLS	134	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-355	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSRSL LYSSGK TYLS	135	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-356	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSRSL LYSQG KTYLS	136	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-357	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	EVSKLD S	140	WQGIDFHQT	144
4A-358	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIHFHQT	145
4A-359	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KASQSL LYSDG KTYLS	137	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-360	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSGQSL LYSDG KTYLS	138	LVSRLD S	141	WQGIDFHQT	144
4A-361	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLE S	142	WQGIDFHQT	144

[0457]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H 3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-362	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSRLD S	141	WQGIDFHQT	144
4A-363	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLADY	124	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLSS	143	WQGIDFHQT	144
4A-364	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KASQSL LYSDG KTYLS	137	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-365	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLSS	143	WQGIDFHQT	144
4A-366	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSRSL LYSDG KTYLS	131	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-367	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-368	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLE S	142	WQGIDFHQT	144
4A-369	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TMVDY	125	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQIRFHQT	145
4A-370	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ	118	TLGDY	126	KSGQSL LYSDG	138	LVSRLD S	141	WQGIDFHQT	144

[0458]

抗体	CDR-H 1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H 3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-371	SYGLS	116	FTG WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLGDY	126	KTYLS KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-372	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLGDY	126	KSSQSL LYSDG KTYLS	130	LVSRLD S	141	WQGIDFHQT	144
4A-373	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	TLVDY	127	KSSRSL LYSDG KTYLS	131	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-374	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FAG	122	TLVDY	127	KSSRSL LYSDG KTYLS	131	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-375	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SLADY	128	KSSRSL LYSDG KTYLS	131	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-376	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSSRSL LYSDG KTYLS	131	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-377	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSSRSL LYSGG KTYLS	132	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-378	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSSRSL LYSEG KTYLS	133	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-379	SYGLS	116	WINTYSG	118	SMADY	129	KSSRSL	134	LVSKLD	139	WQGIDFHQT	144

[0459]

抗体	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
			VPTYAQQ FTG				LYSAG KTYLS		S			
4A-380	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSSRSL LYSSGK TYLS	135	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144
4A-381	SYGLS	116	WINTYSG VPTYAQQ FTG	118	SMADY	129	KSSRSL LYSQG KTYLS	136	LVSKLD S	139	WQGIDFHQT	144

表 8

抗体	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-25	TSDMGV G	146	DIWWD DNKYY NPSLKS	148	RANY GNLFD Y	154	KASQN VRSVA A	155	WASNR HT	159	QHW YLT	162
4A-382	TSDMGV S	147	LIWWD DNKYY STSLKT	149	RANY GNLFD Y	154	RASQN VRSAL A	156	WASNR HS	160	QHW NYLT	163
4A-383	TSDMGV G	146	LIWWD DNKYY SPSLKS	150	RANY GNLFD Y	154	RASQN VRSAL A	156	WASNR HS	160	QHW NYLT	163
4A-384	TSDMGV S	147	LIWWD DNKYY STSLKT	149	RANY GNLFD Y	154	QASQN VRSVA A	157	WASNR HT	159	QHW NYLT	163

[0460]

4A-385	TSDMGV G	146	LIWWD DNKYY SPLSKS	150	RANY GNLFD Y	154	RASQN VRSAL A	156	WASNR HS	160	QQHW NYLT	163
4A-386	TSDMGV S	147	HIWWD DNKSY STSLKS	151	RANY GNLFD Y	154	RASQN VRSAL A	156	WASNR HS	160	QQHW NYLT	163
4A-387	TSDMGV S	147	HIWWD DNKSY STSLKS	151	RANY GNLFD Y	154	QASQN VRSAL N	158	WASNR HT	159	QQHW NYLT	163
4A-388	TSDMGV S	147	HIWWD DNKSY STSLKS	151	RANY GNLFD Y	154	QASQN VRSAL N	158	WASNR HT	159	QQHW NYLT	163
4A-389	TSDMGV G	146	SIWWD DNKYY NPSLKS	152	RANY GNLFD Y	154	RASQN VRSAL A	156	WASSL QS	161	QQHW NYLT	163
4A-390	TSDMGV G	146	SIWYD DNKYY NPSLKS	153	RANY GNLFD Y	154	QASQN VRSAL N	158	WASNR HT	159	QQHW NYLT	163

[0461] 实施例2:重组MS4A4A可溶性多肽的制备

[0462] 对人MS4A4A的一级氨基酸序列(SEQ ID NO:1)进行分析以提供关于其二级和三级

结构的信息。人MS4A4A蛋白具有四个跨膜结构域(TMD),并且每个TMD由21个氨基酸构成。根据氨基酸组成、残基数量和脂质双层的厚度预测,预测MS4A4A会包含四螺旋束(4HB)和两个细胞外环(ECL),所述两个环从N末端至C末端分别连接TMD1和TMD2和TMD3和TMD4(参见图1)。图1示出了人MS4A4A的一级氨基酸序列;细胞内结构域为斜体,跨膜结构域加下划线,并且所述两个细胞外环为粗斜体。

[0463] 使用RCSB蛋白质数据库([http://www\(dot\)rcsb\(dot\)org/](http://www(dot)rcsb(dot)org/))鉴定出可溶性4HB支架蛋白质(预测其会模拟MS4A4A的几何学和构象)的两种模板结构。这些蛋白质支架的PDB_ID为1P68和1M6T。图2A、图2B和图2C示出了两种可溶性四螺旋束支架的结构和一级氨基酸序列(PDB_ID:1P68和PDB_ID:1M6T)。在图2A中,跨膜结构域在结构中呈现为螺旋状;在图2B和图2C中,跨膜结构域在1P68和1M6T的对应氨基酸序列中加下划线。

[0464] 将人MS4A4A的所述两个ECL的氨基酸序列重组置于1P68中,产生多肽JS1和多肽JS4(多肽JS1的阴性对照),并且将其重组置于1M6T中,产生多肽JS5、多肽JS6;和多肽JS10(其用作多肽JS5和多肽JS6的阴性对照)。(参见图3。)图3A示出了多肽JS1、多肽JS5和多肽JS6的氨基酸序列。图3B示出了阴性对照多肽JS4和阴性对照多肽JS10的氨基酸序列。将编码这些蛋白质/多肽支架的核酸分别插入至具有3' his标签和Avi标签的pcDNA3.4表达载体中。使所得克隆在Expi293细胞中表达并通过Ni-NTA琼脂糖(QIAGEN目录号30230)使用制造商的方案进行纯化。产生这些重组MS4A4A可溶性多肽(也称为环状接枝抗原)以获得模拟MS4A4A的所述两个ECL的结构和功能的可溶性蛋白质,其用作抗体结合表征用的可溶性试剂。

[0465] 实施例3:通过肽结合对抗MS4A4A抗体的表位确定

[0466] 如下测定抗MS4A4A抗体4A-21的表位结合特征。JPT peptides(Berlin,Germany)合成一组来源于人MS4A4A(SEQ ID NO:1)的细胞外环(ECL)的重叠肽。这些肽的长度为15个氨基酸,其各自偏移2个氨基酸。在N末端上使所述肽生物素化。肽4A.1至4A.4来源于人MS4A4A ECL1和周围区。肽4A.5至4A.12是来源于人MS4A4AECL2和周围区。

[0467] 使用连续流动微量点样器(CFM)将肽文库印刷至链霉抗生物素蛋白包被的芯片(Xantec SAD50M,Dusseldorf,Germany)上。首先,利用100mM MES,pH 5.5、100 μ L EDC(133mM最终)、100 μ L S-NHS(33.3mM最终)使芯片活化。将肽文库以每个肽250nM固定至芯片上,所述肽稀释至含有1mg/ml BSA和1 μ g/ml小鼠IgG-生物素的HBS-EP+缓冲液(Teknova目录号H8022)中。固定后,利用1M乙醇胺(pH 8.5)使芯片表面去活化10分钟。将杂交瘤上清液和纯化的抗MS4A4A抗体稀释于含有1mg/ml BSA的HBS-EP+缓冲液中并注射至芯片上。对每种抗MS4A4A抗体进行双重测量以确保再现性。测定每种肽-抗体组合的结合特征,这容许定位每种抗体与之相互作用的线性肽区。

[0468] 如下表9中以粗体所指示,抗MS4A4A抗体4A-21和可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12展示出与对应于人MS4A4A ECL2中的区域的肽的强劲结合。抗MS4A4A抗体4A-21结合肽4A.5至4A.9,跨越人MS4A4A的氨基酸残基155至177。抗MS4A4A抗体5C12结合肽4A.6至4A.9,跨越人MS4A4A的氨基酸残基157至177。这两种抗体的结合区重叠但并不相同,这表明其与人MS4A4A的ECL2内的不同残基相互作用。使用上文所描述的方法,这两种抗体均未显示出结合至人MS4A4A ECL1。

[0469] 表9

肽	序列	4A-21	5C12
4A.1	ITMMCMASNTYGSNP (SEQ ID NO:292)	-11.16	-1.49
4A.2	MMCMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:293)	-11.53	-0.19
4A.3	CMASNTYGSNPISVY (SEQ ID NO:294)	-10.55	-1.54
4A.4	ASNTYGSNPISVYIG (SEQ ID NO:295)	-7.90	-0.46
4A.5	LAFYSFHHPYCNYYG (SEQ ID NO:296)	382.80	1.60
[0470] 4A.6	FYSFHHPYCNYYGNS (SEQ ID NO:297)	485.67	44.38
4A.7	SFHHPYCNYYGNSNN (SEQ ID NO:298)	446.10	17.75
4A.8	HHPYCNYYGNSNNCH (SEQ ID NO:299)	308.63	22.30
4A.9	PYCNYYGNSNNCHGT (SEQ ID NO:300)	225.21	30.86
4A.10	CNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:301)	-4.50	1.13
4A.11	YYGNSNNCHGTMSIL (SEQ ID NO:302)	-6.50	-2.73
4A.12	GNSNNCHGTMSILMG (SEQ ID NO:303)	-5.20	-4.08

[0471] 实施例4:抗MS4A4A抗体与对应于人MS4A4A细胞外结构域的肽的结合

[0472] 使用酶联免疫吸附测定(ELISA)测试抗MS4A4A杂交瘤上清液(纯净)或纯化的mIgG(5 μ g/ml)与对应于ECL1(SEQ ID NO:1的人MS4A4A的氨基酸残基86-98)和ECL2(SEQ ID NO:1的人MS4A4A的氨基酸残基159-179)的人MS4A4A肽的结合。简而言之,用在包被缓冲液(0.05M碳酸盐缓冲液,pH 9.6,Millipore Sigma目录号C3041)中的2 μ g/ml或10 μ g/ml合成游离肽或BSA结合肽将96孔聚苯乙烯板在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。然后将包被的板用ELISA稀释液(PBS+0.5%BSA+0.05% Tween 20)封闭1小时,在PBST(PBS+0.05% Tween 20,Thermo目录号28352)中以3 \times 300 μ L洗涤,然后将抗体添加至板中(50 μ l/孔)。30min孵育(室温,振荡)后,在PBST中以3 \times 300 μ L洗涤板。添加在ELISA稀释液中以1:1000稀释度得到的二级抗小鼠HRP抗体(Jackson Immunoresearch目录号115-035-003)(50 μ l/孔),并且在室温下振荡孵育30分钟。在最后一组洗涤(3 \times 300 μ L,在PBST中)后,添加50 μ L TMB底物(BioF_x目录号TMBW-1000-01),然后在5-10min后用50 μ L终止溶液(BioF_x目录号BSTOP-1000-01)使反应淬灭。用BioTek Synergy微孔板读数仪,使用GEN5 2.04软件检测淬灭反应孔在650nm下的吸光度。

[0473] 测试纯化的抗MS4A4A鼠类抗体和3种可商购获得的鼠类抗MS4A4A抗体(5C12、3F2和4H2)。与针对BSA小鼠DAP12(不相关的阴性肽对照)所观察到的结合相比,鼠类抗MS4A4A抗体(4A-21、4A-25、4A-202和4A-214)展示出与huMS4A4A-ELC2游离肽的强结合。所述三种可商购获得的抗MS4A4A抗体未展示出与人MS4A4AECL1和ECL2肽的结合。

[0474] 实施例5:抗MS4A4A抗体的表位确定

[0475] MS4A4A的一级氨基酸序列提供关于其二级和三级结构的重要信息。MS4A4A蛋白具有四个跨膜结构域(TMD),并且每个TMD由21个氨基酸构成。典型TMD由厚度为大约40 Å的磷酸二酯脂质双层构成。磷酸头部分产生亲水层,其与细胞外或胞质空间中的亲水性环境相互作用,并且脂质尾产生内部脂质双层,其与TMD的亲脂性残基相互作用。TMD脂质双层的厚度为大约32 Å至34 Å。根据氨基酸组成、残基数量和脂质双层的厚度预测,预测MS4A4A会包含四螺旋束(4HB)和两个细胞外环(ECL),所述两个环从N末端至C末端分别连接TMD1和TMD2和TMD3和TMD4。所述4螺旋束通过从螺旋-脂质双层相互作用和螺旋-螺旋相互作用获得的显著焓增使膜中的MS4A4A稳定。

[0476] MS4A4A ECL的一级氨基酸序列和组成指示与表位相关的重要特征和动力学性质。ECL1由13个氨基酸构成,包括一个半胱氨酸、一个蛋氨酸、一个丙氨酸、三个丝氨酸、一个苏氨酸、两个天冬酰胺、一个酪氨酸、一个脯氨酸、一个异亮氨酸和仅一个甘氨酸残基。ECL2由21个氨基酸构成,包括两个半胱氨酸残基(其由8个氨基酸隔开)、三个丝氨酸、一个苏氨酸、一个苯丙氨酸、三个组氨酸、一个脯氨酸、三个酪氨酸、四个天冬酰胺、一个蛋氨酸和仅两个甘氨酸残基。在ECL1和ECL2中发现极少的甘氨酸残基,但发现若干个大的β-支链氨基酸残基和脯氨酸残基。此外,ECL2含有两个半胱氨酸残基,预测所述两个残基会产生环内二硫键,其进一步降低构象熵。因此,ECL1和ECL2倾向于采用数目显著降低的在刚体型内部运动中彼此相互作用的构象异构体。

[0477] 从Origene购得编码人MS4A4A并含有C末端GFP标签的表达质粒(NM_024021)(目录号RG223557),并且使用其作为模板以在人MS4A4A的细胞外环1(ECL1)的编码区中(下表10中的4A.A1a1-A1a13;SEQ ID NO:1中对应于ECL1的C67至S79;CMASNTYGSNPIS)、人MS4A4A的细胞外环2(ECL2)的编码区中(下表10中的4A.A1a14-A1a34;SEQ ID NO:1中对应于ECL2的S140至S160;SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS)产生单一丙氨酸扫描突变;和ECL2缺失突变(下表11中的4A.A1a35(缺失SEQ ID NO:1中在ECL2内的氨基酸残基150-152)和4A.A1a36(缺失SEQ ID NO:1中在ECL2内的氨基酸残基148-152))。使用本领域标准的重叠聚合酶链式反应技术进行突变。对每个聚合酶链式反应多核酸片段进行纯化,并且使用MluI和AsiSI限制性位点将其亚克隆回至表达载体中。

[0478] 在使用丙氨酸扫描技术进行表位确定之前,使用HEK293T细胞中上述表达构建体的瞬时转染,如下测定抗MS4A4A抗体的相对EC50。将HEK293T细胞接种在6孔板中并且使其生长过夜。第二天,按照制造商的方案,以4:1的Fugene对DNA比率或3:1的Lipofectamine对DNA比率,用Fugene HD(Promega)或Lipofectamine3000(Thermo Fisher Scientific)转染细胞。在转染后大约24小时,使用胰蛋白酶-EDTA收获细胞并处理所述细胞以进行FACS染色。

[0479] 对于FACS染色,将150,000个细胞添加至96孔板的每个孔中并添加在FACS缓冲液(PBS+2% FBS)中的滴定抗MS4A4A抗体并在冰上孵育60分钟。将板离心(1,400rpm,3分钟),倾析出上清液,并且用200μl FACS缓冲液将细胞洗涤三次,每次洗涤之后进行旋转和倾析步骤。抗体以msIgG1或huIgG1嵌合体形式进行测试,并且在冰上添加在FACS缓冲液中的山羊抗人PE(Southern Biotech,目录号2040-09,1:200)或山羊抗小鼠APC(BD Biosciences,目录号550826,1:100)达30分钟。随后用200μl FACS缓冲液将细胞洗涤两次并在iQue细胞

计数器上成像。对GFP阳性群体(代表表达MS4A4A的细胞)测量中值荧光强度(MFI)。

[0480] 最初测试的抗MS4A4A抗体中有六种结合至表达野生型(WT)MS4A4A-GFP的HEK293T细胞:这些抗体包括抗MS4A4A抗体4A-18、4A-21、4A-202以及已公布的鼠类单克隆抗MS4A4A抗体4H2(Kerafast)、5C12(Biolegend)、3F2(Millipore)。测定每种抗体的滴定曲线以确立用于后续表位定位研究的最佳抗MS4A4A抗体浓度。

[0481] 对于表位定位实验,用不同的人MS4A4A表达构建体(如上文所述;参见下表10)转染HEK293T细胞,并且使用六种不同的抗MS4A4A抗体测定抗体结合:4A-21、4A-18、4A-202、4H2、5C12和3F5。将抗MS4A4A抗体结合计算为与用野生型人MS4A4A表达构建体转染的细胞结合的MFI的%。如果MS4A4A多肽中的氨基酸突变导致抗体结合降低至与野生型MS4A4A结合的20%以下,则将所述突变的氨基酸视为抗MS4A4A抗体结合至MS4A4A蛋白所必需的关键氨基酸。MS4A4A蛋白中的一些氨基酸突变导致抗MS4A4A抗体结合降低至51%以下但在20%以上(与结合至野生型MS4A4A相比);将此类氨基酸定义为有助于抗MS4A4A抗体结合至MS4A4A蛋白的氨基酸。

[0482] MS4A4A中的一些氨基酸影响所有所测试抗体的结合,诸如两个半胱氨酸C165和C174,认为这两个半胱氨酸在MS4型蛋白中形成半胱氨酸桥。将此类氨基酸视为结构性氨基酸。

[0483] 这些实验的结果提供于下表10中。如上所述,Ala.1至Ala.13是指ECL1中的MS4A4A突变;Ala.14至Ala.36是指ECL2中的MS4A4A突变。数据示出为与抗MS4A4A抗体与野生型MS4A4A蛋白的结合相比,抗MS4A4A抗体与各种丙氨酸扫描突变的结合%。独立地重复两次定位实验,结果非常类似。一个不同之处在于,抗MS4A4A抗体4A-21和4A-18在两种浓度下以huIgG1形式测试一次并以msIgG1形式测试第二次。下表11示出了来自所述抗体的msIgG1测试的结果。对于所有其他抗体,表10示出了跨越两个实验的平均抗体结合。在下表10中,显示出抗MS4A4A抗体与MS4A4A蛋白的结合在与野生型MS4A4A的所测量结合的20%以下的值为粗体。

[0484] 所有突变均显示出在大约22%-33%之间的等效转染效率(数据未示出)。在细胞中未观察到平均抗体结合与GFP水平之间的相关性,这表明GFP水平不能用作MS4A4A细胞表面表达的预测因子。

[0485] 表10

[0486]

构建体	环序列	4A-2 1	4A-1 8	4A-202 *	4H2	5C12	3F2
WT ECL1	CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:289)	100					
4A.Ala.1	<u>S</u> MASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:255)	84.1	96.6	86.99	72.80	82.36	79.58
4A.Ala.2	C <u>A</u> ASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:256)	12.5	19.1	9.93	7.42	11.04	7.33
4A.Ala.3	CM <u>S</u> SNTYGSNPIS (SEQ ID NO:257)	90.7	116.6	99.12	87.76	94.47	87.46
4A.Ala.4	CMA <u>A</u> NTYGSNPIS (SEQ ID NO:258)	91.2	85.8	92.48	77.90	88.62	82.49
4A.Ala.5	CMAS <u>A</u> TYGSNPIS (SEQ ID NO:259)	93.1	65.6	81.64	75.95	80.92	83.89
4A.Ala.6	CMASNA <u>Y</u> GSNPIS (SEQ ID NO:260)	100.4	87.5	83.22	77.29	78.57	78.38
4A.Ala.7	CMASNT <u>A</u> GSNPIS (SEQ ID NO:261)	114.5	15.8	98.41	93.36	94.96	92.91
4A.Ala.8	CMASNTY <u>A</u> SNPIS (SEQ ID NO:262)	94.6	70.4	83.82	74.41	17.39	84.41
4A.Ala.9	CMASNTYGA <u>N</u> NPIS	99.6	106.0	102.06	85.83	89.83	94.67

[0487]

构建体	环序列	4A-2 1	4A-1 8	4A-202 *	4H2	5C12	3F2
	(SEQ ID NO:263)						
4A.Ala.1 0	CMASNTYGS <u>A</u> PIS (SEQ ID NO:264)	102.3	103.2	124.27	91.27	93.95	89.57
4A.Ala.1 1	CMASNTYGSNA <u>I</u> S (SEQ ID NO:265)	28.7	14.8	35.06	20.53	32.79	25.29
4A.Ala.1 2	CMASNTYGSNP <u>A</u> S (SEQ ID NO:266)	66.4	91.4	57.21	48.93	56.33	49.19
4A.Ala.1 3	CMASNTYGSNPI <u>A</u> (SEQ ID NO:267)	38.4	41.8	32.34	27.38	36.36	28.92
WT ECL2	SFHHPYCNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:290)	100					
4A.Ala.1 4	<u>A</u> FHHPYCNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:268)	94.3	87.8	78.14	83.99	81.28	85.27
4A.Ala.1 5	S <u>A</u> HHPYCNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:269)	118.7	116.9	111.77	84.71	98.51	87.20
4A.Ala.1 6	SF <u>A</u> HHPYCNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:270)	71.0	48.1	76.87	58.00	71.46	64.58
4A.Ala.1 7	SFH <u>A</u> PYCNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:271)	102.8	99.4	125.37	77.01	82.95	85.21
4A.Ala.1 8	SFHHA <u>A</u> YCNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:)	101.4	103.7	89.39	36.92	46.13	42.33
4A.Ala.1 9	SFHHP <u>A</u> CNYYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:272)	83.8	16.3	26.68	1.66	42.27	1.08
4A.Ala.2 0	SFHHPY <u>S</u> NYYGNSNNCHGT MS (SEQ ID NO:273)	5.0	2.8	8.66	1.94	1.74	1.60
4A.Ala.2 1	SFHHPY <u>C</u> YYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:274)	1.8	73.3	93.33	70.08	73.76	80.30
4A.Ala.2 2	SFHHPY <u>CN</u> YGYGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:275)	1.8	3.0	31.23	1.10	0.99	0.88
4A.Ala.2 3	SFHHPYCN <u>Y</u> AGNSNNCHG TMS (SEQ ID NO:276)	1.4	2.7	50.05	1.19	0.96	0.95
4A.Ala.2 4	SFHHPYCNYY <u>A</u> NSNNCHG TMS (SEQ ID NO:277)	57.5	63.0	75.76	27.67	18.20	33.76
4A.Ala.2 5	SFHHPYCNYYG <u>A</u> SNCHG TMS	69.2	40.0	100.54	37.09	25.55	45.60

构建体	环序列	4A-2 1	4A-1 8	4A-202 *	4H2	5C12	3F2
	(SEQ ID NO:278)						
4A.Ala.2 6	SFHHPYCNYYGN <u>N</u> NNCHG TMS (SEQ ID NO:279)	89.3	96.5	90.84	68.48	81.73	68.38
4A.Ala.2 7	SFHHPYCNYYGNS <u>A</u> NCHG TMS (SEQ ID NO:)	98.3	118.6	98.39	99.46	91.60	94.25
4A.Ala.2 8	SFHHPYCNYYGNSN <u>A</u> CHG TMS (SEQ ID NO:280)	87.3	116.4	98.61	86.22	85.94	83.37
4A.Ala.2 9	SFHHPYCNYYGNSNN <u>S</u> HGT MS (SEQ ID NO:281)	8.4	2.7	4.54	1.09	1.01	0.91
4A.Ala.3 0	SFHHPYCNYYGNSNNC <u>A</u> G TMS (SEQ ID NO:282)	87.5	62.6	92.83	72.87	80.56	82.45
4A.Ala.3 1	SFHHPYCNYYGNSNNC <u>H</u> A TMS (SEQ ID NO:283)	147.8	158.6	142.81	123.1 3	124.1 9	135.5 8
4A.Ala.3 2	SFHHPYCNYYGNSNNCHG <u>A</u> MS (SEQ ID NO:284)	61.6	42.9	63.28	44.61	56.19	45.14
4A.Ala.3 3	SFHHPYCNYYGNSNNCHG <u>T</u> AS (SEQ ID NO:285)	81.8	36.1	73.09	62.83	59.85	60.45
4A.Ala.3 4	SFHHPYCNYYGNSNNCHG <u>T</u> MA (SEQ ID NO:286)	113.4	91.0	117.02	102.4 4	99.15	103.8 0
4A.Ala.3 5	SFHHPYCNYY---NNCHGTM <u>S</u> (SEQ ID NO:287)	107.3	2.7	73.14	1.08	1.00	0.88
4A.Ala.3 6	SFHHPYCN-----NNCHGTMS (SEQ ID NO:288)	1.3	2.6	0.07	0.99	0.93	0.83

[0489] *抗体以huIgG1嵌合体形式测试

[0490] 上文所示的结果表明,本公开的抗MS4A4A抗体识别MS4A4A内的不同线性和/或3D结构性表位。

[0491] 基于从这些实验获得的抗MS4A4A抗体结合数据,人MS4A4A内的以下环氨基酸残基视为MS4A4A蛋白内的结构性氨基酸,因为所述残基中的每一个的突变均影响所测试抗MS4A4A抗体的结合:M87、C165、Y167、Y168、C174(基于人MS4A4A蛋白;SEQ ID NO:1)。预测氨基酸残基C165和C174会建立半胱氨酸桥,其在ECL2中形成环。在不存在此半胱氨酸桥的情况下,抗MS4A4A抗体不结合MS4A4A蛋白,这表明MS4A4A的ECL2内的所述环结构对于抗体结合是重要的。环结构重要的更多证据来自两种环缺失突变体(A1a.35和A1a.36),它们也强烈地影响抗体结合。

[0492] 所述结果进一步显示,氨基酸残基Y167和Y168强烈地影响抗MS4A4A抗体4A-21、

4A-18、4H2、5C12和3F2的结合。这些氨基酸残基也在较小程度上影响抗MS4A4A抗体4A-202的结合。另外，ECL1中的氨基酸残基P96、I97和S98在某种程度上降低所测试的所有抗MS4A4A抗体的结合。这些结果表明，所述五个氨基酸残基中的任一个的突变均改变对于抗体识别和结合重要的细胞外结构域的结构，或这些氨基酸残基对于所列出的六种抗MS4A4A抗体中的每一种的相互作用和结合均是重要的。脯氨酸是最受限制的氨基酸残基，其对于多肽的二级和三级结构至关重要。例如，脯氨酸在规则二级结构元件（包括 α 螺旋和 β 折叠）的中间起破坏作用；然而，常发现脯氨酸作为 α 螺旋的第一个氨基酸残基并且在 β 折叠的边缘链中。酪氨酸、异亮氨酸和丝氨酸残基提供多种抗原-抗体相互作用，包括（例如）范德华相互作用（Van der Waals interaction）、 π - π 堆叠和 π 面氢键合相互作用和/或氢键。因此，酪氨酸、脯氨酸、异亮氨酸或丝氨酸残基均可产生明确定义的结构性表位。这四种氨基酸残基中的任何细微变化都可能显著地破坏抗体结合亲和力。

[0493] MS4A4A中氨基酸残基M87A处的突变极大地降低或消除所测试的所有抗MS4A4A抗体的结合。基于ECL1和ECL2采用明确定义的刚体结构并可能彼此相互作用的预测，所示的M87A结合结果表明，预测M87氨基酸残基会是保持MS4A4A的刚性环结构的最关键残基之一，因为M87的侧链可通过范德华接触和氢键通过主链-侧链和/或主链-主链相互作用与ECL1和/或ECL2中的一个或多个 β -支链氨基酸相互作用。

[0494] 下表11列出了本文所公开的抗MS4A4A抗体的独特结合氨基酸残基。抗MS4A4A抗体4A-21在ECL2中需要N166以供结合至人MS4A4A。数据显示，抗MS4A4A抗体4A-18和5C12结合人MS4A4A的ECL1以及ECL2。抗MS4A4A抗体4A-202因氨基酸残基Y164而具有一定结合作用。

[0495] 所有三种可商购获得的抗MS4A4A抗体均结合P163，而本文所公开且在本研究中测试的抗MS4A4A抗体均不结合P163。人MS4A4A的这种脯氨酸P163在食蟹猴MS4A4A蛋白中被精氨酸替换。此观察结果表明，如可商购获得的MS4A4A抗体的结合特征所展示，这种脯氨酸至精氨酸的变化对于确定食蟹猴交叉反应性或缺乏所述交叉反应性是重要的。脯氨酸是在结构上最受限制的氨基酸残基，而精氨酸（食蟹猴MS4A4A中）在生理pH下是带正电的氨基酸。人对食蟹猴MS4A4A中脯氨酸与精氨酸的差异可极大地影响MS4A4A蛋白的构象，因此阻止可商购获得的MS4A4A抗体结合。抗MS4A4A抗体4A-18、4A-21和4A-202似乎不依赖于这种氨基酸进行结合，因此它们与食蟹猴蛋白质的结合未受影响。

[0496] 概括地说，抗MS4A4A抗体4A-21、4A-18和4A-202在MS4A4A上所结合的表位不同于可商购获得的抗MS4A4A抗体（下表11）。可商购获得的抗MS4A4A抗体4H2和3F2表现出相同的表位，所述表位与抗MS4A4A抗体5C12的表位大幅重叠。相比之下，抗MS4A4A抗体4A-18、4A-21和4A-202各自表现出彼此不同并且与可商购获得的抗MS4A4A抗体不同的独特的表位结合特征。这些结合性质差异示于表10中。另外，结果显示，在所测试的抗MS4A4A抗体中没有两种抗体结合人MS4A4A内的相同表位；然而，跨越一些或全部抗体存在共享氨基酸结合残基（例如氨基酸残基Y167和Y168、Y164、N170、T177）。

[0497] 表11

[0498]	抗体	ECL1 残基	ECL2 残基
--------	----	---------	---------

[0499]	4A-21		N166 (关键)
	4A-18	Y92 (关键)	Y164 (关键) H161、N170、T177、M178 (有作用)
	4A-202		Y164 (有作用)
	4H2		Y164 (关键) P163、G169、N170、T177 (有作用)
	5C12	G93 (关键)	G169 (关键) P163、Y164、N170 (有作用)
	3F2		Y164 (关键) P163、G169、N170、T177 (有作用)

[0500] 实施例6:抗MS4A4A抗体与重组MS4A4A可溶性多肽的结合

[0501] 如下测试本公开的抗MS4A4A抗体与如实施例2中所描述的不同重组MS4A4A可溶性多肽结合的能力。将编码本公开的人源化抗MS4A4A抗体的VH和VL结构域的核酸克隆至pcDNA3.4载体中,所述载体含有人IgG1重链恒定结构域或人κ恒定结构域。在Expi293细胞中表达所述人源化抗MS4A4A抗体并按照制造商的方案通过Mab select抗体纯化树脂(GE Healthcare Life Science,目录号17519902)进行纯化。进行ELISA以测量本公开的抗MS4A4A抗体与重组MS4A4A可溶性多肽的结合。将1μg/ml生物素化抗原在链霉抗生物素蛋白包被的ELISA板(Thermo Scientific,目录号PI15120)上预孵育1小时。将板洗涤3次,之后添加抗体(1μg/ml、0.33μg/ml和0.11μg/ml抗体)。将板在室温下振荡孵育1小时,洗涤3次,然后添加以1/2500稀释度得到的HRP缀合物山羊抗人κ抗体(SigmaAldrich目录号A7164-1ML)。

[0502] 图4示出了某些人源化抗MS4A4A抗体与重组MS4A4A可溶性多肽JS1、JS4、JS5、JS6和JS10结合的ELISA结合结果。如图4中所示,通过ELISA,某些抗MS4A4A抗体(4A-18.hFc、4A-21.hFc、4A-202.hFc、4A-220.mFc、4A-214.mFc、4A-204.mFc(hFc是指人Fc;mFc是指鼠类Fc))显示出与含有人MS4A4A的两个ECL的重组MS4A4A可溶性多肽JS1、JS5和JS6的结合。本发明的抗MS4A4A抗体不结合至重组可溶性多肽JS4和JS10,这两者是阴性对照多肽且不含MS4A4A ECL区序列。两种可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12和4H2未显示出与重组MS4A4A可溶性多肽中的任一种的结合(参见图4)。在图4中,抗MS4A4A抗体4A-214先前公开于国际专利申请号PCT/US2019/016156中,并且具有EVKLEESGGGLVQPGRSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQS PEKGLEWVAEIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLR AEDTGIYYCSSMIIVDYWGQTTVTVSS (SEQ ID NO:179)的重链可变区氨基酸序列和DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASQSVSSSTYSYL HWYQQRPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSTVFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPLTFGAGTKLEMK (SEQ ID NO:180)的轻链可变区氨基酸序列。

[0503] 图4中所呈现的结果来源于下表12中所示的数据:

[0504] 表12

[0505]	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

[0506] 图5示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-21的人源化型式与重组MS4A4A可溶性多肽JS1的ELISA结合结果。抗体以1 μ g/ml的浓度使用。如图5中所示,抗MS4A4A抗体4A-21的许多人源化型式保留其与这种重组多肽结合的能力。抗MS4A4A抗体4A-21的某些人源化型式显示出与重组MS4A4A可溶性多肽JS1的结合降低。

[0507] 图5中所呈现的结果来源于下表13中所示的数据:

[0508] 表13

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
同种型	0.113

[0510] 图6示出了鼠类抗MS4A4A抗体4A-202的人源化型式与重组MS4A4A可溶性多肽JS1的ELISA结合结果。抗体以1 μ g/ml的浓度使用。如图6中所示,抗MS4A4A抗体4A-202的人源化型式能够结合至这种重组多肽。

[0511] 图6中所呈现的结果来源于下表14中所示的数据:

[0512] 表14

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
同种型	0.113

[0514] 进一步测试鼠类抗MS4A4A抗体4A-202和鼠类抗MS4A4A抗体4A-21的各种人源化型式与重组MS4A4A可溶性多肽结合的能力。人源化抗MS4A4A抗体4A-332和人源化抗MS4A4A抗体4A-302显示出合理的结合,并且选择其用于如下进行进一步亲和力改善。使用重叠PCR技术在抗MS4A4A抗体4A-322和抗MS4A4A抗体4A-302的6个CDR中引入随机突变。使用生物素化重组MS4A4A可溶性多肽JS5对这些抗体变体进行噬菌体展示淘选。在3轮淘选后,选择出大约190种突变抗MS4A4A抗体变体并使其在TG1细胞中表达,通过ELISA对所述细胞的溶解物进行筛选。选择出二十二种人源化抗MS4A4A抗体4A-21变体和十五种人源化抗MS4A4A抗体4A-202变体,将其重组转化成全人IgG并在Expi293细胞中表达。如制造商的方案中所指示,通过MabSelect抗体纯化树脂(GE Healthcare Life Science,目录号17519902)纯化抗MS4A4A抗体。随后重复ELISA和流式细胞术实验。

[0515] 通过ELISA,人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体4A-312、4A-313和4A-314在各种抗体浓度(1 μ g/ml、0.33 μ g/ml和0.11 μ g/ml)下显示出与重组MS4A4A可溶性多肽JS5的结合(参见图7),并且选择所述抗体用于进一步功能分析。

[0516] 图7中所呈现的结果来源于下表15中所示的数据:

[0517] 表15

[0518]

抗体	1 μ g/ml	0.33 μ g/m	0.11 μ g/m
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

[0519] 通过ELISA,人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体4A-351和4A-376(0.4 μ g/ml)显示出与重组MS4A4A可溶性多肽JS5的良好结合(参见图8)。然后选择这些抗MS4A4A抗体用作模板以对其CDR-L1中的氨基酸D28进行氨基酸取代;此类氨基酸取代包括D28G、D28E、D28S、D28A和D28Q。

[0520] 图8中所呈现的结果来源于下表16中所示的数据:

[0521] 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

[0523]	4A-21	0.925
--------	-------	-------

[0524] 这些其他抗MS4A4A抗体包括抗MS4A4A抗体4A-352、4A-353、4A-354、4A-355、4A-356、4A-377、4A-378、4A-379、4A-380和4A-381,并通过ELISA测试其在三种不同的抗体浓度(1 μ g/ml、0.33 μ g/ml和0.11 μ g/ml)下与重组MS4A4A可溶性多肽JS5的结合。这些研究的结果示于图9中。如图9中所示,这些其他抗MS4A4A抗体显示出与重组MS4A4A可溶性多肽JS5的结合。

[0525] 图9中所呈现的结果来源于下表17中所示的数据:

[0526] 表17

抗体	1 μ g/ml	0.33 μ g/ml	0.11 μ g/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

[0528] 实施例7:人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体与过表达人MS4A4A的U937细胞的结合

[0529] 如下评估本公开的抗MS4A4A抗体的人源化且亲和力成熟型式与表达人MS4A4A的U937细胞的结合。

[0530] 所测试的抗MS4A4A抗体是从杂交瘤上清液纯化的小鼠IgG或在Expi293细胞中重组产生的人IgG1 Fc嵌合体。如下测定与细胞结合的亲和力。简而言之,收获细胞,洗涤,并且用Aqua Live/Dead标记以用于活力判别。在用PBS洗涤后,在96孔U形底板中每孔等分 2×10^4 个细胞并使其与50 μ L各种浓度(从10 μ g/mL开始3倍稀释)的纯化的抗MS4A4A抗体一起在FACS缓冲液(PBS+2% FBS+1mM EDTA)中孵育。在初次孵育后,经由离心去除上清液,用150 μ L冰冷FACS缓冲液洗涤2次,并且与适当二级抗体一起在冰上孵育15分钟。在二级抗体孵育后,用冰冷FACS缓冲液将细胞再洗涤2次并重悬于200 μ L最终体积的FACS缓冲液中。在FACSCanto系统(BD Biosciences)上进行流式细胞术分析。结合数据表示为中值荧光强度(MFI)。

[0531] 这些结合实验的结果示于下文表18和表19中。表18示出了本公开的某些抗MS4A4A抗体与过表达重组人MS4A4A的U937细胞的结合。使用5 μ g/ml浓度的抗MS4A4A抗体进行这些实验并通过流式细胞术对细胞结合进行分析。

[0532] 表18

	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
[0533]	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
[0534]	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
	同种型对照	33.4

[0535] 表19示出了本公开的某些抗MS4A4A抗体与过表达重组人MS4A4A的U937细胞的结合。使用5 μ g/ml浓度的抗MS4A4A抗体进行这些实验并通过流式细胞术对细胞结合进行分析。在这项测定中,仅用二级抗体染色的细胞的MFI值为大约200。

[0536] 表19

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
[0537] 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
[0538] 4A-312	17715
4A-313	41794
4A-314	15289

[0539] 实施例8:抗MS4A4A抗体调节原代人髓系细胞中的TREM2蛋白

[0540] 已报导,MS4A基因座中的SNP影响人的可溶性TREM2 (sTREM2) 水平、通常TREM2通路和阿尔茨海默氏病易感性。阿尔茨海默氏病保护性MS4A4A等位基因与脑脊液中的sTREM2水平增加相关。总的来讲,这些通路可在阿尔茨海默氏病或其他神经退行性疾病的预防中起作用。另外,用可商购获得的抗MS4A4A抗体处理培养的人巨噬细胞会降低sTREM2水平 (Piccio等人,Acta Neuropathol2016,131:925-933)。为检查本公开的抗MS4A4A抗体调节巨噬细胞中的sTREM2和质膜/细胞表面TREM2 (mTREM2) 水平的作用,进行以下研究。

[0541] 将原代人巨噬细胞铺板在96孔板中并用抗MS4A4A抗体组 (10 μ g/ml) 在完全RPMI中进行处理。在孵育48小时后,收集上清液并使用Meso Scale Discovery (MSD) 测定sTREM2水平。简而言之,在4 $^{\circ}$ C下将MSD板 (目录号L15XA-3) 的孔与1 μ g/ml的捕获抗体以500RPM在定轨摇床上一同孵育过夜。洗涤各孔,然后在20 $^{\circ}$ C下于结合缓冲液 (含1%热灭活的高级BSA的PBS) 中以500RPM于定轨摇床上封闭一小时。在结合缓冲液中制备标准品 (重组人Trem2 Fc 1828-T2 (R&D Systems)) 和适当浓度的未知样品,添加至孔中,然后在20 $^{\circ}$ C下以500RPM于定轨摇床上孵育1小时。洗涤各孔,然后在20 $^{\circ}$ C下与100ng/ml的二级抗体 (生物素化山羊抗人TREM2 (R&D Systems 目录号BAF1828)) 一起以500RPM于定轨摇床上孵育1小时。洗涤各孔,然后与在结合缓冲液中的0.2 μ g/ml检测试剂 (磺基标签-链霉抗生物素蛋白;MSD 目录号R32AD) 一起孵育。然后洗涤各孔,将150 μ l读取缓冲液 (1 \times ,MSD) 添加至每个孔中,并且在

Sector成像仪上读板。

[0542] 单独地,收集抗MS4A4A抗体处理的细胞(上文),并且使用缀合至别藻蓝蛋白或类似荧光团的抗TREM2抗体(Alector)进行流式细胞术以测定mTREM2水平。

[0543] 如表20中所示,抗MS4A4A抗体使从各个供体获得的所培养人原代巨噬细胞上清液中的sTREM2水平增加。本文所述的结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体增加或上调人原代巨噬细胞上清液中的sTREM2水平。表20中所报告的数字是相对于使用同种型对照抗体获得的那些数字(其设置为100)。

[0544] 表20

抗体	供体		
	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

[0546] 如下表21中所示,抗MS4A4A抗体使从各个供体获得的所培养人原代巨噬细胞上的质膜/细胞表面TREM2(mTREM2)水平增加。这些结果与如上表20中所示的在所述细胞的上清液中所观察到的sTREM2的对应增加一致。表21中所报告的数字是相对于使用同种型对照抗体获得的那些数字(其设置为100)。

[0547] 表21

抗体	供体		
	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

[0549] 这些数据显示,用本发明的抗MS4A4A抗体处理人原代巨噬细胞增加这些髓系谱系细胞中的sTREM2和mTREM2水平两者。这些结果与先前报导相反,所述先前报导显示可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12降低所培养人巨噬细胞的上清液中的sTREM2水平(Deming等人,同上)。

[0550] 使用制备成具有低内毒素水平的抗MS4A4A抗体重复上述检查抗MS4A4A抗体对可溶性和膜TREM2的影响的实验。在培养上清液中所测量的sTREM2水平示于下表22中。当高度纯化且基本上不含内毒素时,本公开的大多数抗MS4A4A抗体在不同程度上诱导sTREM2水平的增加。可商购获得的抗MS4A4A抗体3F2、4H2和5C12也使sTREM2水平增加,但程度较低。所述结果与先前公布的数据相反,所述先前公布的数据显示这些可商购获得的抗MS4A4A抗体降低培养物中的sTREM2水平;这有可能是由于可商购获得的制剂中所存在的污染性内毒素、杂质和聚集体。表22中的数据示出了以ng/ml表示的sTREM2水平,并且其针对同种型对照抗体所观察到的水平进行归一化。

[0551] 在抗MS4A4A抗体处理后,所观察到的sTREM2的增加与膜结合TREM2(mTREM2)水平

的增加平行(下表23)。尽管供体反应有所不同,但大多数抗MS4A4A抗体使所测试的三个供体中的2者或3者的mTREM2水平增加。当与可商购获得的抗MS4A4A抗体(3F2、4H2和5C12)相比时,本公开中的多种抗体展示出等效或更优活性。下表23中所示出的水平是以如通过流式细胞术所测定的平均荧光强度表示,并且针对使用同种型对照抗体所观察到的强度进行归一化。

[0552] 表22

抗体	供体		
	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

[0554] 表23

抗体	TREM2 MFI, 相对于对照的差量		
	供体 753	供体 754	供体 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

[0556] 由于遗传学研究已将阿尔茨海默氏病保护性MS4A4A等位基因与阿尔茨海默氏病患者中的sTREM2水平增加相关联,因此所述结果表明,抗MS4A4A抗体通过调节(即增加)TREM2活性和功能有效治疗阿尔茨海默氏病和其他神经退行性疾病。

[0557] 还测定本公开的人源化抗MS4A4A抗体对sTREM2和膜结合TREM2(mTREM2)的影响。为检查此影响,将来自两个供体的人原代巨噬细胞用本公开的抗MS4A4A抗体处理48小时。收集培养上清液并使用Mesoscale Discovery测定对可溶性TREM2的水平进行测定。在用缀合有荧光团的抗TREM2抗体染色后,通过流式细胞术在单独处理的细胞中测量细胞表面TREM2。使用Mesoscale Discovery系统(MSD, Rockville, MD, USA)测量巨噬细胞的培养上清液中的可溶性TREM2。

[0558] 下表24示出了抗MS4A4A抗体对可溶性TREM2水平变化的影响的结果。在表24中,可溶性TREM2水平是以ng/ml列出。如表24中所示,本公开的大多数抗MS4A4A抗体使人原代巨噬细胞中的可溶性TREM2水平增加。与本公开的许多抗MS4A4A抗体所观察到的结果相比,可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12、4H2和3F2未显示出可溶性TREM2水平的任何显著程度的增加,并且5C12、4H2和3F2的影响与同种型对照相当。

[0559] 表24

[0560]

抗体	供体888	供体904
hIgG1同种型	24.1	25.0
4A-202	46.5	38.4
4A-21	47.2	39.7
4A-25	41.3	41.2
4A-302	49.3	41.3
4A-312	41.4	36.2
4A-313	53.7	40.4
4A-314	47.9	37.2
4A-332	44.6	37.3
4A-350	51.4	44.0
4A-351	45.4	42.2
4A-352	41.2	41.0
4A-353	32.3	34.7
4A-354	41.4	38.0
4A-355	35.5	23.2
4A-356	40.4	38.0
4A-358	55.0	45.8
4A-360	45.3	38.4
4A-362	56.0	45.7
4A-369	54.4	41.6
4A-373	54.2	44.5
4A-376	54.2	51.1
4A-377	34.4	37.0
4A-378	32.7	35.1
4A-379	31.9	31.2
4A-380	38.1	33.0
4A-381	33.7	33.1
4A-382	26.9	31.3
4A-383	29.0	30.5
4A-384	23.2	24.1
4A-385	27.4	27.2
4A-386	25.4	28.3
4A-387	26.0	30.6
4A-388	28.7	31.1
4A-390	26.8	31.5
mIgG1同种型	25.9	28.8
5C12	29.7	30.0

4H2	28.9	30.6
3F2	29.4	28.8

[0561] 下表25示出了抗MS4A4A抗体对细胞表面(例如膜) TREM2水平变化的影响的结果。在表25中,细胞表面TREM2水平是以如在流式细胞术程序中所测量的平均荧光强度(MFI)示出。如表25中所示,本发明的大多数抗MS4A4A抗体使人原代巨噬细胞中的细胞表面TREM2水平增加。与本公开的许多抗MS4A4A抗体所观察到的结果相比,可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12、4H2和3F2未显示出细胞表面TREM2水平的任何显著程度的增加,并且5C12、4H2和3F2的影响与同种型对照相当。

[0562] 表25

抗体	供体 888	供体 904
hIgG1 同种型	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

[0563]

[0564]	mIgG1 同种型	2459.5	2690.5
	5C12	2596	2683.5
	4H2	2611.5	2780
	3F2	2629	2629.5

[0565] 如表24和表25中所示,在用本公开的抗MS4A4A抗体处理后,膜TREM2水平和可溶性TREM2水平两者均上调。可商购获得的抗MS4A4A抗体5C12、4H2和3F2不以任何显著程度诱导TREM2表达。

[0566] 实施例9:抗MS4A4A抗体对巨噬细胞表面标记物的影响

[0567] 如下检查抗MS4A4A抗体对各种M1和M2巨噬细胞表面标记物的影响。在完全RPMI1640中用各种抗MS4A4A抗体(10 μ g/ml)将人原代巨噬细胞处理48小时。接着收获所述细胞并使用对M1标记物(CD16、MHC II类、CD86)、M2标记物(CD200R、Dectin-1、CD163)和泛巨噬细胞标记物CD14具有特异性的抗体进行流式细胞术。

[0568] 这些研究的结果示于下表26中。通过流式细胞术对细胞表面标记物表达水平进行测定并且针对在用同种型对照抗体处理的细胞中所获得的水平(其设置为100%)进行归一化。某些M1标记物(包括CD86和MHC-II)的细胞表面表达未因抗MS4A4A抗体处理而改变或其仅受轻微影响。相比之下,某些M2标记物(包括CD200R、CD163和Dectin-1)的细胞表面表达因抗MS4A4A抗体处理而显著降低。

[0569] 表26

抗体	CD200R (M2)	CD14 (泛)	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
[0570] 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

[0571] 总的来讲,这些结果指示,本公开的抗MS4A4A抗体影响巨噬细胞极化,从而影响细胞远离M2表型。这些结果表明,在CNS内,抗MS4A4A抗体治疗可在神经退行性疾病和病症的情形下通过增强、提高或恢复小神经胶质细胞的神经保护功能而提供对小神经胶质细胞活性的有益增强。由于健康条件下的稳态小神经胶质细胞表达更多的M2标记物(诸如CD200R、CD163和CD115),因此这些结果表明,本公开的抗MS4A4A抗体将小神经胶质细胞的生理状态有效地改变成更具保护性的表型,包括改变成更具促炎性或活化状态。由于阿尔茨海默氏病小鼠模型和人阿尔茨海默氏病中的疾病相关的小神经胶质细胞(DAM)处于促炎性或活化状态(这在阿尔茨海默氏病中视为有益的),因此本公开的抗MS4A4A抗体可用于治疗阿尔茨海默氏病和其他神经退行性病症。

[0572] 实施例10:抗MS4A4A抗体增加骨桥蛋白和凝溶胶蛋白的表达

[0573] 已鉴定出与MS4A基因簇相关的阿尔茨海默氏病相关遗传变体(SNP)。那些变异等位基因中的一个是rs1582763,其与CSF sTREM2水平升高以及阿尔茨海默氏病风险降低和发病年龄延迟相关。(Deming等人,2018,bioRxiv,doi:dx doi org/10.1101/352179)。rs1582763等位基因使血液中的MS4A4A mRNA水平降低。所述发现表明,rs1582763等位基因通过降低MS4A4A水平而起保护性作用,潜在性地降低阿尔茨海默氏病风险或严重程度。

[0574] 显示出这种保护性等位基因在人巨噬细胞中的影响的RNA表达谱来源于已公布的RNA表达数据。与显示出表达增加的其他标记物(未示出)相比,如通过倍数变化(“FC”)和p值所指示,SPP1(骨桥蛋白)和GSN(凝溶胶蛋白)的mRNA显示出最为显著的表达增加(参见表27中“rs1582763”下方的栏并在下表28中重复)。所述数据指示,SPP1和GSN是与rs158273等位基因相关的保护性生物活性的药效动力学标记物。

[0575] 测试亲代MS4A4A抗体表型模拟保护性等位基因的能力。用如表27和表28中所指定的抗MS4A4A抗体将人PBMC源性巨噬细胞处理24小时(至多三次重复)。提取RNA并且制备RNA文库并测序,之后进行基因组作图和量化。结果指示,就增加SPP1和GSN的表达而言,所有指定的亲代抗MS4A4A抗体(4A-220除外)均表型模拟保护性rs1582763等位基因(表27和表28)。这些结果表明,与保护性等位基因类似,有效增加SPP1和GSN的表达的本公开的MS4A4A抗体在降低阿尔茨海默氏病风险和/或严重程度方面具有生物活性。

[0576] 表27

[0577] 基因	rs1582763		4A-18		4A-18+4A-21		4A-25		4A-214	
	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

[0578] 表28

[0579] 基因	rs1582763		4A-220		4A-21		4A-202	
	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

[0580] 实施例11:用抗MS4A4A抗体衍生并刺激iPSC源性小神经胶质细胞

[0581] 通过引入与干细胞相关的转录因子混合物,可将任何组织起源的成人细胞转化成诱导型多潜能干细胞(iPSC)(在[https://www\(dot\)cell\(dot\)com/iPSC](https://www(dot)cell(dot)com/iPSC)中深入综述)。iPSC可无限期保持,并且在给予适当生长因子时,可驱动其分化成各种成熟细胞类型。用于从iPSC衍生神经元的方法早已确立(Salimi等人,Mol.Bio.Rep.2014;41:1717-1721;Engle等人,Neuron 2018;100:783-797)。最近,iPSC已用于衍生星形胶质细胞(Julia等人,Stem Cell Report 2017;9:600-614)和小神经胶质细胞(于Pocock和Piers,Nat.Rev.Neurosci.2018;19:445-452中综述)。这些培养系统允许在受控环境中研究这些细胞的生物学和功能,否则可能无法实现。此外,可通过各种方法(诸如通过CRISPR基因编辑)对iPSC进行遗传操纵,以允许进一步剖析这些细胞类型中所关注基因的功能相关性。

[0582] 在从iPSC衍生后,在体外单独培养小神经胶质细胞,使其经历本公开中的抗MS4A4A抗体的刺激。在刺激后,通过对细胞内ATP水平进行量化来评价细胞活力。如上文所述测量对细胞表面TREM2表达变化或对可溶性TREM2水平变化的影响。使用诸如ELISA、Mesoscale Discovery测定(MSD,Rockville,MD,USA)、Legendplex(BioLegend,San Diego,CA,USA)或CBA(BD Biosciences,San Jose,CA,USA)的方法,针对各种细胞因子和趋化因子的表达或水平因抗MS4A4A抗体处理而发生的变化对来自这些培养物的上清液进行分析。使用包括流式细胞术、蛋白质印迹(western blotting)、固定和实时成像以及RNAseq分析在内的各种方法对这些iPSC-小神经胶质细胞因抗MS4A4A抗体处理而发生的吞噬能力、自体

吞噬率、表面标记物表达和基因表达谱的变化进行测量,并且与从用抗MS4A4A抗体处理的单核细胞源性巨噬细胞所获得的变化进行比较。

[0583] 实施例12:抗MS4A4A抗体对巨噬细胞表面标记物的影响

[0584] CNS和外周器官两者中的髓系细胞在其表型和功能上具有固有的可塑性。这可通过体外巨噬细胞来建模,可将巨噬细胞划分成M1和M2型巨噬细胞,其显示出不同的吞噬和炎性潜力、表型和活性。在外周器官中,认为与M1表型相关的巨噬细胞更具促炎性和抗微生物性,而M2样巨噬细胞则更具稳态性和抗炎性。在CNS内,处于稳态条件下的小神经胶质细胞也表达M2标记物,诸如CD200R、CD163,这表明此细胞类型具有调控功能。在体外M2巨噬细胞中,MS4A4A表达升高。

[0585] 如下检查抗MS4A4A抗体对各种M1和M2巨噬细胞表面标记物的影响。在完全RPMI1640中用各种抗MS4A4A抗体(例如10 μ g/ml)将人原代巨噬细胞处理48小时。然后收获所述细胞并使用对M1标记物(诸如CD16、MHC II类、CD86)、M2标记物(诸如CD200R、Dectin-1、CD163)和泛巨噬细胞标记物(包括CD14和其他)具有特异性的抗体进行流式细胞术。

[0586] 实施例13:抗MS4A4A抗体的动力学表征

[0587] 如下由Carterra (South San Francisco, CA) 使用专有阵列表面等离子共振 (SPR) 仪器 (MX-96) 对纯化的抗体与MS4A4A ECL1和ECL2肽的结合动力学进行表征。使用连续流动微量点样器 (CFM) 将抗体印刷至CMD500D芯片 (Xantec编号SPMX CMD500D批号SC CMD500D0117.a Exp.31.12.18) 上。首先,用100mM MES pH 5.5、100 μ L EDC (133mM最终)、100 μ L S-NHS (33.3mM最终) 使芯片活化7分钟。注射一剂抗小鼠IgG-Fc (Jackson ImmunoResearch目录号115-005-071) 达15分钟以建立10000-12000RU的表面密度,之后用1M乙醇胺 (pH 8.5) 使芯片表面去活化10分钟。将所讨论的抗MS4A4A抗体以2:1用HBS-EP+缓冲液 (Teknova目录号H8022) 稀释,然后从相同样品溶液以20分钟和5分钟印刷进行一式两份印刷。将对照抗体稀释至20 μ g/ml以供印刷。

[0588] 为进行动力学分析,在含有1mg/ml BSA的HBS-EP+缓冲液中制备所讨论的肽,其最终测定浓度为2000nM、400nM、80nM、16nM和3.2nM。然后将这些肽在芯片上注射五分钟,之后在非再生动力学系列中以8 μ L/秒进行七分钟解离期。对每种抗MS4A4A抗体进行双重测量以确保再现性。

[0589] 实施例14:MS4A4A抗体对瞬时和天然表达细胞系的亲和力测量

[0590] 评估纯化的抗MS4A4A抗体与各种MS4A4A表达细胞系的结合亲和力。这些表达细胞系包括如上文实施例8中所描述的转染细胞,以及内源地表达MS4A4A的髓系细胞系和原代细胞。所测试的抗MS4A4A抗体是从杂交瘤上清液纯化的小鼠IgG或在Expi293细胞中重组产生的人IgG1 Fc嵌合体。如下测定与细胞的亲和结合力。简而言之,收获细胞,洗涤,并且用Aqua Live/Dead标记以用于活力判别。在用PBS洗涤后,在96孔U形底板中每孔等分 2×10^5 个细胞并使其与50 μ L各种浓度(从10 μ g/mL开始3倍稀释)的纯化的抗MS4A4A抗体一起在FACS缓冲液(PBS+2% FBS+1mM EDTA)中孵育。在初次孵育后,经由离心去除上清液,用150 μ L冰冷FACS缓冲液洗涤2次,并且与适当二级抗体一起在冰上孵育30分钟。在二级抗体孵育后,用冰冷FACS缓冲液将细胞再洗涤2次并重悬于200 μ L最终体积的FACS缓冲液中。在FACSCanto系统 (BD Biosciences) 上实施流式细胞术分析。使用中值荧光强度来分析结合数据并且在Prism中拟合曲线(非线性回归:四参数log抑制剂对剂量反应)以确定EC50值。

[0591] 实施例15:下调MS4A4A蛋白

[0592] 评估抗MS4A4A抗体降低各种细胞系和原代细胞中MS4A4A的细胞表面和总细胞蛋白质水平的能力。任一隔室中MS4A4A蛋白的减少表明细胞中MS4A4A活性的降低。

[0593] 将细胞与本公开的抗MS4A4A抗体一起孵育不同时间段,然后通过FACS(细胞表面)或蛋白质印迹(总细胞蛋白质水平)测定与细胞缔合的剩余MS4A4A蛋白的水平。对于FACS测定,用直接别藻蓝蛋白(APC)缀合的非竞争性抗体检测剩余MS4A4A。对于蛋白质印迹检测,通过添加50 μ L溶解缓冲液(RIPA溶解缓冲液(ThermoFischerScientific目录号89900)+1:100HALT蛋白酶抑制剂混合物(ThermoFischerScientific目录号87786))使细胞溶解,并且通过以14,000 \times g离心15分钟清除不溶性碎片。用二辛可宁酸(bicinchoninic acid,BCA)试剂测定可溶性部分以进行蛋白量化。将来自每个样品的等量蛋白质加载到4-12% Bis-Tris Plus聚丙烯酰胺凝胶(ThermoFisher Scientific NW04120)上并进行电泳分离,之后使用iBlot2(ThermoFisher Scientific IM21001)和Transfer Stacks(ThermoFisher Scientific IB24002)将凝胶中的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将膜用1%牛血清白蛋白或5%脱脂乳封闭以防止非特异性结合。然后使所述膜与内部或可商购获得的检测抗体一起孵育,洗涤,并且与HRP结合的二级抗体(兔,Abcam编号205718;小鼠,Abcam编号205719)一起孵育。通过用SuperSignal West Pico Plus化学发光底物(ThermoFisher Scientific编号34577)显影使结合可视化并用iBright FL1000(ThermoFisher Scientific A32752)或其他兼容系统进行数字化记录。

[0594] MS4A4A蛋白水平的下调还可通过使用本领域技术人员已知且可获得的方法下调MS4A4A核酸表达或水平来实现,例如通过使用反义方法、基因疗法等。

[0595] 实施例16:利用衰老、癫痫发作、脊髓损伤、视网膜营养不良、额颞叶痴呆和阿尔茨海默氏病的动物模型表征抗MS4A4A抗体的活性

[0596] 还可在衰老、癫痫发作、脊髓损伤、视网膜营养不良、额颞叶痴呆和阿尔茨海默氏病的动物模型中测试抗MS4A4A抗体的治疗效用,如先前所描述(例如Beattie,MS等人,(2002)Neuron 36,375-386;Volosin,M等人,(2006)J.Neurosci.26,7756-7766;Nykjaer,A等人,(2005)Curr.Opin.Neurobiol.15,49-57;Jansen,P等人,(2007)Nat.Neurosci.10,1449-1457;Volosin,M等人,(2008)J.Neurosci.28,9870-9879;Fahnestock,M等人,(2001)Mol.Cell Neurosci.18,210-220;Nakamura,K等人,(2007)Cell Death.Differ.14,1552-1554;Yune,T等人,(2007)Brain Res.1183,32-42;Wei,Y等人,(2007)Neurosci.Lett.429,169-174;Provenzano,MJ等人,(2008)Laryngoscope 118,87-93;Nykjaer,A等人,(2004)Nature 427,843-848;Harrington,AW等人,(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101,6226-6230;Teng,HK等人,(2005)J.Neurosci.25,5455-5463;Jansen,P等人,(2007)Nat.Neurosci.10,1449-1457;Volosin,M等人,(2008)J.Neurosci.28,9870-9879;Fan,YJ等人,(2008)Eur.J.Neurosci.27,2380-2390;Al-Shawi,R等人,(2008)Eur.J.Neurosci.27,2103-2114;和Yano,H等人,(2009)J.Neurosci.29,14790-14802)。

[0597] 实施例17:利用肿瘤学动物模型表征抗MS4A4A抗体的影响

[0598] 髓系细胞代表存在于大多数实性肿瘤中的免疫细胞的主要组分。其在肿瘤生物学中的作用依赖于环境,虽然此类细胞有可能在肿瘤的根除中起关键作用,但其最常被宿主肿瘤选择以协助提供促肿瘤表型。这主要通过使髓系细胞向M2表型极化来实现,所述表型

通常具有免疫抑制性,因此会阻断免疫系统根除肿瘤。通过使髓系细胞复极化,抗MS4A4A抗体可逆转这种免疫抑制表型并促进抗肿瘤免疫反应。

[0599] 存在多种动物肿瘤模型。相关动物模型的实例包括人源化小鼠模型,其中小鼠免疫系统遗传性缺失,以NSG小鼠(Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)为代表。这些小鼠充当人免疫细胞的接受性宿主,导致人类适应性和先天性免疫细胞的植入。然后向所述动物接种肿瘤细胞,通常在侧腹上的皮肤下。随时间推移的肿瘤大小代表肿瘤细胞的生长与宿主免疫系统对其的根除之间的平衡。在整个时程中,动物用抗MS4A4A抗体治疗,在与用同种型治疗的动物相比时,这种治疗改变肿瘤进展。在治疗期结束时,提取肿瘤并使其经历各种分析以测定抗MS4A4A抗体对肿瘤细胞和浸润性免疫细胞的影响。可将肿瘤切片,装至载玻片上并在显微镜下分析组织学变化。可通过RT-PCR、RNASeq或微阵列对mRNA进行分析以测定基因表达的变化。可制备肿瘤和浸润性免疫细胞的单细胞悬浮液,用针对各种细胞表面标记物的抗体染色并通过流式细胞术进行分析,以描绘尤其诸如巨噬细胞和T细胞的免疫细胞中的细胞表面表型的变化。在这些分析中的任一项中所观察到的由于抗MS4A4A处理的变化将表明这些抗体具有免疫调节功能。

[0600] 实施例18:抗MS4A4A抗体对TREM2转录和mRNA的影响

[0601] 如下评估抗MS4A4A抗体对TREM2转录水平和mRNA的影响。用各种浓度的本公开的抗MS4A4A抗体将培养的细胞处理不同时间段。之后,然后使用本领域技术人员已知用于测量和/或量化mRNA水平的标准方法测定细胞内TREM2 mRNA水平的变化。

[0602] 实施例19:抗MS4A4A抗体对TREM2再循环和降解的影响

[0603] 为更充分地理解抗MS4A4A抗体对sTREM2和mTREM2水平增加的影响,进行以下研究以检查TREM2再循环和/或降解。在这些研究中,使用环己酰亚胺处理细胞以防止与抗MS4A4A抗体处理相关的进一步的新的TREM2合成。本领域已知的各种方法可用于检查与用抗MS4A4A抗体处理的细胞相比对照细胞中TRME2的再循环和降解。

[0604] 实施例20:其他抗MS4A4A抗体

[0605] 如上文实施例1中所描述,使两种其他抗MS4A4A抗体人源化并从亲代抗体4A-21亲和力和成熟,从而产生抗MS4A4A抗体4A-450和抗MS4A4A抗体4A-419。这些抗体中的每一个的可变重链和可变轻链序列示于下表29中,其中其对应CDR(根据Kabat)加下划线。重链CDR序列示于表30中;轻链CDR序列示于表31中。

[0606] 表29

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0607] 4A-450	QVQLVQSGSELKKPG ASVKVSCKASGYAFT <u>SYGLSWVRQAPGQG</u> LEWMGWINTYSGVP <u>TYAQGFTGRFVFSLD</u> TSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCARTMADY <u>WGQGLVTVSS</u>	304	DVVMTQSPLSLPVTLGQ PASISCKSSRSLLYSAGK <u>TYLSWFQQRPGQSPRRL</u> <u>IYLVSKLDSGVPDRFSGS</u> GSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	305

抗体	可变重链	SEQ ID NO:	可变轻链	SEQ ID NO:
[0608] 4A-419	QVQLVQSGSELKKPG ASVKVSCKASGYRFT SYGLSWVRQAPGQG LEWMGWINTYSGVP TYAQQGFKGRFVFSLD TSVSTAYLQISSLKAE DTAVYYCARTMADY WGQGLVTVSS	306	DVVMTQSPLSLPVTLGQ PASISCKSSRSLLYSAGK TYLSWFQQRPGQSPRRL IYLVSKLDSGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	307

[0609] 表30

抗体	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:
[0610] 4A-450	SYGLS	308	WINTYSGV PTYAQQGFT G	309	TMADY	310
4A-419	SYGLS	311	WINTYSGV PTYAQQGFK G	312	TMADY	313

[0611] 表31

抗体	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
[0612] 4A-450	KSSRSLLYSAGK YLS	314	LVSKL DS	315	WQGIDFH QT	316
4A-419	KSSRSLLYSAGK YLS	317	LVSKL DS	318	WQGIDFH QT	319

[0613] 实施例21:抗MS4A4A抗体在体内对sTREM水平的影响

[0614] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对血清和脑脊液 (CSF) 中的sTREM水平的影响,进行以下研究。

[0615] 通过静脉内输注向食蟹猴施用80mg/ml单一剂量的抗MS4A4A抗体4A-202或同种型对照(huIgG1)。在给药前、施用抗体后0.5、4、10、24、48、96、192、312、480和648小时从动物收集血清样品;在给药前、施用抗体后48、96、192和336小时从动物收集CSF样品。

[0616] 如下测量血清和CSF中的sTREM水平。用于PBS中的捕获抗体将单点滴Meso Scale Discovery (MSD) 板 (Rockville, MD) 在4°C下包被过夜。将猴血清和CSF样品 (以及猴TREM2-Fc标准品) 稀释于结合缓冲液中并在室温下添加至孔中1小时。在结合缓冲液中以1:2,000稀释度添加生物素化的山羊抗人TREM2多克隆抗体 (R&D Systems) 并在室温下孵育1小时,之后利用碘基标签链霉抗生物素蛋白 (MSD) 进行检测。将150 μ l 1 \times 读取缓冲液添加至板中,然后在Sector成像仪 (MSD) 上对板进行分析。

[0617] 在血清中,在施用抗MS4A4A抗体4A-202后,sTREM2水平从基线增加至为大约1.5倍

(从基线增加大约50%) (图10A至图10B)。在食蟹猴中单一剂量的抗MS4A4A抗体4A-202后,血清sTREM2水平保持升高(高于基线水平)至少480小时(20天)。

[0618] 在CSF中,在施用抗MS4A4A抗体4A-202后,sTREM2水平自基线增加至为大约2至4倍(自基线增加大约300%) (图11A至图11B)。在食蟹猴中单一剂量的抗MS4A4A抗体4A-202后,CSF sTREM2水平保持升高(高于基线水平)至少96小时(4天)。

[0619] 这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体在体内有效地增加血清和CSF中的sTREM2水平。

[0620] 实施例22:抗MS4A4A抗体与过表达重组MS4A4A的U937细胞的结合

[0621] 评估本公开的抗MS4A4A抗体与表达人类重组MS4A4A的U937细胞(这些细胞的产生描述于上文中)的结合亲和力。如下测定抗MS4A4A抗体与所述细胞的结合亲和力。简而言之,收获表达重组人MS4A4A的U937细胞,洗涤,并且用Aqua Live/Dead标记以用于活力判别。在用PBS洗涤细胞后,在96孔U形底板中每孔等分 2×10^4 个细胞并使其与50 μ L各种浓度的纯化的抗MS4A4A抗体一起在FACS缓冲液(PBS+2% FBS+1mM EDTA)中孵育。在初次孵育后,经由离心去除上清液,用150 μ L冰冷FACS缓冲液将细胞洗涤2次,然后与适当二级抗体一起在冰上孵育15分钟。在二级抗体孵育后,用冰冷FACS缓冲液将细胞再洗涤2次并重悬于200 μ L最终体积的FACS缓冲液中。然后使用FACSCanto系统(BD Biosciences)进行流式细胞术分析。结合数据表示为平均荧光强度(MFI)。使用基于Kuek等人,2016, Immunology and Cell Biology. 94:11-23的以下等式(或可使用类似4参数拟合),在Prism(Graphpad)软件上分析通过流式细胞仪所测量的MFI值:

[0622]
$$Y = ((F_{max} - B) / (n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6)))) * [(aptKD + X + n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6))) - \sqrt{((aptKD + X + n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6)))^2 - 4 * (n * ((C / 6.02e23) / (V * 1e-6)) * X)}] / 2 + B$$

[0623] 在这些分析中,以下值根据实验条件而受到限制:C=每孔的细胞数量(20,000);V=以微升计的染色总体积;n=细胞表面上的受体数量,估计为每个细胞100,000个受体。这些结合研究的结果示于图12中。

[0624] 如图12中所示,抗MS4A4A抗体4A-313WT huIgG1展示出大约 $2.8e-10$ 的与在U937细胞上表达的重组人MS4A4A的结合亲和力,而抗MS4A4A抗体4A-450WT huIgG1在这项测定中展示出 $3.8e-09$ 的结合亲和力。

[0625] 实施例23:MS4A4A过表达细胞系的产生

[0626] 鉴于产生稳定转染的表达重组人MS4A4A的HEK293细胞系的困难性,检查其他DNA载体和细胞系以确定其对于表达重组人MS4A4A是否将更相容。为进行稳定转染,将MS4A4A编码序列引入至表达载体pD2533-G418或pD3539-puro(Atum, Newark, CA, USA)中。

[0627] MS4A4A在体内髓系细胞中天然表达。因此,为克服使用上述细胞所观察到的毒性,测试若干髓系源性细胞系以极低或观察不到的毒性表达重组人MS4A4A的能力。这些研究中所使用的髓系源性细胞系组包括THP-1细胞(ATCC TIB202)、U937细胞(ATCC CRL-1593.2)、K562细胞(ATCC CCL243)、HL60细胞(ATCC CCL240)和Kasumi-1细胞(ATCC CRL-2724)。还测试300.19细胞(Tufts University T000710),其为小鼠前B细胞系,因为这些细胞常用于重组蛋白表达目的。对这些细胞系中的每一个进行抗生素敏感性筛选,以确定合适剂量的G418或嘌呤霉素以达到选择和转染效率。在重组人编码MS4A4A表达质粒转染和抗生素选择

后,发现来自U937细胞、K562细胞和300.19细胞的转染子具有活力。在通过有限稀释克隆这些细胞后,产生个别克隆并随后使用流式细胞术针对人MS4A4A蛋白细胞表面表达进行筛选。

[0628] 实施例24:人源化且亲和力成熟的抗MS4A4A抗体调节原代人髓系细胞中的TREM2蛋白

[0629] 来自人类遗传学研究的数据已鉴定出MS4A4A (TREM2通路) 与阿尔茨海默氏病 (AD) 易感性之间的关联 (Piccio等人, 2016, *Acta Neuropathol*, 131:925-933; doi:https://dx.doi.org/10.1101/352179)。例如, AD保护性MS4A4A等位基因与脑脊液中的sTREM2水平增加相关。为深入了解这些保护性通路, 进行以下研究。将人原代巨噬细胞用各种浓度的本公开的抗MS4A4A抗体处理48小时。在这些研究中, 测试以下抗MS4A4A抗体: 具有野生型 huIgG1 Fc (WT) 的4A-450、具有 huIgG1 Fc N325S和L328F (NSLF) 的4A-450、具有 huIgG1 Fc K322A的4A-450、4A-313WT huIgG1、4A-313NSLF huIgG1和4A-313K322A huIgG1。然后在随后用缀合有荧光团的抗TREM2抗体将细胞染色后, 通过流式细胞术测量TREM2的细胞表面 (膜结合) 表达。使用MesoScale Discovery系统 (MSD, Rockville, MD, USA) 测量细胞培养上清液中的可溶性TREM2水平。

[0630] 如图13和14中所示, 在向人原代巨噬细胞添加抗MS4A4A抗体后, 所述细胞中的膜TREM2水平以剂量依赖性方式增加。不同 huIgG1 Fc 序列 (野生型 huIgG1、huIgG1 中的 N325S/L328F 氨基酸取代和 huIgG1 中的 K322A 氨基酸取代) 上的抗MS4A4A抗体均能够增加膜TREM2表达水平。下表32和33分别呈现从图13和14获得的在用抗MS4A4A处理的细胞中所观察到的膜结合TREM2水平变化与在未经处理的对照细胞中所观察到的变化的MFI比率的数值。

[0631] 图15和16示出了野生型 huIgG1 Fc 主链上的抗MS4A4A抗体4A-450和4A-313 (分别) 以剂量依赖性方式增加原代人巨噬细胞上清液中的可溶性TREM2水平。下表34和35分别呈现从图15和16获得的在用抗MS4A4A处理的细胞中所观察到的可溶性TREM2相对于测量为板基线水平的倍数增加的数值。

[0632] 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
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

[0634] 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
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

[0636] 表34

	4A-450 WT IgG1 (µg/ml)	sTREM2 (相对于板背景的倍数)
[0637]	0.0256	0.250851509
	0.064	0.337610359

	4A-450 WT IgG1 (µg/ml)	sTREM2 (相对于板背景的倍数)
[0638]	0.16	0.453324666
	0.4	0.60750507
	1	0.838142928
	2.5	1.452549482

[0639] 表35

	4A-313 WT IgG1 (µg/ml)	sTREM2 (相对于板背景的倍数)
	0.0256	0.690304672
[0640]	0.064	0.942481014
	0.16	1.64173901
	0.4	1.690748748
	1	1.687668894
	2.5	1.52381547

[0641] 这些结果显示,抗MS4A4A抗体4A-450WT huIgG1 (2.5µg/ml)使原代人巨噬细胞中的sTREM水平增加至为未经处理细胞的约1.4倍。这些结果还显示,抗MS4A4A抗体4A-313WT huIgG1使原代人巨噬细胞中的sTREM水平增加至为未经处理细胞的约1.5倍至约1.7倍。这些结果表明,本公开的抗MS4A4A抗体在体外有效地增加sTREM水平,因此可提供在体内增加血浆和CSF中的sTREM水平的有效方式,其模拟保护免于发展出阿尔茨海默氏病的MS4A4A等位基因的作用。

[0642] 实施例25:抗MS4A4A抗体对细胞ATP水平的影响

[0643] 按照制造商方案,使用RosetteSep人单核细胞富集混合物(Stemcell technologies)和Ficoll离心从全血分离出人单核细胞。在用ACK溶解缓冲液将红细胞溶解后,将单核细胞重悬于完全培养基(RPMI、10% FBS、Pen/Strep、L-谷氨酰胺、HEPES、非必需氨基酸、丙酮酸钠)中。为从这些分离的单核细胞中获得巨噬细胞,将100ng/ml人M-CSF和8% v/v人血清添加至所述细胞中达5-7天。然后将细胞以50,000个细胞/孔铺板在完全RPMI-1640中并在存在或不存在于溶液中各种浓度的抗MS4A4A抗体(4A-313NSLF、4A-313PS、4A-450NSLF和4A-450PS)的情况下培养2天或在各种浓度的同种型对照抗体存在或不存在的条件下培养48小时。然后使用CellTiter-Glo发光细胞活力试剂盒(Promega,目录号G7571)按照制造商的方案对细胞内的ATP含量进行量化。

[0644] 如图17中所示,抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1、4A-313PS huIgG1、4A-450NSLF huIgG1和4A-450PS huIgG1以剂量依赖性方式增加原代人巨噬细胞中的ATP水平。具有含有N325S/L328F氨基酸取代的huIgG1 Fc且消除Fc γ RIIIa结合(Journal of Biological Chemistry 2014,289:15309-15318)或具有含有P331S氨基酸取代的huIgG1 Fc且消除C1q结合(Journal of Immunology 2000,164:4178-4184)的抗MS4A4A抗体均有效增加人巨噬

细胞中的ATP水平。ATP水平的增加表明人巨噬细胞的活力增加。

[0645] 下表36呈现了在这些研究中所测定的ATP水平的数值(与图17相关),其针对在未经处理的巨噬细胞中所观察到的数值进行归一化。这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体以剂量依赖性方式有效地增加人巨噬细胞中的ATP水平。使用抗MS4A4A抗体4A-450,ATP水平增加至为在未经处理的细胞中所观察到的水平的约1.2倍(0.016 μ g/ml抗MS4A4A抗体)至约1.4倍(1.0 μ g/ml抗MS4A4A抗体)。使用抗MS4A4A抗体4A-313,ATP水平增加至为在未经处理的细胞中所观察到的水平的约1.3倍(0.008 μ g/ml抗MS4A4A抗体)至约1.7倍(1.0 μ g/ml抗MS4A4A抗体)。

[0646] 表36

抗体(μ 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

抗体(μ g/ml)	4A-450.NSLF	4A-450.PS	4A-313.NSLF	4A-313.PS
0.004	0.952	0.957	1.079	1.096

[0649] 实施例26:抗MS4A4A抗体对巨噬细胞表面标记物的影响

[0650] CNS和外周器官两者中的髓系细胞在其表型和功能中具有固有的可塑性。在外周器官中,具有M1样表型的巨噬细胞更具促炎性和抗微生物性,而具有M2样表型的巨噬细胞则更具稳态性和抗炎性。在CNS内,处于稳态条件下的小神经胶质细胞也表达M2样标记物,诸如CD200R和CD163。在体外M2样巨噬细胞中,MS4A4A表达升高,并且已提出MS4A4A是M2样巨噬细胞的新型细胞表面标记物(Immunology and Cell Biology 2017,95:611-619)。

[0651] 如下检查本公开的抗MS4A4A抗体对各种巨噬细胞表面标记物的影响。在完全RPMI1640中用各种浓度(10 μ g/ml、1.0 μ g/ml、0.1 μ g/ml)的抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1或4A-419野生型(WT) huIgG1将人原代巨噬细胞处理48小时。然后收获所述细胞并使用对M1样标记物(例如CD16、MHC II类、CD86)、M2样标记物(例如CD200R、Dectin-1、CD163)和泛巨噬细胞标记物CD14具有特异性的抗体进行流式细胞术。

[0652] 如图18A、18B和18C中所示,与在未经处理的细胞(抗MS4A4A抗体4A-313NSLF huIgG1 Fc(每对中的右侧条)、抗MS4A4A抗体4A-419野生型huIgG1 Fc(WT)(每对中的左侧条))中所观察到的结果相比,向原代人巨噬细胞中添加抗MS4A4A抗体使得CD14和CD163细胞表面标记物以剂量依赖性方式减少。向原代人巨噬细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-313NSLF使得CD200R细胞表面标记物的水平低于在未经处理的细胞中所观察到的水平。相比之下,与在未经处理的细胞中所观察到的结果相比,向原代人巨噬细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-419使得CD200R细胞表面标记物增加。鉴于上文用抗MS4A4A抗体4A-313NSLF所获得的结果,并且鉴于用本公开的其他抗MS4A4A抗体(其减少诸如CD200R的M2样细胞表面标记物)所获得的结果(参见上文实施例9和表26),将这个结果视为这个特定实验的异常。下表37呈现从

图18A、18B和18C中的图所获得的细胞表面标记物的倍数变化数值(高于未经处理的细胞)。数据是来自两个供体的一式三份孔的平均值。

[0653] 表37

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
未经处理	1.00	1.08
CD163		
10	0.25	0.28
1	0.32	0.30
0.1	0.70	0.36
未经处理	0.63	0.75
CD200R		
10	1.17	0.75
1	1.20	0.56
0.1	1.24	0.41
未经处理	0.80	0.96

[0655] 这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体有效地减少M2样巨噬细胞表面标记物。

[0656] 实施例27:补体依赖性细胞毒性(CDC)测定中的人IgG1 Fc变体

[0657] 人IgG1抗体的Fc结构域通过其与多种下游效应分子(诸如例如,C1q、Fc γ 受体和新生Fc受体)的相互作用而影响效应子功能。如下使用C3b沉积/细胞杀伤测定测量具有变体huIgG1 Fc区的本公开的抗MS4A4A抗体影响补体沉积的能力。

[0658] 使用如上文所述产生的过表达重组人MS4A4A的U937细胞作为这些研究中的靶细胞。收获细胞,在PBS中洗涤1次,并且在RPMI 1640培养基中稀释至 2×10^6 个细胞/mL。在圆底96孔板(Falcon编号351177)中每孔等分50 μL 靶细胞(1×10^5 个细胞/孔)。向这些细胞中添加25 μL 在相同培养基中以四倍预定浓度制备的抗MS4A4A抗体。将细胞-抗体混合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育15min,然后每孔添加25 μL 混合补体人血清(Innovative Research, IPLA-CSER)作为补体源并且将板在37 $^{\circ}\text{C}$ 下再孵育2h。之后,将细胞用FACS缓冲液(PBS+2% FBS+1mM EDTA)洗涤2次并且每孔添加100 μL 1:50稀释的抗C3b-APC抗体(Biolegend 846106)并在冰上孵育30分钟。在iQue流式细胞仪(IntelliCyt)上分析之前,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次并重悬于80 μL FACS缓冲液+0.25 μL 碘化丙啶/孔(Fischer Scientific, BD 556463)中。以两种方式测量补体活性,一种是通过高PI细胞百分比来鉴定CDC介导的细胞杀伤程度,另一种是通过APC通道中细胞的MFI来测量C3b沉积。

[0659] 图19示出了表达重组人MS4A4A的U937细胞中的PI(碘化丙啶)摄取%,所述细胞用具有各种huIgG1 Fc变体的抗MS4A4A抗体4A-313处理。如图19中所示,具有野生型huIgG1的抗MS4A4A抗体4A-313能够高度驱动补体沉积并杀伤靶标表达细胞,此观察为细胞对PI的摄取增加。这种作用是剂量依赖性的。在Fc区中具有huIgG1N325S/L328F氨基酸取代(其显著地降低C1q结合)的抗MS4A4A抗体4A-313在这项测定中的CDC几乎完全消除。另外,在Fc区中具有huIgG1 K322A氨基酸取代的抗MS4A4A抗体4A-313在这项测定中具有无CDC活性的类似

作用。

[0660] 下表38示出了与图19中所示的图相关的数值。

[0661] 表38

抗体 (ng/mL)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	同种型对照 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

抗体 (ng/mL)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	同种型对照 IgG1
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

[0664] 这些结果显示,具有野生型人IgG1 Fc区的抗MS4A4A抗体在补体依赖性细胞毒性方面有效,而具有含有N325S/L328F氨基酸取代或K322A氨基酸取代的人IgG1 Fc变体的抗MS4A4A抗体则在补体依赖性细胞毒性方面无效。

[0665] 实施例28:抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)中的人IgG1 Fc变体

[0666] 使用ADCH Reporter Bioassay系统(Promega编号G9901)评估本公开的抗MS4A4A抗体介导抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的能力。这种系统利用稳定表达Fc γ RIIa受体(H131变体)和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件的工程改造的Jurkat T细胞系。这项测定中的活性与效应细胞(在这种情况下为髓系细胞)的ADCP活性相关。此处使用的靶细胞是过表达重组人MS4A4A的U937细胞或来源于单核细胞并用hIL-4 (20ng/ml)和地塞米松(dexamethasone) (20nM)极化的原代人巨噬细胞。

[0667] 将细胞以 1.2×10^6 个/mL的浓度稀释于测定缓冲液(RPMI+4%低IgG血清)中,并且将25 μ L细胞(30,000个/孔)等分至96孔白色测定板(Costar 3922)的内部孔中。板的外部孔中填充有75 μ L无细胞或抗体的分析缓冲液。向含有细胞的孔中添加25 μ L也在测定缓冲液中稀释的浓度为3倍期望最终浓度的抗MS4A4A抗体。在将抗体添加至靶细胞后,使测定系统所提供的效应细胞(以 2×10^7 个/mL冷冻)在37 $^{\circ}$ C下解冻,并且将630 μ L添加至3.6mL预温热(37 $^{\circ}$ C)的测定缓冲液中并轻轻混合。将二十五 μ L效应细胞(75,000个/孔,E:T比为2.5)立即添加至含有靶细胞和抗体的孔中。然后将板在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下孵育六小时以允许受体细胞活化和荧光素酶表达。在孵育后,使板平衡至室温(15min),之后将75 μ L荧光素酶测定试剂添加至每个孔中。然后将板在板振荡器上孵育20min且在BioTek读板仪上测量发光。

[0668] 如图20中所示,野生型huIgG1(同种型对照IgG1)在这项测定中强劲地驱动荧光素酶活性,这是Fc γ RIIa-H131活化的指示。与同种型对照IgG1所观察到的结果相比,具有含有N325S/L328F氨基酸取代的huIgG1 Fc的抗MS4A4A抗体4A-313展示出Fc γ RIIa-H131活化的大量丧失;具有含有K322A氨基酸取代的huIgG1 Fc的抗MS4A4A抗体4A-313在这项测定中

具有类似作用。

[0669] 下表39提供与图20中所呈现的图相关的数值。

[0670] 表39

抗体 (ng/mL)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	同种型对照 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

[0672] 这些结果显示,具有野生型人IgG1 Fc区的抗MS4A4A抗体在抗体依赖性细胞吞噬作用方面有效。另外,这些结果显示,具有含有N325S/L328F氨基酸取代或K322A氨基酸取代的人IgG1 Fc变体的抗MS4A4A抗体在抗体依赖性细胞吞噬作用方面也有效,但有效程度较低。

[0673] 实施例29:抗体依赖性细胞毒性(ADCC)中的人IgG1 Fc变体

[0674] 与其靶细胞结合的抗体可介导ADCC,这种活性被认为主要由自然杀伤细胞上的Fc γ RIIIa活化驱动。使用ADCC Reporter Bioassay系统(Promega编号G7010)评估本公开的抗MS4A4A抗体引起抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力。这项测定系统利用稳定表达Fc γ RIIIa受体(V158变体)和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件的工程改造的Jurkat T细胞系。此处使用的靶细胞是过表达重组人MS4A4A的U937细胞或来源于单核细胞并用hIL-4(20ng/ml)和地塞米松(20nM)极化的原代人巨噬细胞。将靶细胞以 1.2×10^6 个/mL的浓度稀释于测定缓冲液(RPMI+4%低IgG血清)中,并且将25 μ L细胞(30,000个/孔)等分至96孔白色测定板(Costar 3922)的内部孔中。板的外部孔中填充有75 μ L无细胞或抗体的测定缓冲液。向含有细胞的孔中添加25 μ L也在测定缓冲液中稀释的浓度为3倍期望最终浓度的抗体。在将抗体添加至靶细胞后,将所提供的效应细胞(以 2×10^7 个/mL冷冻)在37 $^{\circ}$ C下解冻,并且将630 μ L添加至3.6mL预温热(37 $^{\circ}$ C)的测定缓冲液中,轻轻混合,并且将25 μ L效应细胞(75,000个/孔,E:T比为2.5)立即添加至含有靶细胞和抗体的孔中。然后将板在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下孵育六小时以允许受体细胞活化和荧光素酶表达。在孵育后,将板平衡至室温(15min),之后将75 μ L荧光素酶测定试剂添加至每个孔中。然后将板在板振荡器上孵育20min并在BioTek读板仪上测量发光。

[0675] 如图21中所示,野生型人IgG1(同种型对照IgG1)在这项测定中强劲地驱动荧光素酶活性,这是Fc γ RIIIa-V158活化的指示。与同种型对照IgG1所观察到的结果相比,具有含有N325S/L328F氨基酸取代的huIgG1 Fc的抗MS4A4A抗体4A-313展示Fc γ RIIa-H131活化的大量丧失;具有含有K322A氨基酸取代的huIgG1 Fc的抗MS4A4A抗体4A-313在这项测定中具有类似作用。

[0676] 下表40提供与图21中所呈现的图相关的数值。

[0677] 表40

抗体 (ng/mL)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	同种型对照 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

[0679] 这些结果显示,具有野生型人IgG1 Fc区的抗MS4A4A抗体在抗体依赖性细胞毒性方面有效,而具有含有N325S/L328F氨基酸取代或K322A氨基酸取代的人IgG1 Fc变体的抗MS4A4A抗体则在抗体依赖性细胞毒性方面无效。

[0680] 实施例30:MS4A4A敲除对原代人巨噬细胞中的膜和可溶性TREM2水平的影响

[0681] 如下检查MS4A4A敲除对巨噬细胞中的膜和可溶性TREM2水平的影响。使用CRISPR技术来敲除MS4A4A在原代人巨噬细胞中的表达。简而言之,通过用与非靶向性(NT)或MS4A4A特异性gRNA复合的Cas9蛋白(IDT)电穿孔产生敲除巨噬细胞,所述gRNA由退火至tracrRNA(IDT)的基因座特异性crRNA组成(IDT;NT1, IDT 1号和2号阴性对照crRNA;NT2, GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC(SEQ ID NO:345)和AACCCCTGATTGTATCCGCA(SEQ ID NO:346);1号MS4A4A, AATTGTGTACCCGATATACA(SEQ ID NO:347);2号MS4A4A, AACCATGCAAGGAATGGAAC(SEQ ID NO:348);3号MS4A4A, TATTCATTCCTAGACTACCT(SEQ ID NO:349);4号MS4A4A, GCTCTGTACTGGCTGCATCA(SEQ ID NO:350))。通过流式细胞分析评估MS4A4A敲除效率并且其大于90%(数据未示出)。

[0682] 图22A和22B示出了MS4A4A敲除对膜TREM2(mTREM2)水平和可溶性TREM2(sTREM2)水平的影响。在图22A和22B中,NT1和NT2是非靶向性CRISPR对照;gRNA 2+3和gRNA 1+4是指用于敲除MS4A4A的不同向导物。

[0683] 如图22A和22B中所示,敲除原代人巨噬细胞中的MS4A4A使得mTREM2和sTREM2水平增加。在MS4A4A敲除后所观察到的mTREM2和sTREM2水平的增加与在将抗MS4A4A抗体4A-313添加至NT1和NT2对照细胞后mTREM2和sTREM2水平的增加相当。在用抗MS4A4A抗体处理MS4A4A敲除的原代人巨噬细胞后,未观察到mTREM2或sTREM2水平的进一步增加,这表明在将本公开的抗MS4A4A抗体添加至人巨噬细胞后所观察到的mTREM2和sTREM2水平的增加是抗MS4A4A抗体结合至细胞上的MS4A4A的结果。

[0684] 实施例31:抗MS4A4A抗体调节膜和可溶性TREM2的动力学

[0685] TREM2蛋白的细胞表面表达受质膜对TREM2的胞吞作用/胞吐作用和膜结合蛋白酶对TREM2的调控裂解调控(Thornton等人,2017,EMBO Mol.Med.9:1366-1378;doi:10.15252/emmm.201707673)。如上文实施例中所描述,用本公开的抗MS4A4A抗体处理人巨噬细胞增加膜和可溶性TREM2水平两者。进行以下研究以进一步理解膜和可溶性TREM2水平

变化的动力学。

[0686] 为评价可溶性TREM2 (sTREM2) 水平的变化,将原代人巨噬细胞铺板在24孔或96孔板中,之后添加抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-450.NSLF或同种型对照抗体(所有均为1 μ g/ml)。在存在抗体的情况下0.5、1、4、24和48小时的细胞培养之后,收集上清液并使用Meso Scale Discovery测定sTREM2水平。

[0687] 如下评价在添加本公开的抗MS4A4A抗体后,原代人巨噬细胞中膜TREM2 (mTREM2) 水平的增加的动力学。将原代人巨噬细胞以100,000个细胞/孔铺板在96孔U形底板中3天,之后进行分析(T减72小时)。在各个时间点(T减48小时、T减24小时、T减4小时、T减1小时),将抗体添加至铺板细胞中,其包括同种型对照抗体(同种型对照NSLF)和抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF。铺板后72小时,在用荧光团缀合的抗TREM2抗体将细胞染色后通过流式细胞术测量TREM2的细胞表面(膜结合)表达水平。

[0688] 如图23A中所示,本公开的抗MS4A4A抗体使从各个供体获得的所培养原代人巨噬细胞的上清液中sTREM2的水平快速地增加。抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF使sTREM2水平比在用同种型对照抗体处理的细胞中所观察到的水平增加大约0.5倍(增加大约50%)。抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF使sTREM2水平比在用同种型对照抗体处理的细胞中所观察到的水平增加大约2.5倍(增加大约250%)。

[0689] 如图23B中所示,与在添加同种型对照抗体后所观察的结果相比,在向原代人巨噬细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后1小时和4小时,膜TREM2水平降低。在图23B中,虚线代表同种型对照抗体处理细胞中mTREM2的水平。在添加抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后24小时和48小时时间点,mTREM2的水平增加至高于在用同种型对照抗体处理的细胞中所观察到的水平。如图23A中所示,在所检查的所有时间点,膜TREM2的早期减少与TREM2脱落的增加一致。

[0690] 由于本公开的抗MS4A4A抗体增加原代人巨噬细胞中的TREM2蛋白水平,因此进行以下实验以检查在抗MS4A4A抗体添加后对TREM2 mRNA水平的影响。将原代人巨噬细胞铺板在24孔或96孔板中,并且用在完全RPMI中的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和同种型(1 μ g/ml)处理。在0.5、1、4、24和48小时孵育后,收集细胞沉淀物,并且使用定量PCR分析(qPCR)测定TREM2 mRNA水平。简而言之,使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)提取RNA,使用QuantiNova逆转录试剂盒(Qiagen)从总RNA制备cDNA。使用TaqMan测定通过实时PCR分析TREM2 (Hs00219132_m1)和GAPDH (Hs027886624_g1)的基因表达水平。将每个样品的CT值针对管家基因GAPDH的CT值进行归一化。

[0691] 如图23C中所示,抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF不影响从各个供体获得的所培养人原代人巨噬细胞中的TREM2 mRNA水平;观察到mRNA水平的一些轻微波动(比在同种型对照中所观察到的水平高不到0.5倍)。这些结果指示,本公开的抗MS4A4A抗体增加所培养人原代人巨噬细胞中的TREM2蛋白水平而不影响TREM2 mRNA水平。

[0692] 实施例32:抗MS4A4A抗体增加原代人巨噬细胞中的SPP1和IL1RN分泌

[0693] 如下检查本公开的抗MS4A4A抗体对原代人巨噬细胞中骨桥蛋白(SSP1)和白介素-1受体拮抗剂(IL1RN)的分泌水平的影响并与在经基因修饰以敲除MS4A4A表达的原代人巨噬细胞中所观察到的结果进行比较。

[0694] 使用标准程序,通过用与向导RNA(gRNA)复合的Cas9蛋白电穿孔在原代人巨噬细

胞中产生MS4A4A基因敲除,所述向导RNA呈由退火至tracrRNA的crRNA组成的单一gRNA分子或gRNA双链体形式:非靶向性NT1(IDT 1号和2号阴性对照RNA);NT2(GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC[SEQ ID NO:345]和AACCCCTGATTGTATCCGCA[SEQ ID NO:346]);1号MS4A4A(AATTGTGTACCCGATATACA[SEQ ID NO:347]);2号MS4A4A(AACCATGCAAGGAATGGAAC[SEQ ID NO:348]);3号MS4A4A(TATTCATTCCTAGACTACCT[SEQ ID NO:349]);4号MS4A4A,GCTCTGTACTGGCTGCATCA[SEQ ID NO:350])(所有均来自IDT,Coralville,Iowa,USA)。然后将细胞以50,000个细胞/孔铺板在完全RPMI-1640中并在存在抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF(0.1 μ g/ml)、抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF(0.1 μ g/ml)或同种型对照抗体的情况下培养48小时。收集来自细胞的上清液,并且使用R&D DuoSet ELISA试剂盒(IL1RN目录号DY280、SPP1目录号DY1433)分析IL1RN和SPP1的水平。

[0695] 用抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF或4A-450.NSLF处理NT对照细胞使得所分泌SPP1的水平增加。这些细胞中MS4A4A的基因敲除也使得所分泌的SPP1水平增加,其与用MS4A4A抗体处理所观察到的水平增加相当。这些研究中SPP1的水平为:在NT对照细胞中添加同种型对照抗体后为大约100ng/ml;在NT对照细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后为大约200ng/ml;在NT对照细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF后为大约275ng/ml;并且在MS4A4A敲除细胞中为大约225ng/ml。在添加本公开的任一抗MS4A4A抗体后所分泌SPP1水平的增加与在MS4A4A表达基因敲除的细胞中所观察到的水平增加相当。

[0696] 用抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF或4A-450.NSLF处理NT对照细胞均使得所分泌IL1RN的水平增加。这些细胞中MS4A4A的基因敲除也使得所分泌的IL1RN水平增加,其与用MS4A4A抗体处理所观察到的水平增加相当。这些研究中IL1RN的水平为:在NT对照细胞中添加同种型对照抗体后为大约8ng/ml;在NT对照细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后为大约12ng/ml;在NT对照细胞中添加抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF后为大约16ng/ml;且在MS4A4A敲除细胞中为大约14ng/ml。在添加本公开的任一抗MS4A4A抗体后所分泌IL1RN水平的增加与在MS4A4A表达基因敲除的细胞中所观察到的水平增加相当。

[0697] 综上所述,这些结果指示,本公开的抗MS4A4A抗体在增加原代人巨噬细胞中SPP1和IL1RN的分泌水平方面有效。另外,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体对增加所分泌SPP1和IL1RN水平的影响与在MS4A4A的表达基因敲除时所观察到的影响类似,这表明本公开的抗MS4A4A抗体降低或阻断这些细胞中的MS4A4A活性,从而引起所观察到的SPP1和IL1RN水平的增加。

[0698] 实施例33:抗MS4A4A抗体诱导的人巨噬细胞中的活力是非TREM2依赖性的

[0699] 如上文所示,本公开的抗MS4A4A抗体在抗MS4A4A抗体添加后有效地增加原代人巨噬细胞的活力(如通过总细胞ATP的增加所测量)。另外,如上文所示,本公开的抗MS4A4A抗体增加细胞中的膜TREM2水平。由于本公开的抗MS4A4A抗体增加膜TREM2水平,并且由于抗MS4A4A抗体增加细胞活力,因此进行一系列实验以检查响应于抗MS4A4A抗体添加而观察到的细胞活力的增加是否至少部分地是TREM2依赖性的。为了对此进行探究,使用CRISPR技术将人原代巨噬细胞中的TREM2基因敲除,以检查本公开的抗MS4A4A抗体对在遗传上缺少TREM2表达的原代人巨噬细胞的细胞活力的影响。

[0700] 通过用与向导RNA(gRNA)复合的Cas9蛋白电穿孔产生TREM2敲除巨噬细胞,所述向导RNA呈由退火至tracrRNA的crRNA组成的单一gRNA分子或gRNA双链体形式:非靶向性1

(NT1) (IDT 1号和2号阴性对照crRNA); NT2 (GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC[SEQ ID NO:345]和AACCCCTGATTGTATCCGCA[SEQ ID NO:346]); 1号TREM2 (GCCATCACAGACGATACCCT[SEQ ID NO:351]); 2号TREM2 (ATAGGGGCAAGACACCTGCA[SEQ ID NO:352]); 3号TREM2 (CAGCATCCCGGTGATCCAGG[SEQ ID NO:353]); 4号TREM2, TGGAGATCTCTGGTCCCG[SEQ ID NO:354]) (所有均来自IDT, Coralville, Iowa, USA)。

[0701] 然后将细胞以50,000个细胞/孔铺板在完全RPMI-1640中并在于溶液中存在抗MS4A4A抗体(4A-313NSLF、4A-450NSLF)或同种型对照抗体(所有均为0.1 μ g/ml)的情况下培养48小时。然后使用CellTiter-Glo发光细胞活力试剂盒(Promega, 目录号G7571)按照制造商的方案对细胞内的ATP含量进行量化。

[0702] 与同种型对照抗体所观察到的结果相比,添加抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF或抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF使NT对照细胞中的ATP水平增加大约20%。另外,将抗MS4A4A抗体添加至TREM2敲除细胞中使得ATP水平比同种型对照抗体所观察到的ATP水平增加大约15%-20%。综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体至少部分地以非TREM2依赖性方式增加细胞ATP水平(因此增加细胞活力)。

[0703] 实施例34:MS4A4A的siRNA敲减增加原代人巨噬细胞中的膜和可溶性TREM2水平

[0704] 如上文所示,使用CRISPR技术基因消除MS4A4A表达使得人巨噬细胞中的膜和可溶性TREM2水平增加。为进一步对这些发现提供支援,使用独立实验方法评价MS4A4A的表达缺失对TREM2水平的影响。在这些研究中,在原代人巨噬细胞中进行MS4A4A的siRNA敲减并测量其对膜和可溶性TREM2水平的影响。

[0705] 通过使用N-TER纳米粒子siRNA转染系统(Millipore Sigma)转染对照(Millipore Sigma, SIC001)和MS4A4A靶向siRNA(Millipore Sigma, SASI_Hs01_00150955)产生MS4A4A敲减的巨噬细胞。通过流式细胞分析评估MS4A4A敲除效率(数据未示出)。在用荧光团缀合的抗TREM2抗体将细胞染色后通过流式细胞术测量TREM2的细胞表面(膜结合)表达。

[0706] 如图24A和图24B中所示,MS4A4A表达的siRNA敲减导致膜TREM2水平和可溶性TREM2水平分别增加。在图24A和图24B中,每组连接的点代表来自具有和没有siRNA敲减的一个单独的供体(总共6个供体)的平均结果。这些数据与显示出上文所述遗传工程改造的MS4A4A敲除细胞中mTREM2和sTREM2水平增加的类似结果一致。综上所述,这些结果指示,MS4A4A表达或活性的缺失使原代人巨噬细胞中的可溶性TREM2水平和膜TREM2水平增加。

[0707] 实施例35:抗MS4A4A抗体在体外增加mTREM2、sTREM2和ATP水平的功效

[0708] 在从三个单独供体获得的原代人巨噬细胞中进一步检查本公开的抗MS4A4A抗体增加mTREM2、sTREM2和ATP水平的影响(如先前在上文实施例24和25中所描述)。将原代人巨噬细胞用各种浓度的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和4A-450.NSLF处理48小时。然后测量mTREM2、sTREM2和ATP水平的变化。

[0709] 如图25A、图25B和图25C中所示,抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF分别以剂量依赖性方式使从三个不同供体获得的原代人巨噬细胞中mTREM2的水平增加。图25A、图25B和图25C中的数据呈现为mTREM2的水平相对于使用同种型对照抗体所观察到的水平的倍数增加(x轴示出了抗体浓度(μ g/ml)并且y轴示出了高于对照(其设置为1.0)的倍数增加)。对来自这些图的数据进行分析以确定EC50值和最大反应;这些结果示于下表41中(示出为平均值 \pm SEM)。

[0710] 表41

	抗体	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	最大 mTREM2 反应 (相对于同种型对照的倍数增加)
[0711]	4A-313.NSLF	0.028 +/- 0.013	2.45 +/- 0.23
	4A-450.NSLF	0.039 +/- 0.014	2.36 +/- 0.27

[0712] 如图26A、图26B和图26C中所示,抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF分别以剂量依赖性方式使从三个不同供体获得的原代人巨噬细胞中sTREM2的水平增加。图26A、图26B和图26C中的数据呈现为sTREM2的水平相对于使用同种型对照抗体所观察到的水平的倍数增加(x轴示出了抗体浓度($\mu\text{g/ml}$)并且y轴示出了高于对照(其设置为1.0)的倍数增加)。对来自这些图的数据进行分析以确定EC50值和最大反应;这些结果示于下表42中(示出为平均值+/-SEM)。

[0713] 表42

	抗体	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	最大 sTREM2 反应 (相对于同种型对照的倍数增加)
[0714]	4A-313.NSLF	0.025 +/- 0.007	6.17 +/- 1.90
	4A-450.NSLF	0.069 +/- 0.006	5.74 +/- 1.65

[0715] 如图27A、图27B和图27C中所示,抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF分别以剂量依赖性方式使从三个不同供体获得的原代人巨噬细胞中细胞ATP的水平增加。图27A、图27B和图27C中的数据呈现为细胞ATP的水平相对于使用同种型对照抗体所观察到的水平的倍数增加(x轴示出了抗体浓度($\mu\text{g/ml}$)并且y轴示出了高于对照(其设置为1.0)的倍数增加)。对来自这些图的数据进行分析以确定EC50值和最大反应;这些结果示于下表43中(示出为平均值+/-SEM)。

[0716] 表43

	抗体	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	最大细胞 ATP 反应 (相对于同种型对照的倍数增加)
[0717]	4A-313.NSLF	0.010 +/- 0.001	1.76 +/- 0.10
	4A-450.NSLF	0.021 +/- 0.006	1.43 +/- 0.10

[0718] 综上所述,如通过在抗体添加后mTREM2、sTREM2和细胞ATP的水平增加所证明,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体诱导原代人巨噬细胞中的功能变化。

[0719] 实施例36:抗MS4A4A抗体挽救CSF1R抑制诱导的细胞死亡

[0720] 为评估MS4A4A在CSF1R抑制后保持人巨噬细胞存活的能力,研究本公开的抗MS4A4A抗体在存在CSF1R抑制剂PLX3397的情况下增强细胞存活的能力(参见DeNardo等人, Cancer Discov (2011) 1 (1):54-67.22039576);Peng等人, J. of Exp Canc Res (2019) 38 (1):372.PMID:31438996)。

[0721] 使用RosetteSep人单核细胞富集方案(Stem Cell Technologies)将人单核细胞从全血分离出来。为制备人单核细胞源性巨噬细胞,对单核细胞进行计数并铺板在完全RPMI培养基(补充有Glutamax、青霉素/链霉素、非必需氨基酸、丙酮酸钠和10%热灭活胎牛血清的RPMI)和50ng/ml MCSF(Peprotech)中。6天后,收集分化的单核细胞(巨噬细胞)并以 0.1×10^6 个细胞/孔的密度于含有50ng/ml M-CSF的完全RPMI培养基中铺板至96孔板上。使

巨噬细胞恢复过夜。在第7天,将抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和4A-450.NSLF添加至含有和不含PLX3397(1 μ M)的所培养巨噬细胞中。所有抗体均以1 μ g/ml的最终浓度添加。使用cytotox red试剂(标记濒死细胞的DNA染料,Essen Bioscience)测定细胞活力。通过使用IncuCyte活细胞成像系统(Essen Bioscience)测量若干天的荧光信号来测定cytotox red试剂的水平。

[0722] 如图28A中所示,用PLX3397和抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF处理的人巨噬细胞显示出cytotox red计数与在用PLX3397加同种型对照抗体处理的细胞中所观察到的计数相比减少。图28A中的数据以平均值 \pm SEM的形式绘制;N=3,来自三个人类供体。

[0723] 如图28B中所示,用PLX3397和抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF处理的人巨噬细胞显示出cytotox red计数与在用PLX3397加同种型对照抗体处理的细胞中所观察到的计数相比减少。图28B中的数据绘制为平均值 \pm SEM;N=3,来自三个人类供体。

[0724] 综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体降低细胞死亡并且在CSF1R抑制后保持人巨噬细胞的存活。因此,本公开的抗MS4A4A抗体可用于治疗患有CSF1R缺乏疾病或病症(诸如ALSP或HDLS)的个体。

[0725] 实施例37:抗MS4A4A抗体在食蟹猴血清中的药物动力学

[0726] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内血清中的药物动力学(PK),进行以下研究。

[0727] 通过静脉内弹丸式注射以80mg/kg的剂量向食蟹猴(cynomolgus monkey、cyno)施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT或同种型对照(huIgG1)。每个动物组施用总共五剂;第一剂与第二剂相隔28天间隔并且剩余四剂中每剂相隔7天间隔。

[0728] 在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集血清样品。

[0729] 基于利用生物素标记的山羊抗人IgG(目录号NBP1-74983;Novus Biologicals)作为捕获试剂和Alexa fluor® 647标记的抗人IgG(目录号2049-31;Southern Biotech)作为检测试剂的逐步夹心格式,使用定制Gyrolab测定测量食蟹猴血清中的抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT和4A-18.WT的水平。将标准品、品质控制品和样品稀释于Rexxip HN缓冲液(目录号P0004996,Gyrolab)中。通过生物素化的抗人IgG捕获样品中存在的抗MS4A4A抗体,所述生物素化的抗人IgG结合至gyrolab bioaffy 200CD的链霉抗生物素蛋白包被的亲柱。通过荧光标记的抗人IgG抗体检测所捕获的抗MS4A4A抗体。所产生的荧光信号的强度与样品中所存在的抗MS4A4A抗体的量成正比。使用Gyrolab xP和Excel对数据进行分析。

[0730] 在将80mg/kg剂量施用于动物后,血清中的抗MS4A4A抗体浓度在达到平均最大观察浓度($C_{\text{最大}}$)后稳定地下降,其中在第1天(第一剂的当天)施用后,抗MS4A4A抗体4A-21.WT的平均半衰期($t_{1/2}$)值(平均值 \pm SD)为140 \pm 54.5小时,抗MS4A4A抗体4A-25.WT为269 \pm 114小时,并且抗MS4A4A抗体4A-18.WT为193 \pm 26.8小时。清除率(CL)与 $t_{1/2}$ 成反比,其中在第1天,抗体4A-21.WT的平均CL(平均值 \pm SD)为0.625 \pm 0.107mL/hr/kg,抗体4A-25.WT为0.124 \pm 0.025mL/hr/kg,并且抗体4A-18.WT为0.402 \pm 0.09mL/hr/kg。抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT组在第1天的稳态分布体积(V_{ss})值分别在30.8mL/kg至51.4mL/kg、22.6mL/kg至41.7mL/kg和24.9mL/kg至41.3mL/kg范围内。

[0731] 通过 $C_{\text{最大}}$ 和从0至给药后168小时的浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-168})评价暴露。在第

1天,抗体4A-25.WT具有最高平均 $C_{\text{最大}}$ ($6.26 \times 10^6 \text{ ng/mL}$),其次为抗体4A-18.WT ($4.81 \times 10^6 \text{ ng/mL}$)。在测试品中,抗MS4A4A抗体4A-21.WT ($3.53 \times 10^6 \text{ ng/mL}$)具有最低的 $C_{\text{最大}}$ 。

[0732] 抗MS4A4A抗体4A-25.WT和4A-18.WT具有类似的 AUC_{0-168} (分别为 $3.47 \times 10^8 \text{ ng*hr/mL}$ 和 $3.35 \times 10^8 \text{ ng*hr/mL}$),其显著高于抗体4A-21 ($1.15 \times 10^8 \text{ ng*hr/mL}$)。

[0733] 实施例38:抗MS4A4A抗体在体内增加血清和CSF的sTREM2水平

[0734] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对血清和脑脊液(CSF)中的sTREM2水平的影响,实施以下研究。

[0735] 通过静脉内弹丸式注射以80mg/kg的剂量向食蟹猴施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT或同种型对照(huIgG1)。每组施用总共五剂;第一剂与第二剂相隔28天间隔并且剩余四剂中每剂相隔7天间隔。

[0736] 在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集血清样品。还在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集CSF样品。

[0737] 在血清中,在施用抗MS4A4A抗体4A-25.WT、4A-18.WT和4A-21.WT后,sTREM2水平增加至基线的2倍以上,其中在施用第一个抗体剂量后48至96小时达到峰值水平,分别为其给药前基线水平的232%、261%和287%。此外,在第29天、第36天、第43天和第50天重复每周给药抗MS4A4A抗体的情形下,血清中的sTREM2水平保持升高,其中平均sTREM2水平为在给药前所观察到的基线水平的大约2倍(214%,4A-25.WT;226%,4A-18.WT;199%,4A-21.WT)。在整个给药期,同种型对照保持接近给药前水平(基线的107%)。

[0738] 在CSF中,与在用同种型对照治疗的动物中所观察到的结果相比,在分别施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT ($p=0.0008$,双因素ANOVA)和4A-25.WT ($p=0.004$,双因素ANOVA)后24和96小时,sTREM2水平显著地增加。4A-18.WT治疗组中的sTREM2水平与在同种型对照组中所观察到的水平类似。

[0739] 综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体在体内有效地增加血清和CSF两者中的sTREM2水平。

[0740] 实施例39:抗MS4A4A抗体在体内增加CSF骨桥蛋白水平

[0741] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对CSF中的骨桥蛋白水平的影响,进行以下研究。

[0742] 通过静脉内弹丸式注射以80mg/kg的剂量向食蟹猴施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT或同种型对照(huIgG1)。每组施用总共五剂;第一剂与第二剂相隔28天间隔并且剩余四剂中每剂相隔7天间隔。在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集CSF样品。

[0743] 与同种型对照抗体所观察到的结果相比,抗MS4A4A抗体4A-25.WT、4A-18.WT和4A-21.WT显著地增加CSF中的骨桥蛋白水平。重复施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT使得CSF骨桥蛋白水平显著增加,与同种型对照相比,其在第一剂量后12小时达到峰值至大约280ng/ml ($p <$

0.0001, 双因素ANOVA) 并且在后续剂量后12至24小时继续显示出峰值水平。与同种型对照相比, 重复施用抗MS4A4A抗体4A-25.WT和抗体4A-18.WT显示出在每次剂量后12至24小时CSF骨桥蛋白水平增加(至大约50-80ng/ml的水平)的趋势。

[0744] 这些结果显示, 本公开的抗MS4A4A抗体在体内有效地增加CSF中的骨桥蛋白水平。

[0745] 实施例40: 抗MS4A4A抗体在体内增加各个脑区中的骨桥蛋白水平

[0746] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对食蟹猴额叶皮质和海马体中的骨桥蛋白水平的影响, 进行以下研究。

[0747] 通过静脉内弹丸式注射以80mg/ml的剂量向食蟹猴施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT、4A-25.WT、4A-18.WT或同种型对照(huIgG1)。每组施用总共五剂; 第一剂与第二剂每剂相隔28天间隔, 并且剩余四剂中每剂相隔7天间隔。在第五剂后48小时使动物安乐死, 并且将额叶皮质和海马体移除并冷冻。

[0748] 如下测量脑组织中的骨桥蛋白水平。根据制造商说明书, 将冷冻脑样品用N-Per神经元蛋白质提取试剂(目录号87792, Thermo Scientific)和Halt蛋白酶抑制剂(目录号1861278)在冰上溶解20分钟。将样品离心并且将上清液转移至新管并在-80°C下储存直至进一步分析。根据制造商说明书, 通过BCA蛋白质分析试剂盒(目录号23225, Thermo Scientific)测量每个样品中的总蛋白质浓度。使用蛋白质浓度值来对脑组织中所测量的分析物浓度进行归一化。

[0749] 在用抗MS4A4A抗体4A-21.WT治疗后, 食蟹猴脑组织中的骨桥蛋白水平增加。当与同种型对照抗体所观察到的结果相比时, 向食蟹猴重复施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT使得食蟹猴的额叶皮质中的骨桥蛋白水平显著增加(分别 $p < 0.035$ 和 $p = 0.0003$; 单因素ANOVA)。具体地说, 在抗体施用后, 在额叶皮质中所测量的平均骨桥蛋白水平如下: 大约0.6ng/mg(同种型对照抗体); 大约1.2ng/mg(4A-21.WT); 大约0.7ng/mg(4A-25.WT和4A-18.WT)。当与同种型对照抗体所观察到的结果相比时, 重复施用抗MS4A4A抗体使得食蟹猴海马体中的骨桥蛋白水平有增加的趋势。具体地说, 在抗体施用后, 在海马体中所测量的平均骨桥蛋白水平如下: 大约1.3ng/mg(同种型对照抗体); 大约1.8ng/mg(4A-21.WT及4A-18.WT); 和大约2.4ng/mg(4A-25.WT)。这些结果显示, 本公开的抗MS4A4A抗体有效增加非人灵长类动物中额叶皮质和海马体中的骨桥蛋白水平。

[0750] 实施例41: 抗MS4A4A抗体对CSF蛋白质生物标记物的影响

[0751] 进一步分析从施用抗MS4A4A抗体4A-21.WT(80mg/kg)的外周注射的食蟹猴所获得的脑脊液中蛋白质生物标记物体内表达的变化。在这些研究中, 使用对在注射抗体后24小时从动物获得的CSF样品进行的Somalogic Somascan 1.3k测定测量CSF中蛋白质表达水平的变化。

[0752] 在将抗MS4A4A抗体4A-21.WT施用于食蟹猴后观察到CSF中的蛋白质变化。图29是呈现来自三个CSF样品的全蛋白质组影响的火山图, 所述样品取自外周注射抗MS4A4A抗体4A-21.WT(80mg/kg)后的食蟹猴。所述火山图中的每个点代表1种蛋白质。对于每个所测量的蛋白质, x轴上的值代表抗体治疗动物与对照动物之间CSF中蛋白质水平的倍数变化差异; y轴上的值代表通过ANOVA所评价的这些所观察到的差异的显著性, 其表示为差异表达的p值的负log₁₀。图29中的蛋白质符号呈现p值 $< 1E-3$ 的在抗体治疗动物对对照动物中差异表达的蛋白质。

[0753] 如图29中所示,在施用抗MS4A4A抗体的动物中观察到骨桥蛋白(SSP1)和IL1RN(2种小神经胶质细胞标记物)的CSF水平的增加。综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体增加非人灵长类动物的CSF和血清两者中的IL1RN和骨桥蛋白水平。

[0754] 实施例42:抗MS4A4A抗体在体内增加血清sTREM2水平

[0755] 在非人灵长类动物中进行的另一系列实验中进一步检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对血清和脑脊液(CSF)中的sTREM2水平的影响。

[0756] 通过静脉内弹丸式注射向食蟹猴施用80mg/ml剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT和4A-450.NSLF;250mg/ml剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF,或媒介物对照。每组施用总共四剂;第一剂与第二剂相隔7天间隔,第二剂与第三剂相隔14天间隔,并且第三剂与第四剂相隔28天间隔。

[0757] 在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集血清样品;还在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集CSF样品。

[0758] 如下测量血清中的sTREM水平。用在PBS中的捕获抗体将单点滴Meso Scale Discovery(MSD)板(Rockville,MD)在4°C下包被过夜。将猴血清样品(以及猴TREM2-Fc标准品)稀释于结合缓冲液中并在室温下添加至孔中1小时。在结合缓冲液中以1:2,000稀释度添加生物素化的山羊抗人TREM2多克隆抗体(R&D Systems)并在室温下孵育1小时,之后将其用磺基标签链霉抗生物素蛋白(MSD)进行检测。将150 μ l 1 \times 读取缓冲液添加至板中,然后对板进行分析。

[0759] 这些研究的结果示于图30中。在血清中,在以80mg/kg施用抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后,在给药后24小时,sTREM2水平增加至为基线所观察水平的大约1.5倍(给药前基线水平的约150%)。sTREM2的水平随时间推移继续增加,在80mg/kg的多次剂量后达到为基线所观察水平3倍(给药前基线水平的约300%)的最大水平。

[0760] 在250mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF下,血清sTREM2水平在给药后24小时增加至为基线所观察水平的大约1.5倍并随时间推移继续增加,在250mg/kg的多次剂量后,达到为基线所观察水平4.8倍的最大水平。

[0761] 在以80mg/kg施用抗MS4A4A抗体4A-313.WT后,血清sTREM2水平在给药后24小时开始增加至为基线所观察水平的大约1.5倍。在80mg/kg重复剂量的4A-313.WT的情形下,血清sTREM2水平增加至最大为基线所观察水平的3倍。

[0762] 在以80mg/kg施用抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF后,血清sTREM2水平在给药后24小时增加至为基线所观察水平的大约2倍并随时间推移继续增加,在80mg/kg 4A-450.NSLF的多次剂量后,达到为基线所观察水平3倍的最大水平。

[0763] 综上所述,这些结果显示,本发明的抗MS4A4A抗体在非人灵长类动物中有效地增加血清中的sTREM2水平。

[0764] 实施例43:抗MS4A4A抗体在体内增加CSF骨桥蛋白水平

[0765] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对脑脊液(CSF)中的骨桥蛋白水平的影响,

进行以下研究。

[0766] 通过静脉内弹丸式注射向食蟹猴施用80mg/ml剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT、4A-450.NSLF,250mg/ml剂量的4A-313.NSLF,或媒介物对照。每组施用总共四剂;第一剂与第二剂相隔7天间隔,第二剂与第三剂相隔14天间隔,并且第三剂与第四剂相隔28天间隔。

[0767] 在给药前、施用抗体后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和1224小时从动物收集CSF样品。

[0768] 如下测量CSF中的骨桥蛋白水平。用在PBS中的捕获抗体将单点滴Meso Scale Discovery (MSD) 板 (Rockville, MD) 在4°C下包被过夜。将猴CSF样品稀释于结合缓冲液中并在室温下添加至孔中1小时。在结合缓冲液中添加生物素化的山羊抗人骨桥蛋白多克隆抗体 (R&D Systems) 以1:2,000稀释度添加且在室温下孵育1小时,之后将其用磺基标签链霉抗生物素蛋白 (MSD) 进行检测。将150 μ l 1 \times 读取缓冲液添加至板中,然后在Sector成像仪 (MSD) 上对板进行分析。

[0769] 在施用本公开的抗MS4A4A抗体后,食蟹猴CSF中的骨桥蛋白水平增加。在施用80mg/kg和250mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后,CSF骨桥蛋白水平在第一剂量后24小时达到峰值,分别为基线所观察水平的平均大约13倍和6倍,之后下降至基线水平的1.5倍(图31A和31B)。在重复给药80mg/kg的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF的情形下,CSF骨桥蛋白水平在每次剂量后10至24小时达到峰值,所达到的峰值水平为在基线水平所观察结果的3倍至5倍(图31A)。在重复给药250mg/kg的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF的情形下,CSF骨桥蛋白水平增加,并且在第二剂量后168小时达到为基线所观察水平14倍的峰值水平(图31B)并且在后续剂量后24至48小时达到为基线所观察水平4倍至5倍的峰值水平(图31B)。

[0770] 在以80mg/kg施用抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF后,CSF骨桥蛋白水平在第一剂量后24小时达到为基线所观察水平大约13倍的峰值,之后下降至基线水平(图31C和31D)。在重复给药80mg/kg 4A-450.NSLF的情形下,CSF骨桥蛋白水平在每次剂量后24小时达到峰值,所达到的峰值水平为在基线水平所观察结果的6倍至9倍(图31C)。

[0771] 在重复施用80mg/kg的抗MS4A4A抗体4A-313.WT后,CSF骨桥蛋白水平在每次剂量后24小时达到为基线所观察水平大约1.5倍的峰值,之后下降至基线水平(图31D)。

[0772] 综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体在非人灵长类动物中有效地增加CSF中的骨桥蛋白水平。

[0773] 实施例44:抗MS4A4A抗体在体内增加各个脑区中的骨桥蛋白水平

[0774] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对额叶皮质和海马体中的骨桥蛋白水平的影响,进行以下研究。

[0775] 通过静脉内弹丸式注射向食蟹猴施用80mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT和4A-450.NSLF,和250mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF,或媒介物对照。每组施用总共四剂;第一剂与第二剂相隔7天间隔,第二剂与第三剂相隔14天间隔,并且第三剂与第四剂相隔28天间隔。在第四剂后48小时使动物安乐死,并且将额叶皮质和海马体移除并冷冻。

[0776] 如下测量脑组织中的骨桥蛋白水平。根据制造商说明书,将冷冻脑样品用N-Per神

神经元蛋白质提取试剂(目录号87792, Thermo Scientific)和Halt蛋白酶抑制剂(目录号1861278)在冰上溶解20分钟。将样品离心并且将上清液转移至新管并在 -80°C 下储存直至进一步分析。根据制造商说明书,通过BCA蛋白质分析试剂盒(目录号23225, Thermo Scientific)测量每个样品中的总蛋白质浓度。使用蛋白质浓度值来对脑组织中所测量的分析物浓度进行归一化。

[0777] 在施用抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF后,食蟹猴脑组织中的骨桥蛋白水平增加。当与对照动物中所观察到的结果相比时,重复施用80mg/kg的抗体4A-450.NSLF使得食蟹猴额叶皮质中的骨桥蛋白水平显著增加($p=0.027$, t检验)(图32A)。类似地,当与在对照治疗动物中所观察到的结果相比时,重复施用80mg/kg的抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF使得食蟹猴海马体中的骨桥蛋白水平显著增加($p=0.027$, t检验)(图32B)。

[0778] 综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体在非人灵长类动物中有效地增加脑组织(例如额叶皮质和海马体)中的骨桥蛋白水平。

[0779] 实施例45:抗MS4A4A抗体在体内增加各个脑区中的CSF1R水平

[0780] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对额叶皮质和海马体中的群落刺激因子1受体(CSF1R)水平的影响,进行以下研究。

[0781] 通过静脉内输注向食蟹猴施用80mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT和4A-450.NSLF, 250mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF,或媒介物对照。每组施用总共四剂;第一剂与第二剂相隔7天间隔,第二剂与第三剂相隔14天间隔,并且第三剂与第四剂相隔28天间隔。在第四剂后48小时使动物安乐死,并且将额叶皮质和海马体移除并冷冻。

[0782] 如下测量脑组织中的CSF1R水平。根据制造商说明书,将冷冻脑样品用N-Per神经元蛋白质提取试剂(目录号87792, Thermo Scientific)和Halt蛋白酶抑制剂(目录号1861278)在冰上溶解20分钟。将样品离心并且将上清液转移至新管并在 -80°C 下储存直至进一步分析。根据制造商说明书,通过BCA蛋白质分析试剂盒(目录号23225, Thermo Scientific)测量每个样品中的总蛋白质浓度。使用蛋白质浓度值来对脑组织中所测量的分析物浓度进行归一化。

[0783] 在施用抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF后,食蟹猴脑组织中的CSF1R水平增加。当与在对照治疗动物中所观察到的结果相比时,重复施用250mg/kg的抗体4A-313.NSLF使得食蟹猴额叶皮质中的CSF1R水平显著增加($p=0.046$, t检验)(图33A)。类似地,当与在对照动物中所观察到的结果相比时,重复施用80mg/kg的抗MS4A4A抗体4A-450.NSLF使得食蟹猴海马体中的CSF1R水平显著增加($p=0.013$, t检验)(图33B)。

[0784] 综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体在非人灵长类动物中有效地增加脑组织(例如额叶皮质和海马体)中的CSF1R水平。

[0785] 实施例46:抗MS4A4A抗体在体内增加各个脑区中的总TREM2水平

[0786] 为检查本公开的抗MS4A4A抗体在体内对额叶皮质和海马体中的可溶性TREM2和膜TREM2(总TREM2)水平的影响,进行以下研究。

[0787] 通过静脉内弹丸式注射向食蟹猴施用80mg/kg剂量的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT、4A-450.NSLF, 250mg/kg剂量的4A-313.NSLF,或媒介物对照。每组施用总共四剂;第一剂与第二剂相隔7天间隔,第二剂与第三剂相隔14天间隔,并且第三剂与第四剂相

隔28天间隔。在第四剂后48小时使动物安乐死,并且将额叶皮质和海马体移除并冷冻。测量这些脑区中的总TREM2水平。

[0788] 在用抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF、4A-313.WT和4A-450.NSLF治疗后,食蟹猴脑组织中的总TREM2水平增加。与在对照治疗动物中所观察到的结果相比,重复施用250mg/kg的抗体4A-313.NSLF使得食蟹猴海马体中的总TREM2水平在统计学上显著增加($p=0.014$,单因素ANOVA)(图34A)。当与在对照治疗动物中所观察到的结果相比时,重复施用250mg/kg的抗体4A-313.NSLF和80mg/kg的抗体4A-313.WT使得食蟹猴额叶皮质中的TREM2水平有增加趋势(图34B)。

[0789] 综上所述,这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体在非人灵长类动物中有效地增加脑组织(例如额叶皮质和海马体)中的TREM2水平。

[0790] 实施例47:抗MS4A4A抗体对体内小神经胶质细胞中的基因表达谱的影响

[0791] 如上文所述在向食蟹猴施用本公开的抗MS4A4A抗体后,如下进行通过小神经胶质细胞RNAseq分析测量的基因表达变化。抗MS4A4A抗体包括抗体4A-313.WT(80mg/kg)、4A-313.NSLF(80mg/kg和250mg/kg)和4A-450.NSLF(80mg/kg)。在将动物最终杀死(take down)后,使用温和手动解离方案解离出额叶皮质样品,之后进行Percoll梯度分离以去除碎片。将细胞沉淀用Cd11b抗体染色20分钟,洗涤,用DAPI标记并处理以进行小神经胶质细胞的FACS分离。将DAPI⁻:CD11b⁺细胞直接分选至350ul或RLT plus缓冲液(Qiagen)中并且立即处理细胞以进行RNA分离。使用tape station测定RNA质量并且使用稍作修改的Lexogen QuantSeq的低输入方案产生文库。使用tape station对文库进行量化并使用Next Seq测序。使用Lexogen多重纠错工具对测序数据进行解复用并进行分析。

[0792] 如图35A、35B和35C中所示,在食蟹猴中外周注射本公开的抗MS4A4A抗体导致小神经胶质细胞中的基因表达变化,如通过在从这些非人灵长类动物的额叶皮质分离而来的FACS分选的小神经胶质细胞中的RNAseq分析所测量。在小神经胶质细胞中显示出通过抗MS4A4A抗体处理强烈诱导的基因是小神经胶质细胞活化(C型凝集素结构域家族7成员A, CLEC7A)、小神经胶质细胞迁移(肌醇1,4,5-三磷酸受体2,ITPR2)和小神经胶质细胞增殖(抗原KI-67(MKI67))的标记物(图35A)。如图35B中所示,还观察到小神经胶质细胞活化的其他标记物的变化,并且包括小神经胶质细胞活化标记物IL1RN、SPP1和1-磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸磷酸二酯酶 γ -2(PLCG2)。图35C.本公开的抗MS4A4A抗体对两种稳态小神经胶质细胞标记物(嘌呤能受体P2RY12和CX3C趋化因子受体1(CX3CR1))的影响示于图35C中,其中这两种稳态小神经胶质细胞标记物的表达水平在抗MS4A4A抗体处理后降低。图35A、35B和35C中的数据呈现为log₂尺度上的平均值,误差条为SEM,并且每个实验组和每个时间点N=5。

[0793] 综上所述,这些结果显示,如通过与小神经胶质细胞活化、迁移和增殖相关的蛋白质的各种mRNA水平的增加和与小神经胶质细胞稳态相关的蛋白质的各种mRNA水平的降低所证明,本公开的抗MS4A4A抗体在体内有效地使小神经胶质细胞活化。

[0794] 实施例48:抗MS4A4A抗体减少带HA-Snorke1标签的MS4A4A在U937细胞上的表面表达

[0795] 用编码带有snorke1标签的人MS4A4A的表达质粒转染U937细胞(ATCC CRL-1593.2)(将后接HA标签的跨膜结构域连接至人MS4A4A的细胞质C末端)。以此方式,标签展

示在细胞外,但在结构上与膜蛋白质分离。经转染的U937细胞在质粒转染和抗生素选择后具有活力。然后使用流式细胞术针对人MS4A4A蛋白细胞表面表达对细胞进行筛选,并且仅收集5%的阳性最强细胞用于以下研究中。

[0796] 使用如上文所述产生的过表达重组人MS4A4A-snorke1的U937细胞作为这些研究中的靶细胞。将细胞用PMA (25ng/ml) 预处理24小时,然后收获并以100,000个细胞/孔于RPMI 1640完全培养基中接种在圆底96孔板中的,其中PMA和抗MS4A4A抗体和同种型对照抗体的最终浓度为0.01ug/ml、0.1ug/ml和1ug/ml。将细胞孵育48小时。用冷的FACS缓冲液(PBS+2% FBS)洗涤细胞并且每孔添加50 μ L 1:200稀释的抗HA标签单克隆抗体(ThermoFisher,A-21287)并在冰上孵育30分钟,还用Aqua Live/Dead标记细胞以用于活力判别。用冷的FACS缓冲液将细胞洗涤2次并重悬于200 μ L FACS缓冲液中。在FACSCanto系统(BD Biosciences)上进行流式细胞术分析。使用中值荧光强度分析结合数据。

[0797] 如图36中所示,抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和4A-450.NSLF以剂量相关方式降低表达人带MS4A4A-snorke1标签的蛋白质的U937细胞中的质膜MS4A4A的水平。在1 μ g/ml的最高抗MS4A4A抗体浓度下,与在用同种型对照抗体处理的细胞中所观察到的表面MS4A4A水平相比,抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF和4A-450.NSLF使表面MS4A4A水平降低大约50%。这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体降低或下调表达重组人MS4A4A-snorke1的U937细胞中的细胞表面MS4A4A水平。

[0798] 实施例49:抗MS4A4A抗体调节原代人髓系细胞中的糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)蛋白质水平

[0799] GPNMB是在多种细胞类型(包括组织巨噬细胞和小神经胶质细胞)中表达的表面糖蛋白。若干种遗传变体与帕金森氏病风险相关。PD患者黑质中的GPNMB蛋白质水平升高,并且在溶酶体应激后GPNMB水平增加(Moloney等人,2018,Neurobio Dis.120:1-11)。另外,GPNMB的表达增加与SNP rs199347相关,此风险SNP位于GPNMB基因内(Murthy等人,2017,18:121-133)。为确定MS4A4A是否可调节GPNMB的表达水平,将来自两个供体(供体1117号和1118号)的人原代巨噬细胞用各种浓度的抗MS4A4A抗体4A-313.NSLF处理48小时。在将细胞用缀合有荧光团的抗GPNMB抗体染色后,通过流式细胞术测量细胞表面(膜结合)GPNMB。

[0800] 如图37中所示,在向人原代巨噬细胞添加抗MS4A4A抗体4A.313.NSLF后,所述细胞中的膜GPNMB水平降低。响应于抗MS4A4A抗体处理的GPNMB水平的降低呈剂量依赖性方式。这些结果显示,本公开的抗MS4A4A抗体有效地降低髓系细胞(例如巨噬细胞)中GPNMB的细胞表面表达水平。

[0801] 具有野生型huIgG1或野生型huIgG1的Fc变体的示例性抗MS4A4A抗体重链氨基酸序列:

[0802] 4A-450(huIgG1重链)(SEQ ID NO:320)

[0803] QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0804] 4A-450 (无C末端K的huIgG1重链) (SEQ ID NO:321)

[0805] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0806] 4A-450 (hIgG1重链;P331S) (SEQ ID NO:322)

[0807] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0808] 4A-450 (无C末端K的hIgG1重链P331S) (SEQ ID NO:323)

[0809] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0810] 4A-450 (huIgG1重链N325S/L328F) (SEQ ID NO:324)

[0811] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0812] 4A-450 (无C末端K的hIgG1重链N325S/L328F) (SEQ ID NO:325)

[0813] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0814] 4A-450 (huIgG1重链K322A) (SEQ ID NO:326)

[0815] QVQLVQSGSELKPKGASVKVCKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC

PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0816] 4A-450 (无C末端K的huIgG1重链K322A) (SEQ ID NO:327)

[0817] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFTGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0818] *****

[0819] 4A-419 (huIgG1重链) (SEQ ID NO:328)

[0820] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0821] 4A-419 (无C末端K的huIgG1重链) (SEQ ID NO:329)

[0822] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0823] 4A-419 (hIgG1重链P331S) (SEQ ID NO:330)

[0824] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0825] 4A-419 (无C末端K的hIgG1重链P331S) (SEQ ID NO:331)

[0826] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0827] 4A-419 (huIgG1重链N325S/L328F) (SEQ ID NO:332)

[0828] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0829] 4A-419 (无C末端K的hIgG1重链N325S/L328F) (SEQ ID NO:333)

[0830] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0831] 4A-419 (huIgG1重链K322A) (SEQ ID NO:334)

[0832] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0833] 4A-419 (无C末端K的huIgG1重链K322A) (SEQ ID NO:335)

[0834] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQGFKGRFV
FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0835] *****

[0836] 4A-313 (huIgG1重链恒定区) (SEQ ID NO:336)

[0837] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0838] 4A-313 (无C末端K的huIgG1重链恒定区) (SEQ ID NO:337)

[0839] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0840] 4A-313 (hIgG1重链恒定区P331S) (SEQ ID NO:338)

[0841] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0842] 4A-313 (无C末端K的hIgG1重链恒定区P331S) (SEQ ID NO:339)

[0843] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0844] 4A-313 (huIgG1重链恒定区N325S/L328F) (SEQ ID NO:340)

[0845] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0846] 4A-313 (无C末端K的hIgG1重链恒定区N325S/L328F) (SEQ ID NO:341)

[0847] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0848] 4A-313 (huIgG1重链恒定区K322A) (SEQ ID NO:342)

[0849] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0850] 4A-313 (无C末端K的huIgG1重链恒定区K322A) (SEQ ID NO:343)

[0851] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0852] *****

- [0853] Human IgG1轻链恒定区 (SEQ ID NO:344)
- [0854] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0855] *****
- [0856] 4A-313 (huIgG1重链) (SEQ ID NO:355)
- [0857] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0858] 4A-313 (无C末端K的huIgG1重链) (SEQ ID NO:356)
- [0859] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0860] 4A-313 (hIgG1重链P331S) (SEQ ID NO:357)
- [0861] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0862] 4A-313 (无C末端K的hIgG1重链P331S) (SEQ ID NO:358)
- [0863] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- [0864] 4A-313 (huIgG1重链N325S/L328F) (SEQ ID NO:359)
- [0865] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0866] 4A-313(无C末端K的hIgG1重链N325S/L328F)(SEQ ID NO:360)

[0867] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYWMQWVRQAPGGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKAFPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0868] 4A-313(huIgG1重链K322A)(SEQ ID NO:361)

[0869] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYWMQWVRQAPGGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0870] 4A-313(无C末端K的huIgG1重链K322A)(SEQ ID NO:362)

[0871] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYWMQWVRQAPGGLEWMGATHPGHGDTRYAQKFQGRVT
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0872] *****

[0873] 4A-450-全长轻链(SEQ ID NO:363)

[0874] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCWQGIDFHQTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0875] 4A-419-全长轻链(SEQ ID NO:364)

[0876] DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCWQGIDFHQTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0877] 4A-313-全长轻链(SEQ ID NO:365)

[0878] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASEVDNYGVS RMN WYQQKPGQAPRLLIYGASNQSGIPARFSGS
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSKEVPPTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

MHQYSRHCRPEESTFSAAMTTMQGMEQAMPGAGPGVPQLGNMAVIHSHLWKGLQEKFLKGEP
KVLGVVQILTALMSLSMGITMMCMA^SNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIISGSL^SIAAGIRTTKG
LVRGSLGMNITSSVLAASGILINTFSLAFY^SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMSILMGLDGMVLLL
SVLEFCIAV^SLSAFGCKVLCCTPGGVVLLPSSHMAETASPTPLNEV

图1



图2A

1P68 (SEQ ID NO:181)

MYGKLN^DLLEDLQEV^LKNLHKN^NWHGGK^DNLHDVDNHLQNVIEDIHDFMQGGGSGGKLOE
MMKEFQOVLDELNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR

图2B

1M6T (SEQ ID NO:182)

ADLEDN^WETLNDNLK^VIEKADN^AAQVKDALTKMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDSP^EEMKD
FRHGF^DILVGOIDDALKLANEGKVKEAQAAA^EOLK^TTRNAYIQKYL

图2C

JS1 (SEQ ID NO:172)

MGWSCILFLVATATGVHSMYGKLNLDLEDLQEV LKNLHKNCMASNTYGSNPISKDNLHD
VDNHLQNVIEDIHDFMQGGGSGGKLQEMMKEFQQVLDLNNHSFHHPYCNYYGNSNCH
GTMSHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHRHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

JS5 (SEQ ID NO:173)

MGWSCILFLVATATGVHVSADLEDNWETLNDNLKVIECMASNTYGSNPISAAQVKDALTKM
RAAALDAQKATPPKLEDKSPDPEMKDFRHGFDILVGQIDDALKLANSFHHPYCNYYGNSN
NCHGTMSVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQKYLHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

JS6 (SEQ ID NO:174)

MGWSCILFLVATATGVHVSADLEDNWETLNDNLKVIEGPCMASNTYGSNPISAAQVKDALTKM
RRAAALDAQKATPPKLEDKSPDPEMKDFRHGFDILVGQIDDALKLANSFHHPYCNYYG
NSNCHGTMSVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQKYLHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

图3A

JS4 (SEQ ID NO:175)

MGWSCILFLVATATGVHSMYGKLNLDLEDLQEV LKNLHKNWHGGKDNLHDVDNHLQNV
EDIHDFMQGGGSGGKLQEMMKEFQQVLDLNNHLQGGKHTVHHIEQNIKEIFHHLEELVHR
HHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

JS10 (SEQ ID NO:176)

MGWSCILFLVATATGVHVSADLEDNWETLNDNLKVIEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQ
KATPPKLEDKSPDPEMKDFRHGFDILVGQIDDALKLANEGKVKEAQAAAEQLKTTRNAYIQ
KYLHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

图3B

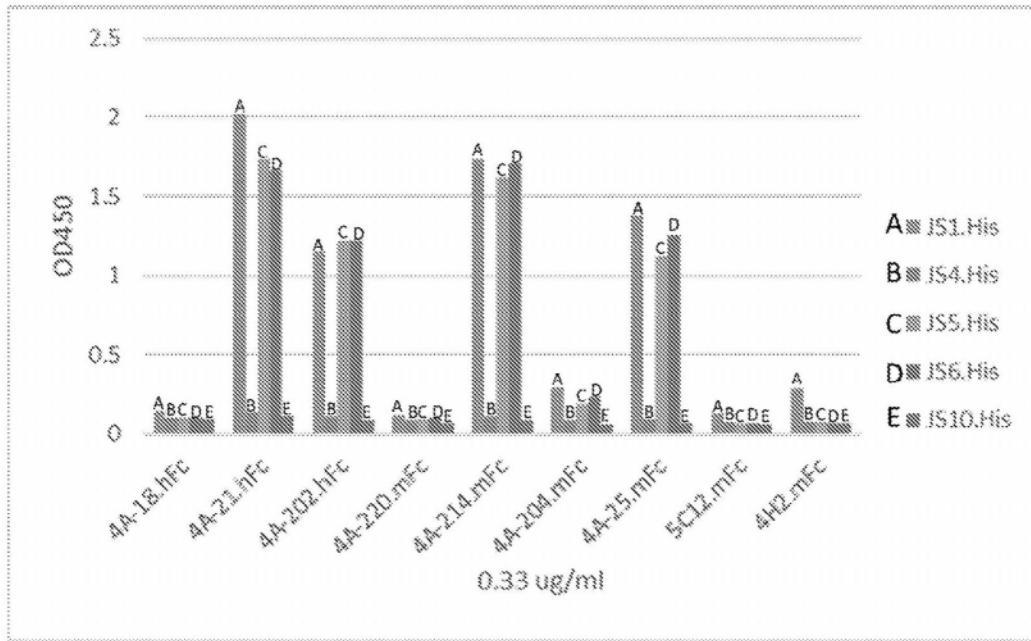


图4

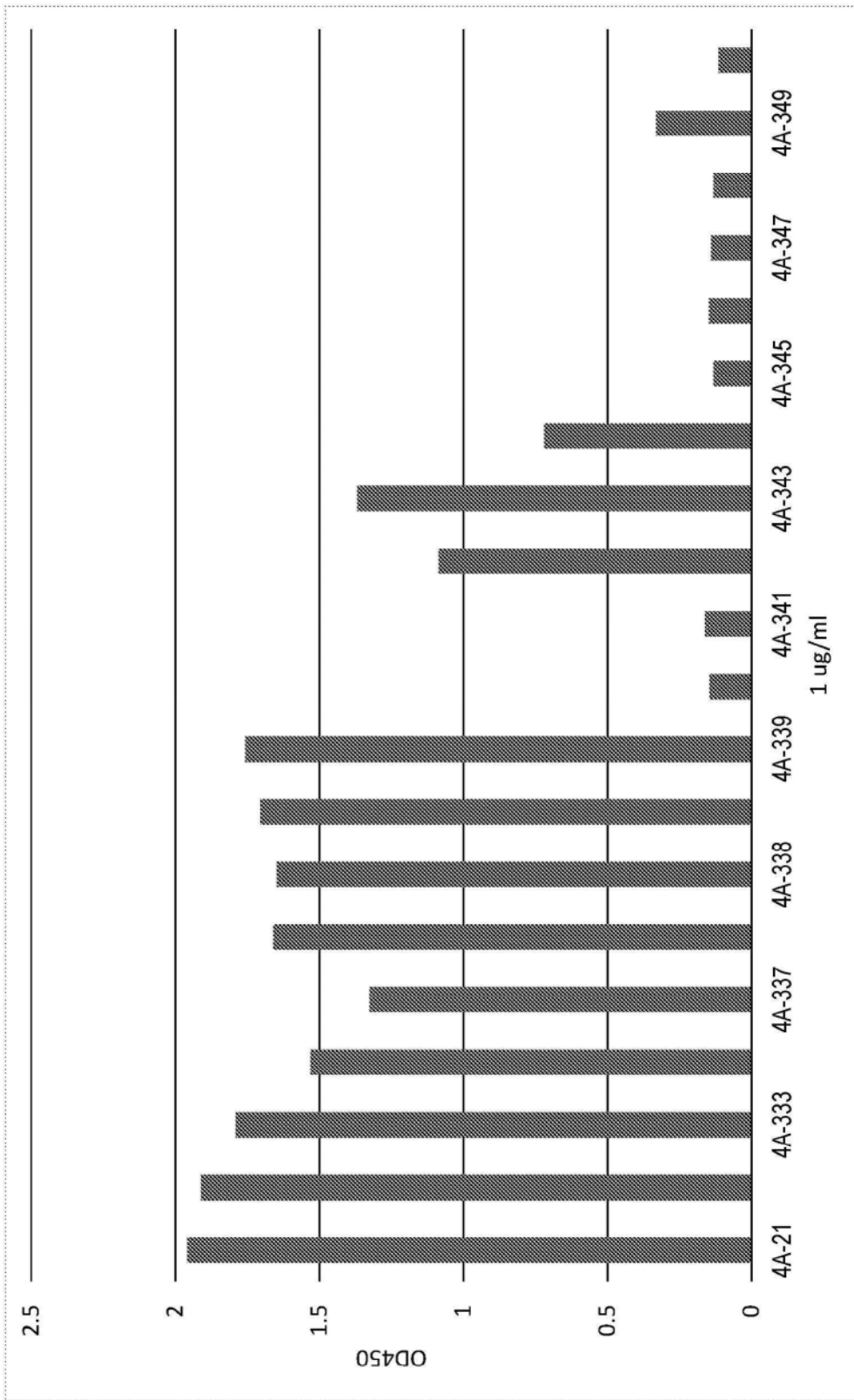


图5

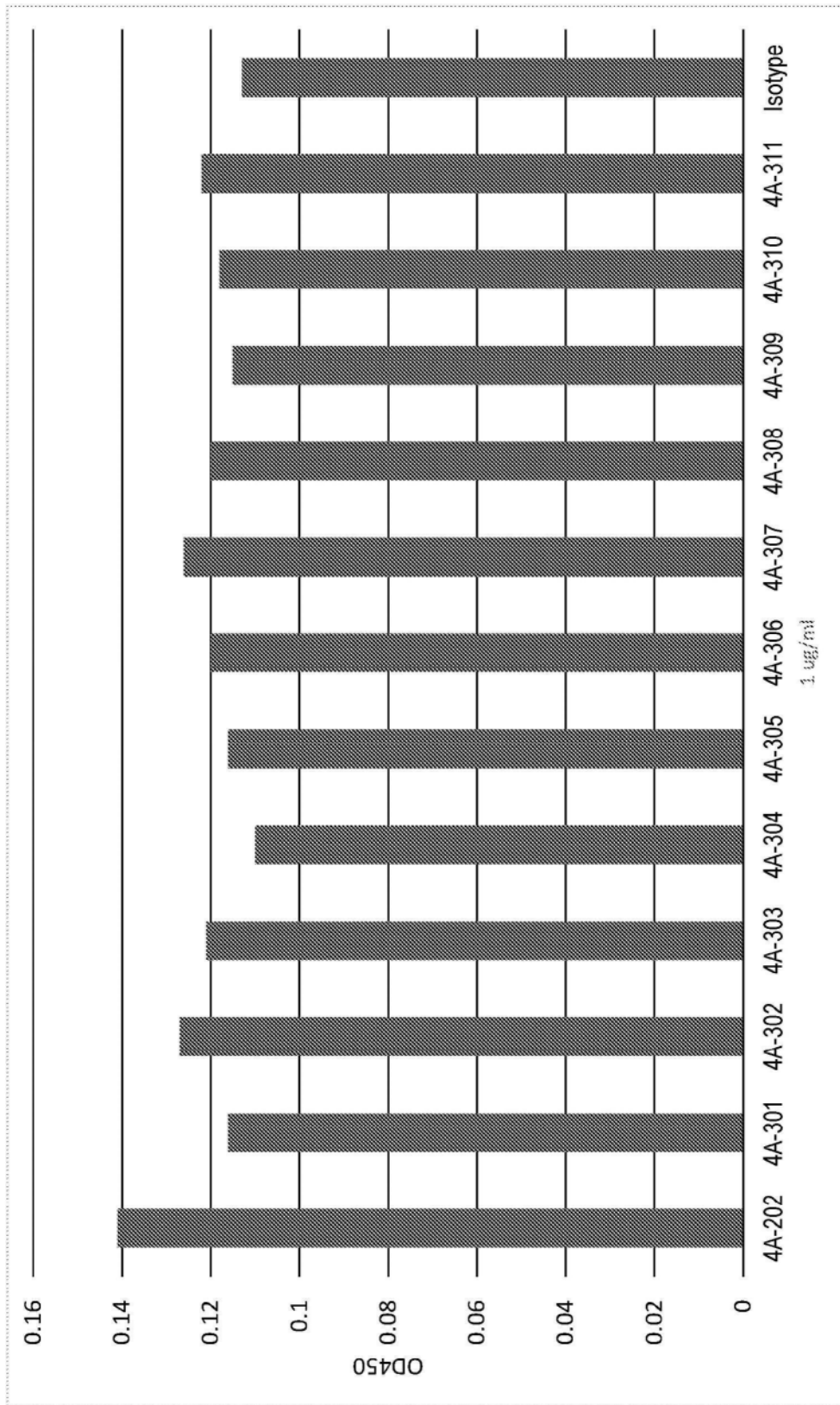


图6

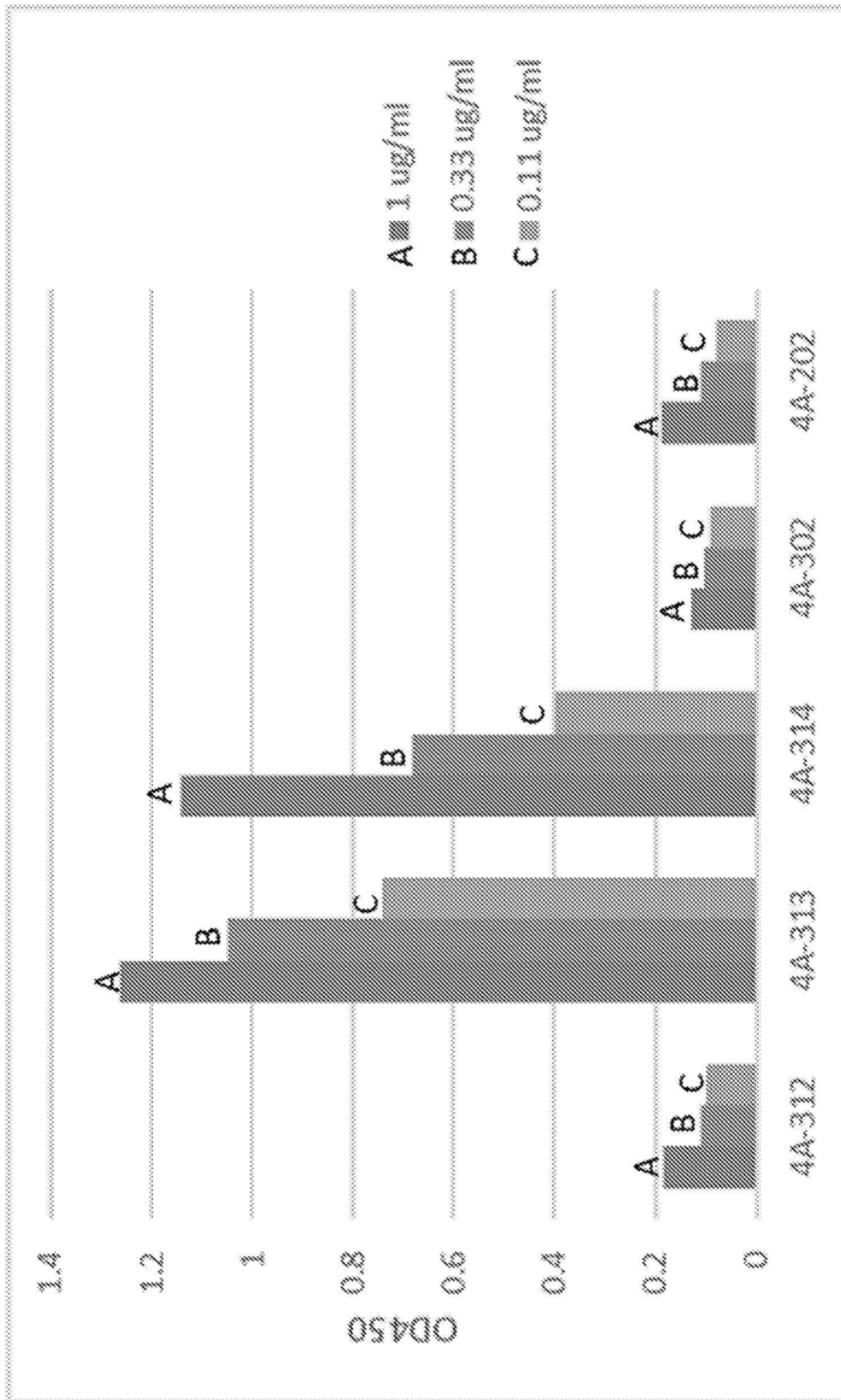


图7

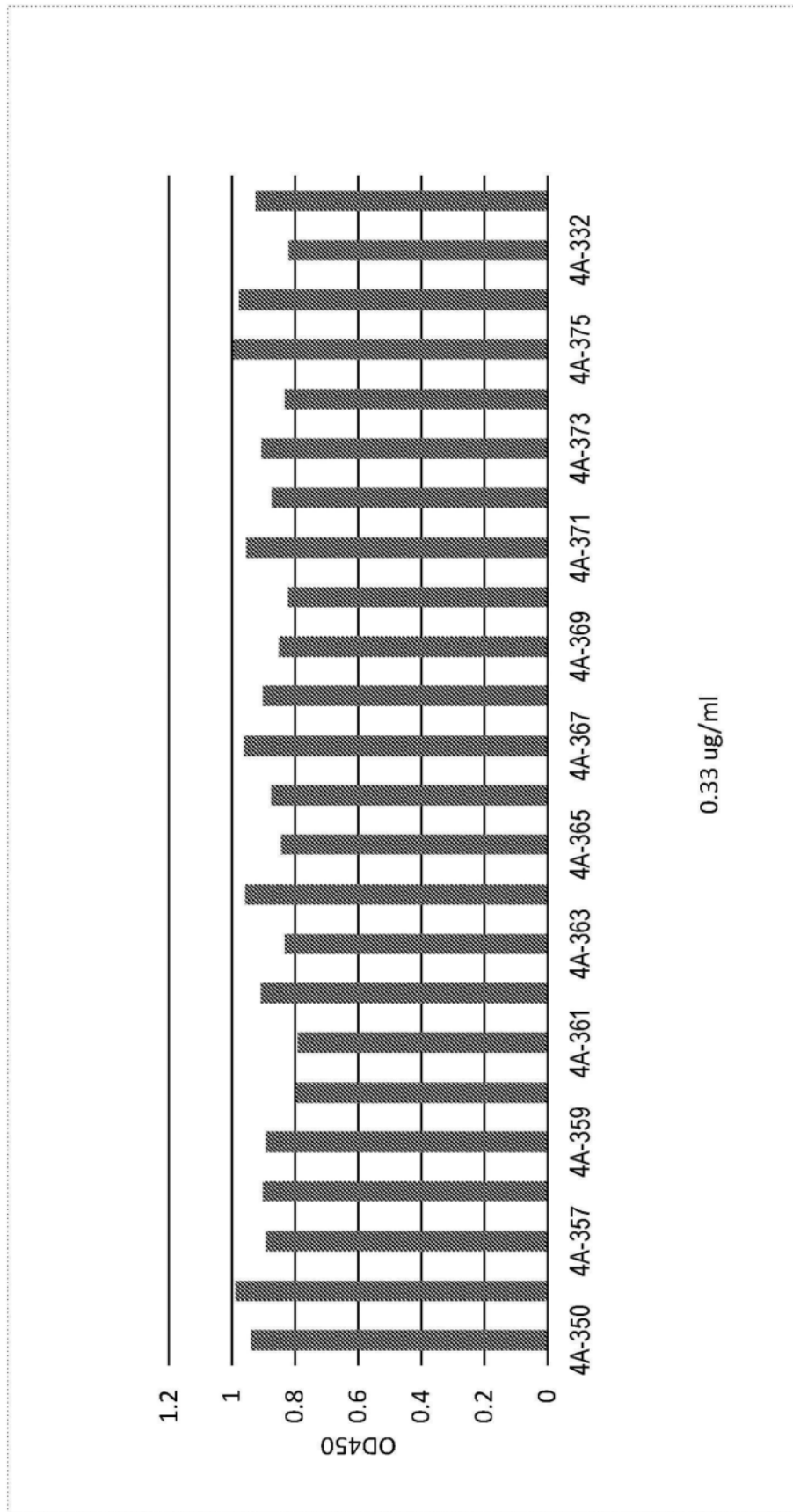


图8

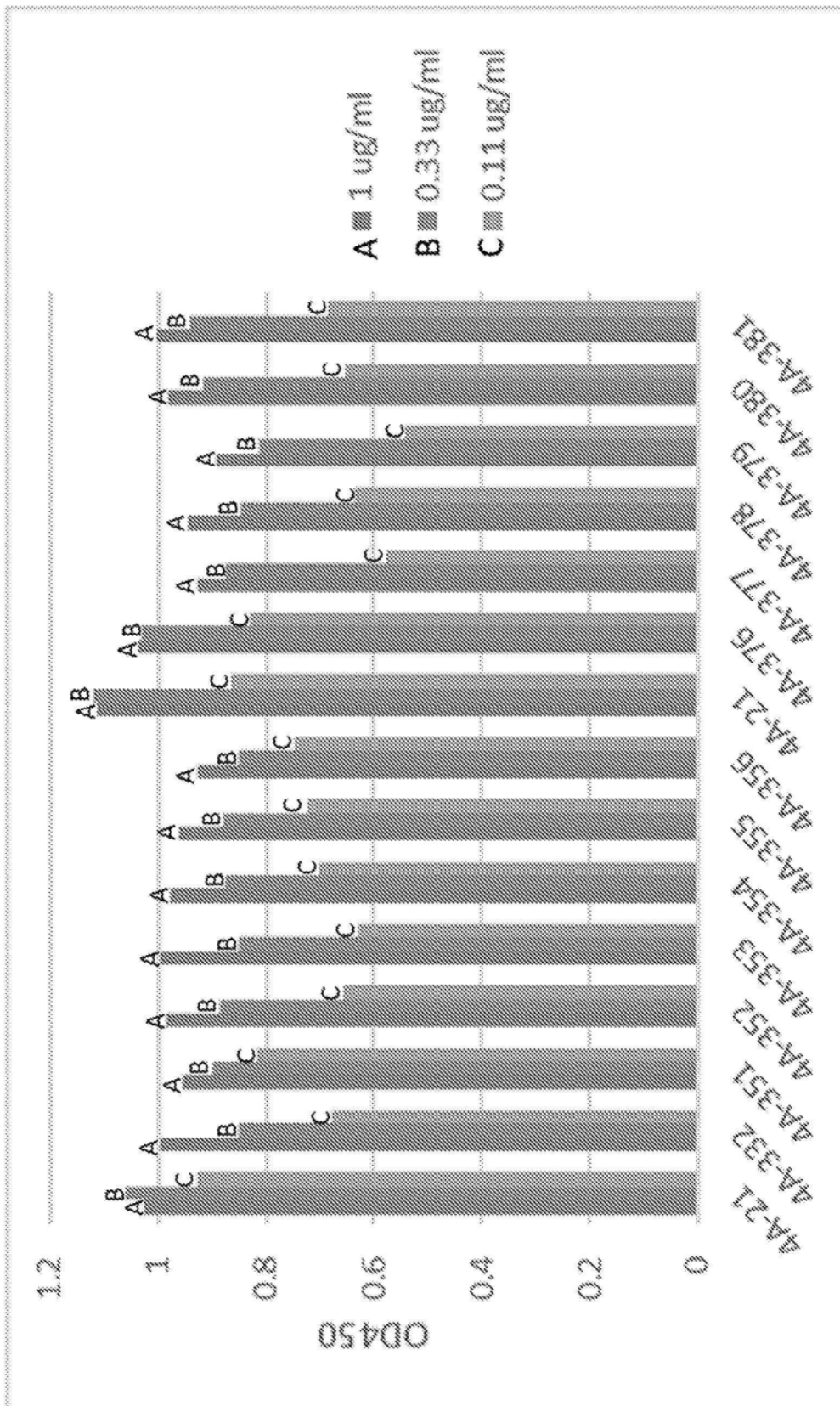


图9

食蟹猴血清sTREM2水平

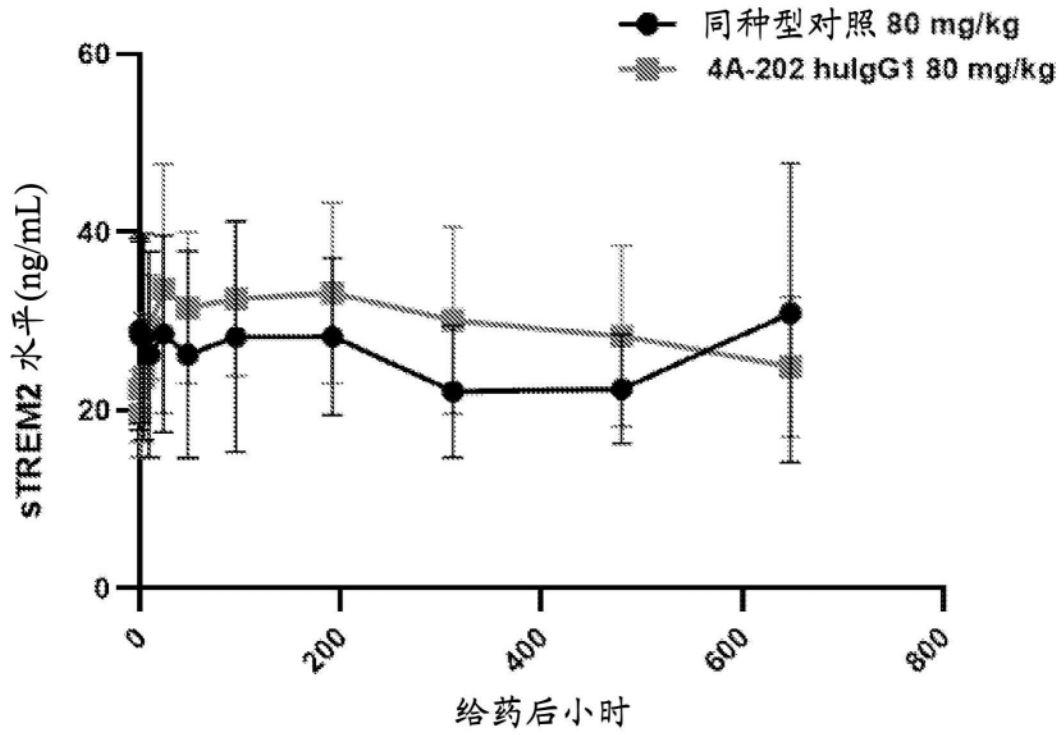


图10A

归一化的食蟹猴血清
sTREM2水平(基线的%)

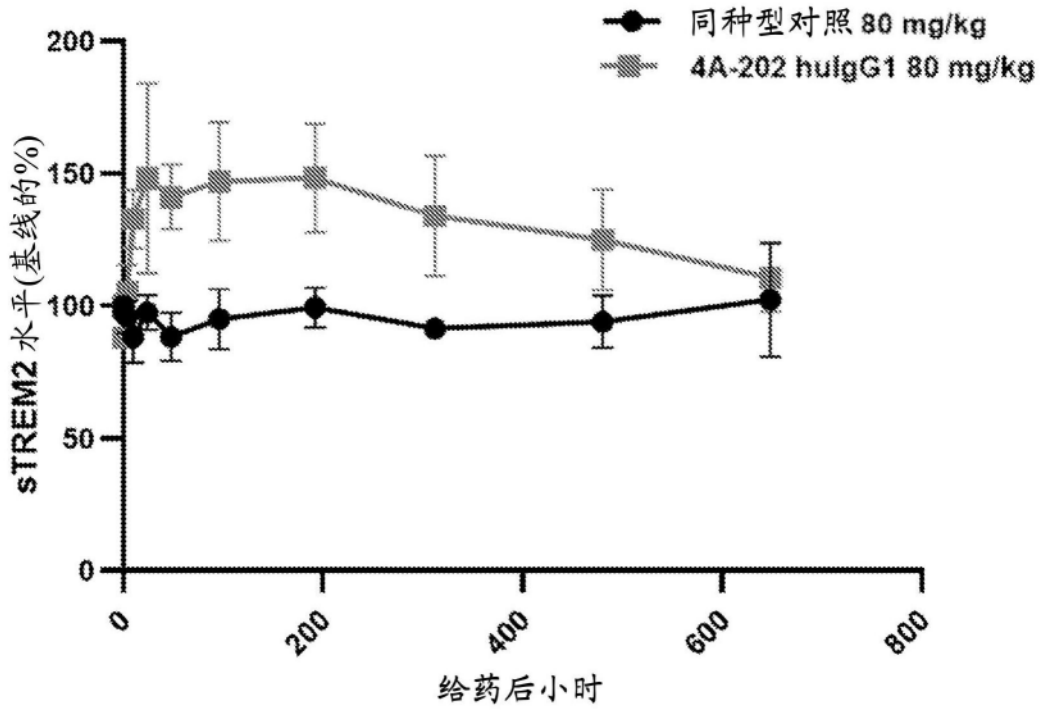


图10B

食蟹猴CSF sTREM2水平

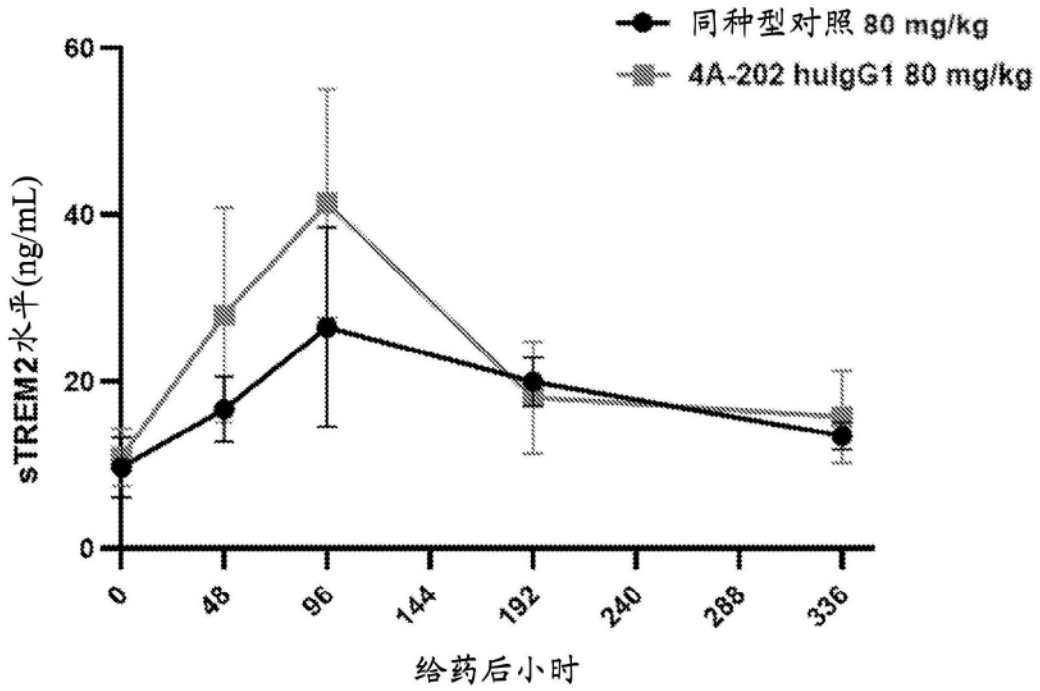


图11A

归一化的食蟹猴
CSF sTREM2水平(基线的%)

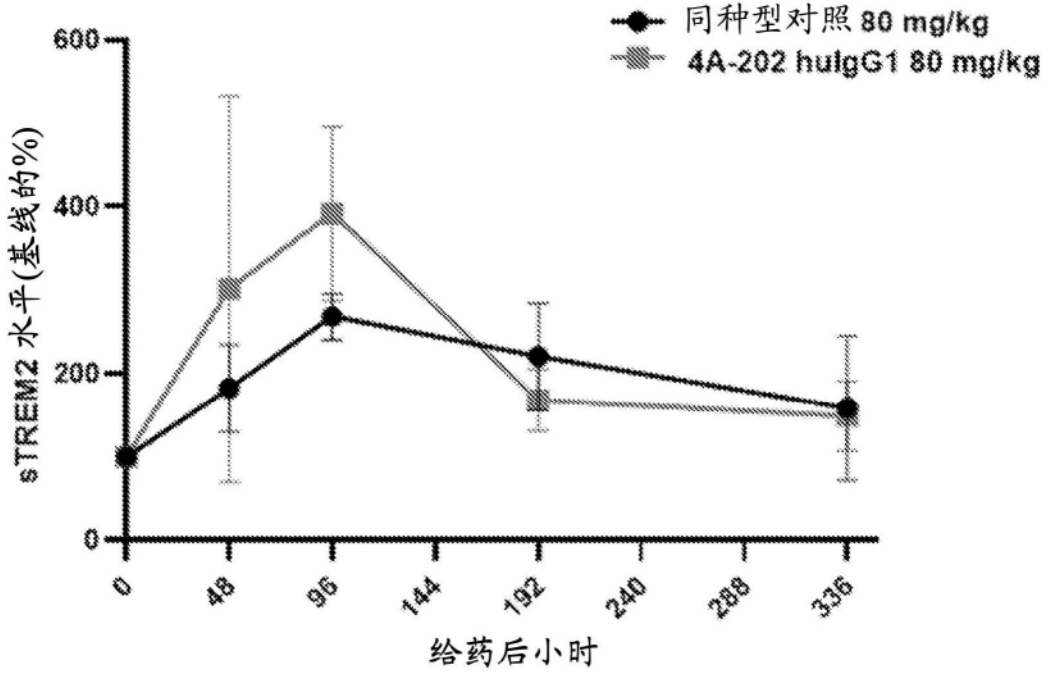


图11B

与MS4A4A的结合

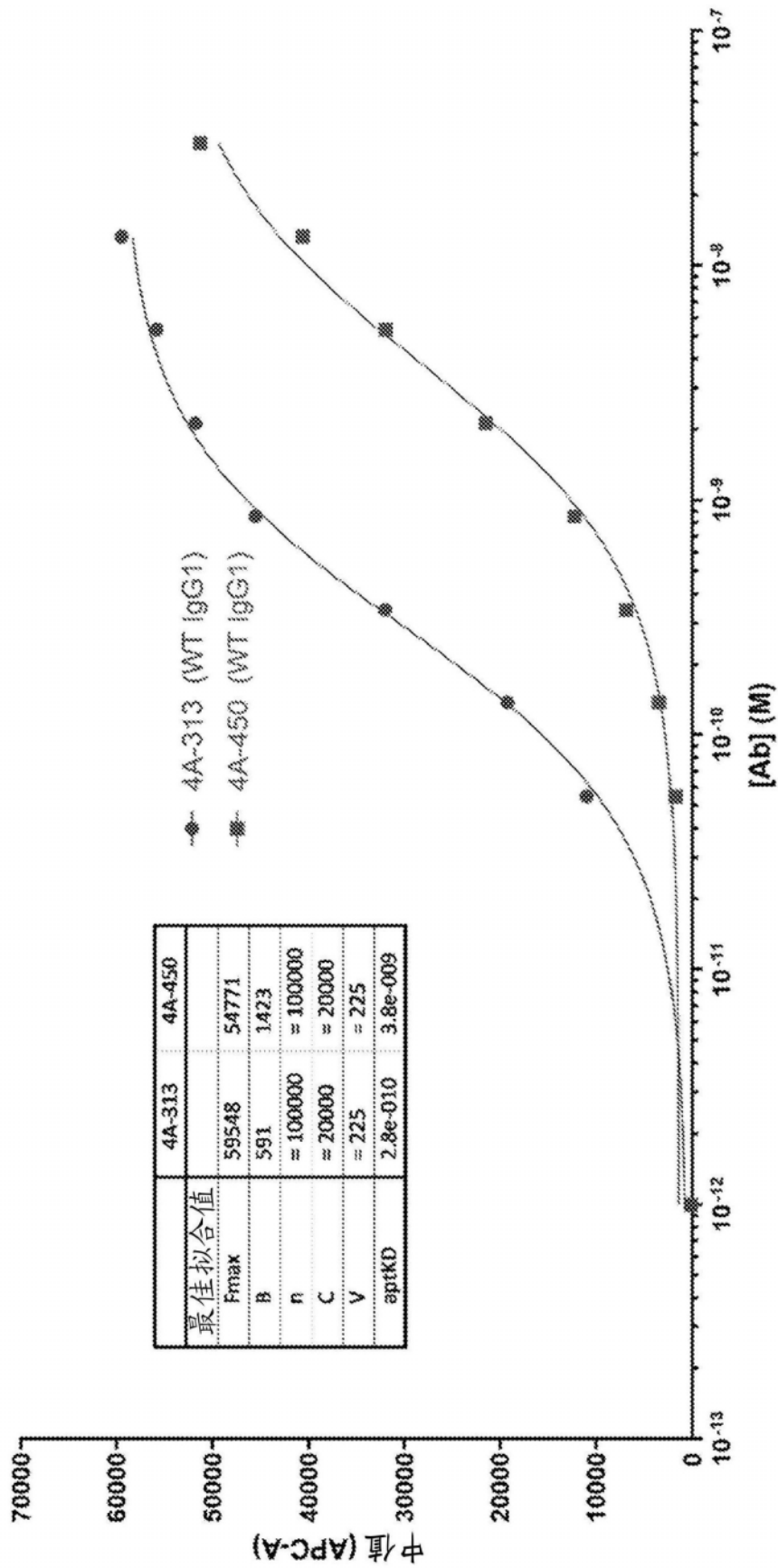


图12

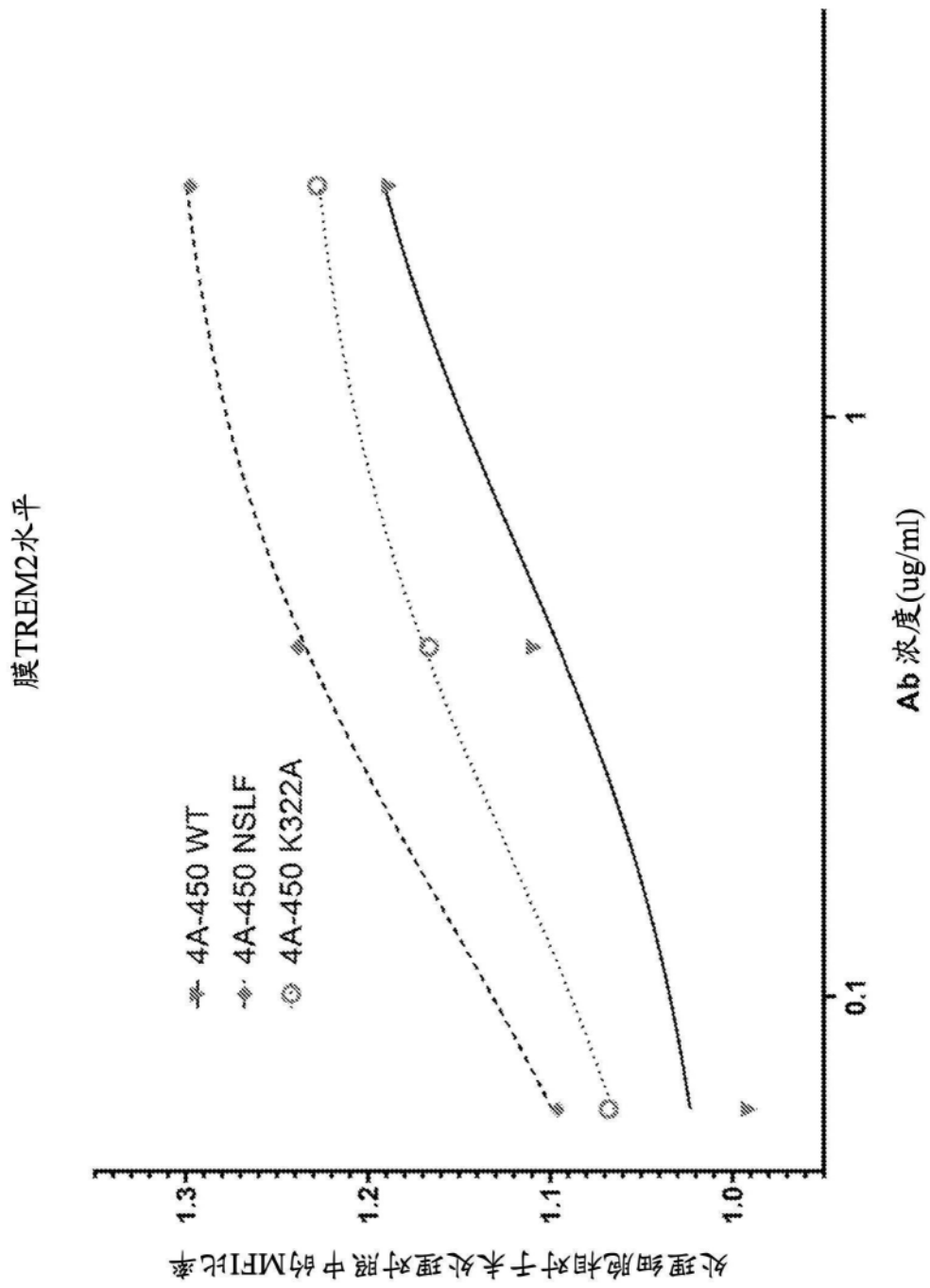


图13

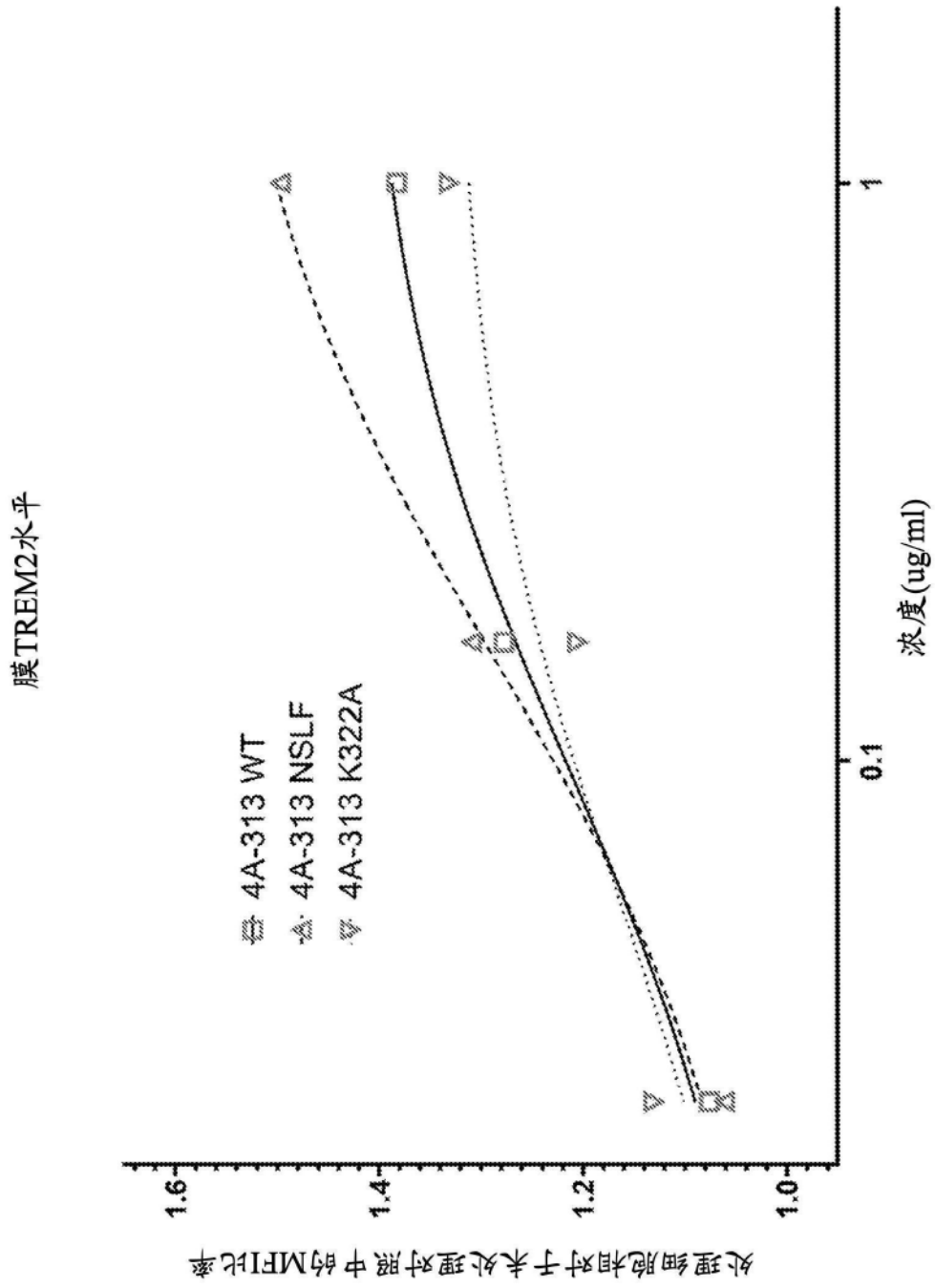


图14

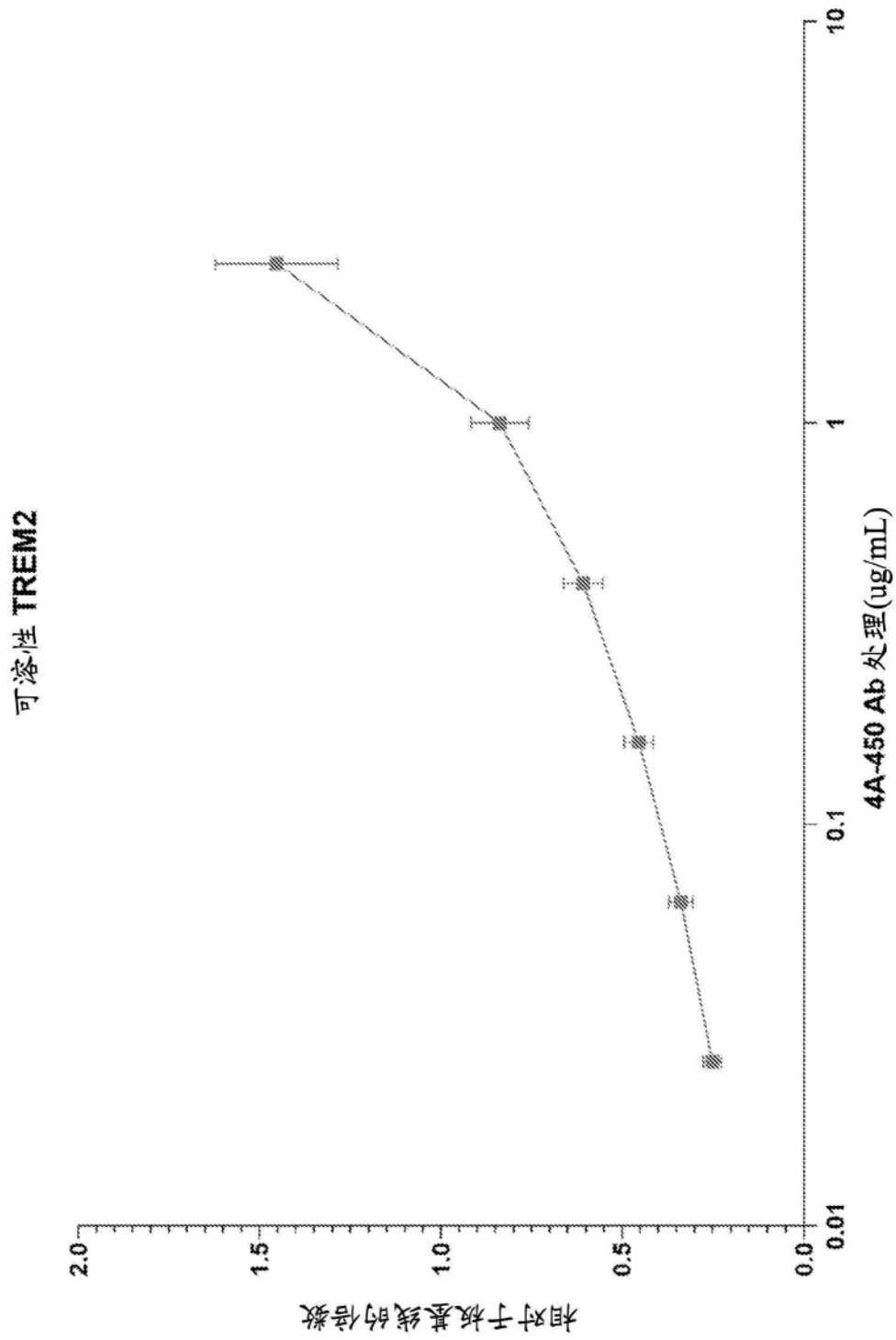


图15

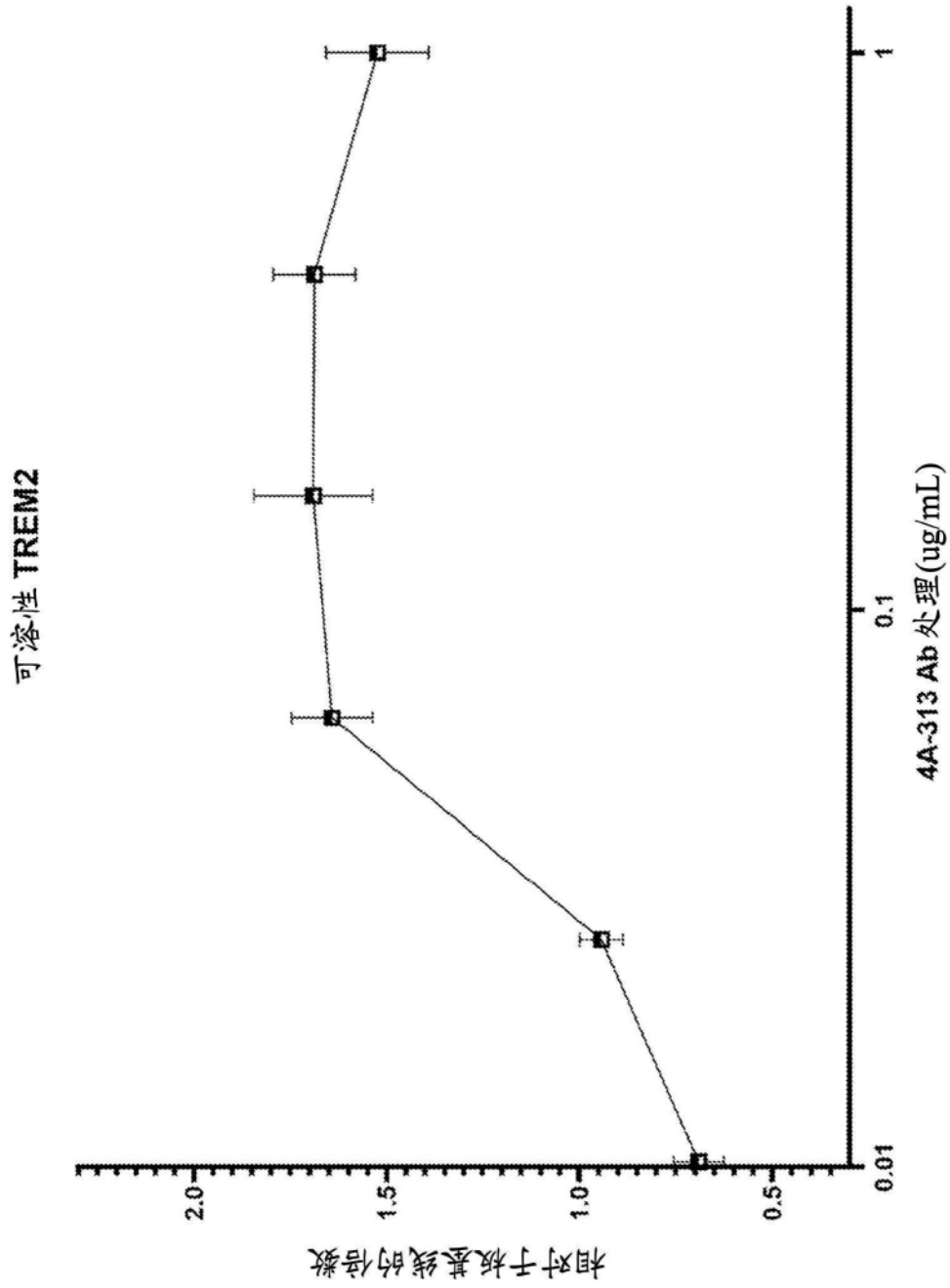


图16

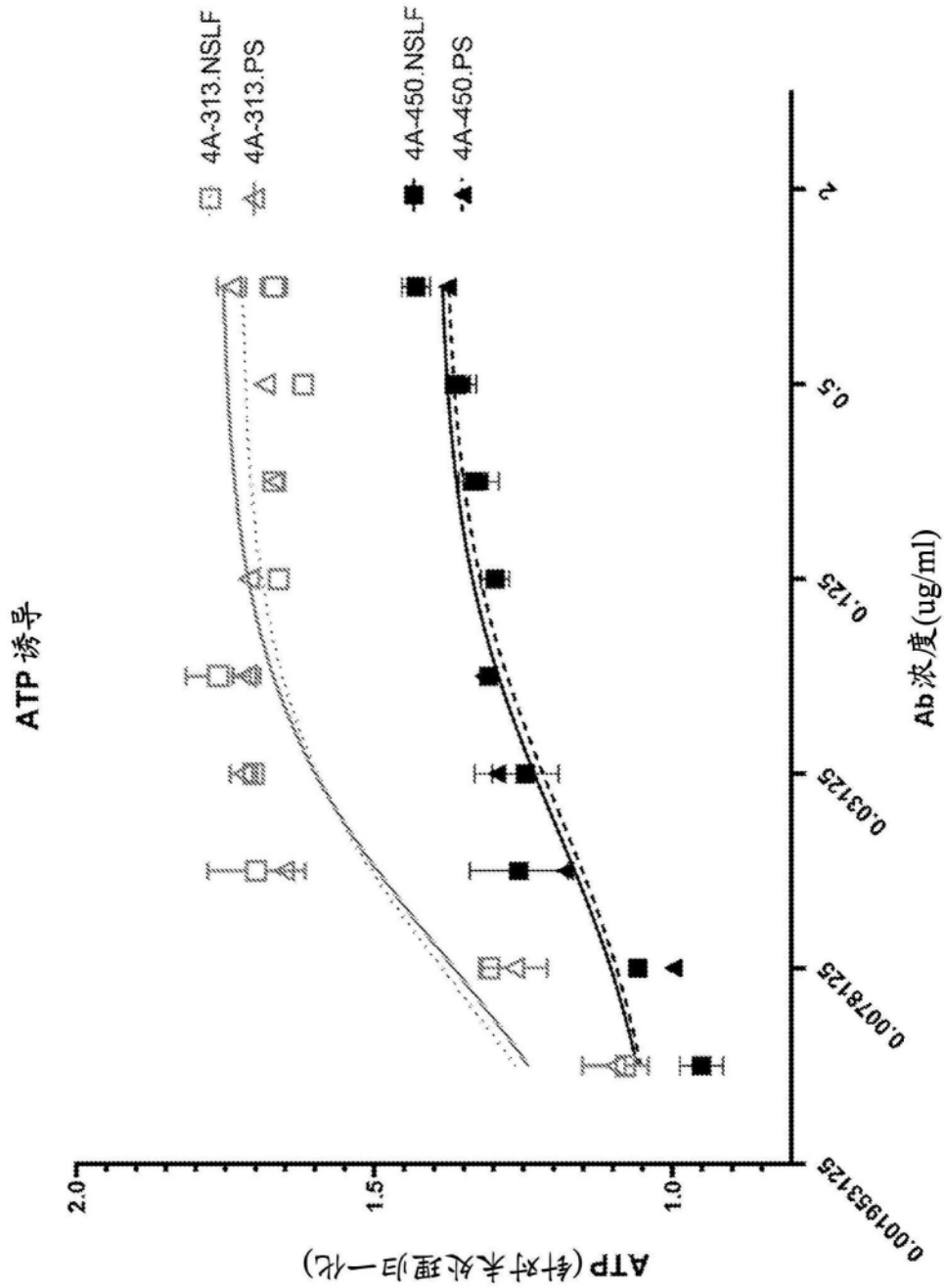


图17

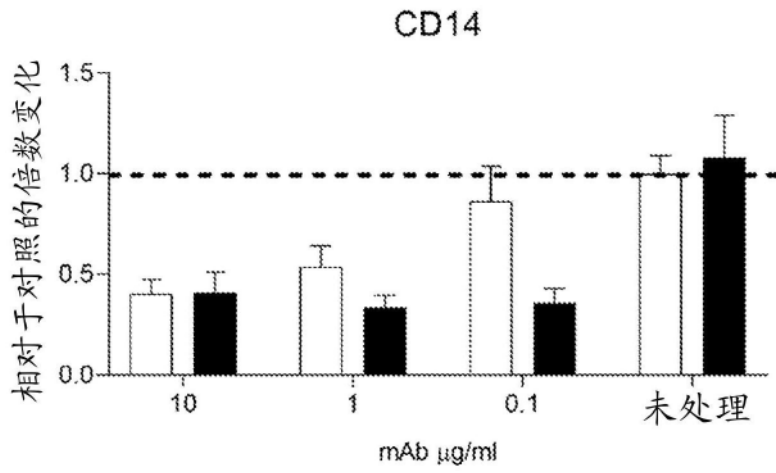


图18A

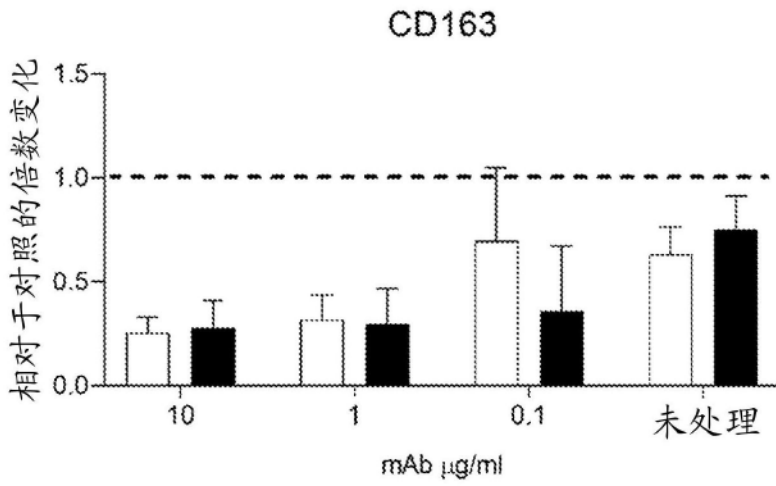


图18B

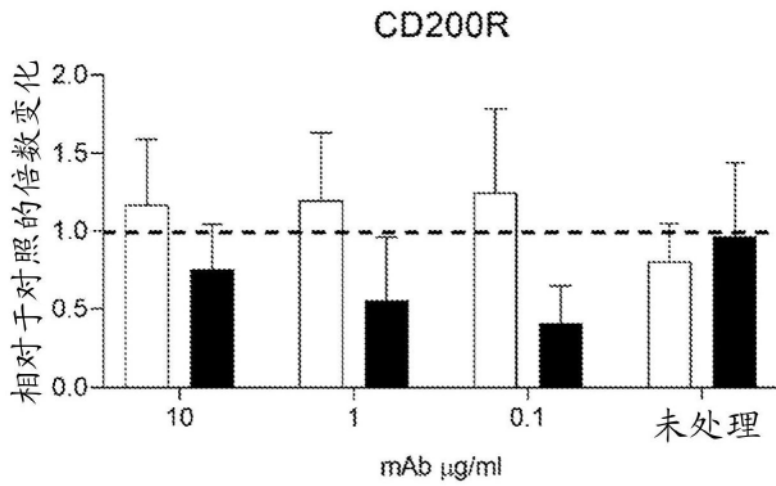


图18C

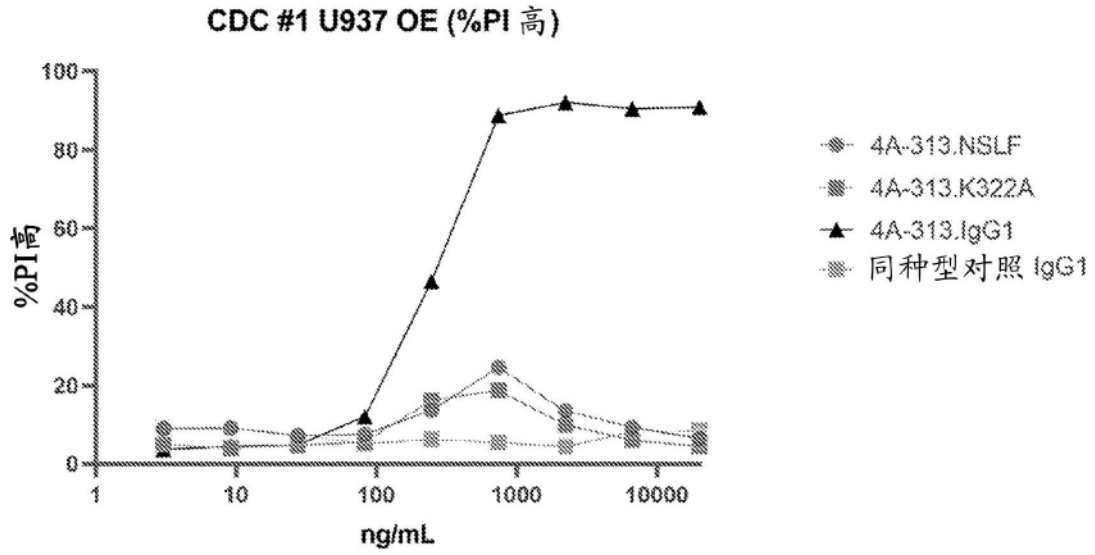


图19

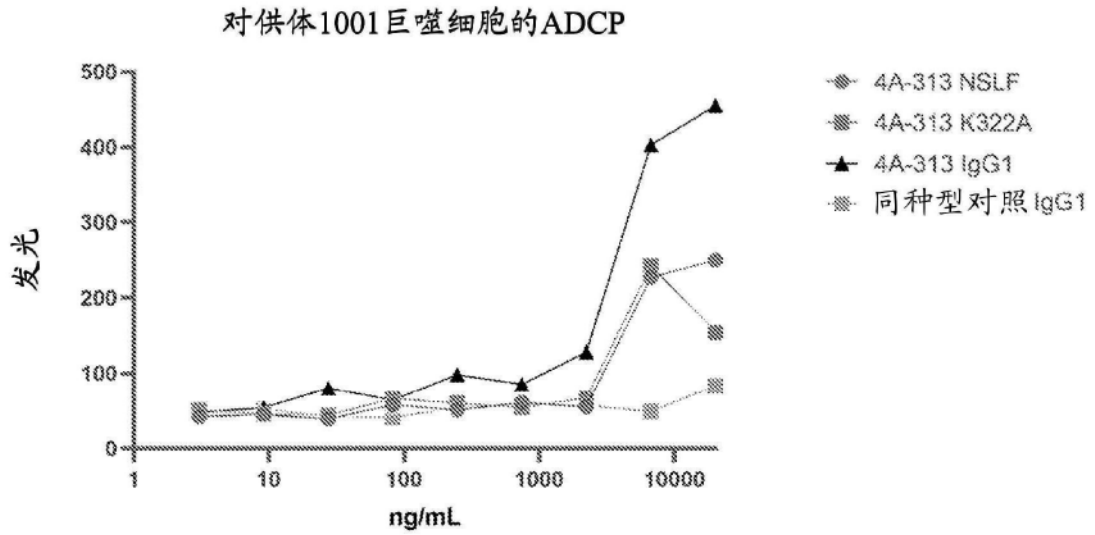


图20

对供体1001巨噬细胞的ADCC

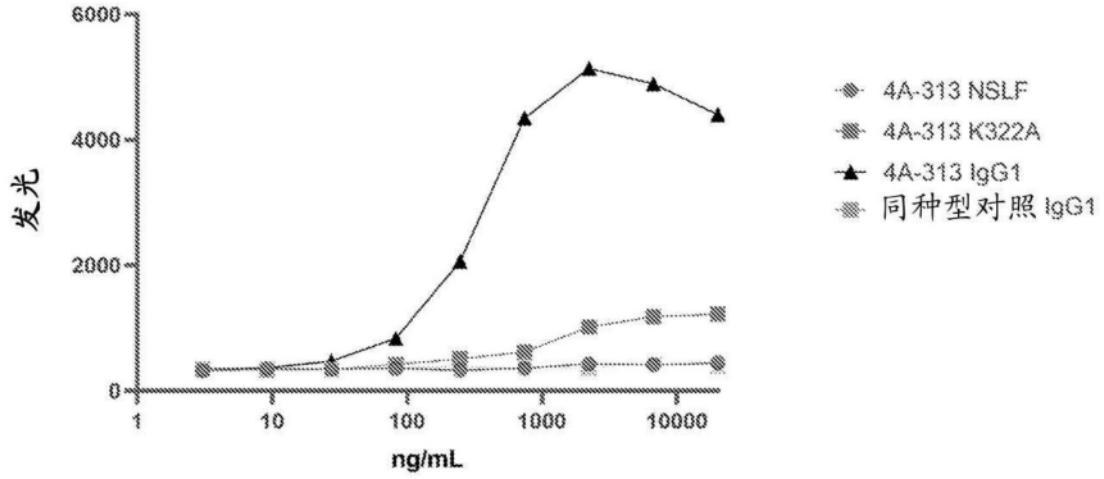


图21

mTREM2

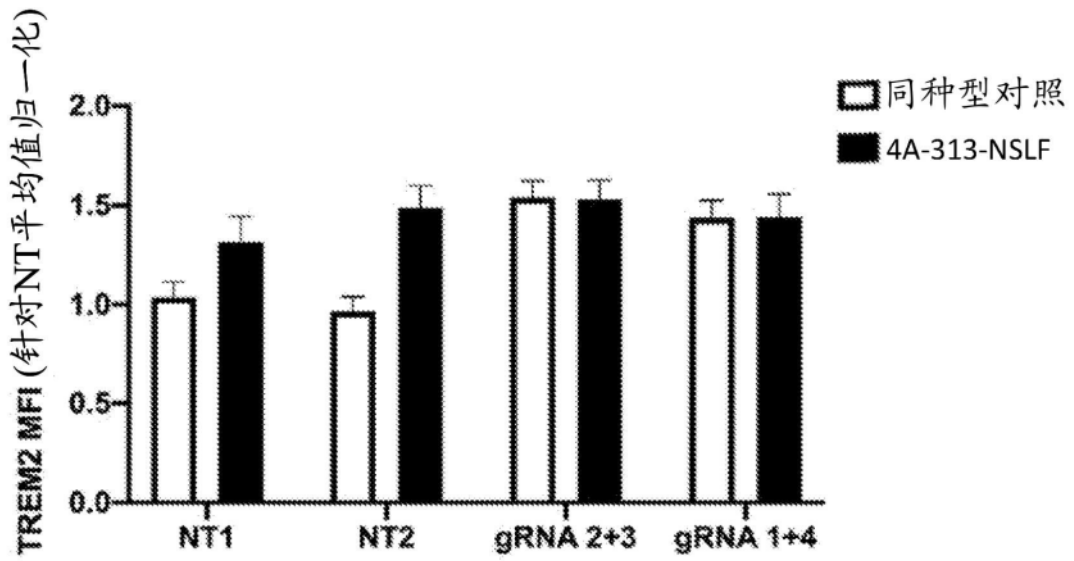


图22A

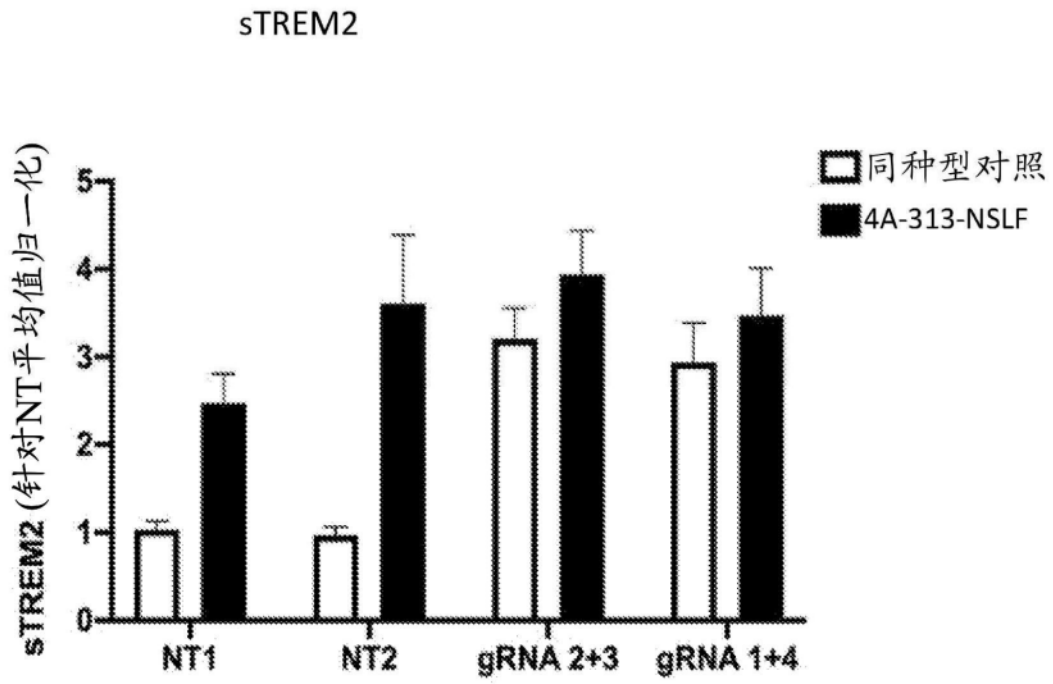


图22B

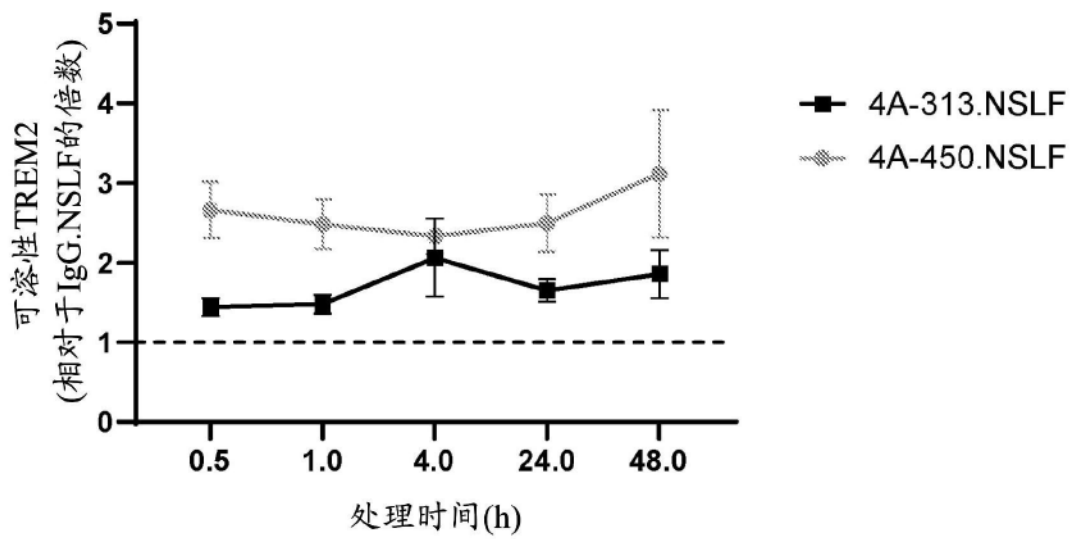


图23A

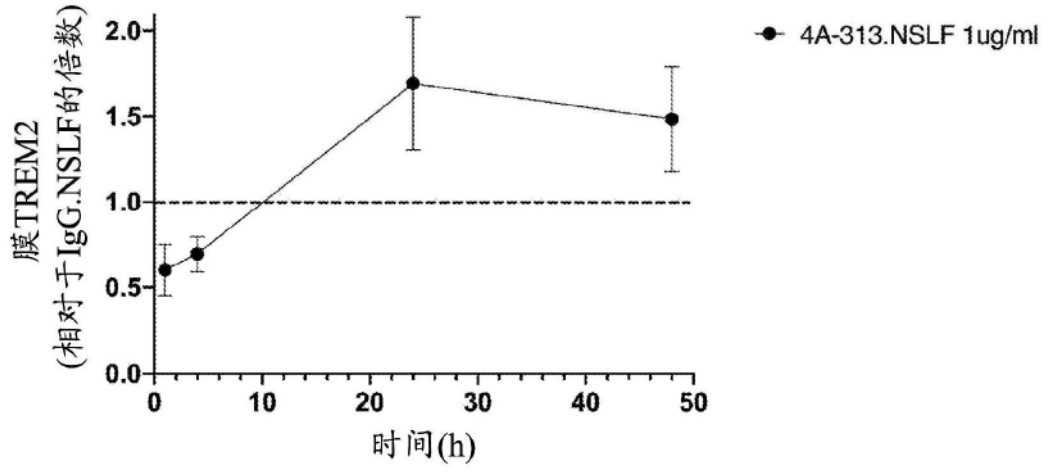


图23B

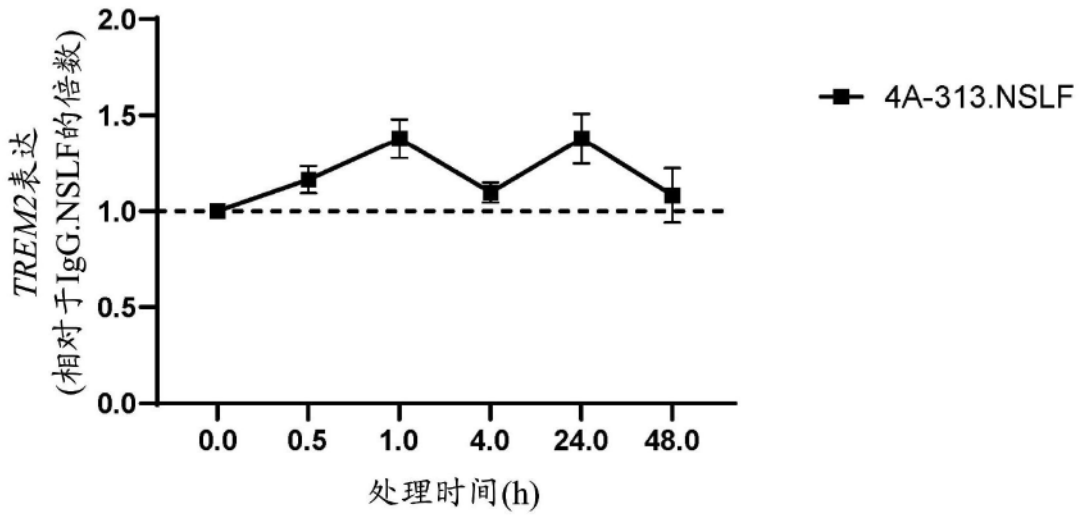


图23C

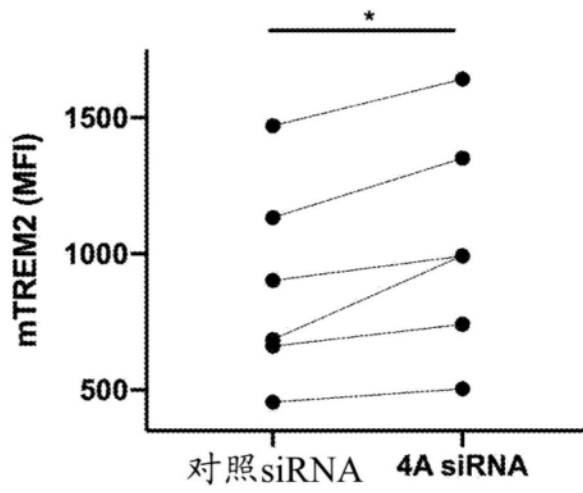


图24A

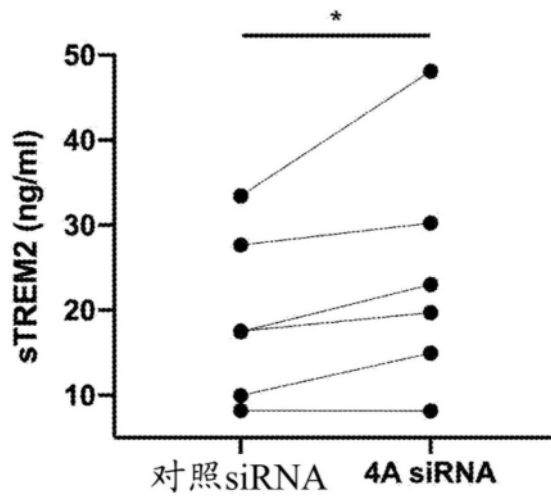


图24B

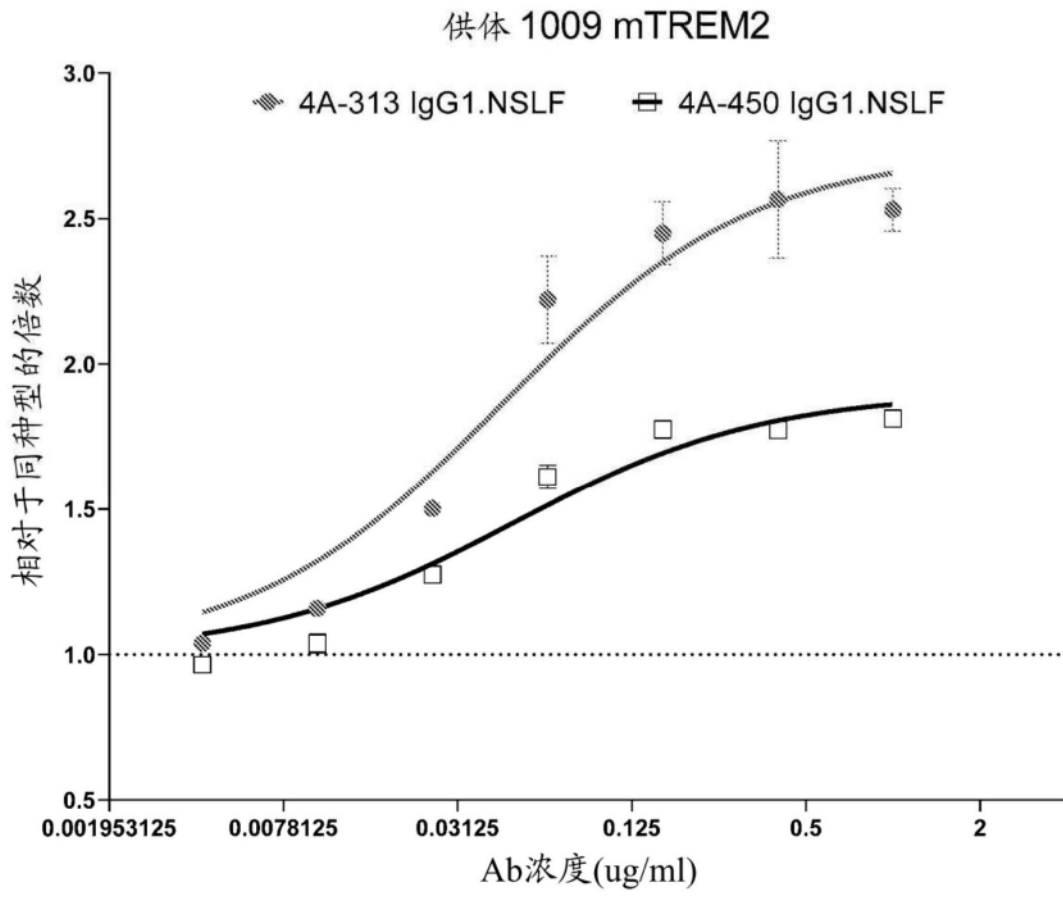


图25A

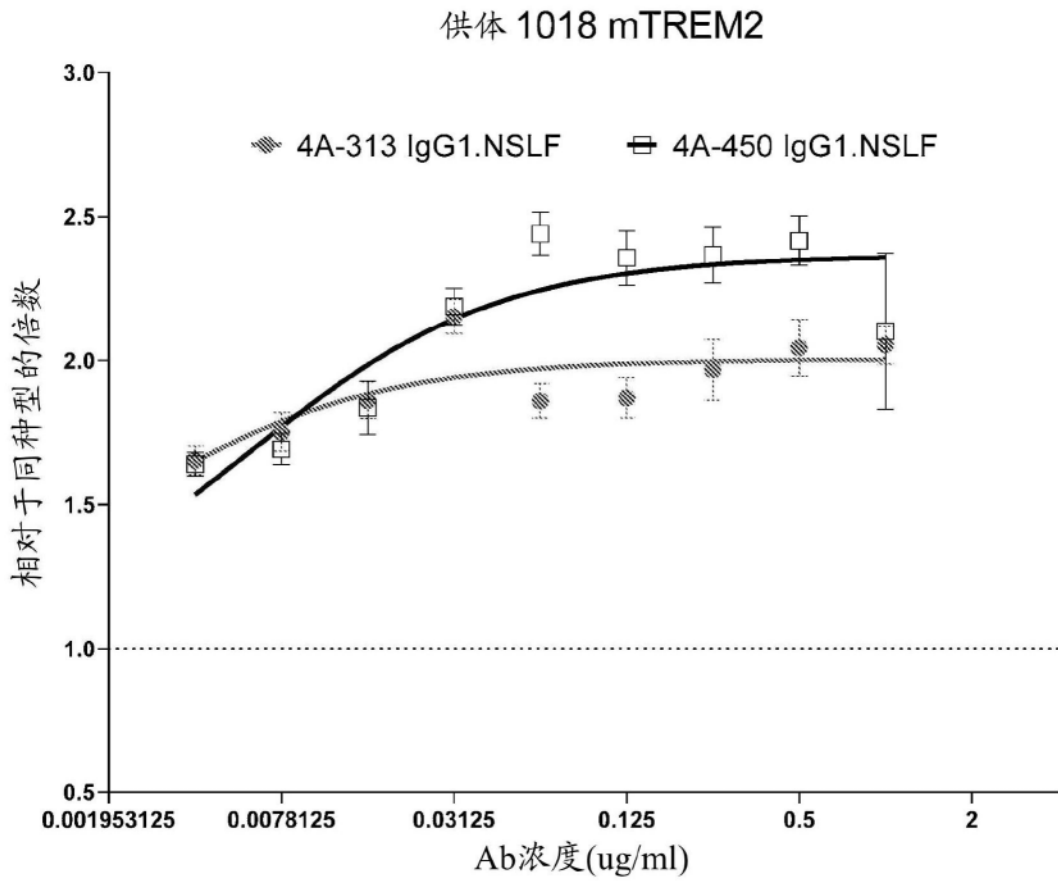


图25B

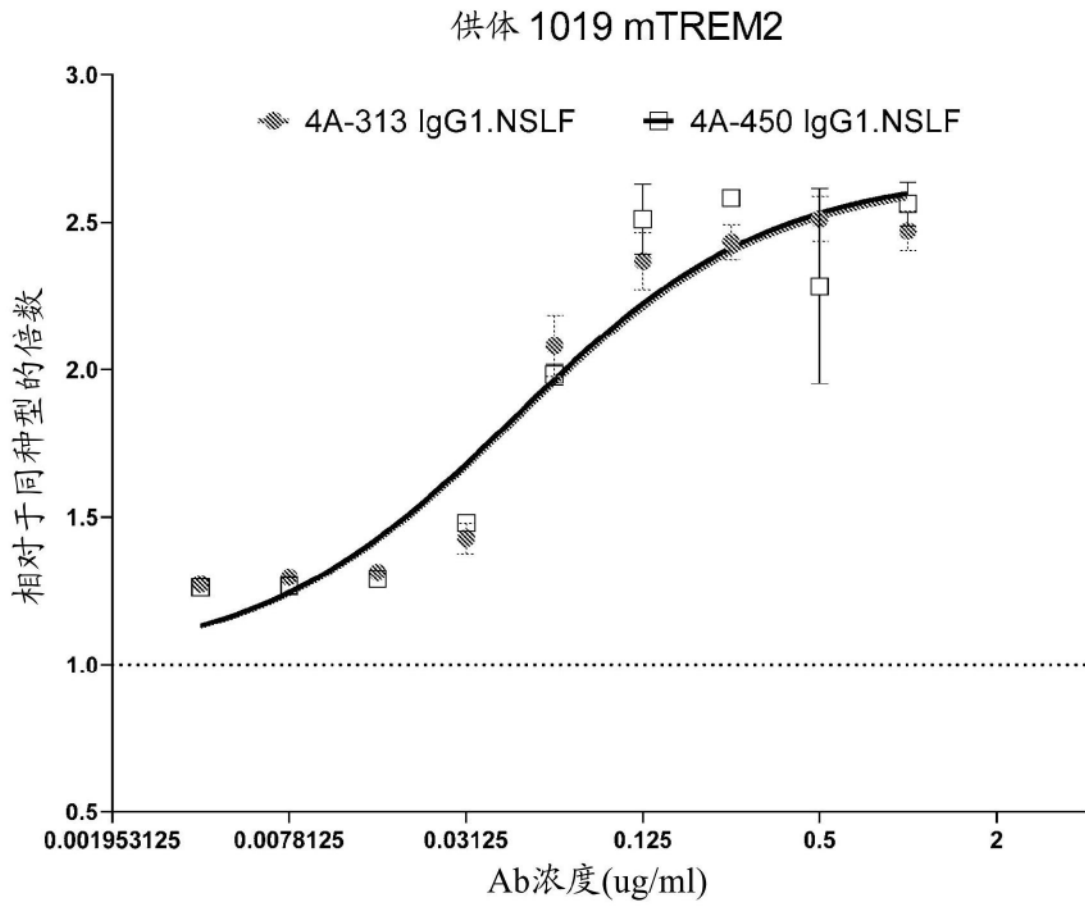


图25C

供体 1009 sTREM2

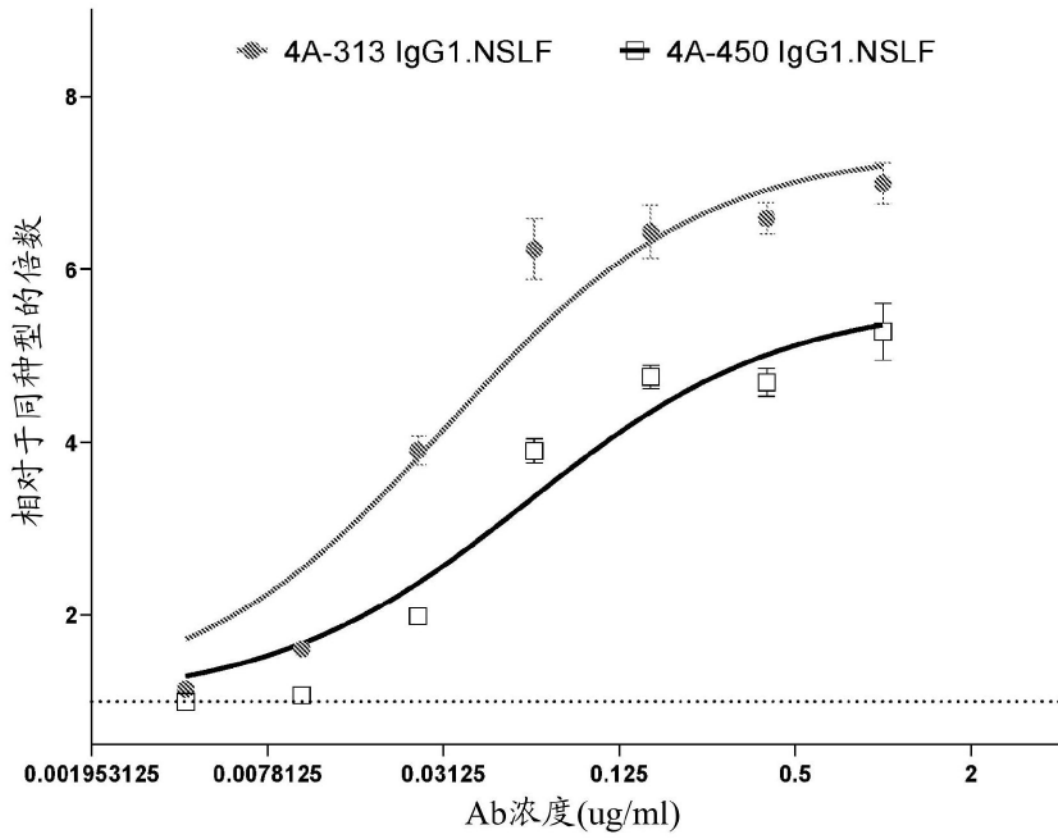


图26A

供体 1018 sTREM2

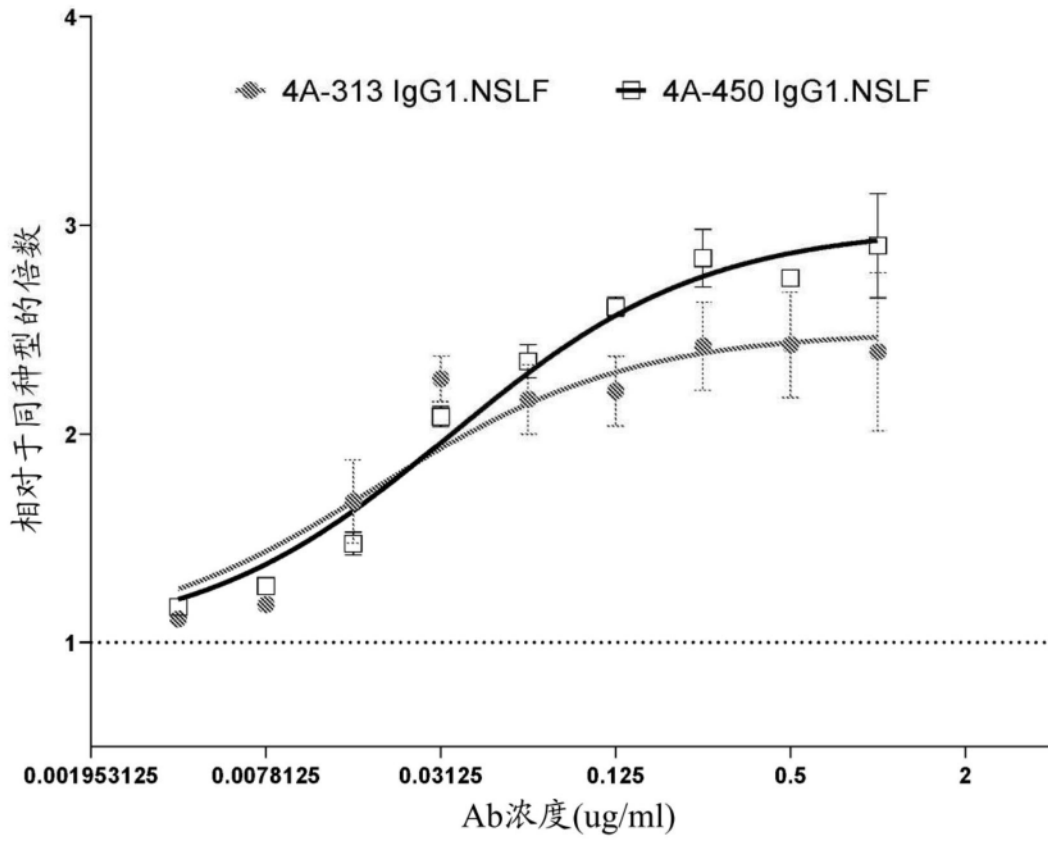


图26B

供体 1019 sTREM2

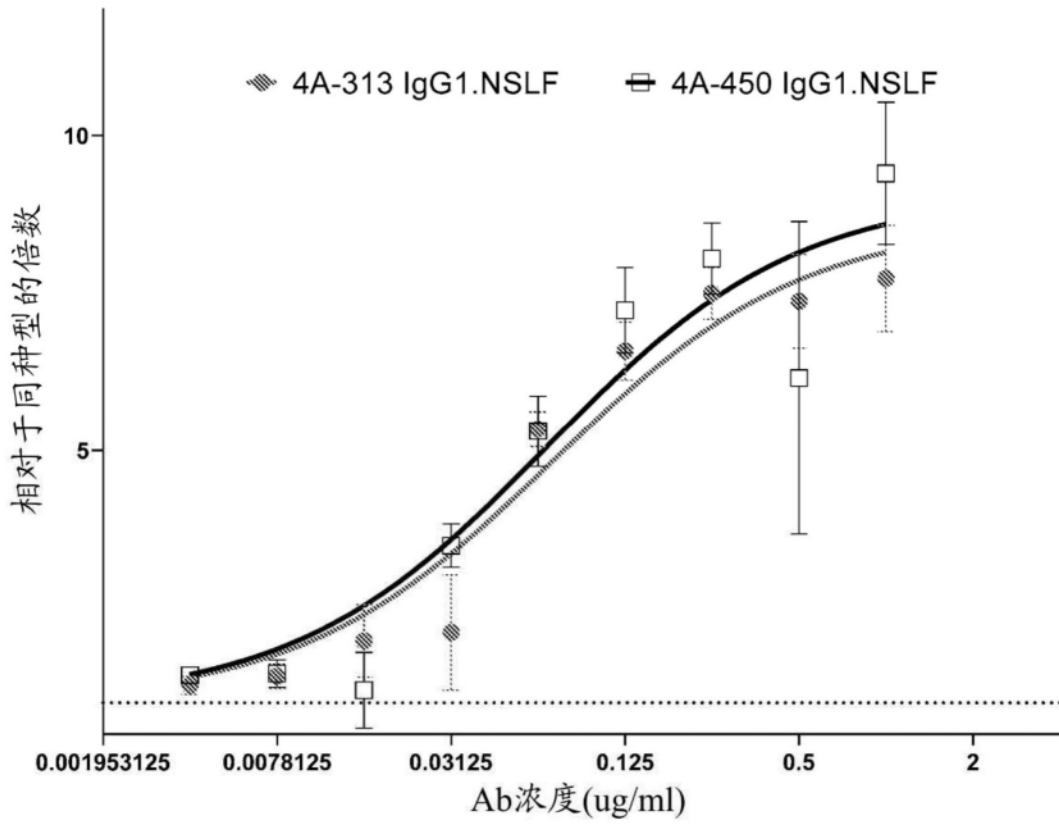


图26C

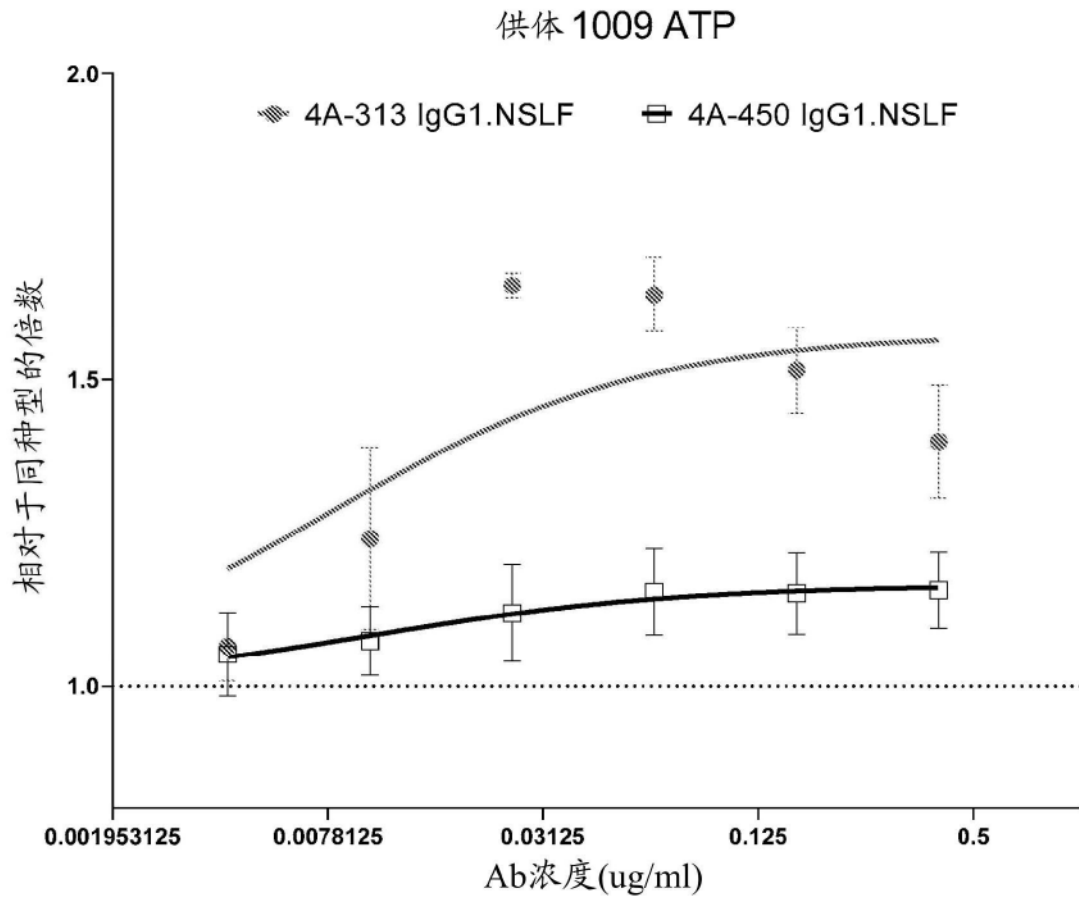


图27A

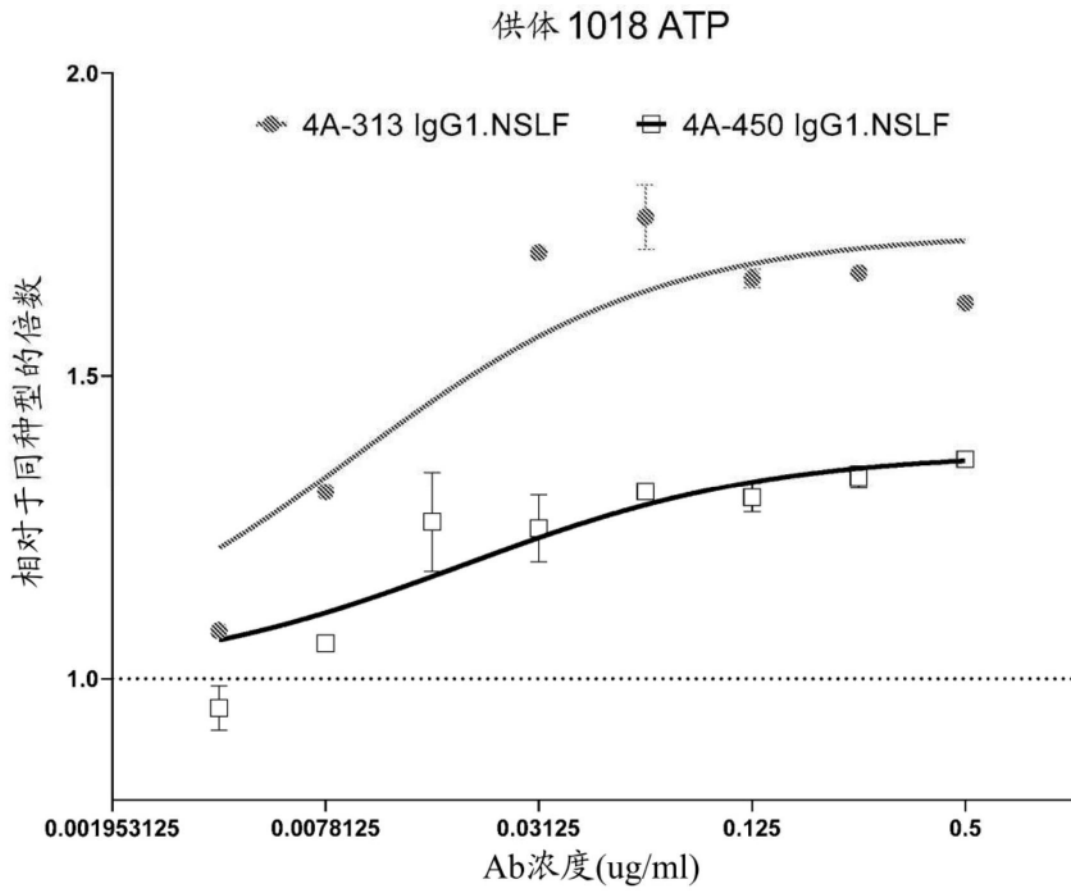


图27B

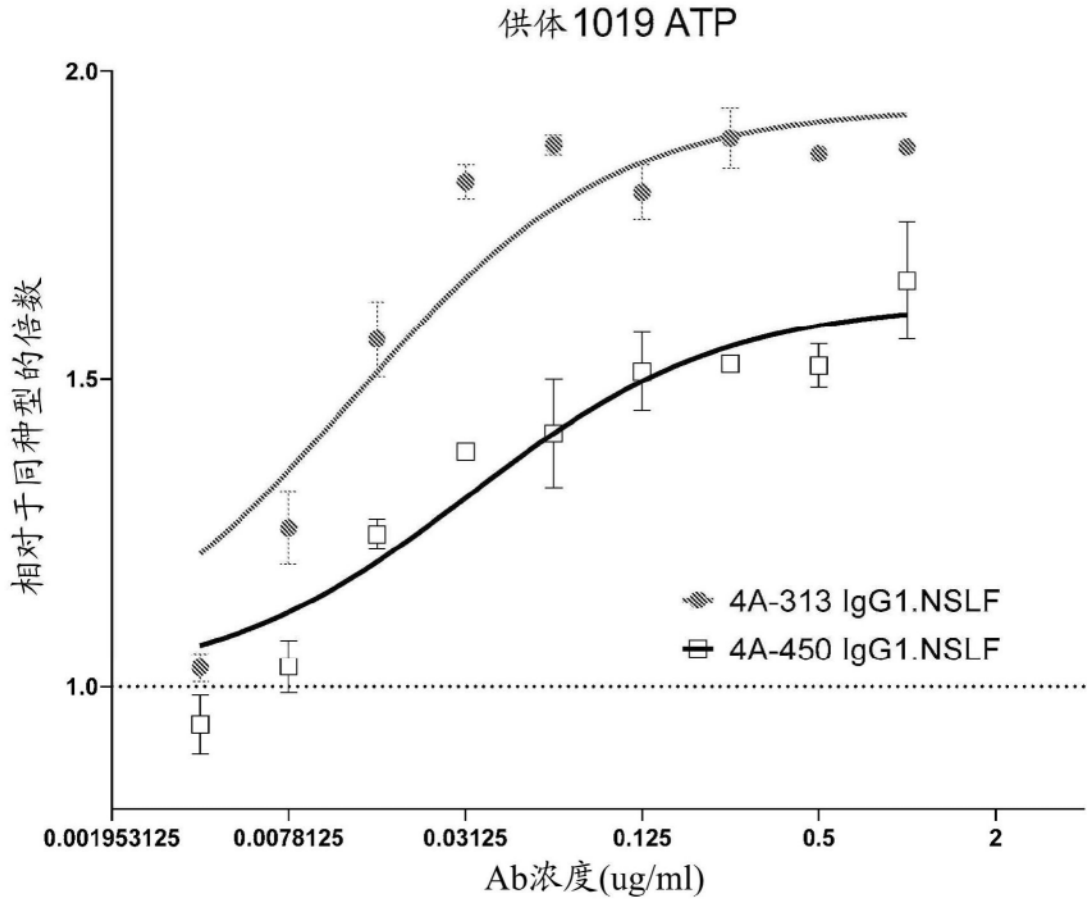


图27C

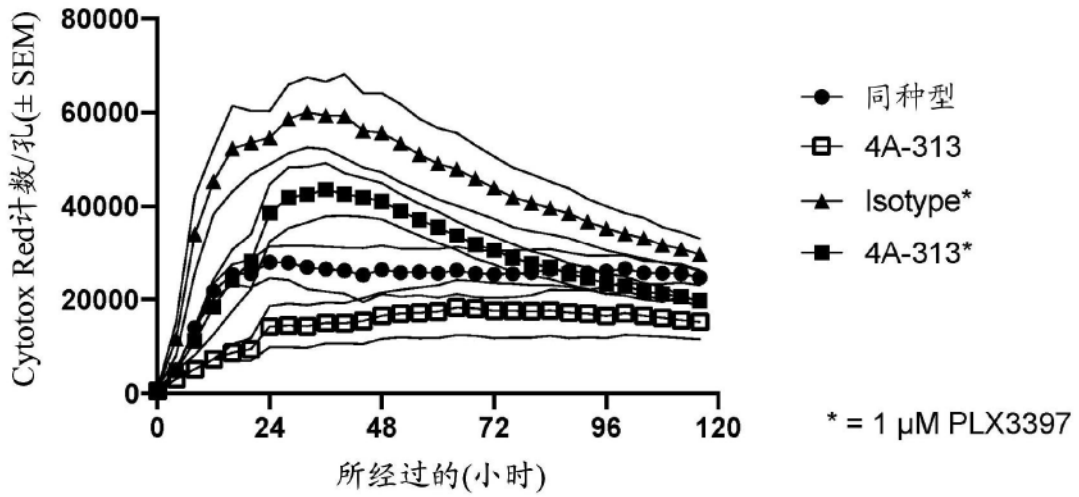


图28A

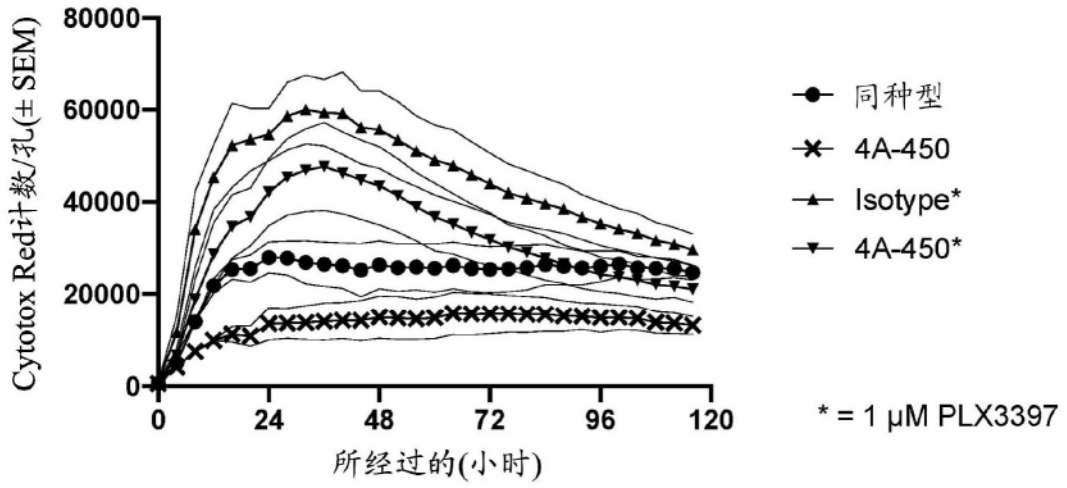


图28B

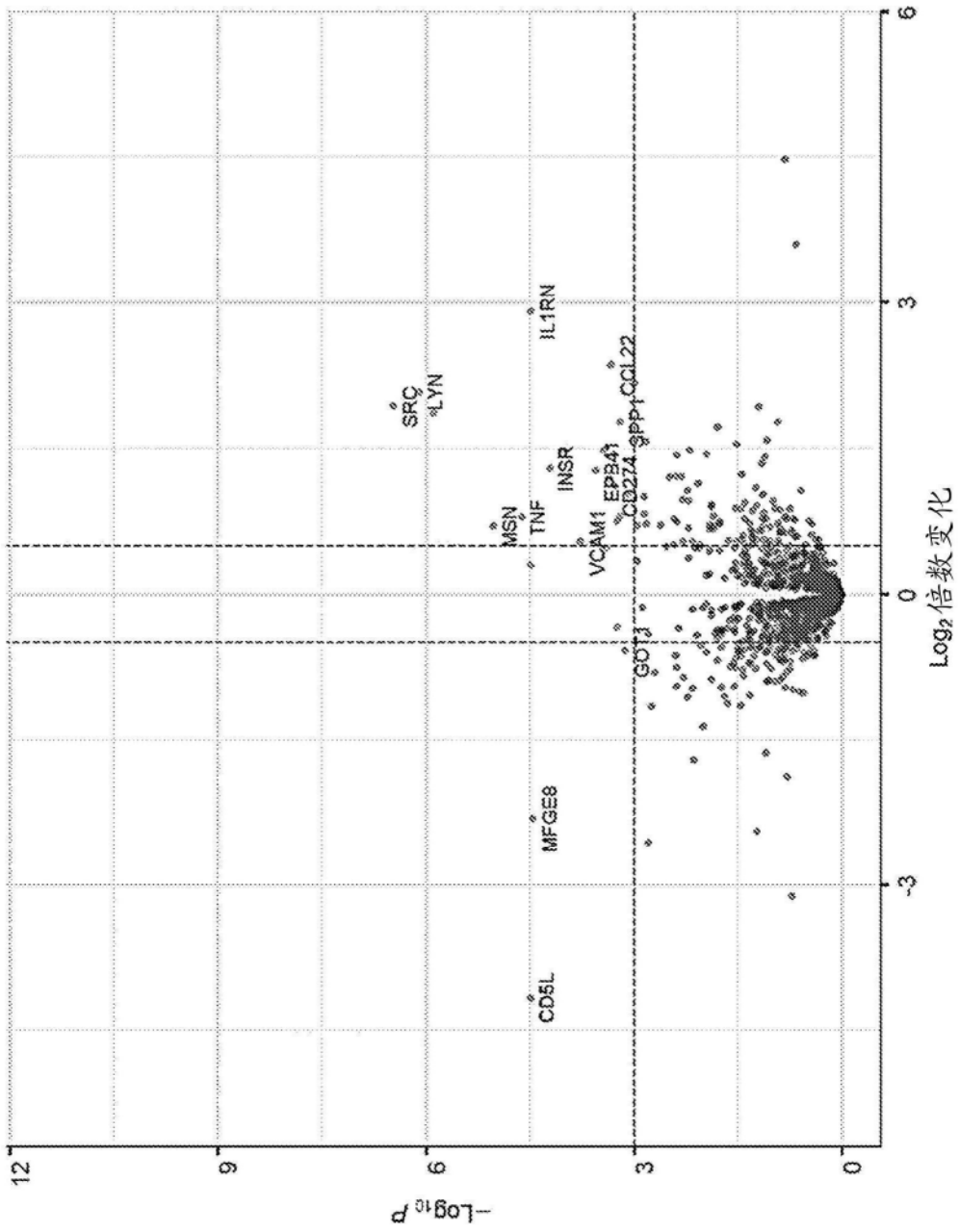


图29

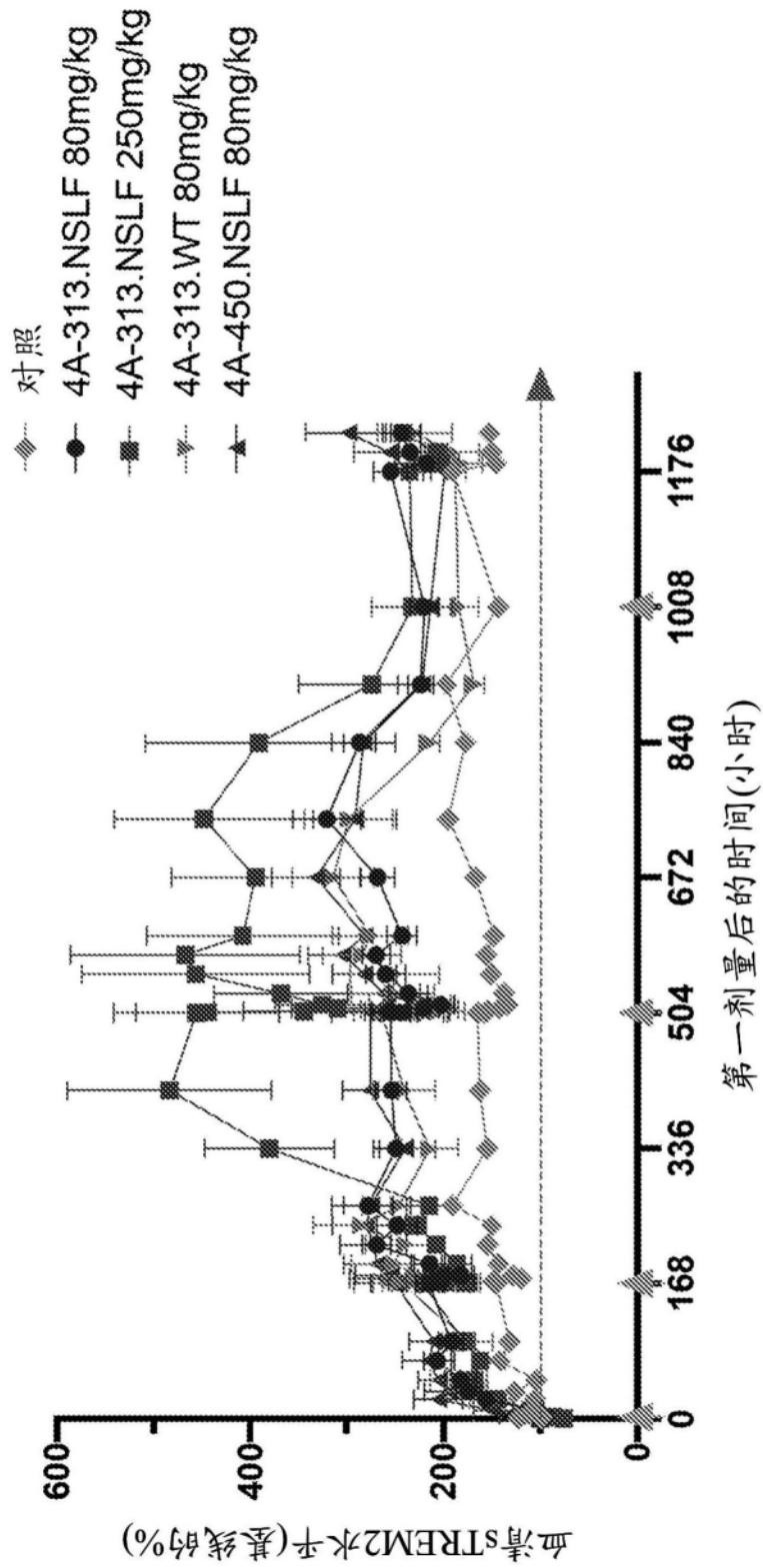


图30

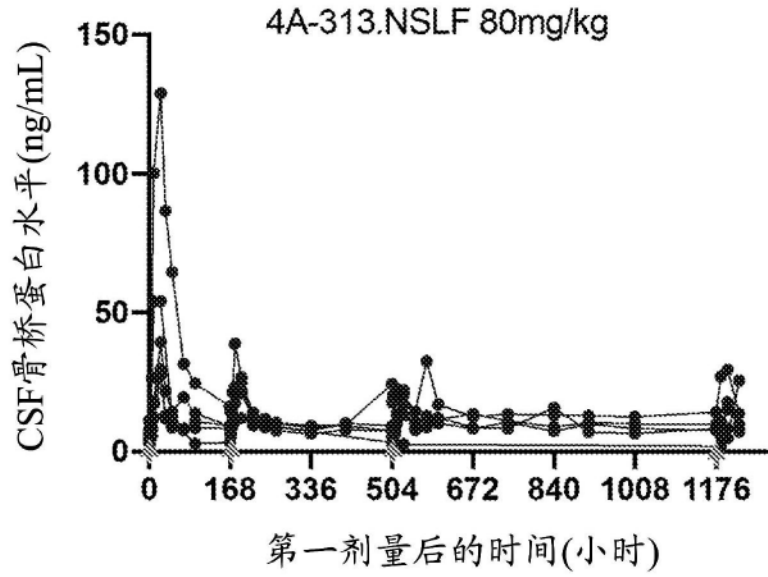


图31A

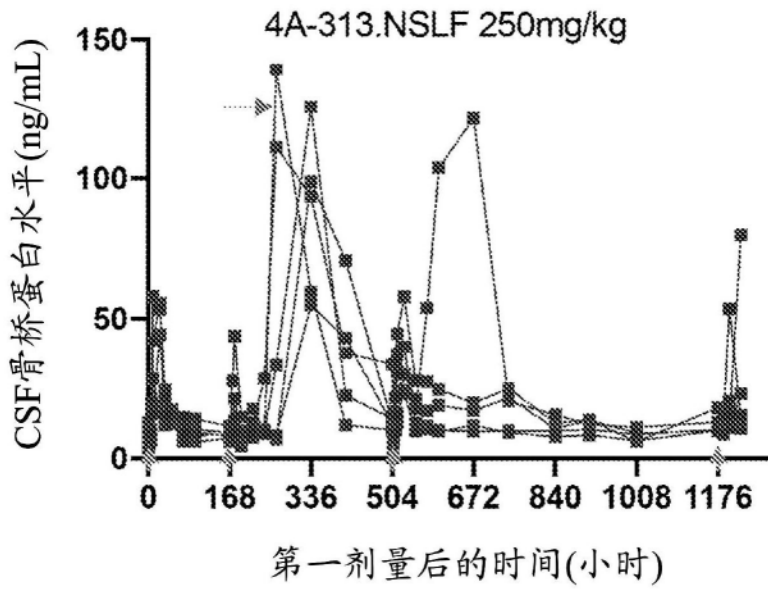


图31B

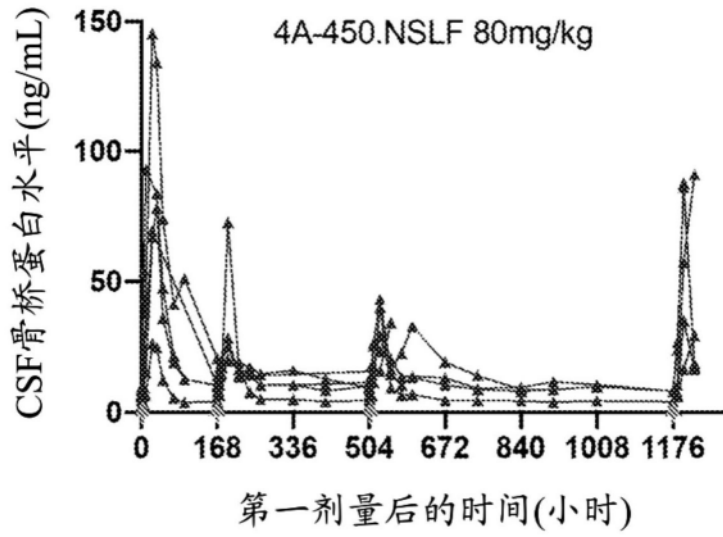


图31C

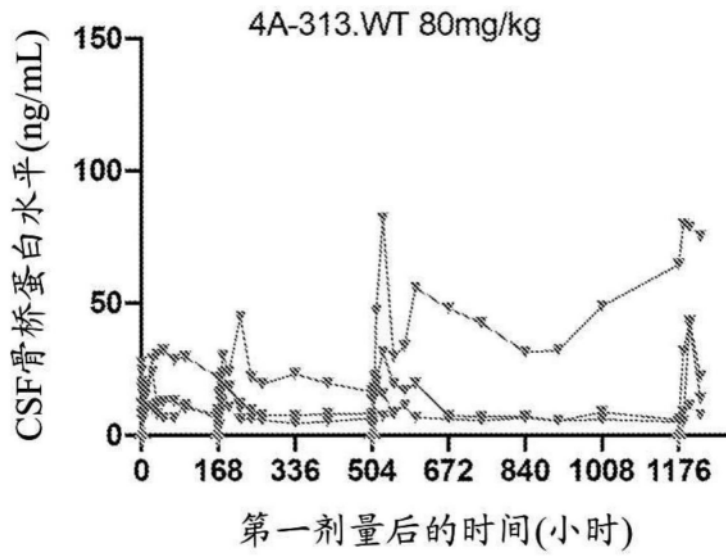


图31D

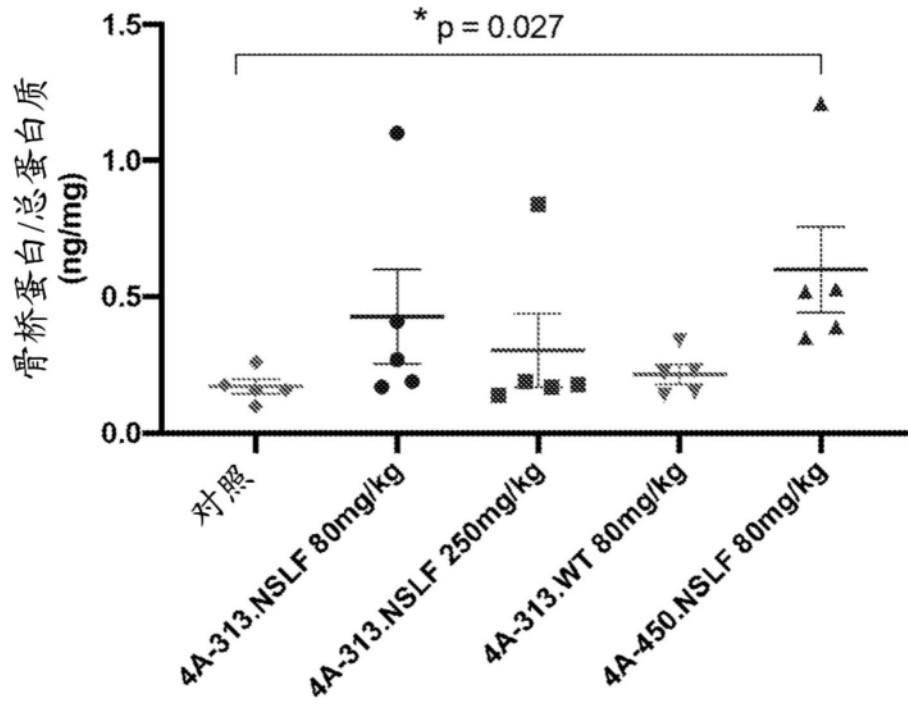


图32A

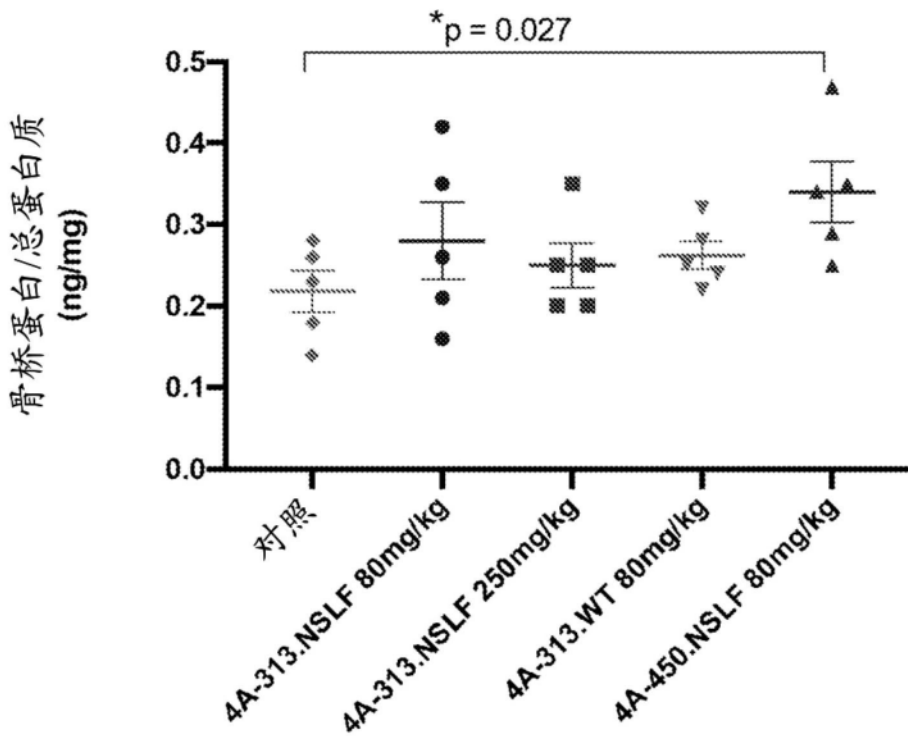


图32B

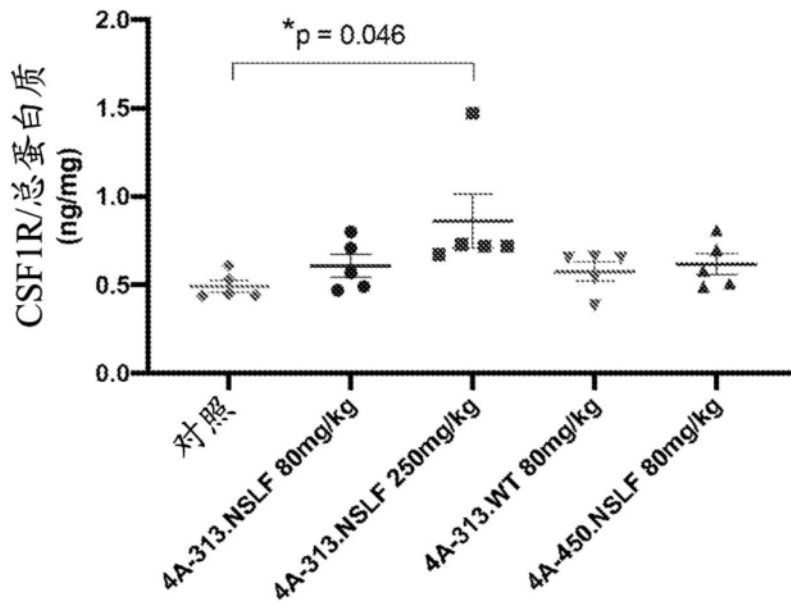


图33A

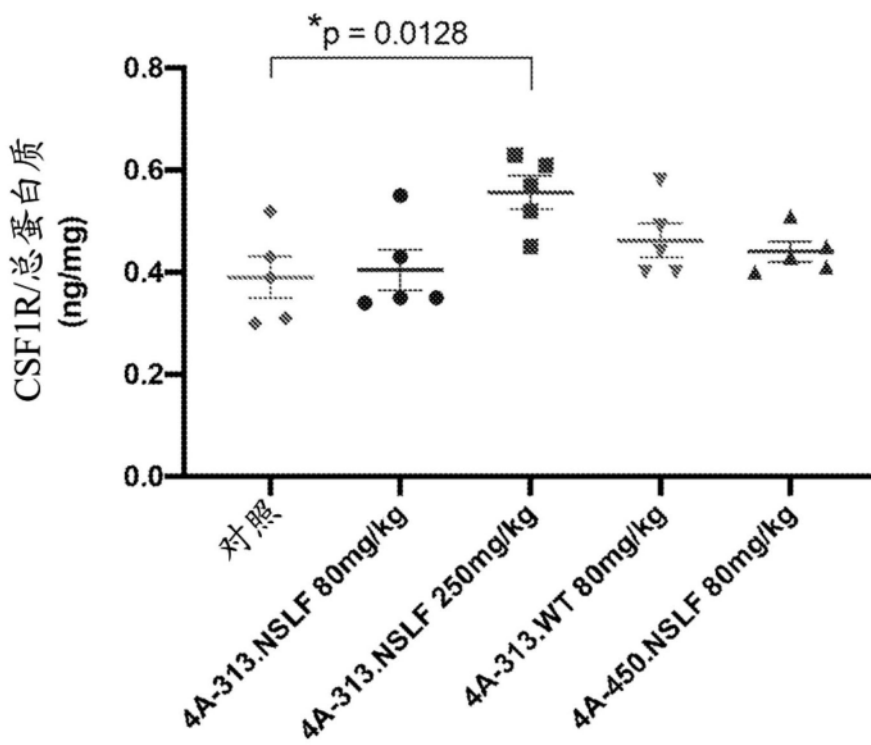


图33B

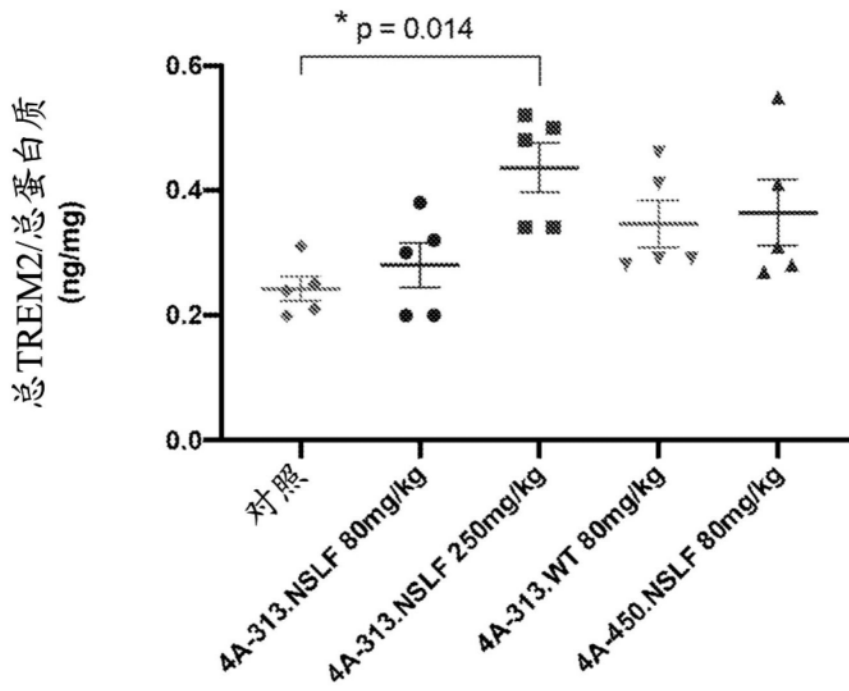


图34A

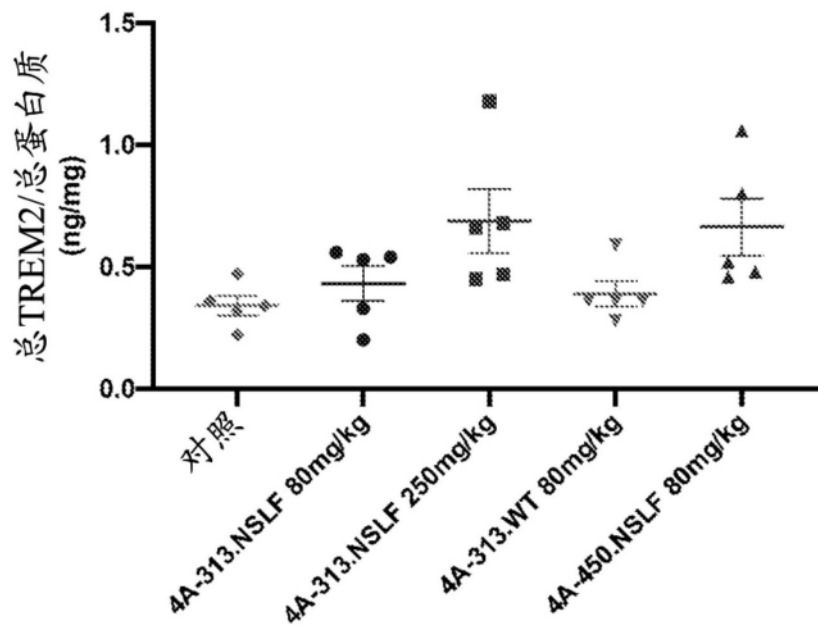


图34B

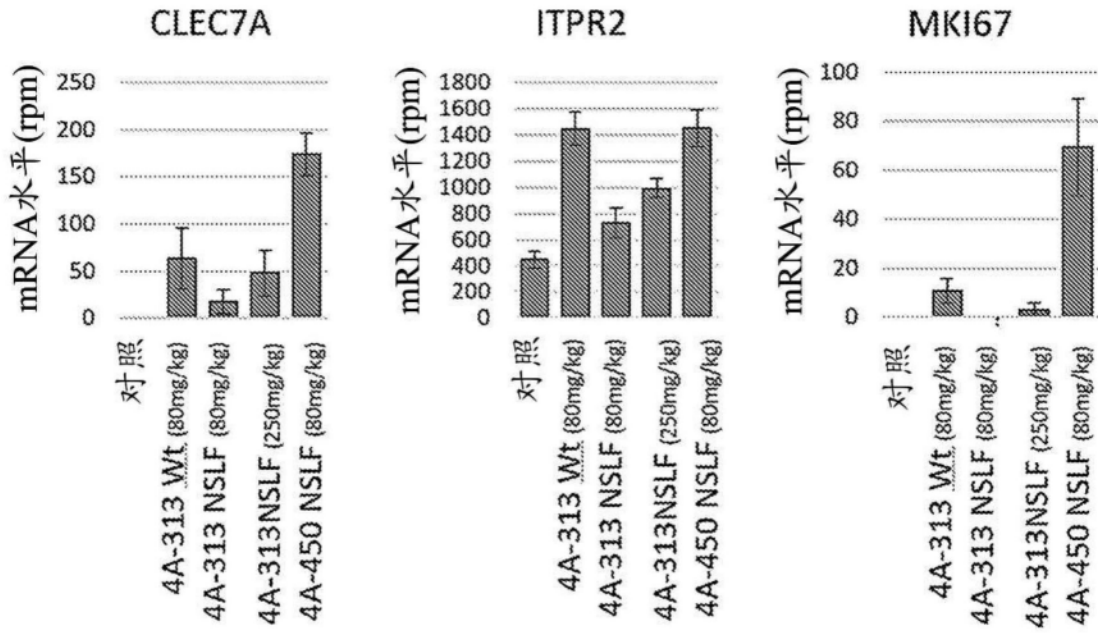


图35A

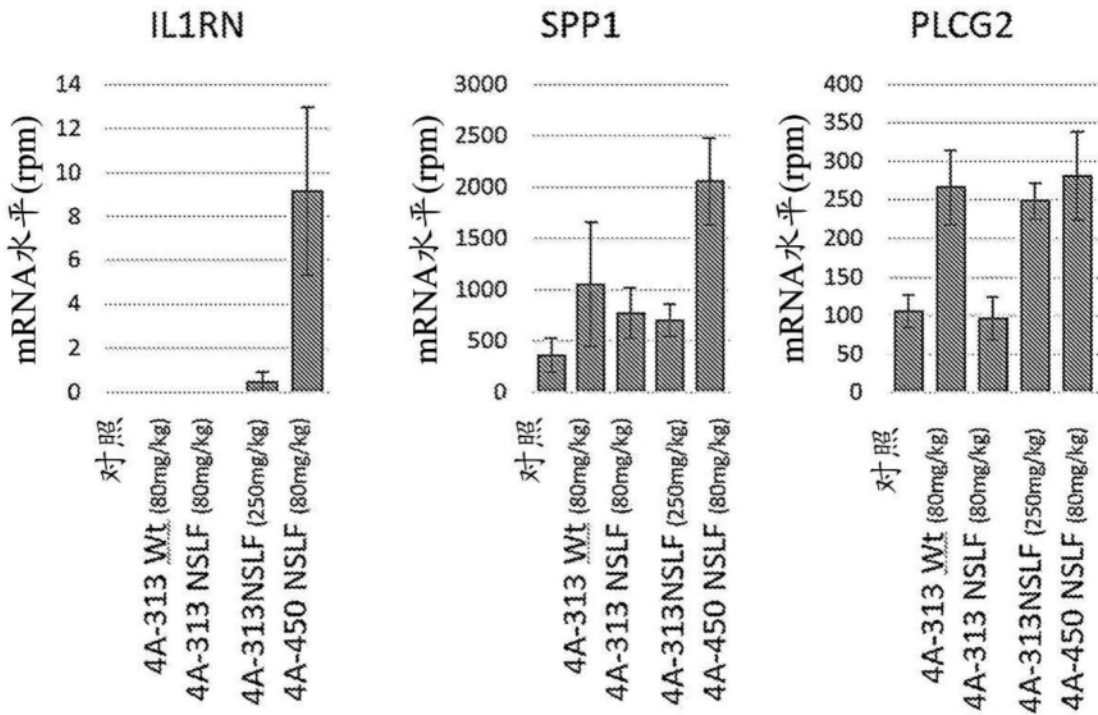


图35B

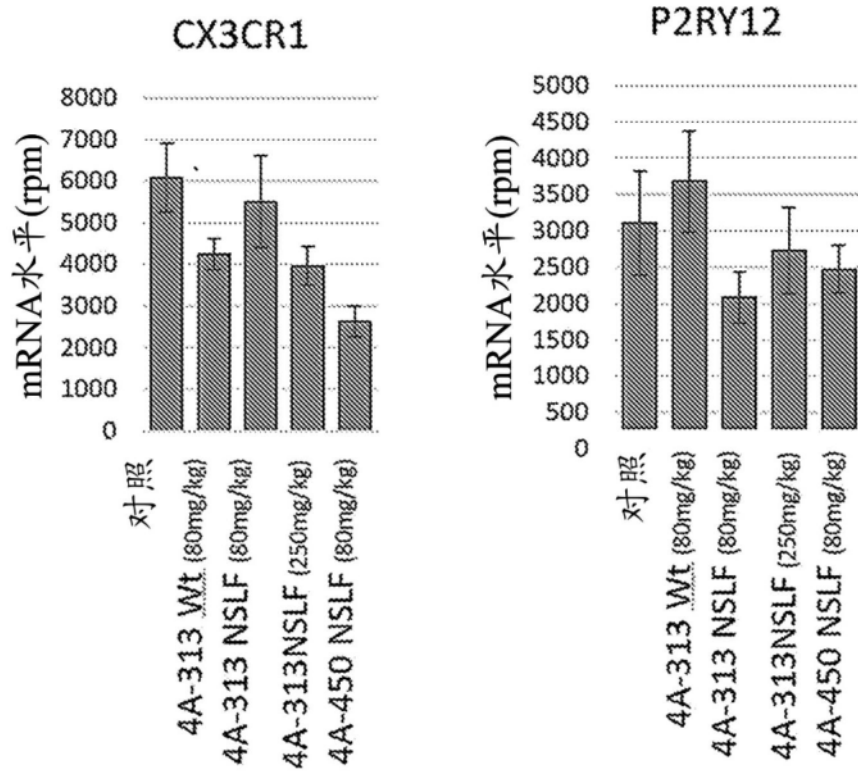


图35C

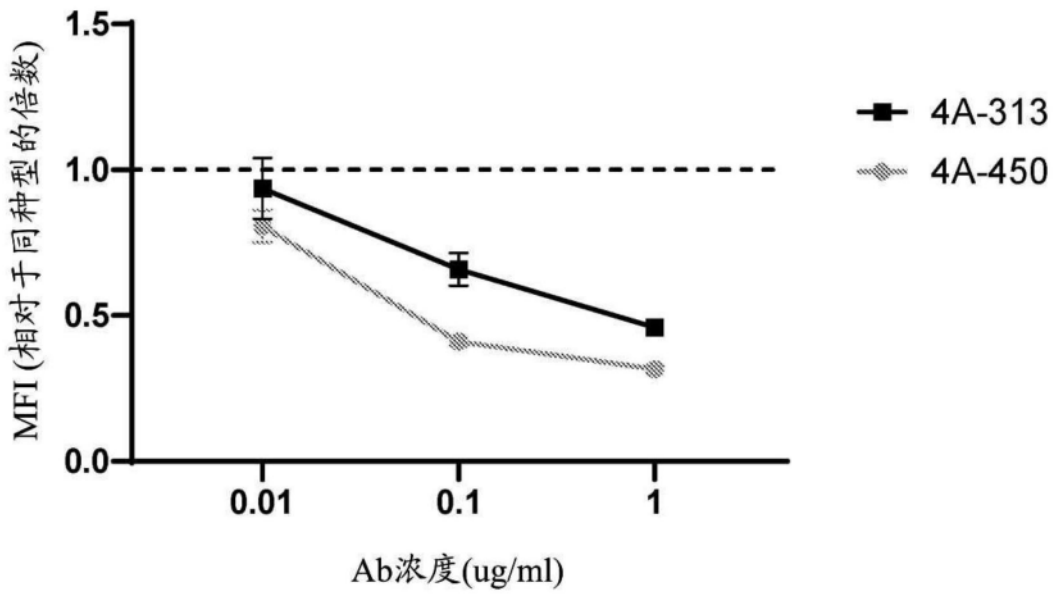


图36

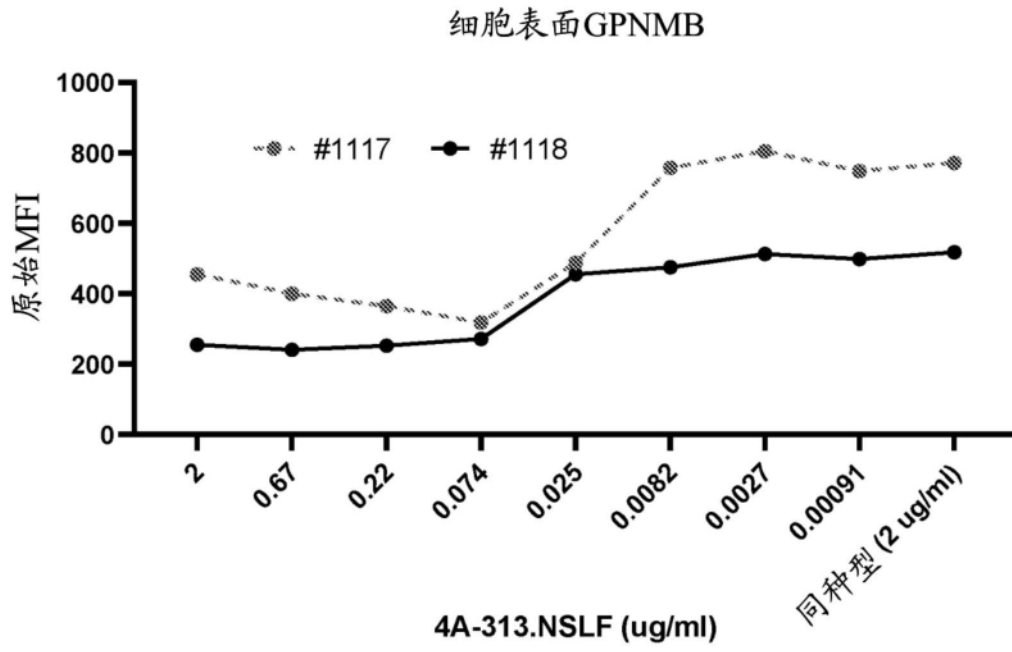


图37