

ANTICUERPOS ANTI-MS4A4A Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

PRESENTACIÓN DE LISTADO DE SECUENCIA EN ARCHIVO DE TEXTO ASCII

[0001] El contenido de la siguiente presentación en archivo de texto ASCII se incorpora en su totalidad al presente documento a modo de referencia: un soporte informático del Listado de Secuencia en forma legible por computadora (CRF) (el nombre del archivo: 4503_008PC06_Seqlisting_ST25.TXT; date of creation: July 28, 2020; size: 289,448 bytes).

CAMPO DE LA PRESENTE INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a los anticuerpos anti-MS4A4A y a los usos terapéuticos de los mismos.

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCIÓN

[0003] El grupo de genes de la subfamilia A de cuatro dominios transmembrana (MS4A) está presente en el cromosoma 11q12 e incluye a dieciocho genes. La familia de genes MS4A codifica las proteínas de membrana que normalmente tienen una topología de tetra-expansión (Ishibashi et al, 2001, Gene, 265:87-93; Liang y Tedder, 2001, Genomics, 72:119-127; Efthymiou y Goate, 2017, Molecular Neurodegeneration, 12:43). Los dominios transmembrana están interconectados por un bucle intracelular y dos bucles extracelulares en donde ambas terminales N y C residen dentro del citosol. La mayoría de las proteínas MS4A comparten una homología de secuencia de aminoácidos a la de MS4A1 (CD20) (20-30% de similitud), en las que el mayor grado de identidad de secuencia tiene lugar en los tres primeros dominios transmembrana. Los motivos altamente conservados dentro de estas regiones transmembrana a través de las diferentes proteínas MS4A sugieren que los dominios donde se expande la membrana tienen un importante rol general en la función de la proteína MS4A. Las regiones de mayor variación entre las proteínas MS4A tienen lugar dentro de los dominios citoplasmáticos de sus terminales N- y C- y el supuesto segundo bucle extracelular (Ishibashi et al, 2001, Gene, 265:87-93), lo que sugiere que estas regiones imparten propiedades funcionales exclusivas.

[0004] A pesar de esta diversidad, los dominios MS4A poseen algunos elementos comunes. Por ejemplo, una característica notable conservada en las proteínas MS4A (a excepción de las MS4A8B y de las MS4A12) es la conservación de dos residuos de cisteína en el supuesto segundo bucle extracelular que pueden formar un puente de disulfuro. Los dominios de las terminales N- y C- de las proteínas MS4A también son ricos en residuos de prolina, aunque la importancia funcional de esto aún no se ha dilucidado (Hulett et al, 2001, Genomics, 72:119-127). Sin embargo, las regiones ricas en prolina participan comúnmente en varios procesos celulares, tales como por ejemplo el reordenamiento

citoesquelético, la iniciación de la transcripción, las cascadas de señales y la asociación con dominios SH3 como parte de un sistema adaptador que facilite las interacciones entre proteínas (Kay *et al*, 2000, FASEB J, 14:231-241).

[0005] La familia de proteínas MS4A está relativamente poco caracterizada por su función, con algunas excepciones importantes: MS4A1 (CD20) se expresa exclusivamente en linfocitos B, donde la proteína tiene la función de señalización por el receptor de antígenos de las células B, y el influjo de calcio. CD20 es el objetivo de los anticuerpos inmunoterapéuticos utilizados para reducir las células patógenas B en la leucemia linfocítica crónica, los linfomas, las enfermedades autoinmunes y en el trasplante de órganos sólidos. El MS4A2 (FcεRβ) es una subunidad de señalización del receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) y del receptor de baja afinidad para IgG (FcγRIII) en mastocitos, con un papel clave en la hipersensibilidad y las reacciones alérgicas. MS4A2 es una proteína del dominio ITAM que amplifica las señales a través de un complejo de 4 proteínas del receptor de alta afinidad para IgE. MS4A3 (Htm4) se expresa en membranas intracelulares de células linfoides y mieloides, y funciona como una proteína adaptadora en la regulación del ciclo celular.

[0006] Mientras que la mayoría de los miembros de la familia MS4A están poco caracterizados, los informes sugieren que las proteínas MS4A actúan como quimiosensores y quimioreceptores para una variedad de ligandos exógenos y endógenos, entre ellos ácidos grasos, péptidos, y esteroides sulfatados, y se los ha implicado en mediar el influjo de calcio, regular la endocitosis, el tráfico, pudiendo actuar como adaptadores para los complejos de transducción de señales (Cruse *et al*, 2015, Mol Biol Cell, 26:1711-1727; Greer *et al*, 2016, Cell, 165:1734-1748; Eon Kuek *et al*, 2016, Cell, 165:1734-1748; Koslowski *et al*, 2008, Cancer Res, 68:3458-3466; Bubien *et al*, 1993; J Cell Biol, 121:1121-1132).

[0007] Determinados genes MS4A han sido vinculados genéticamente a varios desórdenes y enfermedades, en particular a trastornos neurodegenerativos. Por ejemplo, los análisis de asociación de significación de todo el genoma han identificado al grupo de genes MS4A, localizado en el cromosoma 11q12, como uno de los lugares específicos más significativos de la enfermedad de Alzheimer. Un gen de particular interés identificado es el MS4A4A (Lambert *et al*, 2013, Nat Genet, 45:1452-1458; Hollingworth *et al*, 2011, Nat Genet, 43:429-435; Naj *et al*, 2011, Nat Genet, 43:436-441).

[0008] En consecuencia, existe la necesidad de terapias dirigidas al MS4A4A, que incluyun anticuerpos que se ligen específicamente al MS4A4A, y / o terapias que sean capaces de modular (*por ejemplo*, inhibiendo o reduciendo; activando o ampliando) la actividad del MS4A4A, de modo tal que mediante la reducción o el aumento de los niveles de proteína o la actividad del MS4A4A, se puedan tratar varias enfermedades, trastornos, y condiciones asociadas con la actividad del MS4A4A.

[0009] Todas las referencias que aquí se citan, inclusive las solicitudes de patentes y las publicaciones, quedan en su totalidad incorporadas al presente documento a modo de referencia.

COMPENDIO DE LA PRESENTE INVENCION

5 [0010] La presente invención está dirigida generalmente a los anticuerpos anti-MS4A4A y a los métodos de uso de dichos anticuerpos. Los métodos aquí provistos encuentran uso en la prevención, la reducción del riesgo o el tratamiento de un individuo aquejado con una enfermedad, trastorno o condición neurodegenerativa. En algunas formas de realización, la presente revelación proporciona un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que tiene una enfermedad, trastorno o
10 condición neurodegenerativa seleccionada de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, la demencia y el deterioro cognitivo, el método comprende administrar al individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A. En algunas formas de realización, la presente revelación proporciona un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo aquejado por una enfermedad, un trastorno o una condición asociada con
15 el aumento de la expresión o la actividad del MS4A4A, en donde el método comprende la administración al individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A.

[0011] En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una
20 region variable de cadena ligera, donde la region variable de cadena pesada comprende: una región hipervariable pesada (en adelante, HVR-H) HVR-H1 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los números de identidades de secuencia (en adelante SEQ ID NO): 94, 108, 116, 146, 147, 308, y 311; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, y 312; y una HVR-H3 con
25 una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, y 313; y la región variable de cadena ligera comprende: una región hipervariable – ligera (en adelante, HVR-L) HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314, y 317; una HVR-L2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 105,
30 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 159, 160, 161, 315, y 318; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 107, 115, 144, 145, 163, 316, y 319.

[0012] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de

cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:94; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:96-99; y una HVR-H3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:100-102; y la región variable de
5 cadena ligera comprende: una HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:103-104; una HVR-L2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:105-106; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:107.

[0013] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo
10 aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:308; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:309; y una HVR-H3 con una secuencia de aminoácidos del
15 SEQ ID NO:310; y la región variable de cadena ligera comprende: una HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:314; una HVR-L2 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:315; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:316.

[0014] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo
20 aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:311; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:312; y una HVR-H3 con una secuencia de aminoácidos del
25 SEQ ID NO:313; y la región variable de cadena ligera comprende: una HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:317; una HVR-L2 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:318; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:319.

[0015] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo
30 aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:108; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:110-111; y una HVR-H3 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:112; y la región variable de cadena ligera comprende: una
HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:113; una HVR-L2 con una secuencia de

aminoácidos del SEQ ID NO:114; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:115.

[0016] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:116; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:118-122; y una HVR-H3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:123-129; y la región variable de cadena ligera comprende: una HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:130-138; una HVR-L2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:139-143; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:144-145.

[0017] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:146-147; una HVR-H2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:149-153; y una HVR-H3 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:154; y la región variable de cadena ligera comprende: una HVR-L1 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:156-158; una HVR-L2 con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO:159-161; y una HVR-L3 con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:163.

[0018] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO:5-15, 304, y 306. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 24-30. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se

liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 40-53. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 76-84.

[0019] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 17-22, 305, y 307. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 32-36. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 55-74. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera, donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 86-93.

[0020] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 5-15, 304, y 306, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 17-22, 305, and 307. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo

comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 24-30, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 32-36. En algunas formas de realización que se pueden
5 combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 40-53, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de
10 aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 55-74. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos
15 seleccionada de entre SEQ ID NO: 76-84, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 86-93.

[0021] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y
20 una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 320-343. En algunas formas de realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 336-343 (en forma opcional, donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 22, y más aún opcionalmente, donde la cadena ligera comprende además
25 una región constante con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 344). En algunas formas de realización, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 320-327 (en forma opcional, donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:304, y aún más opcionalmente donde la cadena ligera comprende además una región constante con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID
30 NO: 344). En algunas formas de realización, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los SEQ ID NO: 328-335 (en forma opcional donde la cadena ligera comprende una reeegión variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:305, aún más opcionalmente donde la cadena ligera comprende además una región constante con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 344).

[0022] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende una HVR-H1 con una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:94, una HVR-H2 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:96, y una HVR-H3 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:102; y la región variable de cadena ligera comprende una HVR-L1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:104, una HVR-L2 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:105, y una HVR-L3 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:107. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:14, y la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:22. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 359 o del NO: 360, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:365.

[0023] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:308; una HVR-H2 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:309; y una HVR-H3 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:310; y la región variable de cadena ligera comprende: una HVR-L1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:314; una HVR-L2 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:315; y una HVR-L3 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:316. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:304, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:305. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de

realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 324 o del NO. 325, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:363.

5 **[0024]** En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende: una HVR-H1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:311; una HVR-H2 con la
10 secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:312; y una HVR-H3 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:313; y la región variable de cadena ligera comprende: una HVR-L1 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:317; una HVR-L2 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:318; y una HVR-L3 con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:319. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-
15 MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:306, y la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:307. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de
20 realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 332 o del NO 333, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO:364.

[0025] En un aspecto, la presente revelación se refiere a un anticuerpo aislado que se liga a una
25 proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo inhibe competitivamente la unión con uno o más anticuerpos de cualquiera de las formas de realización aquí establecidas para ligarse a MS4A4A.

[0026] En otro aspecto, la presente revelación se refiere a un anticuerpo aislado que se liga a la proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo o a un epítipo sobrepuesto en MS4A4A como el anticuerpo de cualquiera de las formas de realización aquí
30 establecidas.

[0027] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo se liga a un dominio extracelular 1 del MS4A4A humano. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las

formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo se liga a uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO: 177) del SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las

5 formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo se liga a un dominio extracelular 2 del MS4A4A humano. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo se liga

10 a uno o más residuos aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO: 178) del SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo se liga a uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia

15 de aminoácidos SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) del SEQ ID NO:1, y además donde el anticuerpo no se liga a la prolina residual de aminoácidos 163 (P163) del SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, el anticuerpo anti-MS4A4A es un anticuerpo anti-MS4A4A humano o un anticuerpo anti-MS4A4A humanizado.

20 **[0028]** En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo aislado que se liga a una proteína del MS4A4A, donde el anticuerpo reduce los niveles de superficie celular del MS4A4A o reduce los niveles intracelulares del MS4A4A.

[0029] En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de

25 realización aquí establecidas, la proteína de MS4A4A es una proteína de mamífero o una proteína humana. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, la proteína de MS4A4A es una proteína de tipo silvestre. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas la proteína de MS4A4A es una variante que se da naturalmente.

30 **[0030]** En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de Receptor de Activación Expresado en Células Mieloides 2 (TREM2, según las siglas en inglés) soluble, aumenta los niveles de TREM2 en membrana, o aumenta los niveles de TREM2 soluble y aumenta los niveles de TREM2 en membrana en las células mieloides. En algunas formas de

realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 soluble. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 en membrana. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 soluble y los niveles de TREM2 en membrana. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 en membrana *in vivo*. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo*. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 soluble en fluido cerebroespinal (CSF, según las siglas en inglés) *in vivo*. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero y en CSF *in vivo*.

[0031] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención reduce la expresión de los marcadores de superficie celular M2 (por ejemplo, los receptores) en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención disminuye o reduce los niveles de los marcadores de superficie celular M2 en una célula mieloides, por ejemplo, en un macrófago.

[0032] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención reduce la expresión de CD200R, Dectina-1, o CD163 en células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención disminuye o reduce los niveles de superficie celular de CD200R, Dectina-1, y/o CD163 en células mieloides, por ejemplo, en un macrófago.

[0033] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta el ARNm y/o la expresión proteica de gelsolina y/u osteopontina en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta el ARNm y/o los niveles proteicos de IL1RN

en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta el ARNm y/o los niveles proteicos de CSF1R (receptor del factor estimulante de colonias 1) en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención disminuye al

5 ARNm y/o los niveles proteicos del receptor purinérgico P2RY12 y/o del receptor 1 de quimiocinas CX3C (CX3CR1), en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención aumenta el ARNm y/o los niveles proteicos de 1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

10 fosfodiesterasa gamma-2 (PLCG2), la familia de lectinas de dominio tipo C 7 miembro A (CLEC7A), inositol 1,4,5-trifosfato receptor 2 (ITPR2), y/o el antígeno KI-67 (MK167) en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención disminuye el ARNm y/o los niveles proteicos of la glucoproteína transmembrana NMB (GPNMB) en las células mieloides.

15 **[0034]** En un aspecto, la presente revelación se refiere a un anticuerpo aislado que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo aumenta el ARNm y/o la expresión proteica de gelsolina y/o osteopontina en las células mieloides. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas las células mieloides son macrófagos humanos. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de

20 realización aquí establecidas el anticuerpo aislado que se liga a una proteína de MS4A4A es humano o humanizado. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo aislado que se liga a la proteína de MS4A4A es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo conjugado o un anticuerpo quimérico. En

25 determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo aislado que se liga a una proteína MS4A4A se une al mismo epítipo que el anticuerpo seleccionado de entre 4A-18, 4A-25, 4A-214, 4A-21 y 4A-202. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo aislado que se liga a una proteína MS4A4A reduce la expresión de los

30 marcadores M2 en las células mieloides. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas las células mieloides son macrófagos humanos. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas los marcadores M2 son CD200R, Dectina-1, y/o CD163. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de

realización aquí establecidas el anticuerpo aislado que se liga a una proteína MS4A4A aumenta la membrana plasmática o la superficie celular TREM2 en macrófagos humanos en al menos un 50%, 90%, 100%, 150%, 200% o 250%. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo aislado that binds to a MS4A4A protein increases soluble TREM2 in human macrophage supernatant by at least 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, or 70%.

[0035] En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo anti-MS4A4A es un anticuerpo biespecífico que reconoce un primer antígeno y un segundo antígeno. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el primer antígeno es MS4A4A y el segundo antígeno es un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el segundo antígeno se selecciona de entre MS4A4A, un receptor de transferrina (TR, en inglés), un receptor de insulina (HIR, en inglés), un receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR, en inglés), un receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado a proteínas 1 y 2 (LPR-1 y 2, en inglés), un receptor de toxina diftérica, CRM197, un nanoanticuerpo de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poli-arginina, un péptido angiopéptido, basigina, Glut1, y CD98hc, y ANG1005.

[0036] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un anticuerpo multivalente. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

[0037] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención es de la clase IgG, de la clase IgM, o de la clase IgA. En algunas formas de realización, el anticuerpo es de la clase IgG y tiene un isótopo IgG1, IgG2, o IgG4. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas

de realización aquí establecidas el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se liga a un epítipo con residuos de aminoácidos en MS4A4A humano o en una proteína de MS4A4A de mamífero. En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el fragmento de anticuerpo es un fragmento de Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, o scFv.

[0038] En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico reconociendo un primer antígeno y un segundo antígeno. En algunas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el primer antígeno es MS4A4A y el segundo antígeno es:

- (a) un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica;
- (b) un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera hematoencefálica seleccionado de entre el receptor de transferrina (TR), el receptor de insulina (HIR), el receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), el receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado a las proteínas 1 y 2 (LPR-1 y 2), el receptor de toxina diftérica, CRM197, un nanoanticuerpo de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteína, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido de poli-arginina, un angiopéptido, y ANG1005;
- (c) Un agente patógeno seleccionado de entre los péptidos o proteínas patógenos o ácidos nucleicos patógenos, donde los ácidos nucleicos patógenos son ARN de expansión repetida en antisentido GGCCCC (G₂C₄), las proteínas patógenas se seleccionan de entre beta amiloide, beta amiloide oligomérica, placas beta amiloideas, proteína precursora de amiloide o sus fragmentos, Tau, IAPP, alfa-sinucleína, TDP-43, proteína FUS, C9orf72 (cromosoma 9 marco de lectura abierto 72), proteína c9RAN, proteína priónica, PrP^{Sc}, huntingtina, calcitonina, superóxido dismutasa, ataxina, ataxina 1, ataxina 2, ataxina 3, ataxina 7, ataxina 8, ataxina 10, cuerpo de Lewy, factor natriurético auricular, polipéptido amiloide de los islotes, insulina, apolipoproteína AI, amiloide sérico A, medina, prolactina, transtiretina, lisozima, microglobulina beta 2, gelsolina, queratoepitelina, cistatina, inmunoglobulina de cadena ligera AL, proteína S-IBM, productos de traducción no ATG asociados a repetición (RAN), péptidos de repetición de diPéptidos (DPR), péptidos de repetición de glicina-alanina (GA), péptidos de repetición de glicina-prolina (GP), péptidos de repetición de glicina-arginina (GR), péptidos de repetición de prolina-alanina (PA), ubiquitina y péptidos de repetición de prolina-arginina (PR);
- (d) ligandos y/o proteínas expresadas en células inmunes, donde los ligandos y/o las proteínas se seleccionan de entre 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, y fosfatidilserina; o

(e) una proteína, un lípido, un polisacárido, o un glucolípido expresados en una o más células tumorales.

[0039] En otro aspecto, la presente revelación se refiere a un ácido nucleico aislado incluyendo una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de cualquiera de las formas de realización precedentes. En algunas formas de realización, la presente revelación se refiere a un vector incluyendo el ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización precedentes. En algunas formas de realización, la presente revelación se refiere a una célula huésped aislada incluyendo al vector de cualquiera de las formas de realización precedentes.

[0040] En otro aspecto, la presente revelación se refiere a un método de producir un anticuerpo que se liga al anticuerpo MS4A4A humano, incluyendo el cultivo de la célula huésped de cualquiera de las formas de realización precedentes para que se produzca el anticuerpo anti-MS4A4A. En determinadas formas de realización, el método incluye además la recuperación del anticuerpo anti-MS4A4A producido por la célula.

[0041] En otro aspecto la presente revelación se refiere a una composición farmacéutica incluyendo al anticuerpo de cualquiera de las formas de realización precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0042] En un aspecto, la presente revelación se refiere a un método de prevenir, reducir el riesgo, o tratar a un individuo que padece una enfermedad, trastorno, o condición seleccionadas de entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía y el deterioro cognitivo, el método incluye la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de las formas anteriores de realización. En otro aspecto, la presente declaración se refiere a un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que padece una enfermedad, un trastorno, una afección o una condición causadas por o asociadas con la sobreexpresión o el aumento de la actividad de MS4A4A, el método incluye la administración a un individuo que la necesite de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de las formas de realización precedentes. En algunas formas de realización de la presente invención, el método incluye además la detección de niveles de osteopontina, gelsolina, membrana plasmática o superficie celular TREM2, y/o TREM2 soluble antes y/o después de la administración del anticuerpo.

[0043] En un aspecto, la presente revelación se refiere a un método de prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que padece una enfermedad o trastorno CSF1R-deficiente, el método incluye la administración a un individuo que la necesite de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de cualquiera de las formas de realización precedentes. En algunas formas de realización, la enfermedad o trastorno CSF1R-deficiente es la leucoencefalopatía del adulto con esferoides axonales y glía pigmentada (ALSP) o la leucoencefalopatía difusa hereditaria (HDLS).

[0044] Otros aspectos de la presente revelación se refieren a un anticuerpo aislado anti-MS4A4A producido por el método de cualquiera de las formas de realización precedentes. Otros aspectos de la presente revelación se relacionan con una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes, y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0045] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada incluye la HVR-H1, la HVR-H2, y la HVR-H3 del anticuerpo 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, o 4A-450 (como se indica en la **Tabla 1**, la **Tabla 5**, la **Tabla 30**, y la **Tabla 31**).

[0046] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena ligera incluye la HVR-L1, la HVR-L2, y la HVR-L3 del anticuerpo 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, o 4A-450 (como se indica en la **Tabla 1**, la **Tabla 5**, la **Tabla 30**, y la **Tabla 31**).

[0047] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada que incluye una HVR-H1, una HVR-H2, y una HVR-H3 y una región variable de cadena ligera, que incluye una HVR-L1, una HVR-L2, y una HVR-L3, donde el anticuerpo incluye las HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 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, or 4A-450 (como se indica en la **Tabla 1**, la **Tabla 5**, la **Tabla 30**, y la **Tabla 31**).

[0048] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada incluye la HVR-H1, la HVR-H2, y la HVR-H3 del anticuerpo 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, or 4A-331 (como se indica en la **Tabla 2** y en la **Tabla 6**).

[0049] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena ligera incluye la HVR-L1, la HVR-L2, y la HVR-L3 del anticuerpo 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, or 4A-331 (como se indica en la **Tabla 2** y en la **Tabla 6**).

[0050] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada que incluye una HVR-H1, una HVR-H2, y una HVR-H3 y una región variable de cadena ligera, que incluye una HVR-L1, una HVR-L2, y una HVR-L3, donde el anticuerpo incluye las HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 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, or 4A-331 (como se indica en la **Tabla 2** y la **Tabla 6**).

[0051] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada incluye la HVR-H1, la HVR-H2, y la HVR-H3 del anticuerpo 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, or 4A-381 (como se indica en la **Tabla 3** y la **Tabla 7**).

[0052] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena ligera incluye la HVR-L1, la HVR-L2, y la HVR-L3 del anticuerpo 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, or 4A-381 (como se indica en la **Tabla 3** y la **Tabla 7**).

[0053] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada que incluye una HVR-H1, una HVR-H2, y una HVR-H3 y una región variable de cadena ligera, que incluye una HVR-L1, una HVR-L2, y una HVR-L3, donde el anticuerpo incluye las HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 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, or 4A-381 (como se indica en la **Tabla 3** y la **Tabla 7**).

[0054] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena pesada incluye la HVR-H1, la HVR-H2, y la HVR-H3 del anticuerpo 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, or 4A-390 (como se indica en la **Tabla 4** y en la **Tabla 8**).

[0055] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, donde la región variable de la cadena ligera incluye la HVR-L1, la HVR-L2, y la HVR-L3 del anticuerpo 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, or 4A-390 (como se indica en la **Tabla 4** y en la **Tabla 8**).

[0056] En otro aspecto la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada que incluye una HVR-H1, una HVR-H2, y una HVR-H3 y una región variable de cadena ligera, que incluye una HVR-L1, una HVR-L2, y una HVR-L3, donde el anticuerpo incluye las HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2, y HVR-L3 del anticuerpo 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, or 4A-390 (como se indica en la **Tabla 4** y la **Tabla 8**).

[0057] En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas la presente revelación se refiere a un anticuerpo que se liga a una proteína de MS4A4A, donde el anticuerpo aumenta el ARNm y/o la expresión proteica de gelsolina y/o osteopontina en las células mieloides. En algunas formas de realización, las células mieloides son macrófagos.

[0058] En determinadas formas de realización que se pueden combinar con algunas de las formas de realización aquí establecidas el anticuerpo anti-MS4A4A se liga específicamente a un MS4A4A humano, un MS4A4A de ratón, un MS4A4A cino, o una combinación de éstos.

[0059] These and other embodiments of the disclosure are further described by the detailed description that follows. Debe entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas formas de realización aquí descritas pueden combinarse para formar otras formas de realización de la presente invención. Estos y otros aspectos de la revelación resultarán evidentes a los expertos en la técnica. Estas y otras formas de realización de la invención se describen en mayor detalle la descripción que sigue a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0060] La patente o expediente de solicitud contiene al menos una figura en color. La oficina brindará copias de esta patente o publicación de la solicitud de patente con los dibujos en color, previa solicitud y pago de arancel requerido.

[0061] La **FIG. 1** ilustra la secuencia primaria de aminoácidos del MS4A4A humano. Los dominios intracelulares aparecen en cursiva, los dominios transmembrana están subrayados, los bucles extracelulares están en negrita y cursiva.

[0062] La **FIG. 2A** muestra un esquema de la estructura de andamiaje de un paquete de cuatro hélices de proteínas solubles (PDB_ID:1P68) obtenido del Banco de Datos de Proteínas RCSB que posee cuatro dominios transmembranales ilustrados como cintas helicoidales en la estructura. Las **FIG. 2B** y **FIG. 2C** muestra la secuencia primaria de aminoácidos del andamiaje del paquete de cuatro helices de proteínas solubles PDB-ID:1P68 y PDB_ID:1M6T, respectivamnete; los cuatro dominios transmembranales están subrayados en las secuencias de aminoácidos.

[0063] La **FIG. 3A** muestra las secuencias primarias de aminoácidos del andamiaje del paquete de cuatro helices de proteínas solubles JS1, JS5, and JS6, dentro del cual se agregaron los dos bucles extracelulares de MS4A4A humano (que aparecen en negrita y subrayadas). La **FIG. 3B** muestra las secuencias primarias de aminoácidos del andamiaje del paquete de cuatro helices de proteínas solubles JS4 y JS10 usadas como variantes negativas de control.

[0064] La **FIG. 4** ilustra determinados anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación que se ligan a polipéptidos recombinantes MS4A4A solubles injertados en bucles JS1, JS4, JS5, JS6, y JS10 mediante el método ELISA.

[0065] La **FIG. 5** muestra determinadas variantes de anticuerpos anti-MS4A4A humanizados del anticuerpo murino anti-MS4A4A 4A-21 que se liga al polipéptido recombinante MS4A4A soluble injertado en bucle JS1.

[0066] La **FIG. 6** muestra determinadas variantes de anticuerpos anti-MS4A4A humanizados del anticuerpo murino anti-MS4A4A 4A-202 que se liga al polipéptido recombinante MS4A4A soluble injertado en bucle JS1.

[0067] La **FIG. 7** muestra determinadas variantes de anticuerpos anti-MS4A4A humanizados y madurados por afinidad de anticuerpos anti-MS4A4A murinos 4A-202 que se ligan al polipéptido recombinante MS4A4A soluble injertado en bucle JS5.

[0068] La **FIG. 8** muestra determinadas variantes de anticuerpos anti-MS4A4A humanizados y madurados por afinidad de anticuerpos anti-MS4A4A murinos 4A-21 que se ligan al polipéptido recombinante MS4A4A soluble injertado en bucle JS5.

[0069] La **FIG. 9** muestra determinadas variantes de anticuerpos anti-MS4A4A humanizados y madurados por afinidad de anticuerpos anti-MS4A4A murinos 4A-21 que se ligan al polipéptido recombinante MS4A4A soluble injertado en bucle JS5.

[0070] Las **FIGS. 10A-10B** muestran el efecto del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 en los niveles de sTREM2 en el suero de monos cynomolgus. La **FIG. 10A** muestra los niveles (ng/mL) de sTREM2 en el

suero de monos cynomolgus a las horas indicadas luego de la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 o del anticuerpo de control del isotipo (hulgG1), en ambos casos con una dosis de 80 mg/kg. La **FIG. 10B** muestra los niveles de sTREM2 (porcentaje de la línea de base) en el suero de monos cynomolgus a las horas indicadas luego de la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 o del anticuerpo de control del isotipo (hulgG1), en ambos casos con una dosis of 80 mg/kg.

[0071] Las **FIGS. 11A-11B** muestran el efecto del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 en los niveles de sTREM2 en el fluido cerebrospinal (CSF) de monos cynomolgus. La **FIG. 11A** muestra los niveles (ng/mL) de sTREM2 en el CSF de monos cynomolgus a las horas indicadas luego de administrado un anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 o un anticuerpo de control del isotipo (hulgG1), en ambos casos con una dosis de 80 mg/kg. La **FIG. 11B** muestra los niveles de sTREM2 (porcentaje de la línea de base) en el CSF de monos cynomolgus a las horas indicadas luego de administrado un anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 o anticuerpo de control de isotipo (hulgG1), en ambos casos con una dosis de 80 mg/kg.

[0072] **FIG. 12** establece datos que muestran curvas de unión de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 de tipo silvestre (WT, en inglés) hulgG1 y 4A-450 WT hulgG1 a células U937 que expresan MS4A4A recombinante humano.

[0073] La **FIG. 13** establece datos que muestran niveles de membrana TREM2 en macrófagos primarios humanos tratados con anticuerpos anti-MS4A4A 4A-450 WT hulgG1, 4A-450 NSLF hulgG1, y 4A-450 K322A hulgG1.

[0074] La **FIG. 14** establece datos que muestran niveles de membrana TREM2 en macrófagos primarios humanos tratados con anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 WT hulgG1, 4A-313 NSLF hulgG1, y 4A-313 K322A hulgG1.

[0075] La **FIG. 15** establece datos que muestran niveles aumentados de TREM2 soluble en el sobrenadante de macrófagos primarios humanos tratados con anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450 hulgG1.

[0076] La **FIG. 16** establece datos que muestran niveles aumentados de TREM2 soluble en el sobrenadante de macrófagos primarios humanos tratados con anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 hulgG1.

[0077] La **FIG. 17** establece datos que muestran niveles aumentados de ATP macrófagos primarios humanos tratados con anticuerpos anti-MS4A4A 4S-313 NSLF hulgG1, 4A-313 PS hulgG1, 4A-450.NSLF hulgG1, y 4A-450.PS hu IgG1.

[0078] Las **FIGS. 18A, 18B, y 18C** establecen datos que muestran cambios en los niveles de CD14, CD163, y CD200R (respectivamente) en macrófagos primarios humanos tratados con anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 NSLF hulgG1 y 4A-419 WT hulgG1.

[0079] La **FIG. 19** establece datos que muestran actividad citotóxica de complemento (CDC) dependiente de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 NSLF hulgG1, 4A-313 K322A hulgG1 y 4A-313 WT

hulgG1 en células U937 que expresan MS4A4A recombinante humano, según mediciones por captación de yoduro de propidio.

[0080] La **FIG. 20** establece datos que muestran la actividad ADCP (fagocitosis celular dependiente de anticuerpos) de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 NSLF hulgG1, 4A-313 K322A hulgG1, y 4A-313 WT hulgG1 en macrófagos primarios humanos según mediciones por activación de FcγRIIIa.

[0081] La **FIG. 21** establece datos que muestran la actividad ADCC de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 NSLF hulgG1, 4A-313 K322A hulgG1, y 4A-313 WT hulgG1 en macrófagos primarios humanos según mediciones por activación de FcγRIIIa.

[0082] Las **FIGS. 22A y 22B** establecen datos que muestran el efecto de MS4A4A knockout en TREM2 membrana (**FIG. 22A**) y TREM2 soluble (**FIG. 22B**) en macrófagos primarios humanos.

[0083] Las **FIGS. 23A, 23B, y 23C** establecen datos que muestran la cinética de cambios en los niveles proteicos en TREM2 soluble, TREM2 membrana y en los niveles de TREM2 ARNm respectivamente, en macrófagos humanos tratados con anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0084] Las **FIGS. 24A y 24B** establecen datos que muestran modificación genética (knockdown) de siARN de los niveles de MS4A4A aumentados de TREM2 membrana y TREM2 soluble en macrófagos humanos.

[0085] Las **FIGS. 25A, 25B, y 25C** establecen datos que muestran un aumento dependiente de la dosis en los niveles de TREM2 membrana en macrófagos primarios humanos de tres donantes diferentes luego del agregado de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0086] Las **FIGS. 26A, 26B, y 26C** establecen datos que muestran un aumento dependiente de la dosis en los niveles de TREM2 soluble en macrófagos primarios humanos de tres donantes diferentes luego del agregado de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0087] Las **FIGS. 27A, 27B, y 27C** establecen datos que muestran un aumento dependiente de la dosis en los niveles de ATP en macrófagos primarios humanos de tres donantes diferentes luego del agregado de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0088] Las **FIGS. 28A y 28B** establecen datos que muestran que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención resultan efectivos para rescatar la muerte celular inducida por inhibición de CSF1R.

[0089] La **FIG. 29** muestra una gráfica volcánica de los efectos de la proteoma en el CSF de monow cynomolgus tras la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención.

[0090] La **FIG. 30** establece datos que muestran niveles aumentados de sTREM2 en suero de monos cynomolgus tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0091] Las **FIGS. 31A, 31B, 31C, y 31D** establecen datos que muestran niveles aumentados de osteopontina en el CSF de monos cynomolgus tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0092] Las **FIGS. 32A y 32B** establecen datos que muestran niveles aumentados de osteopontina en la corteza frontal e hipocampo, respectivamente, en el cerebro de monos cynomolgus tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0093] Las **FIGS. 33A y 33B** establecen datos que muestran niveles aumentados de CSF1R en la corteza frontal e hipocampo, respectivamente, en el cerebro de monos cynomolgus tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0094] Las **FIGS. 34A y 34B** establecen datos que muestran increased total TREM2 niveles proteicos in frontal cortex y hippocampus, respectivamente, in cynomolgus monkey brains following administration of anti-MS4A4A antibodies of the present disclosure.

[0095] Las **FIGS. 35A, 35B, y 35C** establecen datos que muestran cambios en los niveles de ARNm en marcadores de activación, migración y proliferación de microglías aisladas del cerebro de monos cynomolgus a los que se administró anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención.

[0096] La **FIG. 36** establece datos que muestran la expression disminuida de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención de la proteína etiquetada HA-Snorkel MS4A4A expresada recombinantemente en las células U937.

[0097] La **FIG. 37** establece datos que muestran la expresión reducida de GPNMB (Glicoproteína, proteína B del melanoma no metastásico) en la superficie celular en macrófagos primarios humanos.

DESCRIPCIÓN EN DETALLE DE LA PRESENTE REVELACIÓN

[0098] La presente revelación se relaciona con anticuerpos anti-MS4A4A (*p.ej.*, anticuerpos monoclonales); métodos para producir y utilizar tales anticuerpos; composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos; ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos; y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos.

[0099] Las técnicas y procedimientos que aquí se describen o se citan como referencia son por lo general bien comprendidos y comúnmente empleados utilizando metodología convencional por parte de personas expertas en la técnica, tomo por ejemplo las metodologías ampliamente utilizadas tales como las descritas en Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* editores, (2003); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, editores, Oxford University Press, 2000).

I. Definiciones

[0100] Los términos "MS4A4A" o "polipéptido MS4A4A" se emplean indistintamente aquí y se refieren en la presente a todo MS4A4A nativo de cualquier fuente de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como primates (*p.ej.*, humanos y monos) y roedores (*p.ej.*, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En algunas formas de realización, el término comprende tanto secuencias de tipo silvestre como secuencias con variantes que ocurren en estado natural, *p.ej.*, variantes de empalme o variantes alélicas. En algunas formas de realización, el término comprende MS4A4A "de máxima extensión" así como cualquier forma de MS4A4A que resulte de un proceso intracelular. En algunas formas de realización, el MS4A4A es MS4A4A humano. En algunas formas de realización, la secuencia de aminoácido de un MS4A4A usado como ejemplo es Uniprot Accession No. Q96JQ5 al 1 de diciembre de 2001. En algunas formas de realización, la secuencia de aminoácido de un MS4A4A humano usado como ejemplo es el SEQ ID NO: 1.

[0101] Los términos "anti-MS4A4A anticuerpo", un "anticuerpo que se liga a MS4A4A" y "anticuerpo que se liga específicamente a MS4A4A" se refieren a un anticuerpo que es capaz de ligar MS4A4A con tal suficiente afinidad que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico que tiene como blanco MS4A4A. En una forma de realización, el grado de ligadura de un anticuerpo anti-MS4A4A a un polipéptido no relacionado, no-MS4A4A es de menos de alrededor 10% de la ligadura del anticuerpo a MS4A4A medido, *p.ej.*, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización un anticuerpo que se liga a MS4A4A tiene una constante de disociación (KD) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0,1 \text{ nM}$, $< 0,01 \text{ nM}$, o $< 0,001 \text{ nM}$ (*p.ej.*, 10^{-8} M o menos, *p.ej.* desde 10^{-8} M hasta 10^{-13} M , *p.ej.*, desde 10^{-9} M hasta 10^{-13} M). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A se liga a un epítipo de MS4A4A que está conservado entre MS4A4A de diferentes especies.

[0102] Con respecto a la ligadura de un anticuerpo a una molécula blanco, el término "ligadura específica" o "se liga específicamente" o es "específica para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido blanco particular significa ligadura que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La ligadura específica puede ser mensurada, por ejemplo, al determinar la ligadura de una molécula en comparación con la ligadura de una molécula de control. Por ejemplo, la ligadura específica puede ser determinada por competición con una molécula de control que es similar al blanco, por ejemplo, un exceso de blanco no marcado. El término "ligadura específica" o "se liga específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido blanco particular como se lo utiliza aquí puede exhibirse, por ejemplo, por una molécula que tenga un KD para el blanco de alrededor de alguno de 10^{-4} M o inferior, 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, 10^{-12} M o inferior o un KD en el rango de 10^{-4} M a 10^{-6} M o 10^{-6} M a 10^{-10} M o 10^{-7} M to 10^{-9} M . Como podrá apreciar el experto en la

técnica, la afinidad y los valores KD están inversamente relacionados. Una elevada afinidad para un antígeno se mide por un bajo valor KD. En una forma de realización, el término “ligadura específica” se refiere a la ligadura en la que una molécula se liga a un polipéptido particular o a un epítipo en un polipeptido particular sin ligarse en forma sustancial a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

- 5 **[0103]** El término “*inmunoglobulina*” (Ig) se emplea en la presente en forma indistinta con “*anticuerpo*”. El término “anticuerpo” se emplea en la presente en el sentido más amplio y cubre especialmente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (*p.ej.*, anticuerpos biespecíficos) incluyendo aquellos formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo siempre que exhiban la actividad biológica deseada.
- 10 **[0104]** “*Anticuerpos nativos*” son por lo general glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 Daltons, compuestas por dos cadenas Ligeras (“L”) idénticas y por dos cadenas pesadas (“P”) idénticas. Cada cadena ligera se encuentra vinculada a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente, mientras que la cantidad de enlaces de disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes de
- 15 disulfuros intracatenarios a espacios regulares. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una cantidad de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos
- 20 particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.
- [0105]** Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, ver *p.ej.*, *Basic and Clinical Immunology*, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (editores), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, pág. 71 y capítulo 6.
- [0106]** La cadena ligera de cualquier especie de vertebrados puede asignarse a uno de dos tipos
- 25 claramente distintos, llamados kappa (“κ”) y lambda (“λ”), basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Según la secuencia de aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas alfa (“α”), delta (“δ”), epsilon (“ε”), gamma (“γ”), y mu (“μ”), respectivamente. Las clases “γ” y “α” están a su vez divididas
- 30 en subclases (isotipos) con base en diferencias relativamente menores en la secuencia CH y función, *p.ej.*, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. A las estructuras de sub-unidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas se las conoce y se las describe en general en por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 4ª ed. (W.B. Saunders Co., 2000).

[0107] La “*región variable*” o el “*dominio variable*” de un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, se refiere a los dominios amino-terminales de la cadena pesada o de la cadena ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera pueden ser referidos como “V_H” y “V_L”, respectivamente. Estos dominios son por lo general las partes más variables del anticuerpo (en relación con otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de ligadura del antígeno.

[0108] El término “*variable*” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos, tales como anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación. El dominio variable media ligadura de antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no está distribuida en forma uniforme a través de todo el espectro de los dominios variables. En cambio, está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones mejor conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas nativas pesadas y ligeras comprenden cada uno cuatro regiones FR, y adoptan en una configuración general de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan con la estructura de lámina beta, y en algunos casos forman parte de dicha estructura. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas próximas a las regiones FR, y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de ligadura del antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la ligadura del anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de un anticuerpo.

[0109] El término “*anticuerpo monoclonal*” según se lo utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo, tal como anticuerpo monoclonal anti-MS4A4A de la presente revelación, obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren en forma natural y/o modificaciones pos-traslación (*p.ej.*, isomerizaciones, amidaciones, *etc.*) que pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. A diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de ser sintetizados por el cultivo hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y

no se debe interpretar que requieren la producción del anticuerpo por un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizarse de acuerdo con la presente revelación pueden ser el resultado de diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método hibridoma, métodos de ADN recombinante, y tecnologías para producir anticuerpos humanos o cuasi-humanos en animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana.

[0110] Los términos “*anticuerpo de máxima extensión*”, “*anticuerpo intacto*” o “*anticuerpo completo*” se emplean indistintamente para referirse aun anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesada y ligera incluyendo una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (*p.ej.*, dominios constantes de secuencia nativa humana) o sus variantes de secuencia de aminoácidos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

[0111] Un “*fragmento de anticuerpo*” se refiere a una molécula que no sea un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se liga al antígeno al cual se liga el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver Patente de los Estados Unidos de América 5641870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0112] La digestión de anticuerpos de papaína, tales como anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, produce dos fragmentos idénticos de ligadura de antígenos, llamados fragmentos “*Fab*” y un fragmento “*Fc*”, designación que refleja la capacidad de cristalizar en forma inmediata. El fragmento Fab consta de una cadena ligera entera junto con el dominio de región variable de la cadena pesada (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la ligadura del antígeno, es decir, tiene un único sitio de ligadura del antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un fragmento grande único F(ab')₂ que corresponde a grandes rasgos a dos fragmentos Fab ligados disulfuro que tienen diferente actividad de ligadura de antígenos y conservan la capacidad de ligadura cruzada del antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que poseen residuos adicionales en la terminal carboxi del dominio C_{H1}, incluyendo uno o más cisteínas de la región bisagra de los anticuerpos. Fab'-SH es la designación que aquí se le da a Fab' donde el/los residuo(s) de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas entre ellos. También se conocen otras duplas químicas de fragmentos de anticuerpos.

[0113] El fragmento Fc comprende las porciones de terminal carboxi de ambas cadenas pesadas unidas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por secuencias en la región Fc, región que también es reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

5 [0114] Los “*Fragmentos funcionales*” de anticuerpos, tales como anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, comprenden una porción de un anticuerpo intacto, incluyendo por lo general la ligadura del antígeno o la región variable del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que retiene o ha modificado la capacidad de ligadura de FcR. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos
10 formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0115] El término “*diacuerpos*” se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos preparados para construir fragmentos sFv (ver el párrafo precedente) con residuos de conexión escasos (unos 5 a 10) entre los dominios V_H y V_L de modo tal que se produzca acople entre cadenas pero no intracatenario, resultando por lo tanto en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de
15 ligadura de antígenos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “transversales” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes de las diferentes cadenas de polipéptidos.

[0116] Según se lo utiliza aquí, un “*anticuerpo quimérico*” se refiere a un anticuerpo (inmunoglobulina), tal como un anticuerpo quimérico anti-MS4A4A de la presente revelación, en el cual una porción de la
20 cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los antibióticos
25 quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos PRIMATIZED® (PRIMATIZADOS) en los que la región del anticuerpo de ligadura del antígeno deriva de un anticuerpo producido, *p.ej.*, al inmunizar monos macacos con un antígeno de interés. Según se usa en la presente, “anticuerpo humanizado” usa un subgrupo de “anticuerpos quiméricos”.

[0117] Las formas “*humanizadas*” de anticuerpos no humanos (*p.ej.*, murinos), tales como formas
30 humanizadas de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, son anticuerpos quiméricos que comprenden residuos aminoácidos de HVR no humanos y residuos aminoácidos de FR humanas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas de cada HVR (*p.ej.* CDR) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente

todas de cada FR corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender en forma opcional por lo menos una porción de la región constante del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, *p.ej.*, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que ha sufrido humanización.

5 [0118] Un “anticuerpo humano” es un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, que posee una secuencia de aminoácido correspondiente a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que ha sido producido utilizando alguna de las técnicas para hacer anticuerpos humanos según se expone en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de ligadura a antígenos no
10 humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando diversas vías conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de expresión en fagos y bibliotecas de expresión en levaduras. Los anticuerpos humanos pueden prepararse por medio de la administración del antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido inhabilitados, *p.ej.*, xenoratonos inmunizados así como
15 generados mediante una tecnología de hibridoma de célula B humana.

[0119] El término “*región hipervariable*”, “HVR”, o “HV”, cuando se lo utiliza en la presente se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo, tal como el de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Por lo general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la V_H (H1, H2, H3), y tres en la V_L (L1, L2,
20 L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único en conferir la justa especificidad a los anticuerpos. Los anticuerpos de camélidos que ocurren en forma natural y que constan de una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera.

[0120] Hay en uso una cantidad de delineaciones de HVR y están incluidas aquí. En algunas formas de
25 realización, las HVR pueden ser regiones que determinan la complementaridad de Kabat (CDR) con base en la variabilidad de secuencia y son las de uso más común (Kabat *et al.*, *arriba*). En algunas formas de realización, las HVR pueden ser CDR Chothia. Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). En algunas formas de realización, las HVR pueden ser HVR AbM. Las HVR AbM representan una solución intermedia entre
30 las CDR Kabat y los bucles estructurales, y se las utiliza en el software de modelo de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. En algunas formas de realización, las HVR pueden ser HVR de “contacto”. Las HVR de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras complejas de cristal disponibles. Los residuos de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
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
5 H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

10 **[0121]** Las HVR pueden comprender “HVR ampliadas” según lo siguiente: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2), y 89-97 o 89-96 (L3) en la VL, y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (realización preferida) (H2), y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos de dominio variable están numerados de acuerdo con Kabat *et al.*, *arriba*, para dada una de estas definiciones de HVR ampliadas.

[0122] Los residuos “marco” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable que no son residuos HVR según se los define en la presente.

15 **[0123]** Un “marco humano aceptante” según se utiliza aquí es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco V_L o V_H derivado de un marco humano de inmunoglobulina o un marco humano de consenso. Un marco humano aceptante “derivado de” un marco humano de inmunoglobulina o un marco humano de consenso puede comprender su misma secuencia de aminoácidos, o puede comprender cambios en la secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas
20 formas de realización, la cantidad de cambios de aminoácidos preexistentes es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. Cuando los cambios de los aminoácidos preexistentes están presentes en una VH, preferentemente esos cambios ocurrirán en solamente tres, dos, o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en esas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una forma de realización, el marco
25 humano aceptante VL es idéntico en secuencia a la secuencia del marco humano de inmunoglobulina V_L o secuencia del marco humano de consenso.

[0124] Un “marco humano de consenso” es un marco que representa los residuos de aminoácidos que ocurren con mayor frecuencia en una selección de secuencias marco humano de inmunoglobulina V_L o V_H . Por lo general, la selección de secuencias marco humano de inmunoglobulina V_L o V_H proviene de
30 un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los ejemplos incluyen para la V_L , el subgrupo puede ser subgrupo kappa I, kappa II, kappa III o kappa IV como en Kabat *et al.*, *arriba*.

Además, para la V_H, el subgrupo puede ser subgrupo I, subgrupo II, o subgrupo III como en Kabat *et al.*, *arriba*.

[0125] Una “*modificación de “aminoácido”* en una posición específica, *p.ej.*, de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, se refiere a la sustitución o eliminación del residuo específico, o la inserción de por lo menos un residuo de aminoácido adyacente al residuo específico. “*Adyacente*” a un residuo específico significa inserción dentro de uno a dos residuos del mismo. La inserción puede ser terminal-N o terminal-C al residuo específico. Una modificación preferida de aminoácido en la presente es una sustitución.

[0126] Un anticuerpo “*maduro por afinidad*”, tal como un anticuerpo anti-MS4A4A maduro por afinidad de la presente revelación, es uno con una o más alteraciones en una o más HVR de la misma que resulta en una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo madre que no posee dicha alteración o alteraciones. En una forma de realización, un anticuerpo maduro por afinidad tiene afinidades nanomolares o aun picomolares para el antígeno blanco. Los anticuerpos maduros por afinidad son producidos por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe maduración de afinidad por combinación de dominios V_H- y V_L. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o residuos marco es descrita por, por ejemplo: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al. J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); and Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0127] “*Fv*” es el mínimo fragmento de anticuerpo que comprende un sitio de completo de reconocimiento de antígeno y de ligadura. Este fragmento consta de un dímero de un dominio variable de una región pesada y una ligera en asociación estrecha, no covalente. Desde el pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada cadena, la pesada y la ligera) que contribuyen a los residuos de aminoácidos para ligadura de antígeno y le confieren al anticuerpo especificidad de ligadura de antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o medio de una Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y ligar antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio completo de ligadura.

[0128] “*Fv de cadena simple*” también abreviados “*sFv*” o “*scFv*” son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados a una cadena simple de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L, lo que permite que sFv forme la estructura deseada para la ligadura del antígeno.

[0129] Las “*funciones efectoras*” del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (secuencia nativa de la región Fc o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varía según el isotipo del anticuerpo.

[0130] El término “*región Fc*” se emplea aquí para definir una región terminal-C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada IgG humana está definida generalmente por extenderse desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el terminal carboxilo de la misma. La lisina de terminal-C (residue 447 según el sistema de numeración de la Unión Europea) de la región Fc puede ser extraída, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o al actuar en forma recombinante sobre el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Del mismo modo, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con la totalidad de los residuos K447 removido, y poblaciones de anticuerpos que tengan una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia nativa aptas para su uso en los anticuerpos de la presente revelación incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

[0131] Una “*región Fc nativa*” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc en estado natural. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG1 humana de secuencia nativa (alotipos no-A y A); región Fc IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc IgG4 humana de secuencia nativa, así como sus variantes halladas en la naturaleza.

[0132] Una “*región Fc variante*” comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de aquella de una región Fc de secuencia nativa en virtud de por lo menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene por lo menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con una región Fc de un polipéptido madre, *p.ej.* de alrededor de una a alrededor de diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de alrededor de una a alrededor de cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido madre. La región Fc variante en la presente tendrá preferentemente por lo menos alrededor de un 80% de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido madre, y más preferentemente por lo menos alrededor de un 90% de homología con lo que queda dicho, más preferentemente por lo menos alrededor de un 95% de homología con lo que se ha mencionado.

[0133] “*receptor Fc*” o “*FcR*” describe un receptor que se liga a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno que se liga a un anticuerpo IgG (receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas de empalme de estos receptores, FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activante”), y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias similares de aminoácidos que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor

activante FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunoreceptor con base en tirosina (“ITAM”) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibitor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor con base en tirosina (“ITIM”) en su dominio citoplasmático. Otras FcR, incluyendo aquellas a ser identificadas en el futuro, están abarcadas por el término “FcR” empleado en la presente.

5 Las FcR también pueden incrementar la vida media en suero de los anticuerpos.

[0134] Según se los emplea en la presente, “*porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácido*” y “*homología*” con respecto a una secuencia de anticuerpo de un péptido, polipéptido o anticuerpo se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de un péptido o polipéptido específico, después de alinear las
10 secuencias e introducir brechas, de ser necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin considerar sustituciones conservadoras como parte de la identidad de la secuencia. La alineación a los efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas formas dentro del conocimiento en la técnica, por ejemplo, utilizando software de uso público tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la
15 técnica pueden determinar parámetros apropiados para la alineación de medida, incluyendo un algoritmo conocido en la técnica necesario para lograr máxima alineación sobre la extensión total de las secuencias que se comparan.

[0135] El término “*competir*” cuando se lo utiliza en el contexto de anticuerpos (*p.ej.*, anticuerpos neutralizantes) que compiten por el mismo epítipo significa competencia entre anticuerpo según lo
20 determinado en un ensayo en el cual el anticuerpo sometido a prueba evita o inhibe (*p.ej.*, reduce) ligadura específica de una molécula de referencia (*p.ej.*, un ligante o anticuerpo de referencia) a un antígeno común (*p.ej.*, MS4A4A o un fragmento del mismo). Se pueden usar numerosos tipos de ensayos de ligadura competitiva para determinar si un anticuerpo compete con otro, por ejemplo radioinmunoensayo de fase sólida directa o indirecta (RIA), radioinmunoensayo de enzima de fase
25 sólida directa o indirecta (EIA), ensayo de competencia sandwich (ver, *p.ej.*, Stahli *et al.*, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); EIA de fase sólida directa con biotina-avidina (ver, *p.ej.*, Kirkland *et al.*, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619) ensayo marcado de fase sólida directa, (ver, *p.ej.*, Harlow & Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA marcada de fase sólida directa utilizando marcado 1-125 (ver, *p.ej.*, Morel *et al.*, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); EIA de fase sólida
30 directa con biotina-avidina xxsolid phase direct biotin-avidin EIA (ver, *p.ej.*, Cheung, *et al.*, 1990, Virology 176:546-552); y RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Generalmente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado ligado a una superficie sólida o células que tienen alguno de ellos, un anticuerpo no marcado de prueba y un anticuerpo marcado de referencia. La inhibición de competencia se mide mediante la determinación de la cantidad de marcado

- ligada a la superficie sólida o células en presencia del anticuerpo de prueba. Por lo general hay una presencia excesiva del anticuerpo de prueba. Los anticuerpos identificados por ensayo de competencia (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se ligan al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y los anticuerpos que se ligan a un epítipo adyacente lo suficientemente proximal al epítipo ligado por el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico. Aparecen detalles adicionales respecto de métodos para determinar ligadura competitiva en los ejemplos que aquí se incluyen. Por lo general, cuando hay presencia excesiva de un anticuerpo competitivo, el mismo inhibirá (p.ej., reducirá) ligadura específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en por lo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, y/o cerca de 100%.
- 5
- 10 **[0136]** Según se emplea en la presente, una “*interacción*” entre un polipéptido MS4A4A y un segundo polipéptido abarca, sin limitación, interacción proteína-proteína, una interacción física, una interacción química, ligadura, ligadura covalente, y ligadura iónica. Según aparece en la presente, un anticuerpo “*inhibe interacción*” entre dos polipéptidos cuando el anticuerpo interrumpe, reduce o elimina por completo una interacción entre dos polipéptidos. Un anticuerpo de la presente revelación, en la misma,
- 15 “*inhibe interacción*” entre dos polipéptidos cuando el anticuerpo de los mismos se liga a uno de los dos polipéptidos. En algunas formas de realización, la interacción puede ser inhibida por lo menos en algún valor de entre 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, y/o cerca de 100%.
- [0137]** El término “*epítipo*” incluye todo determinante capaz de ser ligado por un anticuerpo. Un epítipo es una región de un antígeno que es ligada por un anticuerpo que tiene como blanco dicho
- 20 antígeno, y cuando el antígeno es un polipéptido, incluye aminoácidos específicos que hacen contacto directo con el anticuerpo. La mayoría de las veces, los epítipos residen en polipéptidos, pero en algunos casos pueden residir en otros tipos de moléculas, tales como ácidos nucleicos. Los determinantes de epítipos pueden incluir grupos de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforil o sulfonil, y pueden tener
- 25 características estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga. Por lo general, los anticuerpos específicos para un antígeno de un blanco particular reconocerán preferentemente un epítipo en el antígeno blanco en una mezcla compleja de polipéptidos y/o macromoléculas.
- [0138]** Un anticuerpo “*agonista*” o un anticuerpo “*activante*” es un anticuerpo que induce (p.ej., aumenta) una o más actividades o funciones del antígeno después de que el anticuerpo se liga al antígeno.
- 30 **[0139]** Un anticuerpo “*antagonista*” o un anticuerpo “*bloqueador*” o un anticuerpo “*inhibitorio*” es un anticuerpo que reduce, inhibe, y/o elimina (p.ej., disminuye) la ligadura de antígeno a uno o más ligandos después de que el anticuerpo se liga al antígeno, y/o que reduce, inhibe y/o elimina (p.ej.,

disminuye) una o más actividades o funciones del antígeno después de que el anticuerpo se liga al antígeno. En algunas formas de realización, anticuerpos antagonistas, o anticuerpos bloqueadores, o anticuerpos inhibidores inhiben sustancial o completamente la ligadura del antígeno a uno o más ligandos y/o a una o más actividades o funciones del antígeno.

5 **[0140]** Un anticuerpo “*aislado*”, tal como un anticuerpo aislado anti-MS4A4A de la presente revelación, es uno que ha sido identificado, separado y/o recuperado de un componente de su ambiente de producción (*p.ej.*, natural o recombinantemente). Los componentes contaminantes desde su ambiente de producción, tales como los que resultan de células recombinantes transfectadas, son materiales que generalmente interfieren con la investigación, el diagnóstico o usos terapéuticos para el anticuerpo, y
10 pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En formas de realización preferenciales, el anticuerpo será purificado (1) a más del 95% por peso del anticuerpo según se determine, por ejemplo, por el método Lowry, y en algunas formas de realización, a más del 99% por peso; (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de terminal-N o secuencia interna de aminoácido por uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad
15 por SDS-PAGE en condiciones de reducción o no reducción utilizando tinción con azul Coomassie o preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el ambiente natural del anticuerpo *in situ* dentro de las células-T recombinantes ya que por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, sin embargo, se habrá preparado un polipéptido o anticuerpo para por lo menos un paso de purificación.

20 **[0141]** Una molécula de ácido nucleico “*aislada*” que codifica un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, es una molécula de ácido nucleico que está identificada y separada de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual está comúnmente asociada en el ambiente en el que fue producida. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el ambiente de producción. Las moléculas
25 aisladas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos y anticuerpos en la presente aparecen en una forma que no es la forma o ambiente en que se las halla en estado natural. Las moléculas aisladas de ácido nucleico se distinguen por lo tanto del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos de la presente que existen naturalmente en las células.

[0142] El término “*vector*,” según se lo utiliza aquí, busca referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha ligado. Un tipo de vector es un plásmido, que se
30 refiere a un ADN circular de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector viral, donde pueden estar ligados segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. Ciertos vectores tienen la capacidad de replicación autónoma en una célula huésped en la cual se introducen (*p.ej.*, vectores bacteriales que tienen un

origen bacterial de replicación y vectores episomales en mamíferos). Otros vectores (*p.ej.* vectores no episomales en mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped a la introducción de la célula huésped, y de ese modo son replicadas junto con el genoma huésped. Asimismo, ciertos vectores tienen la capacidad de dirigir la expresión de genes a los cuales están ligados operativamente.

5 Aquí se hace referencia a tales vectores como “vectores de expresión recombinante” o simplemente, “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante aparecen muchas veces en forma de plásmidos. En la presente especificación, “plásmido” y “vector” pueden emplearse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada.

10 **[0143]** “*Polinucleótido*,” o “*ácido nucleico*,” según se emplean en forma indistinta en la presente, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier extensión, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero por polimerasa de ADN o ARN o por una reacción sintética.

15 **[0144]** Una “*célula huésped*” incluye una célula individual o cultivo de células que haya sido o pueda ser receptor de vector(es) para la incorporación de inserciones de polinucleótidos. Las células huésped incluyen progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN genómico) a la célula madre original debido a mutación natural, accidental, o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas in vivo con un(os)
20 polinucleótido(s) de la presente revelación.

[0145] Los términos “*membrana TREM2*”, “*membrana de plasma TREM2*”, y “*superficie celular TREM2*”, según se utilizan en la presente, se emplean indistintamente.

[0146] “*Vehículos*” según se emplea en la presente, incluye vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores que son no-tóxicos para la célula o para el mamífero aquí expuesto a las
25 dosis y concentraciones empleadas.

[0147] Según se lo emplea en la presente, el término “*preventivo*” incluye realizar profilaxis respecto de la ocurrencia o recurrencia de una enfermedad, de un trastorno o condición particular de un individuo. Un individuo puede estar predispuesto, o ser susceptible a una enfermedad, trastorno o condición particular, o en riesgo de desarrollar tal enfermedad, trastorno o condición, pero aún no se lo ha
30 diagnosticado con la enfermedad, trastorno o condición.

[0148] Según se emplea el término en la presente, un individuo “*en riesgo*” de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición particular puede o no tener enfermedad detectable o síntomas de enfermedad, y puede o no haber exhibido enfermedad detectable o síntomas de enfermedad antes de los métodos de tratamiento que aquí se describen. “*En riesgo*” denota que un individuo tiene uno o más

factores de riesgo, que son parámetros mensurables que guardan correlación con el desarrollo de una enfermedad, trastorno o condición particular, según se conoce en la técnica. Un individuo con uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición particular que un individuo sin uno o más de estos factores de riesgo.

5 **[0149]** Según se lo emplea en la presente, el término “*tratamiento*” se refiere a la intervención clínica destinada a alterar el curso natural del individuo tratado durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la disminución del índice de avance, mejoramiento o paliativo del estado patológico, y remisión o prognosis mejorada de una enfermedad, trastorno, o condición particular. Un individuo es “*tratado*” con éxito, por ejemplo, si uno o más síntomas asociados
10 con una enfermedad, trastorno, o condición particular es/son mitigado(s) o eliminado(s).

[0150] Una “*cantidad efectiva*” se refiere a por lo menos una cantidad efectiva, en las dosis y por períodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad efectiva se puede proporcionar en una o más administraciones. Una cantidad efectiva aquí puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la
15 capacidad del tratamiento para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad efectiva es también una en la que todo efecto tóxico o perjudicial del tratamiento es ampliamente contrarrestado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como eliminar o reducir el riesgo, atenuar la severidad, o dilatar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas biomédicos, histológicos y/o actitudinales de la
20 enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presenten durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como disminuir uno o más síntomas que resulten de la enfermedad, aumentando la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminuyendo la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, mejorando el efecto de otra medicación tal como dirigirse a un blanco, demorando el avance de la enfermedad y/o prolongando la sobrevida. Una
25 cantidad efectiva de droga, compuesto, o preparado farmacéutico es una cantidad suficiente para alcanzar tratamiento profiláctico o terapéutico ya sea directa o indirectamente. Según se entiende en el contexto clínico, se puede alcanzar o no una cantidad efectiva de droga, compuesto, o preparado farmacéutico en conjunción con otra droga, compuesto o preparado farmacéutico. De este modo, una
30 “*cantidad efectiva*” puede ser considerada en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos, y se puede considerar que un agente único se administra en una dosis efectiva, si en conjunción con uno o más de otros agentes, se puede lograr o se logra un resultado deseable.

[0151] Un “*individuo*” a los efectos de tratamiento, prevención o reducción de riesgo se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y

animales de zoológico, de deportes, o de compañía, tales como perros, caballos, conejos, ganado vacuno, cerdos, hámsters, gerbos, ratones, tejones, ratas, gatos y similares. En algunas formas de realización, el individuo es humano.

[0152] Según se la usa aquí, la administración “*en conjunción*” con otro compuesto o composición incluye administración simultánea y/o administración en momentos diferentes. La administración en conjunción también abarca administración como una co-formulación o administración como composiciones separadas, incluyendo en diferentes frecuencias de dosis o intervalos, y utilizando la misma ruta de administración o diferentes rutas de administración. En algunas formas de realización, la administración en conjunción es administración como parte del mismo régimen de tratamiento.

[0153] El término “*alrededor*” según se lo emplea aquí se refiere al rango usual de error para el valor respectivo bien conocido por el experto en la técnica en este campo técnico. La referencia a “*alrededor*” de un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) formas de realización que están dirigidas a dicho valor o parámetro *per se*.

[0154] Según se las utiliza aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un “anticuerpo” es una referencia a uno o muchos anticuerpos, tales como cantidades molares, e incluye equivalentes del mismo conocidos por expertos en el arte, y así en otros casos.

[0155] Se entiende que los aspectos y las formas de realización de la presente revelación que aquí se describen incluyen “que comprende”, “que consiste” y “que esencialmente consta de” aspectos y formas de realización.

II. Anticuerpos anti-MS4A4A

[0156] Aquí aparecen anticuerpos anti-MS4A4A. Los anticuerpos que aquí aparecen son útiles *p.ej.*, para el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con MS4A4A.

[0157] En un aspecto, la presente revelación trae anticuerpos aislados (*p.ej.*, monoclonales) que se ligan a un epítipo dentro de una proteína MS4A4A de la presente revelación. Las proteínas MS4A4A de la presente revelación incluyen, sin limitación, una proteína MS4A4A de mamífero, proteína MS4A4A humana, proteína MS4A4A de ratón, y proteína MS4A4A de mono. Las proteínas MS4A4A de la presente revelación incluyen variantes de MS4A4A en estado natural.

[0158] La MS4A4A humana es una proteína de aminoácido 239 que codifica una glicoproteína de membrana. La secuencia de la MS4A4A humana está establecida en el SEQ ID NO:1:

```
MHQTYSRHRCPPEESTFSAAMTTMQGMEQAMPGAGPGVPQLGNMAVIHSHLWKGLQEKFLKGEPKVL
GVVQILTALMSLSMGITMMCMASNTYGSNPISVYIGYTIWGSVMFIISGSLSIAAGIRTTKGLVRGSLGMNI
TSSVLAASGILINTFSLAFYSFHHPYCNYYGNSNNCHGTMSILMGLDGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFGCKV
LCCTPGGVVLILPSHSHMAETASPTPLNEV
```

[0159] Además, la secuencia de aminoácido de MS4A4A de ratón está establecida en el SEQ ID NO:2:
MLVIQGTEQSALEAGYGAQQNGQPLYVNSHSWKRMTEKFLKGEPKILGIVQIVIAIMNLSIGIMMIIATVST
GEIPPSSVYIGYPIWGSMLFIISGSFSIVAGRRTTKGLVRSSLGLNITSSVFAFSGIVISSLSPGIYSFHVYY
CTYRGSSEGCHMTLSILMGLDIVVVVLSVLEFCIGVSLSAFGCRMCCNPGGVMIIMPSNPTKAETANPV
5 TLQSGLMPPEHQERNVPENMH

[0160] Además, la secuencia de aminoácido de MS4A4A de cynomolgus (mono) está establecida en el
SEQ ID NO:3:

[0161] HQTYYRRHCRPEESTFSAAMTTMQGMEQATPGAGPGVPQLGNMAVVHSHLWKGLQEKFLLKGE
PKVLGVVQILIALMSLSMGITMMCVAFSAYGHYPISVYIGYTIWGSVMFIISGSLSIAAGIRTTKGLVRGSL
10 GMNITSSVLAVSAILINTISLTIYSFYHRYCNYYGNPNNCHGTVSILMGMDGMVLLLSVLEFCIAVSLSAFG
CKAICCTPGGVVLIIPSNHMAEAAPLTPLNEV

[0162] En algunas formas de realización MS4A4A se expresa en una célula. En algunas formas de
realización, MS4A4A se expresa en células mieloides. En algunas formas de realización, MS4A4A se
expresa en células cerebrales. En algunas formas de realización, MS4A4A se expresa en astrocitos,
15 incluyendo sin limitación astrocitos maduros. En algunas formas de realización, MS4A4A se expresa en
oligodendrocitos. En algunas formas de realización, MS4A4A se expresa en células microgliales. En
algunas formas de realización, MS4A4A se expresa en células inmunes, incluyendo sin limitación
macrófagos, eosinófilos, células mastoides, células dendríticas, células destructoras naturales,
neutrófilos, y células-T. En algunas formas de realización, MS4A4A se expresa en células olfatorias. En
20 algunas formas de realización, MS4A4A se expresa en la superficie celular.

[0163] Las proteínas MS4A4A de la presente revelación incluye varios dominios, incluyendo sin
limitación, un dominio citoplásmico (residuos de aminoácidos 1-64 de MS4A4A humanos; ver el SEQ ID
NO:1); un dominio transmembranal (residuos de aminoácidos 65-85 de MS4A4A humanos); un dominio
extracelular (dominio extracelular 1; ECL1), correspondiente a los residuos de aminoácidos 86-98 de
25 MS4A4A humanos; un dominio transmembranal (residuos de aminoácidos 99-119 de MS4A4A
humanos); un dominio citoplásmico (residuos de aminoácidos 120-137 de MS4A4A humanos); un
dominio transmembranal (residuos de aminoácidos 138-158 de MS4A4A humanos); un dominio
extracelular (dominio extracelular 2; ECL2), correspondiente a residuos de aminoácidos 159-179; un
dominio transmembranal (residuos de aminoácidos 180-200 de MS4A4A humanos); y un dominio
30 citoplásmico (residuos de aminoácidos 201-239 de MS4A4A humanos). Además, las proteínas MS4A4A
de la presente revelación se expresan en una cantidad de tejidos y célula, incluyendo sin limitación, el
cerebro, neuronas, células gliales, células endoteliales, células perivasculares, pericitos, etc.

MS4A4A en macrófagos y función celular microglial

[0164] Los macrófagos y las células mieloides del sistema nervioso central (SNC), tales como microglías, son inherentemente plásticas en su fenotipo y función. Los macrófagos *in vitro* pueden dividirse en macrófagos M1 y macrófagos M2, que tienen diferente potencial fagocítico e inflamatorio, fenotipos, y actividades. Por ejemplo, en órganos periféricos, se considera que los macrófagos que tienen un fenotipo M1 tienen fenotipo y función pro-inflamatoria y anti-microbiana, mientras que se considera que los macrófagos que tienen fenotipo M2 están en un estado homeostático, y que tienen un fenotipo y una función anti-inflamatoria.

[0165] Microglía asociada con condiciones homeostáticas y de salud expresan más marcadores M2 en su superficie celular (*p.ej.*, CD200R, CD163 y CD115) en comparación con las de los marcadores M2 (*p.ej.*, CD16, MHC Class II, CD86) (Ginhoux y Prinz, 2015, Cold Spring Harb Perspect Biol, 7:a020537). No obstante, las microglías asociadas con enfermedad (DAM) tanto en modelos de enfermedad de Alzheimer en ratones como en enfermedad de Alzheimer en humanos están en un estado pro-inflamatorio o activado. Las microglías asociadas con enfermedad en estados pro-inflamatorios o activados se consideran beneficiosas al desarrollar un papel activo en reducir la patología asociada con la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

[0166] La expresión MS4A4A se eleva en macrófagos M2 *in vitro*, y se ha sugerido que MS4A4A es un nuevo marcador de superficie celular para macrófagos M2. Además, MS4A4A también ha demostrado regular el transporte en la superficie celular de cKit en células mastoides, lo que sugiere un rol de MS4A4A en la modulación de la desgranulación y supervivencia de las células mastoides (Cruse *et al*, 2015, Molecular Biol Cell, 26:1711-1727). Tomados en conjunto, estos hallazgos informados sugieren que dirigirse a un blanco MS4A4A puede afectar el reciclado, la expresión y/o la degradación de varios receptores de superficie de células macrófagos, asociados con fenotipos macrófagos M1 y M2, afectando de ese modo sus funciones y actividades.

[0167] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación afectan la expresión de marcadores celulares de la superficie de células macrófagos M2. En particular, los anticuerpos anti- MS4A4A de la presente revelación reducen la expresión de superficie celular de CD200R, Dectin-1 y CD163 en macrófagos, lo que sugiere que los anticuerpos anti-MS4A4A modulan la polarización, función y/o actividad de los macrófagos, al reducir la expresión de receptores de superficie de las células macrófagos M2. Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación reducen los receptores de superficie de las células macrófagos M2, lo que sugiere que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son efectivos en alterar el estado fisiológico de células microgliales hacia un fenotipo más protector, tal como a un estado más activado o proinflamatorio (*p.ej.*, a un fenotipo más M1). De igual modo, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención son útiles en el tratamiento

de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos, en parte, al alterar el fenotipo de macrófagos y microglías a un estado activado y proinflamatorio.

[0168] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación afectan el estado de activación de microglías. Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de mRNA de proteínas asociadas con activación de microglías (*p.ej.*, el dominio de lectina tipo-C familia 7 miembro A (CLEC7A)), migración de microglías (*p.ej.* inositol 1,4,5-trifosfato receptor 2 (ITPR2)), y proliferación de microglías (*p.ej.*, antígeno KI-67 (MKI67) *in vivo*). Además, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de mRNA de los marcadores de activación de microglías IL1RN, SPP1, y PLCG2. Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación también disminuyeron los niveles de mRNA de los marcadores homeostáticos de microglía receptor purinérgico P2RY12 y CX3C receptor 1 de quimiocina (CX3CR1). Del mismo modo, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son efectivos en activar microglías *in vivo* como lo evidencian los aumentos en varios niveles en mRNA de proteínas asociadas con activación, migración y proliferación de microglías; y por las disminuciones en varios niveles en mRNA de proteínas asociadas con homeostasis de microglías.

Expresión de MS4A4A y TREM2

[0169] Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan, en parte, por una función inmune defectuosa en el sistema nervioso central (SNC). Por ejemplo, se piensa que una disminución en la viabilidad y función del compartimiento de célula mieloide, incluyendo sin limitación microglías, contribuye a la susceptibilidad a trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer. La intervención farmacológica que aumenta la viabilidad y/o función de las células mieloides sería un tratamiento efectivo para mejorar el comienzo, severidad, o avance de tales enfermedades y trastornos neurodegenerativos.

[0170] El receptor desencadenante expresado en células mieloides 2 (TREM2) es un receptor afín con inmunoglobulina que se expresa principalmente en células mieloides, tales como macrófagos, células dendríticas, monocitos, células cutáneas de Langerhans, células de Kupffer, osteoclastos, y microglías. TREM2 tiene gran expresión en microglías y en la infiltración de macrófagos en el SNC durante encefalomiелitis autoinmune experimental y enfermedad de Alzheimer (Piccio et al, 2007, Eur J Immunol, 37:1290-1301; Wang, 2015, Cell, 160:1061-1071). La ruta de TREM2 es un modulador clave de la viabilidad y función de la célula mieloide en el SNC.

[0171] Los datos de estudios de genética humana han sugerido fuertes vínculos genéticos entre MS4A4A y TREM2 con susceptibilidad a enfermedad de Alzheimer (Piccio et al., 2016, Acta Neuropathol, 131:925-9330). En particular, alelos protectores de MS4A4A para la enfermedad de

Alzheimer están ligados a niveles aumentados de sTREM2 en el líquido cerebroespinal de los pacientes.

[0172] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención aumentan los niveles de ATP celular en macrófagos, lo que indica que los anticuerpos anti-MS4A4A son efectivos en incrementar, mantener, o ampliar la función y viabilidad de las células (*p.ej.*, macrófagos, células mieloides, microglías). Además, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención aumentaron los niveles de sTREM2 y mTREM2 en macrófagos, en contraposición con lo informado previamente donde el anticuerpo anti-MS4A4A 5C12 disponible en el mercado redujo los niveles de sTREM2 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos humanos (Deming *et al*, 2018, bioRxiv, doi: dx doi org / 10.1101/352179). Como los alelos protectores de MS4A4A para enfermedad de Alzheimer están ligados a niveles aumentados de sTREM2, los resultados aquí expuestos indican que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención copian o replican un fenotipo protector en enfermedades y trastornos neurodegenerativos, tales como enfermedad de Alzheimer, al incrementar los niveles de sTREM2 y mTREM2. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta la expresión de superficie celular de TREM2 en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 50%, en por lo menos 75%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200% o en por lo menos 250%. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta la expresión de superficie celular de TREM2 en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 30%, en por lo menos 40%, en por lo menos 50%, en por lo menos 60%, en por lo menos 70%, en por lo menos 80%, en por lo menos 90%, o en por lo menos 100%.

[0173] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de proteína mTREM en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) con una EC50 de alrededor de 0,028 µg/ml a alrededor de 0,039 µg/ml. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de proteína sTREM en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) con una EC50 de alrededor de 0,025 µg/ml a alrededor de 0,069 µg/ml. En aún otras formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de ATP en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) con una EC50 de alrededor de 0,010 µg/ml a alrededor de 0,021 µg/ml. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de ATP en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en alrededor de 1,2 veces, alrededor de 1,4 veces, o alrededor de 1,7 veces sobre el nivel de ATP en dichas células en ausencia de anticuerpo anti-MS4A4A.

[0174] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble *in vivo* (p.ej. en un primate no humano o en un humano). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 50%, en por lo menos 75%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, o en por lo menos 150% de la línea basal de niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en alrededor de 50% de la línea basal de niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención.

[0175] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en por lo menos 1,1 veces, en por lo menos 1,2 veces, en por lo menos 1,3 veces, en por lo menos 1,4 veces, en por lo menos 1,5 veces, en por lo menos 1,6 veces, en por lo menos 1,7 veces, en por lo menos 1,8 veces, en por lo menos 1,9 veces, o en por lo menos 2 veces respecto de los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en alrededor de 1,5 veces respecto de los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación.

[0176] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 1 día, por lo menos 2 días, por lo menos 3 días, por lo menos 4 días, por lo menos 5 días, por lo menos 6 días, por lo menos 7 días, por lo menos 8 días, por lo menos 9 días, por lo menos 10 días, por lo menos 11 días, por lo menos 12 días, por lo menos 13 días, por lo menos 14 días, por lo menos 15 días, por lo menos 16 días, por lo menos 17 días, por lo menos 18 días, por lo menos 19 días, o por lo menos 20 días. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 20 días. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas,

- por lo menos 72 horas, por lo menos 96 horas, por lo menos 120 horas, por lo menos 144 horas, por lo menos 168 horas, por lo menos 192 horas, por lo menos 216 horas, por lo menos 240 horas, por lo menos 264 horas, por lo menos 288 horas, por lo menos 312 horas, por lo menos 336 horas, por lo menos 360 horas, por lo menos 384 horas, por lo menos 408 horas, por lo menos 432 horas, por lo menos 456 horas, o por lo menos 480 horas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en suero *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 480 horas.
- 5 [0177] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 50%, en por lo menos 75%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200%, en por lo menos 225%, en por lo menos 250%, en por lo menos 275%, en por lo menos 300%, en por lo menos 325%, en por lo menos 350%, en por lo menos 375%, o en por lo menos 400% de la línea basal de niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en alrededor de 300% de la línea basal de niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación.
- 10 15 [0178] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en por lo menos 1,4 veces, en por lo menos 1,6 veces, en por lo menos 1,8 veces, en por lo menos 2,0 veces, en por lo menos 2,2 veces, en por lo menos 2,4 veces, en por lo menos 2,6 veces, en por lo menos 2,8 veces, en por lo menos 3,0 veces, en por lo menos 3,2 veces, en por lo menos 3,4 veces, en por lo menos 3,6 veces, en por lo menos 3,8 veces, o en por lo menos 4,0 veces respecto de los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* entre 2 veces a alrededor de 4 veces respecto de los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación.
- 20 25 [0179] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 1 día, por lo menos 2 días, por lo menos 3 días, o por lo menos 4 días. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los
- 30

niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 4 días. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 24 horas, por lo menos 48 horas, por lo menos 72 horas, o por lo menos 96 horas. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* en comparación con los niveles de TREM2 soluble en CSF *in vivo* antes de la administración de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación en por lo menos 96 horas.

[0180] La evidencia aportada aquí demuestra que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación afectan TREM2, pero no excluyen los anticuerpos que actúan a través de otras rutas.

Anticuerpos antagonistas

[0181] En algunas formas de realización, los anticuerpos que ligan una proteína MS4A4A pueden incluir anticuerpos antagonistas que ligan MS4A4A, inhiben una o más actividades de MS4A4A ya sea al evitar la interacción entre MS4A4A y su(s) ligando(s), o al evitar la transducción de señal de MS4A4A en el citoplasma de la célula en la presencia del ligando. En algunas formas de realización, los anticuerpos antagonistas de la presente revelación pueden tener la especificidad del epítipo de un anticuerpo agonista de la presente revelación, pero tienen un dominio Fc que no tiene la capacidad de ligar receptores Fcg y por lo tanto es incapaz de, por ejemplo, agrupar el receptor de MS4A4A.

[0182] En algunas formas de realización, un anticuerpo de la presente revelación es un anticuerpo antagonista. En algunas formas de realización, el anticuerpo antagonista inhibe una o más actividades de MS4A4A. En algunas formas de realización, el anticuerpo antagonista disminuye la actividad de uno o más genes dependientes de MS4A4A. En algunas formas de realización, el anticuerpo antagonista inhibe la interacción entre MS4A4A y uno o más ligandos de MS4A4A. En algunas formas de realización, el anticuerpo antagonista inhibe la transducción de señal de MS4A4A. En algunas formas de realización, el anticuerpo antagonista inhibe la interacción entre MS4A4A y uno o más ligandos de MS4A4A e inhibe la transducción de señal de MS4A4A.

[0183] En algunas formas de realización, la regulación por disminución de los niveles de proteína de MS4A4A o la reducción de la actividad de MS4A4A se logra por medio de un anticuerpo anti-MS4A4A que regula por disminución o reduce los niveles de proteína de MS4A4A en una célula. En algunas formas de realización, la regulación por disminución de los niveles de proteína de MS4A4A o reducción de la actividad de MS4A4A se logra por la regulación por disminución de la expresión o niveles de ácido nucleico MS4A4A, mediante p.ej. el uso de metodologías antisentido, terapia génica, etc., empleando

métodos conocidos y a disposición de un experto en la técnica. Del mismo modo, en algunas formas de realización, la disminución de los niveles o actividad de de proteína de MS4A4A se logra con un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación o al reducir la expresión o niveles del ácido nucleico MS4A4A (p.ej., mRNA).

- 5 **[0184]** En algunas formas de realización, se requiere reticulación de anticuerpos para la función de anticuerpo agonista. La reticulación de anticuerpos puede producirse por medio de la ligadura a un anticuerpo secundario *in vitro* o a través de la ligadura a receptores Fc *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas pueden convertirse en anticuerpos agonistas por medio de reticulación de biotina/estreptavidina o ligadura de anticuerpo secundario *in vitro* (ver por ejemplo Gravestein *et al.*,
10 1996, J. Exp. Med. 184:675-685; Gravestein *et al.*, 1994, International Immunol, 7:551-557). Los anticuerpos agonistas pueden ejercer su actividad por medio de copiar la actividad biológica del ligando del receptor o al aumentar la aglutinación del receptor, activando por lo tanto la señalización del receptor. En algunas formas de realización, se requiere la ausencia de reticulación de anticuerpos para que haya actividad antagonista. Los anticuerpos antagonistas pueden ejercer su actividad al bloquear
15 las interacciones entre receptor y ligando.

Gelsolina, osteopontina, y fenocopia del alelo protector de la enfermedad de Alzheimer

- [0185]** Existen tres SNP en el grupo de gen MS4A que ha sido asociado con un riesgo aumentado de enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío. Los mismos incluyen rs4938933 en MS4A4A, rs670139 en MS4A4E, y rs610932 in MS4A6A (Hollingworth *et al*, 2011, Nat Genetics, 43:429-435; Naj *et al*,
20 2011, Nature Genetics, 43:436-441; Antunez *et al*, 2011, Genome Medicine, 3, article 33). Además, hay locus de SNP MS4A4A (rs2304933 y rs2304935) asociados con niveles más altos de MS4A4A y riesgo aumentado de enfermedad de Alzheimer, incluyendo enfermedad de Alzheimer de comienzo tardío including (LOAD) (Allen *et al*, 2012, Neurology, 79:221-228).

- [0186]** Se han identificado variantes genéticas (SNP) asociadas con enfermedad de Alzheimer
25 asociada con el grupo de gen MS4A. Uno de esos alelos variantes es rs1582763, que está asociado con niveles elevados de CSF sTREM2 y con riesgo reducido de enfermedad de Alzheimer y edad avanzada al comienzo de la enfermedad, y por lo tanto se lo considera un alelo protector (Deming *et al*, 2018, bioRxiv, doi: dx doi org / 10.1101/352179). El alelo protector rs1582763 es asociado con niveles disminuidos de MS4A4A mRNA en sangre. Estos hallazgos sugieren además que el alelo rs1582763
30 desempeña un rol protector al reducir los niveles de MS4A4A, y disminuir el riesgo de enfermedad de Alzheimer o su severidad. También se asocia el protector rs1582763 con niveles aumentados de expresión de osteopontina y con niveles aumentados de gelsolina. Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención son efectivos en fenocopiar estos aspectos de los alelos protectores, por lo menos con respecto a disminuir la expresión de MS4A4A, aumentar la expresión de osteopontina, aumentar la

expresión de gelsolina y/o aumentar los niveles de sTREM. En algunos aspectos de la presente revelación, se aportan anticuerpos anti-MS4A4A donde los anticuerpos fenocopian uno o más alelos de MS4A que están asociados con riesgo reducido de enfermedad de Alzheimer y/o edad avanzada al comienzo de la enfermedad de Alzheimer.

5 **[0187]** Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de mARN osteopontina (SPP1) e incrementaron los niveles de mARN gelsolina (GSN) en macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica humana. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentan los niveles de mARN y/o los niveles de proteína osteopontina. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente
10 revelación aumentan los niveles de mARN y/o los niveles de proteína gelsolina. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de mARN y/o los niveles de proteína osteopontina en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 30%, en por lo menos 40%, en por lo menos 50%, en por lo menos 60%, en por lo menos 70%, en por lo
15 menos 75%, en por lo menos 80%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200%, o en por lo menos 250%. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de mARN gelsolina y/o los niveles de proteína en células mieloides (*p.ej.*, macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 30%,
20 en por lo menos 40%, en por lo menos 50%, en por lo menos 60%, en por lo menos 70%, en por lo menos 75%, en por lo menos 80%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200%, o en por lo menos 250%.

[0188] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de osteopontina (SSP1) en primates no humanos. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la
25 presente revelación aumentaron los niveles de mARN y/o los niveles de proteína de osteopontina *in vivo* (*p.ej.*, en primates no humanos o en humanos). En algunas formas de realización, un anticuerpo de la presente revelación aumenta los niveles de mARN y/o de proteína de osteopontina en suero y/o en CSF. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de mARN y/o de proteína de osteopontina en suero y/o en CSF en por lo menos 10%, en por
30 lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 30%, en por lo menos 40%, en por lo menos 50%, en por lo menos 60%, en por lo menos 70%, en por lo menos 75%, en por lo menos 80%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200%, o en por lo menos 250%. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de proteína de osteopontina en el cerebro. En algunas formas

de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de proteína de osteopontina en la corteza frontal y/o en el hipocampo.

[0189] En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación fenocopian el alelo protector rs1582763 respecto de aumentar la expresión de osteopontina y gelsolina.

5 En otros aspectos, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son efectivos en aumentar la expresión de osteopontina, de gelsolina, y/o de sTREM2 y son biológicamente activos en disminuir el riesgo de enfermedad de Alzheimer y/o su severidad, de modo similar al del alelo protector rs1582763. Los datos indicaron que SPP1 y GSN son marcadores farmacodinámicos para la actividad biológica protectora asociada con el alelo rs1582763.

10 *Expresión de CSFR1 e IL1RN*

[0190] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de CSF1R en primates no humanos. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentan los niveles de mRNA y/o de proteínas de CSF1R *in vivo* (p.ej. en primates no humanos o en humanos). En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente
15 revelación aumenta los niveles de mRNA y/o de proteína de CSF1R en suero y/o en CSF. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de mRNA y/o de proteína de CSF1R en suero y/o en CSF en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 30%, en por lo menos 40%, en por lo menos 50%, en por lo menos 60%, en por lo menos 70%, en por lo menos 75%, en por lo menos 80%, en por lo menos 90%, en por
20 lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200%, o en por lo menos 250%. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de proteína de CSF1R en el cerebro. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de proteína de CSF1R en la corteza frontal y/o en el hipocampo.

25 **[0191]** La deficiencia de CSF1R impacta en forma negativa el desarrollo de microglías en el cerebro (Swerdlow et al (2000) *Neurology*, 111:300-311; Baba et al (2006) *Acta Neuropath*, 111:300-311) y la investigación reciente ha vinculado mutaciones en el gen CSF1R a diversos trastornos, incluyendo leucoencefalopatía de comienzo en edad adulta con esferoides axonales y glia pigmentada (ALSP) y leucoencefalopatía difusa hereditaria con esferoides (HDLS) (Oosterhof et al (2019) *Am J Hum Genet*,
30 104:936-947; Rademaker et al (2011) *Nat Genet*, 44:200-205; Nicholson et al (2013) *Neurology*, 80:1033-1040). Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación redujeron la muerte celular y mantuvieron la sobrevivencia de macrófagos humanos con posterioridad a la inhibición de CSF1R. Del mismo modo, en algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación

son útiles en el tratamiento de un individuo con una enfermedad o un trastorno de deficiencia de CSF1R, tal como ALSP o HDLS.

[0192] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de IL1RN en macrófagos derivados de células mononucleares en sangre periférica humana. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentan los niveles de mRNA y/o de proteína de IL1RN. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentan los niveles de mRNA y/o de proteína de IL1RN. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación aumenta los niveles de mRNA y/o de proteína de IL1RN en células mieloides (e.g., macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 25%, en por lo menos 30%, en por lo menos 40%, en por lo menos 50%, en por lo menos 60%, en por lo menos 70%, en por lo menos 75%, en por lo menos 80%, en por lo menos 90%, en por lo menos 100%, en por lo menos 125%, en por lo menos 150%, en por lo menos 200%, o en por lo menos 250%.

Expresión de GPNMB

[0193] GPNMB (glicoproteína de melanoma no metastásico de proteína B) es una glicoproteína superficial expresada en múltiples tipos de células incluyendo macrófagos tisulares y microglías. Distintas variantes genéticas han sido asociadas con riesgo de enfermedad de Parkinson (PD). Los niveles de proteína GPNMB son elevados en la sustancia negra de pacientes de PD y los niveles de GPNMB aumentan después de estrés lisosomal (Moloney et.al., 2018, Neurobio Dis. 120: 1-11). Además, la expresión aumentada de GPNMB fue vinculada con SNP rs199347, estando este riesgo de SNP localizado dentro del gen GPNMB (Murthy et al, Neurogenetics, 2017, 18:121-133).

[0194] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación redujeron los niveles de proteína superficial celular GPNMB en macrófagos primarios humanos. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación disminuye los niveles de proteína superficial celular GPNMB en células mieloides (p.ej., macrófagos, macrófagos humanos, microglías) en por lo menos 10%, en por lo menos 20%, en por lo menos 30%, en por lo menos 40%, o en por lo menos 50%. Como los niveles aumentados de GPNMB están asociados con alelos de riesgo para PD, una reducción de GPNMB después del agregado de anticuerpos anti -MS4A4A puede proporcionar un medio para el tratamiento de PD.

A. Anticuerpos de Ejemplo y Otras Ciertas Formas de realización de Anticuerpos

[0195] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas a partir de (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:94, 108, 116, 146, 147, 308, y 311, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de

homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:94, 108, 116, 146, 147, 308, y 311; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, y 312, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, y 312; (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, y 313, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, y 313; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314, y 317, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314, y 317; (e) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 161, 315, y 318, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 161, 315, y 318; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:107, 115, 144, 145, 163, 316, y 319, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID Nos:107, 115, 144, 145, 163, 316, y 319.

[0196] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas a partir de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:94 y 308, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:94 y 308; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:96, 97, 98, 99, y 309, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, y 309; (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:100, 101, 102, y 310, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, 102, y 310; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:103 104, y 314, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de

SEQ ID NO: 103, 104, y 314; (e) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:105, 106, y 315, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 105, 106, y 315; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:107 y 316, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:107 y 316.

[0197] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas a partir de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:108, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO: 108; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:110 y 111, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:110 y 111; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:112, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO: 112; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:113, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO:113; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:114, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO: 114; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:115, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO:115.

[0198] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas a partir de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122; (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138; (e) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del

grupo que consta de SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, y 143, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:139, 140, 141, 142, y 143; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nos:144 y 145, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID Nos:144 y 145.

[0199] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas a partir de: (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:146 y 147, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:146 y 147; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:149, 150, 151, 152, y 153, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:154, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con el aminoácido de SEQ ID NO: 154; (d) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:156, 157, y 158, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158; (e) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 159, 160, y 161, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 159, 160, y 161; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:163, o un aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con un aminoácido seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO:163.

[0200] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:96; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:100; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:103; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:105; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:97; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:100; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:103; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:105; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b)

HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:98; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:100; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:103; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:105; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:96; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:101; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:103; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:106; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:96; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:102; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:104; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:105; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107; o (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:99; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:100; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:104; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:105; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107.

[0201] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:308; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:309; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:310; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:314; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:315; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:316; o (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:311; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:312; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:313; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:317; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:318; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:319.

[0202] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:108; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:110; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:112; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:113; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID

NO:114; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:115; o (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:108; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:111; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:112; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:113; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:114; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:115.

[0203] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:118; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:123; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:130; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:139; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:119; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:123; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:130; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:139; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:120; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:123; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:130; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:139; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:121; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:123; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:130; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:139; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:118; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:124; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:130; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:139; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:144; (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:118; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:124; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:131; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:139; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[0205] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:96, 97, 98, y 99, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor del 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID Nos:96, 97, 98, y 99; y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, y 102, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, y 102.

[0206] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:308, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:308; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:309, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID No:309; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:310, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:310.

[0207] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:311, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:311; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:312, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID No:312; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:313, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:313.

[0208] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:103 y 104, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 103 y 104; (b)

HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 105 y 106, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:105 y 106; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107.

[0209] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO:314, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO:314; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 315, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO:315; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:316, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:316.

[0210] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO:317, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO:317; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 318, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:318; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:319, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:319.

[0211] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden (a) un dominio V_H que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:94, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 96, 97, 98, y 99, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 96, 97, 98, y 99, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, y 102, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, y 102, y (b) un dominio V_L que comprende

por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 103 y 104, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 103 y 104, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 105 y 106, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 105 y 106, y (iii) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 107, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:107.

5 [0212] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden (a) un dominio V_H que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:308, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:308, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 309, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 309, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 310, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 310, y (b) un dominio V_L que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 314, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 314 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 315, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO: 315, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 316, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:316.

20 [0213] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden (a) un dominio V_H que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:311, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:311, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 312, una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 312, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 313, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95%

25 30

- de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 313, y (b) un dominio V_L que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 317, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 317 (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 318, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido seleccionada de SEQ ID NO: 318, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 316, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 316.
- 5 [0214] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 15 25, 26, 27, 28, 29, y 30; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 110 y 111, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 110 y 111; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 112, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una 20 secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 112.
- [0215] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprenden la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 113, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ 25 ID NO: 113; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115.
- 30 [0216] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden (a) un dominio V_H que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 108, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 108, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de

aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 110 y 111, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 110 y 111, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 112, o una secuencia de aminoácido con por lo menos
5 alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 112, y (b) un dominio a V_L que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 113, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114, o una
10 secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115.

[0217] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 116, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 116; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122, o una secuencia de aminoácido con por lo menos
20 alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122; y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129.

[0218] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, o una secuencia de aminoácido con por lo menos
25 alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138; (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143; y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 144 y
30

145, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:144 y 145.

5 **[0219]** En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden (a) un dominio V_H que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:116, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129, y (b) un dominio V_L que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143, y (iii) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 144 y 145, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 144 y 145.

25 **[0220]** En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:146 y 147, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:146 y 147; (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:149, 150, 151, 152, y 153, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 154, o

una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 154.

[0221] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158; (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163.

[0222] En algunas formas de realización, en las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden (a) un dominio V_H que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_H HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 146 y 147, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 146 y 147, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 154, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 154, y (b) un dominio V_L que comprende por lo menos una, por lo menos dos, o las tres secuencias V_L HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163, o una secuencia de aminoácido con por lo menos alrededor de 95% de homología con la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163.

[0223] En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de 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, y 306. En ciertas formas de realización, una secuencia V_H que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de 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, y 306 contiene sustituciones (*p.ej.*, sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende tal secuencia retiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en 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, o 306. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en 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, o 306. En ciertas formas de realización, sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_H de los 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, o 306, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_H comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 94, 108, 116, 146, 147, y 308, y 311, (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, 110, 111, 118, 119, 120, 121, 122, 149, 150, 151, 152, 153, 309, y 312, y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 100, 101, 102, 112, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 154, 310, y 313.

[0224] En otro aspecto, se presenta un anticuerpo anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los 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, y 307. En ciertas formas de realización una secuencia V_L que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de 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, y 307 y contiene sustituciones (*p.ej.*, sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia retiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un total de 1 to 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en 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, o 307. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en 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, o 307. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (*es decir*, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_L de 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, o 307, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_L comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 103, 104, 113, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 156, 157, 158, 314 y 317, (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 105, 106, 114, 139, 140, 141, 142, 143, 160, 161, 315 y 318, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 107, 115, 144, 145, 163, 316 y 319.

[0225] En algunas formas de realización, se presenta un anticuerpo anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una V_H como en cualquiera de las formas de realización presentadas más arriba, y una V_L como en cualquiera de las formas de realización peresentadas más arriba. En algunas formas de realización, entre las que aquí se presentan están los anticuerpos anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende una V_H como en cualquiera de las formas de realización presentadas más arriba, y una V_L como en cualquiera de las formas de realización peresentadas más arriba. En una forma de realización, el anticuerpo somprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:5-15 ynd SEQ ID NO:17-22, respectivamente, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:24-30 y SEQ ID NO:32-36, respectivamente, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:40-53 y SEQ ID NO:55-74, respectivamente, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dichas secuencias. En una forma de

realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:76-84 y SEQ ID NO:86-93, respectivamente, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:304 y SEQ ID NO:305, respectivamente, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dichas secuencias. En una forma de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en el SEQ ID NO: 306 y en el SEQ ID NO:307, respectivamente, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dichas secuencias.

[0226] En algunas formas de realización, entre las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde las V_H y V_L son seleccionadas del grupo que consta de: V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:5 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:5 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:18; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:6 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:5 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:19; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:7 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:5 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:20; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:8 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:9 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:10 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:18; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:11 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:12 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:17; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:13 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:21; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:14 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:22; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:15 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:122; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:304 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:305; y V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:306 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:307.

[0227] En algunas formas de realización, entre las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde las V_H y V_L son seleccionadas del grupo que consta de: V_H que comprende la

secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:24 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:25 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:33; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:25 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:26 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:33; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:26 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:27 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:27 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:34; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:28 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:33; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:28 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:28 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:35; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:28 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:34; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:29 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:29 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:36; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:30 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:37; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:30 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:32; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:30 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:38; y V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:30 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:36.

[0228] En algunas formas de realización, entre las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde las V_H y V_L son seleccionadas del grupo que consta de: V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:40 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:55; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:41 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:55; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:40 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:56; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:40 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:57; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:40 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:58; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:41 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:56; V_H que comprende la

[illegible]

secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:74; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:48 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:70; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:48 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:74; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:48 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:62; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:48 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:55; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:48 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:72; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:48 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:69; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:49 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:71; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:49 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:55; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:49 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:73; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:50 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:62; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:51 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:62; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:52 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:62; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:53 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:62; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:53 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:63; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:53 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:64; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:53 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:65; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:53 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:66; y V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:53 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:67.

[0229] En algunas formas de realización, entre las que aquí aparecen están los anticuerpos anti-MS4A4A que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde las V_H y V_L son seleccionadas del grupo que consta de: V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:76 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:86; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:77 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:87; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:78 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:88; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:79 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:89; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:80 y V_L que comprende la

secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:90; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:81 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:91; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:82 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:91; V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:83 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:92; y V_H que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:84 y V_L que comprende la secuencia de aminoácido del SEQ ID NO:93.

[0230] En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, y 306. En ciertas formas de realización, una secuencia V_H que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, y 306 contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, o 306. En ciertas formas de realización, sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_H de los SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 304, o 306, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_H comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 94 y 308, y (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, y 309, y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID Nos:100, 101, 102, y 310.

[0231] En otro aspecto, se presenta un anticuerpo anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 21, 22, 305, y 307. En ciertas formas de realización, una secuencia V_L que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305, y 307, y contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total

de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305 o 307. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_L de los SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 305 o 307, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_L comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 103, 104, y 314, (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 105, 106, y 315, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 107 y 316.

[0232] En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30. En ciertas formas de realización, una secuencia V_H que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, y 30 y contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_H SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30, incluyendo modificaciones traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_H comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 108, (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 110 y 111, y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido del SEQ ID NO: 112.

[0233] En otro aspecto, se presenta un anticuerpo anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35 y 36. En ciertas formas de realización, una secuencia V_L que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de

identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, y 36, y contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, o 36. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_L de los SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, o 36, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_L comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 113, (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115.

[0234] En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, y 53. En ciertas formas de realización, una secuencia V_H que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, y 53 y contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, o 53. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, o 53. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_H de los SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, o 53, incluyendo modificaciones traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_H comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 116, (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122, y (c) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129.

[0235] En otro aspecto, se presenta un anticuerpo anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, y 74. En ciertas formas de realización, una secuencia V_L que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, y 74, y contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, o 74. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en los SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, o 74. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_L de los SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, o 74, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_L comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143, y (c) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 144 y 145.

[0236] En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (V_H) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, y 84. En ciertas formas de realización, una secuencia V_H que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, y 84 contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, u 84. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos,

- insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, u 84. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_H de SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, u 84, incluyendo modificaciones traslacionales de dicha
- 5 secuencia. En una forma realización en particular, la V_H comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 146 y 147, (b) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:154.
- 10 **[0237]** En otro aspecto, se presenta un anticuerpo anti-MS4A4A, donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (V_L) que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, y 93. En ciertas formas de realización, una
- 15 secuencia V_L que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, y 93, y contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un
- 20 total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, o 93. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, o 93. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En forma opcional, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende la secuencia V_L de
- 25 SEQ ID NO: 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, o 93, incluyendo modificaciones pos-traslacionales de dicha secuencia. En una forma de realización en particular, la V_L comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158, (b) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163.
- 30 **[0238]** En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de extensión completa que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 320-335 y 355-362. En ciertas formas de realización, una secuencia de aminoácido de cadena pesada de extensión completa que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%,

- 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 320-335 y 355-362 contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 320-335 y 355-362. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 320-335 y 355-362. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR).
- 10 **[0239]** En otro aspecto, un anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de aminoácido de cadena ligera de extensión completa que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 363-365. En ciertas formas de realización, una cadena pesada de extensión completa que tiene por lo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%
- 15 de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 363-365 contiene sustituciones (p.ej. sustituciones conservadoras), inserciones, o eliminaciones relativas a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende dicha secuencia mantiene la capacidad de ligarse a MS4A4A. En ciertas formas de realización, un total de 1 a 10 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 363-365. En
- 20 ciertas formas de realización, un total de 1 a 5 aminoácidos han sido sustituidos, insertados, y/o eliminados en SEQ ID NO: 363-365. En ciertas formas de realización, las sustituciones, inserciones, o eliminaciones tienen lugar en regiones fuera de las LVR (es decir, en las FR).
- [0240]** En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de extensión completa de SEQ ID NO:355-362 y una secuencia de
- 25 aminoácido de cadena ligera de extensión completa de SEQ ID NO:365. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de extensión completa de SEQ ID NO:320-327 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de extensión completa de SEQ ID NO:363. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A comprende una secuencia de aminoácido de cadena pesada de extensión completa de SEQ ID
- 30 NO:328-335 y una secuencia de aminoácido de cadena ligera de extensión completa de SEQ ID NO:364.
- [0241]** En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-450. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-331. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-381. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, 4A-390.

[0242] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación se liga a un epítipo de MS4A4A humano que es el mismo o se superpone con el epítipo MS4A4A ligado por al menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-450. Ejemplos de métodos de ejemplo para representar un epítipo al que se liga un anticuerpo aparecen detallados en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

[0243] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-450, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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 y 4A-331, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A. En

algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-381 y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación inhibe en forma competitiva la ligadura de por lo menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, o 4A-390, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A.

[0244] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación tiene el mismo epítipo o superpuesto en MS4A4A ligado por al menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-450, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación tiene el mismo epítipo o superpuesto en MS4A4A ligado por al menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-331, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación tiene el mismo epítipo o superpuesto en MS4A4A ligado por al menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 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, y 4A-381, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación tiene el mismo epítipo o superpuesto en MS4A4A ligado por al menos un anticuerpo de referencia seleccionado de 4A-25, 4A-382, 4A-383, 4A-384, 4A-385, 4A-386, 4A-387, 4A-388, 4A-389, y 4A-390, y cualquier combinación de los mismos, para ligarse a MS4A4A.

[0245] En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación se liga a dominio extracelular 1 (ECL1) de MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación se liga a uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácido CMASNTYGSNPIS (SEQ ID NO:177) de SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación se liga a dominio extracelular 2 (ECL2) de

MS4A4A. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación se liga a uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácido SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:178) of SEQ ID NO:1

[0246] Todo ensayo de competencia afin o ensayo de ligadura de MS4A4A conocido en la técnica, tal como análisis BIAcore, ensayos ELISA, o citometría de flujo, puede usarse para determinar si un anticuerpo anti-MS4A4A compite con (o inhibe en forma competitiva la ligadura de) uno o más anticuerpos de referencia seleccionados de 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, y 4A-450, y cualquier combinación de los mismos para ligarse a MS4A4A. En un ejemplo de ensayo de competencia, MS4A4A inmovilizado o células que expresan MS4A4A en la superficie celular se incuban en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se liga a MS4A4A (*p.ej.*, humano o primate no humano) y un segundo anticuerpo no marcado al que se somete a prueba para conocer su capacidad para competir con el primer anticuerpo en la ligadura a MS4A4A. El segundo anticuerpo puede estar presente en un hibridoma sobrenatante. Como control, MS4A4A inmovilizado o células que expresan MS4A4A se incuban en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación en condiciones permisivas para la ligadura del primer anticuerpo a MS4A4A, se retira el exceso de anticuerpo no ligado, y se mide la cantidad de marcado asociado con MS4A4A inmovilizado o células que expresan MS4A4A. Si la cantidad de marcado asociado con MS4A4A inmovilizado o células que expresan MS4A4A se reduce sustancialmente en la muestra de la prueba con relación a la muestra de control, ello indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo en la ligadura a MS4A4A. Ver Harlow & Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* c.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

[0247] En la presente aparecen además anticuerpos anti-MS4A4A que en forma competitiva inhiben la ligadura de y/o compiten en la ligadura con un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:94 y 308, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, y 309, y (iii) HVR-H3 que

comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, 102, y 310, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 103, 104, y 314, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 105, 106, y 315, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 107 y 316. En algunas formas de realización el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:5-15 y 304, y SEQ ID NO:17-22 y 305, respectivamente.

[0248] En la presente aparecen anticuerpos anti-MS4A4A que se ligan a un epítipo de MS4A4A humano que es el mismo o se superpone con el epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:94 y 308, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 96, 97, 98, 99, y 309, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 100, 101, 102, y 310, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 103, 104, y 314, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 105, 106, y 315, y (iii) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 107 y 316. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:5-15 y 304, y SEQ ID NO:17-22 y 305, respectivamente. En algunas formas de realización, el epítipo de MS4A4A humano es el mismo epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A.

[0249] En la presente aparecen además anticuerpos anti-MS4A4A que en forma competitiva inhiben la ligadura de y/o compiten en la ligadura con un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia del aminoácido SEQ ID NO: 108, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 110 y 111, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 112, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115. En algunas formas de realización el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:24-30 y SEQ ID NO:32-36, respectivamente.

[0250] En la presente aparecen anticuerpos anti-MS4A4A que se ligan a un epítipo de MS4A4A humano que es el mismo o se superpone con el epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 108, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo

que consta de SEQ ID NO: 110 y 111, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID NO:112, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 113, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 114, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 115. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:24-30, y SEQ ID NO:32-36, respectivamente. En algunas formas de realización, el epítipo de MS4A4A humano es el mismo epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A.

[0251] En la presente aparecen además anticuerpos anti-MS4A4A que en forma competitiva inhiben la ligadura de y/o compiten en la ligadura con un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia del aminoácido SEQ ID NO: 116, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de los SEQ ID NO: 118, 119, 120, 121, y 122, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143, y (iii) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 144 y 145. En algunas formas de realización el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:40-53 y SEQ ID NO:55-74, respectivamente.

[0252] En la presente aparecen anticuerpos anti-MS4A4A que se ligan a un epítipo de MS4A4A humano que es el mismo o se superpone con el epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 116, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO:118, 119, 120, 121, y 122, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 123, 124, 125, 126, 127, 128, y 129, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, y 138, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 139, 140, 141, 142, y 143, y (iii) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 144 y 145. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:40-53 y SEQ ID NO:55-74, respectivamente. En algunas formas de realización, el epítipo de MS4A4A humano es el mismo epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A.

[0253] En la presente aparecen además anticuerpos anti-MS4A4A que en forma competitiva inhiben la ligadura de y/o compiten en la ligadura con un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 146 y 147, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 154, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157, y 158, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163. En algunas formas de realización el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:76-84 y SEQ ID NO:86-93, respectivamente.

[0254] En la presente aparecen anticuerpos anti-MS4A4A que se ligan a un epítipo de MS4A4A humano que es el mismo o se superpone con el epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A que comprende (a) un dominio V_H que comprende (i) HVR-H1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 146 y 147, (ii) HVR-H2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 149, 150, 151, 152, y 153, y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 154, y (b) un dominio V_L que comprende (i) HVR-L1 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 156, 157 y 158, (ii) HVR-L2 que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NO: 160 y 161, y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 163. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende las secuencias V_H y V_L en SEQ ID NO:76-84 y SEQ ID Nos:86-93, respectivamente. En algunas formas de realización, el epítipo de MS4A4A humano es el mismo epítipo ligado por un anticuerpo anti-MS4A4A.

[0255] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A de acuerdo con alguna de las formas de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo humanizado y/o humano. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A es un fragmento de anticuerpo, *p.ej.*, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo, o F(ab')₂. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A es un anticuerpo sustancialmente de extensión completa, *p.ej.*, un anticuerpo IgG1, anticuerpo IgG2a, u otra clase de anticuerpo o isotipo según se lo define en la presente.

[0256] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-MS4A4A de acuerdo con alguna de las formas de realización anteriores puede incorporar alguna de las característica, solas o combinadas según se describe en las Secciones 1-7 a continuación:

(1) *Afinidad de ligadura del anticuerpo anti-MS4A4A*

[0257] En varias de las formas de realización de alguna de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo tiene una disociación constante (K_d) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0,1 \text{ nM}$, $< 0,01 \text{ nM}$, o $< 0,001 \text{ nM}$ (*p.ej.*, 10^{-8} M o menos, *p.ej.*, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , *p.ej.*, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Las constantes de disociación se pueden determinar a través de cualquier técnica analítica, incluyendo cualquier técnica bioquímica o biofísica tal como ELISA, resonancia plasmónica de superficie (SPR), interferometría de capa biológica (ver, *p.ej.*, Octet System by ForteBio), calorimetría de titulación isotérmica (ITC), calorimetría de barrido diferencial (DSC), dicroísmo circular (CD), análisis de flujo interrumpido, y análisis de fundido de proteína fluorescente o colorimétrica. En una forma de realización, K_d se mide por ensayo de ligadura antigénica radiomarcada (RIA). En una forma de realización, se lleva a cabo un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, por ejemplo como se describe en Chen *et al. J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999). En algunas formas de realización K_d se mide empleando un ensayo de resonancia plasmónica de superficie BIACORE, por ejemplo, se realiza un ensayo empleando un BIACORE -2000 o un BIACORE -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips de CM5 antígeno a ~ 10 unidades de respuesta (RU). En algunas formas de realización, el K_D se determina empleando un anticuerpo monovalente (*p.ej.*, un Fab) o un anticuerpo de extensión completa. En algunas formas de realización, el K_D se determina empleando un anticuerpo de extensión completa en una forma monovalente.

(2) *Fragmentos de anticuerpos*

[0258] En algunas formas de realización de los varios anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')_2 , Fv, y scFv, y otros fragmentos que se describen a continuación. Para un estudio de ciertos fragmentos de anticuerpos, ver Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para un estudio de fragmentos scFv fragments, ver *p.ej.*, WO 93/16185; y las patentes de los Estados Unidos Nos. 5571894 y 5587458. Para comentarios sobre fragmentos Fab y F(ab')_2 que comprenden salvataje de residuos de epítipo de ligadura de receptor y que hayan aumentado la vida media *in vivo*, ver la patente de los Estados Unidos No. 5869046.

[0259] Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de ligadura de antígenos que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver por ejemplo, EP404097; WO 1993/01161; Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al. Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Anticuerpos de dominio único son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo humano de dominio único (ver la patente de los Estados Unidos No. 6248516).

[0260] Los fragmentos de anticuerpos pueden estar hechos por medio de diversas técnicas, incluyendo sin limitación la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto así como la producción por células huésped recombinantes (*p.ej.*, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

(3) *Anticuerpos quiméricos y humanizados*

5 [0261] En varias formas de realización de algunos de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, *p.ej.*, en la patente de los Estados Unidos No. 4816567. En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (*p.ej.*, una región variable derivada de ratón, rata, hámster, conejo, o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un
10 anticuerpo de “clase cambiada” en el que la clase o subclase ha sido cambiada de la del anticuerpo madre. Los anticuerpos quiméricos incluyen sus fragmentos de ligadura de antígenos.

[0262] En varias formas de realización de algunos de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Generalmente, un anticuerpo no humano es humanizado para reducir inmunogenicidad a humanos, mientras retiene la especificidad y afinidad del anticuerpo parental no
15 humano. En ciertas formas de realización un anticuerpo humanizado es sustancialmente no inmunogénico en humanos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado tiene sustancialmente la misma afinidad para un blanco que un anticuerpo de otras especies de las que deriva el anticuerpo humanizado. Ver, *p.ej.*, patentes de los Estados Unidos Nos. 5530101, 5693761; 5693762; y 5585089. En ciertas formas de realización, se identifican los aminoácidos de un dominio
20 variable de un anticuerpo que puede ser modificado sin disminuir la afinidad intrínseca del dominio de ligadura del antígeno mientras reducen su inmunogenicidad. Ver, *p.ej.*, patentes de los Estados Unidos Nos. 5766886 and 5869619. Por lo general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR (o porciones de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo
25 humanizado también comprenderá por lo menos una porción de una región constante humana. En algunas formas de realización, varios residuos de FR en un anticuerpo humanizado son sustituidas por los correspondientes residuos de un anticuerpo no humano (*p.ej.*, el anticuerpo del cual derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad.

[0263] Los anticuerpos humanizados y los métodos para producirlos se analizan, por ejemplo, en
30 Almagro *et al. Front. Biosci.* 13:161 9-1633 (2008), y además aparecen descritos, *p.ej.*, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5821337, 7527791, 6982321, y 7087409. Las regiones marco humanas que pueden usarse para humanización incluyen sin limitación: regiones marco seleccionadas que emplean el método “best-fit” (ver *p.ej.*, Sims *et al. J. Immunol.* 151:2296 (1993)); las regiones marco derivadas de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones

variables ligeras o pesadas (ver *p.ej.*, Carter *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); y Presta *et al., J. Immunol.* 151 :2623 (1993)); regiones marco humanas maduras (mutadas somáticamente) o regiones marco humanas de línea germinal (ver *p.ej.*, Almagro & Fransson *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones marco derivadas de selección de bibliotecas FR (ver Baca *et al. J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al. J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

(4) Anticuerpos Humanos

[0264] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el empleo de diversos mecanismos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen en general en van Dijk *et al. Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) y Lonberg *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

[0265] Los anticuerpos humanos pueden prepararse por medio de la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que ha sido modificado par producir anticuerpos humanos intactos con regiones variables humanas en respuesta a compromiso antigénico. Uno puede manipular cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos del Ig loci humano en anticipación de que tales ratones fueran a producir anticuerpos humanos en ausencia de anticuerpos de ratón. Los grandes fragmentos de Ig humano pueden preservar la gran diversidad genética variable así como la correcta regulación de producción de y expresión de anticuerpos. Al explotar la maquinaria del ratón para la diversificación y selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a proteínas humanas, el espectro de anticuerpos humanos reproducidos en estas cepas de ratón puede dar como resultado anticuerpos humanos completos de elevada afinidad frente a algún antígeno de interés, incluyendo antígenos humanos. Empleando tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales humanos de antígeno específico con la especificidad deseada. Ejemplos de ciertos métodos se describen en las patentes de los Estados Unidos No. 5545807, EP 546073, y EP 546073. Ver también, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6075181 y 6150584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de los Estados Unidos No. 5770429 que describe la tecnología HUMAB®; la patente de los Estados Unidos No. 7041870 que describe la tecnología K-M MOUSE®, y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US 2007/0061900, que describe la tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por tales animales pueden modificarse más aún, *p.ej.*, al combinarlas con una región constante humana diferente.

[0266] Los anticuerpos humanos también pueden producirse por medio de métodos basados en hibridoma. Se han descrito el mieloma humano y las líneas celulares de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Ver, *p.ej.*, Kozbor *J. Immunol.* 133:3001

(1984) y Boerner *et al.* J. Immunol. 147:86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de célula-B humana también se describen en Li *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006). Métodos adicionales incluyen los que se han descrito, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 7189826 (que describe la producción de anticuerpos IgM monoclonales humanos de líneas celulares de hibridoma). La tecnología de hibridoma humano (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers *et al.* Histology and Histopathology 20(3) :927-937 (2005) y Vollmers *et al.* Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology 27(3):185-91 (2005). Los anticuerpos humanos también pueden generarse al aislar secuencias de dominio variable de clon Fv seleccionadas a partir de las bibliotecas de expresión de fago derivadas de humanos. Dichas secuencias de dominio variable pueden luego combinarse con el dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas humanas se describen a continuación.

[0267] En varias formas de realización de algunos de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado mediante métodos *in vitro* y/o selección de bibliotecas combinatorias sobre anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Ejemplos correctos incluyen sin limitación a expresión de fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (antes Proliferon), Affimed) expresión de ribosoma (CAT), expresión de levaduras (Adimab), y similares. En ciertos métodos de expresión de fagos, repertorios de genes VH y VL están clonados por separado por una reacción de cadena de polimerasa (PCR) y recombinados en forma aleatoria en bibliotecas de fagos, que pueden luego ser revisadas para hallar fagos de ligadura de antígenos como se describe en Winter *et al.* Ann. Rev. Immunol. 12: 433-455 (1994). Por ejemplo, se conocen una variedad de métodos en la técnica para generar bibliotecas de expresión de fagos y para revisar esas librerías con miras a hallar anticuerpos que posean las características de ligadura deseadas. Ver también Sidhu *et al.* J. Mol. Biol. 338(2): 299-310, 2004; Lee *et al.* J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093, 2004; Fellouse Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); y Lee *et al.* J. Immunol. Methods 284(-2):1 19-132 (2004). Generalmente, los fagos expresan fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de elevada afinidad al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Como alternativa, se puede clonar el repertorio no activado (p.ej., de humano) para proporcionar un amplio espectro de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.* EMBO J. 12: 725-734 (1993). Por último, las bibliotecas no activadas también se pueden crear en forma sintética al clonar segmentos de genes V no reordenados de las células madre, y empleando cebadores de PCR que comprenden una secuencia aleatoria para codificar las muy variables regiones HVR3 y lograr reordenamiento *in vitro*, como se describe en Hoogenboom *et al.* J.

Mol. Biol., 227: 381-388, 1992. Las publicaciones de patentes que describen las bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5750373, y las publicaciones de patentes de los Estados Unidos Nos. 2007/0292936 y 2009/0002360. Los anticuerpos aislados de las bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran en la presente anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humano.

(5) *Regiones constantes incluyendo regiones Fc*

[0268] En varias formas de realización de algunos de los anticuerpos que aquí se presentan, el anticuerpo comprende una Fc. En algunas formas de realización, la Fc es un isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3, y/o IgG4. En algunas formas de realización, el anticuerpo es de la clase IgG, de la clase IgM, o de la clase IgA.

[0269] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, el anticuerpo tiene un isotipo IgG2. En algunas formas de realización, el anticuerpo contiene una región constante humana IgG2. En algunas formas de realización, la región constante humana IgG2 incluye una región Fc. En algunas formas de realización, el anticuerpo induce una o más actividades MS4A4A o en forma independiente de la ligadura a un receptor Fc. En algunas formas de realización, el anticuerpo liga un receptor Fc inhibitorio. En ciertas formas de realización, el receptor Fc inhibitorio es un receptor Fc-gamma inhibitorio IIB (FcγIIB).

[0270] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, el anticuerpo tiene un isotipo IgG1. En algunas formas de realización, el anticuerpo contiene una región constante IgG1 de ratón. En algunas formas de realización, el anticuerpo contiene una región constante IgG1 humana. En algunas formas de realización, la región constante IgG1 humana incluye una región Fc. En algunas formas de realización, una región constante de cadena ligera IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 344. En algunas formas de realización, el anticuerpo liga un receptor Fc inhibitorio. En ciertas formas de realización, el receptor Fc es un receptor Fc-gamma inhibitorio IIB (FcγIIB).

[0271] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, el anticuerpo tiene un isotipo IgG4. En algunas formas de realización, el anticuerpo contiene una región constante IgG4 humana. En algunas formas de realización, la región constante IgG4 humana incluye una región Fc. En algunas formas de realización, el anticuerpo liga un receptor Fc inhibitorio. En ciertas formas de realización, el receptor Fc inhibitorio es un receptor Fc-gamma IIB (FcγIIB).

[0272] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, el anticuerpo tiene un isotipo híbrido IgG2/4. En algunas formas de realización, el anticuerpo incluye una secuencia de aminoácido que comprende aminoácidos 118 a 260 de acuerdo con la numeración de la

Unión Europea de IgG2 humano, y aminoácidos 261-447 según la numeración de la Unión Europea de IgG4 humano (WO 1997/11971; WO 2007/106585).

[0273] En algunas formas de realización, la región Gc aumenta la formación de grupos sin activar el complemento en comparación con un correspondiente anticuerpo que comprende una región Fc que no comprende las sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, el anticuerpo induce una o más actividades de un blanco ligado en forma específica por el anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo liga a MS4A4A.

[0274] También puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación para modificar la función efectora y/o para aumentar la vida media en suero del anticuerpo. Por ejemplo, el sitio de ligadura del receptor Fc en la región constante puede modificarse o mutarse para eliminar o reducir la afinidad de ligadura de ciertos receptores Fc, tales como FcγRI, FcγRII, y/o FcγRIII para reducir citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo. En algunas formas de realización, la función efectora es alterada al retirar la N-glicosilación de la región Fc (*p.ej.*, en el dominio CH2 de IgG) del anticuerpo. En algunas formas de realización, la función efectora es alterada al modificar las regiones tales como 233-236, 297, y/o 327-331 de IgG humano como se describe en WO 99/58572 y Armour *et al. Molecular Immunology* 40: 585-593 (2003); Reddy *et al. J. Immunology* 164:1925-1933 (2000). En otras formas de realización, también puede ser deseable modificar un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación para modificar la función efectora y aumentar la selectividad de búsqueda hacia FcγRIIb que contiene ITIM (CD32b) para aumentar el agrupamiento de anticuerpos MS4A4A en células adyacentes sin activar respuestas humorales incluyendo citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo y fagocitosis celular dependiente del anticuerpo.

[0275] Para aumentar la vida media del anticuerpo en suero, uno puede incorporar un epítipo de salvataje de ligadura de receptor en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la patente de los Estados Unidos 5739277, por ejemplo. Según se lo utiliza aquí, el término “*epítipo de salvataje de ligadura de receptor*” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (*p.ej.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG. Otras modificaciones de secuencia de aminoácido.

(6) *Anticuerpos Multiespecíficos*

[0276] Los multiespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de ligadura para por lo menos dos epítopos diferente, incluyendo aquellos en el mismo o en otro polipéptido (*p.ej.*, uno o más polipéptidos MS4A4A de la presente revelación). En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo biespecífico. En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico puede ser un anticuerpo tetraespecífico. Tales anticuerpos pueden derivar de

anticuerpos de extensión completa o fragmentos de anticuerpos (*p.ej.*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂ bispecific antibodies). En algunas formas de realización, el anticuerpo multiespecífico comprende una primera región de ligadura al antígeno que se liga al primer sitio en MS4A4A y comprende una segunda a región de ligadura a un antígeno que se liga a un segundo sitio en MS4A4A. En algunas formas de realización, los anticuerpos multiespecíficos comprenden una primera región de ligadura al antígeno que se liga a MS4A4A y una segunda región de ligadura a un antígeno, que se liga a un segundo polipéptido.

[0277] En la presente aparecen anticuerpos multiespecíficos que comprenden una primera región de ligadura a antígeno, donde la primera región de ligadura al antígeno comprende las seis HVR de un anticuerpo que aquí se describe, que se liga a MS4A4A y una segunda región de ligadura a un antígeno que se liga a un segundo polipéptido. En algunas formas de realización, la primera región de ligadura al antígeno comprende la V_H o V_L of de un anticuerpo que aquí se describe.

[0278] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos multiespecíficos, el segundo polipéptido es a) un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera sangre-cerebro. (b) un antígeno que facilita el transporte a través de la barrera sangre-cerebro desde el receptor de transferina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento insulínico (IGFR), receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado con proteínas 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina de difteria, CRM197, un anticuerpo de dominio único de llama, TMEM 30(A), un dominio de transducción de proteínas, TAT, Syn-B, penetratina, un péptido poli-arginina, un péptido angiopep, y ANG1005; (c) una proteína que causa enfermedad seleccionada a partir de beta amiloide, beta amiloide oligomérica, placas beta amiloides, proteína precursora de amiloide o fragmentos de la misma, Tau, IAPP, alfa-sinucleína, TDP-43, proteína FUS, C9orf72 (cromosoma 9 marco abierto de lectura 72), proteína c9RAN, proteína prion, PrPSc, huntingtina, calcitonina, superóxido dismutasa, ataxin, ataxin 1, ataxin 2, ataxin 3, ataxin 7, ataxin 8, ataxin 10, cuerpo de Lewy, factor natriurético atrial, polipéptido islote amiloide, insulina, apolipoproteína AI, amiloide sérico, medin, prolactina, transtiretina, lisozima, beta 2 microglobulina, gelsolina, queratoepitelina, cistatina, cadena ligera de inmunoglobulina AL, S-IBM proteína, productos de traslación de repetición asociada no ATG (RAN), péptidos de repetición DiPeptide (DPR), péptidos de repetición glicina-alanina (GA), péptidos de repetición glicina-prolina (GP), péptidos de repetición glicina-arginina (GR), péptidos de repetición prolina-alanina (PA), ubiquitina, y péptidos de repetición prolina-arginina (PR); (d) ligandos y/o proteínas expresadas en células inmunes, donde los ligandos y/o proteínas seleccionadas de 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, y fosfatidilserina; y/o (e) una proteína, lípido, polisacárido, o glicolípido expresada en una o más células tumorales y toda combinación de las mismas.

[0279] En la técnica se conocen numerosos antígenos que facilitan el transporte a través de la barrera sangre-cerebro (ver, *p.ej.*, Gabathuler R. *Neurobiol. Dis.* 37:48-57 (2010)). Tales segundos antígenos incluyen, sin limitación, receptor de transferrina (TR), receptor de insulina (HIR), receptor de factor de crecimiento insulínico (IGFR), receptor de lipoproteína de baja densidad relacionado con proteínas 1 y 2 (LPR-1 y 2), receptor de toxina de difteria, incluyendo CRM197 (toxina no tóxica mutante de difteria), anticuerpo de dominio único de llama tal como TMEM 30(A) (Flipasa), dominios de transducción de proteína tales como TAT, Syn-B, o penetratina, poli-arginina o péptido generalmente de carga positiva, péptidos Angiopep tales como ANG1005 (vee, *p.ej.*, Gabathuler, 2010), y otras proteínas de superficie celular que están enriquecidas en las células endoteliales en la barrera sangre-cerebro (ver, *p.ej.*, Daneman *et al.* *PLoS One* 5(10):e13741 (2010)).

[0280] Los anticuerpos multivalentes pueden reconocer el antígeno MS4A4A así como sin limitación antígenos adicionales A β péptido, antígeno o un antígeno de proteína α -sinucleína o, antígeno de proteína Tau, antígeno de proteína TDP-43 o, antígeno de proteína prion, antígeno de proteína huntingtina, o RAN, antígeno de traslación de productos, incluyendo péptidos de repetición DiPeptide,(péptidos DPR) compuestos de glicina-alanina (GA), glicina-prolina (GP), glicina-arginina (GR), prolina-alanina (PA), o prolina-arginina (PR), receptor de insulina, receptor de factor de crecimiento insulínico. Receptor de transferrina o algún otro antígeno que facilita la transferencia de anticuerpos a través de la barrera sangre-cerebro. En algunas formas de realización, el segundo polipéptido es transferrina. En algunas formas de realización, el segundo polipéptido es Tau. En algunas formas de realización, el segundo polipéptido es A β . En algunas formas de realización, el segundo polipéptido es TREM2. En algunas formas de realización, el segundo polipéptido es α -sinucleína.

[0281] El anticuerpo multivalente contiene por lo menos una cadena de polipéptido (y preferentemente dos cadenas de polipéptidos) donde la cadena o cadenas de polipéptidos comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc region, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. De modo similar, la cadena o cadenas del polipéptido pueden comprender una cadena de región V_H-C_H1-conector flexible -V_H-C_H1-Fc; o una cadena de región V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc. El anticuerpo multivalente de la presente preferentemente comprende además por lo menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera que aquí se contemplan comprenden un dominio variable de cadena ligera y, en forma opcional comprenden además un dominio CL.

[0282] Las técnicas para hacer anticuerpos multiespecíficos incluyen, sin limitación co-expresión recombinante de dos pares de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina que tienen diferentes especificidades (ver Milstein and Cuello *Nature* 305: 537 (1983), WO 93/08829, y Traunecker *et al. EMBO J.* 10:3655 (1991)), y tecnología “knob-in-hole” (ver, *p.ej.*, patente de los Estados Unidos No. 5731168). Ver también WO 2013/026833 (CrossMab). También se pueden hacer anticuerpos multiespecíficos por medio de ingeniería de efectos electrostáticos de dirección para hacer moléculas de anticuerpos Fc-heterodiméricas (WO 2009/089004A1); enlaces cruzados de dos o más anticuerpos (ver, *p.ej.*, la patente de los Estados Unidos No. 4676980); empleando leucina; empleando tecnología “diacuerpo” para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, *p.ej.*, Hollinger *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)); y empleando dímeros de +oand using single-chain Fv (scFv) de cadena simple (ver, *p.ej.*, Gruber *et al. J. Immunol.* 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos triespecíficos como se describe, *p.ej.*, en Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

[0283] También se incluyen aquí anticuerpos diseñados con tres o más sitios de ligadura funcional de antígenos, incluyendo “Anticuerpos pulpo” (ver, *p.ej.*, Estados Unidos 2006/0025576). El anticuerpo en la presente también incluye un “FAB de Doble Acción” o “DAF” que comprende un sitio de ligadura de antígeno que se liga a múltiple MS4A4A (ver Estados Unidos 2008/0069820).

(7) Variantes de Anticuerpos

[0284] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de ligadura y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo.

(i) Variantes de Sustitución, Inserción, y Eliminación

[0285] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, se aportan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse al introducir modificaciones apropiadas en la secuencia del nucleótido que codifica el anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones a partir de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo.

TABLA A: Sustituciones de Aminoácidos

Residuo Original	Ejemplos de Sustituciones	Sustituciones Preferidas
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

Residuo Original	Ejemplos de Sustituciones	Sustituciones Preferidas
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; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; 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; Norleucina	Leu

[0286] Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran al seleccionar sustituciones que difieren en forma significativa por su efecto en mantener (a) la estructura del meollo del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo conformación en forma plana o helicoidal, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio blanco, o (c) el grueso de la cadena lateral. Los residuos en estado natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrofílico neutral: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básico: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

(6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

[0287] Por ejemplo, sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse, por

ejemplo, en regiones de un anticuerpo humano que son homólogas con anticuerpos no humanos, o en regiones no homólogas de la molécula.

[0288] Al efectuar cambios en el polipéptido o anticuerpo que aquí se describe, de acuerdo con ciertas formas de realización, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le asigna un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga. Son ellos: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); penilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (−0,4); treonina (−0,7); serina (−0,8); triptofan (−0,9); tirosina (−1,3); prolina (−1,6); histidina (−3,2); glutamato (−3,5); glutamina (−3,5); aspartato (−3,5); asparagina (−3,5); lisina (−3,9); y arginina (−4,5).

[0289] En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva en una proteína. Kyte *et al.* *J. Mol. Biol.*, 157:105-131 (1982). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y aún conservan una actividad biológica similar. Al realizar cambios basados en el índice hidropático, en ciertas formas de realización, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 . En ciertas realizaciones se incluyen aquellos que están dentro de ± 1 , y en ciertas formas de realización, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$.

[0290] También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos afines puede realizarse en forma efectiva sobre la base de hidrofiliidad, especialmente donde la proteína funcional o péptido así creado tiene por objeto su uso en formas de realización inmunológicas, como en el caso presente. En ciertas formas de realización, la mayor hidrofiliidad promedio de una proteína, según se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos, guarda correlación con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

[0291] Los siguientes valores de hidrofiliidad han sido asignados a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0 $\pm$ 1); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (−0,4); prolina (−0,5 $\pm$ 1); alanina (−0,5); histidina (−0,5); cisteína (−1,0); metionina (−1,3); valina (−1,5); leucina (−1,8); isoleucina (−1,8); tirosina (−2,3); fenilalanina (−2,5) y triptofan (−3,4). Al realizar cambios que se basan en valores similares de hidrofiliidad, en ciertas formas de realización, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , en ciertas formas de realización se incluyen aquellos que están dentro de ± 1 , y en ciertas formas de realización, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$. Uno puede asimismo identificar epítomos a partir de secuencias primarias de aminoácidos sobre la base de hidrofiliidad. También se hace referencia a estas regiones como “regiones centrales epitópicas”.

[0292] En ciertas formas de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones, o eliminaciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del

anticuerpo para ligar antígeno. Por ejemplo, alteraciones conservadoras (*p.ej.*, sustituciones conservadoras como se presentan aquí) que no reducen sustancialmente la afinidad de ligadura se pueden hacer en las HVR. Tales alteraciones pueden, por ejemplo estar fuera de los residuos en contacto con antígenos en las HVR. En ciertas formas de realización de las secuencias variantes VH y VL presentadas más arriba, cada HVR, o permanece inalterada, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

[0293] Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones de terminal carboxil y/o amino que en extensión van desde un residuo a polipéptidos que comprenden cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionil N-terminal. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del terminal N- o C- del anticuerpo a una enzima (*p.ej.*, por ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media del anticuerpo en suero.

[0294] Todo residuo de cisteína no involucrado en mantener la conformación correcta del anticuerpo también puede ser sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir entrecruzamiento anormal. Por otro lado, puede(n) agregarse ligadura(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (especialmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

(ii) *Variantes de glicosilación*

[0295] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí se presentan, el anticuerpo es alterado para aumentar o disminuir el grado de glicosilación del anticuerpo. El agregado o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse en forma conveniente por medio de la alteración de la secuencia de aminoácido de modo tal que se cree o se elimine uno o más sitios de glicosilación.

[0296] Generalmente, la glicosilación de anticuerpos está unida por enlaces N-glucosídicos o enlaces O-glucosídicos. Un enlace N- se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de alguna de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación por un enlace O- se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, siendo el más común serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0297] El agregado de sitios de glicosilación se logra en forma conveniente al alterar la secuencia de aminoácido de modo tal que contenga una o más de las secuencias de tripéptido que se describen más

arriba (para los sitios de glicosilación N-glucosídicos). La alteración también puede realizarse por medio del agregado de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación O-glucosídicos).

[0298] Donde el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a la misma puede ser alterado. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamíferos generalmente comprenden un oligosacárido ramificado biantenarico que está unido generalmente por un enlace N-glucosídico a Asn297 de acuerdo con la numeración de Kabat del dominio CH2 de la región Fc. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa, y ácido siálico, así como fucosa unida a GlcNAc en el “tallo” de la estructura biantenaria del oligosacárido.

En algunas formas de realización, modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la revelación pueden tener lugar a los efectos de crear variantes de anticuerpos con ciertas propiedades mejoradas.

[0299] En una forma de realización, aparecen variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa agregada (directa o indirectamente) a una región Fc. Ver, *p.ej.*, Publicación de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2003/0157108 y 2004/0093621. Ejemplos de publicaciones relativas a variantes de anticuerpos “defucosiladas” o “fucosa-deficiente” incluyen US 2003/0157108; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; Okazaki *et al. J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004). Ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Led 3 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US 2003/0157108), y líneas celulares desactivadas, tales como gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO desactivadas (ver, *p.ej.*, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004) y Kanda *et al. Biotechnol. Bioeng.* 94(4):680-688 (2006)).

(iii) Regiones constantes modificadas

[0300] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo Fc es un isotipo y/o modificación de anticuerpo Fc. En algunas formas de realización, el isotipo y/o modificación de anticuerpo Fc tiene la capacidad de ligarse al receptor Fc gamma.

[0301] En algunas formas de realización de cualquiera de los anticuerpos aquí dispuestos, el anticuerpo Fc modificado es un IgG1 Fc modificado. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una o más sustituciones de aminoácidos (*p.ej.*, en relación con una región Fc en estado natural del mismo isotipo). En algunas formas de realización, la una o más sustituciones son seleccionadas de N297A (Bolt S *et al. (1993) Eur J Immunol* 23:403-411), D265A (Shields *et al. (2001) R. J. Biol. Chem.* 276, 6591–6604), L234A, L235A (Hutchins *et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA*, 92:11980-11984; Alegre *et al., (1994) Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu *et al., (2000) Cell Immunol*,

200:16-26), G237A (Alegre *et al.* (1994) *Transplantation* 57:1537-1543. 31; Xu *et al.* (2000) *Cell Immunol*, 200:16-26), C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern *et al.*, (2007) *Blood*, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, y/o T256E, donde la posición del aminoácido está de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

[0302] En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutación N297A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutaciones D265A y N297A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutación N297A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutación K322A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutación N297A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutación P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutaciones D270A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutaciones L234A y L235A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutaciones L234A y G237A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende mutaciones L234A, L235A y G237A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende una o más (incluyendo todas) mutaciones de P238D, L328E, E233, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende una o más mutaciones de S267E/L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones N325S y L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea (N325S/L328F). En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones P238D, L328E, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones P238D, S267E, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de

realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones P238D, S267E, L328E, G237D, H268D, P271G y A330R de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones C226S, C229S, E233P, L234V, y L235A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones L234F, L235E, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones S267E de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc comprende un sustituto de la región constante pesada 1 (CH1) y región bisagra de IgG1 con CH1 y región bisagra de IgG2 (aminoácidos 118-230 de IgG2 de acuerdo con la numeración de la Unión Europea) con una cadena ligera de Kappa.

[0303] En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el Fc incluye dos o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la formación de grupos de anticuerpos sin activar complemento en comparación con el correspondiente anticuerpo que tiene una región Fc que no incluye las dos o más sustituciones de aminoácidos. Del mismo modo, en varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados el IgG1 Fc modificado es un anticuerpo que comprende una región Fc, donde el anticuerpo comprende una sustitución de aminoácido en la posición E430G y una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc en una posición de residuo seleccionada de: L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, y cualquier combinación de los mismos de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G, L234A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones L234A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G, K322A, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende

una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G, K322A, y A330S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En algunas formas de realización, el IgG1 Fc modificado comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G, K322A, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

5 **[0304]** En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el IgG1 Fc modificado puede además comprender aquí y puede combinarse con una mutación A330L (Lazar *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 103:4005-4010 (2006)), o una o más mutaciones de L234F, L235E, y/o P331S (Sazinsky *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 105:20167-20172 (2008)), de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea according to the EU numbering convention, para eliminar la activación
10 de complemento. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el IgG1 Fc modificado puede además comprender una o más mutaciones de A330L, A330S, L234F, L235E, y/o P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el IgG1 Fc modificado puede además comprender una o más mutaciones para aumentar la vida media del anticuerpo en suero humano, (*p.ej.*, una o más (incluyendo todas) de
15 M252Y, S254T, y T256E de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea). En varias formas de realización de alguno de los IgG1 Fc modificados, el IgG1 Fc modificado puede además comprender una o más mutaciones de E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y/o S440W de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

[0305] Otros aspectos de la presente revelación se relacionan con los anticuerpos que han modificado
20 las regiones constantes (es decir, regiones Fc). Un anticuerpo dependiente de ligadura al receptor de FcγR para activar los receptores impactados puede perder su actividad agonista si fuese diseñado para eliminar ligadura a FcγR (ver *p.ej.*, Wilson *et al. Cancer Cell* 19:101-113 (2011); Armour *et al. Immunology* 40:585-593 (2003); y White *et al. Cancer Cell* 27:138-148 (2015)). Como tal, se piensa que un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación con la correcta especificidad del epítipo
25 puede activar el antígeno blanco, con mínimos efectos adversos, cuando el anticuerpo tiene un dominio de Fc de un isotipo IgG2 (CH1 y región bisagra) u otro tipo de dominio Fc que es capaz de ligar en forma preferencial los receptores r FcγRIIB inhibitorios o una variante de los mismos.

[0306] En varias formas de realización de alguno de los anticuerpos que aparecen aquí, el anticuerpo modificado Fc es un IgG2 Fc modificado. En algunas formas de realización, el IgG2 Fc modificado
30 comprende una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el IgG2 Fc modificado comprende una o más sustituciones de aminoácido (*p.ej.*, en relación con una región Fc en estado natural del mismo isotipo). En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, la una o más sustituciones de aminoácidos son seleccionadas de V234A (Alegre *et al. Transplantation* 57:1537-1543 (1994); Xu *et al. Cell Immunol*, 200:16-26 (2000)); G237A (Cole *et al.*

Transplantation, 68:563-571 (1999)); H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour *et al. Eur J Immunol* 29: 2613-2624 (1999); Armour *et al. The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27 (2000); Armour *et al. The Haematology Journal* 1(Suppl.1):27 (2000)), C219S, y/o C220S (White *et al. Cancer Cell* 27, 138-148 (2015)); S267E, L328F (Chu *et al. Mol Immunol*, 45:3926-3933 (2008)); y M252Y, S254T, y/o T256E de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones V234A y G237A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones C219S o C220S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones A330S y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

[0307] En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución C127S de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea (White *et al.*, (2015) *Cancer Cell* 27, 138-148; Lightle *et al. Protein Sci.* 19:753-762 (2010); y WO 2008/079246). En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el anticuerpo tiene un isotipo IgG2 con un dominio constante de cadena ligera que comprende una sustitución C214S de aminoácido de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea (White *et al. Cancer Cell* 27:138-148 (2015); Lightle *et al. Protein Sci.* 19:753-762 (2010); y WO 2008/079246).

[0308] En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución C220S de aminoácidos de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el anticuerpo tiene un isotipo IgG2 con un dominio constante de cadena ligera de Kappa que comprende una sustitución C214S de aminoácido de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea.

[0309] En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución C219S de aminoácidos de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el anticuerpo tiene un isotipo IgG2 con un dominio constante de cadena ligera de Kappa que comprende una sustitución C214S de aminoácido de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea.

[0310] En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc incluye un isotipo IgG2 de dominio constante de cadena pesada 1 (CH1) y región bisagra (White *et al. Cancer Cell* 27:138-148 (2015)). En ciertas formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el isotipo IgG2 CH1 y región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos de 118-230 de acuerdo con la

numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, la región del anticuerpo Fc comprende una sustitución S267E de aminoácido, una sustitución L328F de aminoácido, o ambas, y/o una sustitución N297A o N297Q de aminoácido de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea.

5 **[0311]** En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones E430G, E430S, E430F, E430T, E345K, E345Q, E345R, E345Y, S440Y, y S440W de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc puede comprender además una o más mutaciones para aumentar la vida media del anticuerpo en suero humano (*p.ej.*, una o más mutaciones (incluyendo todas) de M252Y, S254T, y T256E de acuerdo con la numeración de la Unión Europea). En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc puede comprender además A330S y P331S.

10 **[0312]** En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc es un Fc híbrido IgG2/4. En algunas formas de realización, el Fc híbrido IgG2/4 comprende IgG2 aa 118 a 260 y IgG4 aa 261 a 447. En varias formas de realización de alguno de los IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones H268Q, V309L, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

15 **[0313]** En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una o más sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionadas de A330L, L234F; L235E, o P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea; y cualquier combinación de las mismas.

20 **[0314]** En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la posición de residuo seleccionada de C127S, L234A, L234F, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, A330S, P331S, E345R, E430G, S440Y, y cualquier combinación de las mismas de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, L243A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización

de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, A330S, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y A330S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E430G, K322A, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición C127S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias formas de realización de alguno de los IgG1 y/o IgG2 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones E345R, E430G y S440Y de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

[0315] En varias de las formas de realización de alguno de los anticuerpos que aquí aparecen, el anticuerpo Fc modificado es un IgG4 Fc modificado. En algunas formas de realización, el IgG4 Fc modificado comprende una o más modificaciones. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el IgG4 Fc modificado comprende una o más sustituciones de aminoácidos (*p.ej.*, en relación con una región Fc en estado natural del mismo isotipo). En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados la una o más sustituciones de aminoácidos son seleccionadas de L235A, G237A, S229P, L236E (Reddy *et al. J Immunol* 164:1925-1933(2000)), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, y/o T256E de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados el Fc puede además comprender L235A, G237A, y E318A de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc puede comprender además S228P y L235E de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el IgG4 Fc modificado puede comprender además S267E y L328F de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea.

[0316] En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el IgG4 Fc modificado puede combinarse con una mutación S228P de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea (Angal *et al. Mol Immunol.* 30:105-108 (1993)) y/o con una o más mutaciones que se describen en (Peters *et al. J Biol Chem.* 287(29):24525-33 (2012)) para aumentar la estabilización del anticuerpo.

[0317] En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el IgG4 Fc puede además comprender una o más mutaciones para aumentar la vida media del anticuerpo en suero

humano (*p.ej.*, una o más mutaciones (incluyendo todas) de M252Y, S254T, y T256E mutations de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea).

[0318] En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende L235E de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende la mutación de S228P de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende las mutaciones de S267E y L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una o más sustituciones de aminoácido en una posición de residuo seleccionada de C127S, F234A, L235A, L235E, S267E, K322A, L328F, E345R, E430G, S440Y, y cualquier combinación de las mismas, de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G, L243A, L235A, y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones positions E430G y P331S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición E430 de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, la región de Fc comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E430G y K322A de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones S267E y L328F de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en la posición C127S de acuerdo con la numeración de la Unión Europea. En varias de las formas de realización de alguno de los IgG4 Fc modificados, el Fc comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones E345R, E430G y S440Y de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

[0319] En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 336. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 328. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 320.

[0320] En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana sin una lisina C-terminal. En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana con una mutación P331S. En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana con una mutación P331S y sin una lisina C-terminal. En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana con mutaciones N325S y L328F (N325S/L328F). En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana con una mutación N325S/L328F y sin una lisina C-terminal. En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana con una mutación K322A. En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena pesada de IgG1 humana con una mutación K322A y sin una lisina C-terminal. En las formas de realización precedentes, las mutaciones se indican de acuerdo con la numeración de la Unión Europea.

[0321] En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 337. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 338. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 339. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 340. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 341. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 342. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 343.

[0322] En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 329. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 330. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 331. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 332. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 333. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 334. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 335.

[0323] En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 321. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 322. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 323. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 324. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 325. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 326. En algunas formas de realización, un anticuerpo consta de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 327.

(8) *Otras modificaciones en los anticuerpos*

[0324] En algunas formas de realización de los anticuerpos, el anticuerpo es un derivado. El término “derivado” se refiere a una molécula que incluye una modificación química diferente de una inserción, una supresión, o una sustitución de aminoácidos (o de ácidos nucleicos). En determinadas formas de realización, los derivados comprenden modificaciones covalentes, inclusive, aunque sin limitarse solamente a la unión química con polímeros, lípidos u otras porciones orgánicas o inorgánicas. En determinadas formas de realización, una proteína de unión de antígenos modificada químicamente puede tener una mayor vida media circulante que una proteína de unión de antígenos no modificada químicamente. En determinadas formas de realización, una proteína de unión a antígenos modificada químicamente puede tener una mayor capacidad de orientación a las células, tejidos y órganos deseados. En algunas formas de realización, una proteína derivada de unión a antígenos se modifica covalentemente para incluir uno o más aditamentos de polímeros solubles en agua, inclusive, aunque sin limitarse solamente a polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol. Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos de América Nos. 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 y 4179337. En determinadas formas de realización, una proteína derivada de unión de antígenos comprende uno o más polímeros, inclusive, entre otros, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, los copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli-(N-vinil pirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico, así como las mezclas de dichos polímeros.

[0325] En determinadas formas de realización, un derivado se modifica covalentemente con subunidades de polietilenglicol (PEG). En determinadas formas de realización, uno o más polímeros

solubles en agua se unen en una o más posiciones específicas, por ejemplo en el extremo amino, de un derivado. En determinadas formas de realización, uno o más polímeros solubles en agua se unen aleatoriamente a una o más cadenas laterales de un derivado. En determinadas formas de realización, PEG se utiliza para mejorar la capacidad terapéutica de una proteína de unión de antígenos. En determinadas formas de realización, PEG se utiliza para mejorar la capacidad terapéutica de un anticuerpo humanizado. Algunos de estos métodos son tratados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos de América No. 6133426, que se incorpora aquí a modo de referencia para el propósito que sea.

[0326] Los análogos de péptidos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido patrón. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan “péptidos miméticos” o “peptidomiméticos”. Fauchere, *J. Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986); y Evans *et al. J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987), que se incorporan aquí a modo de referencia para el propósito que sea. Tales compuestos a menudo se desarrollan con la ayuda de modelos moleculares computarizados. Los péptidos miméticos que son estructuralmente similares a los péptidos de utilidad terapéutica pueden utilizarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico similar. Generalmente, la peptidomimética es estructuralmente similar a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o una actividad farmacológica), como, por ejemplo, el anticuerpo humano, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado de entre: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por métodos bien conocidos en el arte. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso por un aminoácido D del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede utilizarse en ciertas formas de realización para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de la secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden generarse a través de métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch *Ann. Rev. Biochem.*, 61:387 (1992), incorporados aquí a modo de referencia para el propósito que sea); por ejemplo, añadiendo residuos internos de cisteína capaces de formar puentes intramoleculares de disulfuro que ciclizan el péptido.

[0327] La conjugación de fármacos implica el acoplamiento de una carga útil biológica activa citotóxica (anticancerígena) o de un fármaco a un anticuerpo cuyo objetivo específico es un determinado marcador tumoral (por ejemplo, un polipéptido que, idealmente, sólo se encuentra dentro o sobre las células tumorales). Los anticuerpos rastrean a estas proteínas en el cuerpo y se adhieren a la superficie de las células cancerosas. La reacción bioquímica entre el anticuerpo y la proteína objetivo (antígeno) activa una señal en la célula tumoral, que luego absorbe o internaliza el anticuerpo junto con la citotoxina. Después de que el conjugado anticuerpo-fármaco (CAD, en inglés) es internalizado, la droga citotóxica es liberada y mata al cáncer. Debido al rastreo del objetivo, idealmente el fármaco tiene

menos efectos secundarios y da una ventana terapéutica más amplia que otros agentes quimioterapéuticos. Las técnicas para conjugar anticuerpos que se revelan son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Jane de Lartigue OncLive July 5, 2012; ADC Review on antibody-drug conjugates; y Ducry *et al. Bioconjugate Chemistry* 21 (1):5-13 (2010).

5 **III. Ácidos nucleicos, vectores, y células huésped**

10 **[0328]** Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación pueden producirse mediante métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de América No. 4816567. En algunas formas de realización, se proveen ácidos nucleicos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación. Tales ácidos nucleicos pueden codificar una secuencia de aminoácidos que comprende V_L y/o una secuencia de aminoácidos que comprende V_H del anticuerpo anti-MS4A4A (es decir, las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En algunas formas de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dichos ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, se provee también una célula huésped que comprende dichos ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, la célula huésped comprende (ha sido transducida con): (1) un vector que consta de un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende V_L del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende V_H del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende V_L del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende V_H del anticuerpo. En algunas formas de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO, en inglés) o una célula linfocítica (por ejemplo, Y0, NS0, célula Sp20). Las células huésped de la presente revelación también incluyen, sin limitarse solamente a células aisladas, células cultivadas *in vitro*, y células cultivadas *ex vivo*.

25 **[0329]** Se brindan métodos para el desarrollo de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención. En algunas formas de realización, el método incluye cultivar una célula huésped de la presente invención que comprende un ácido nucleico que codifica al anticuerpo MS4A4A, bajo condiciones aptas para la expresión del anticuerpo. En algunas formas de realización, el anticuerpo es posteriormente recuperado de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

30 **[0330]** Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, se aísla un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-MS4A4A y se inserta en uno o más vectores para su posterior clonación y/o expresión en una célula huésped. Dicho ácido nucleico puede ser fácilmente aislado y secuenciado mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de

oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo).

[0331] Los vectores adecuados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, o fragmentos expresados en la superficie celular o polipéptidos de los mismos (incluidos los anticuerpos) aquí descriptos incluyen, sin limitación, a los vectores de clonación y a los vectores de expresión. Se pueden construir vectores de clonación adecuados de acuerdo con técnicas estándar, o se los puede seleccionar de entre un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Si bien el vector de clonación seleccionado puede variar según la célula huésped que se vaya a utilizar, los vectores de clonación útiles suelen tener la capacidad de autorreplicarse, pueden poseer un solo objetivo para una endonucleasa particular de restricción, y/o pueden portar genes para un marcador que se puede usar en la selección de los clones que componen el vector. Entre los ejemplos adecuados figuran plásmidos y los virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fago y vectores transportadores o de lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Éstos y muchos otros vectores de clonación están disponibles en el mercado a través de empresas como BioRad, Strategene e Invitrogen.

[0332] Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores de codificación de anticuerpo incluyen células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación se pueden producir en bacterias, en particular cuando la glicosilación y la función de efector Fc no son necesarias. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias (por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5648237, 5789199, y 5840523. Tras la expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y luego continuar su purificación.

[0333] Además de los procariotas, los microorganismos eucarióticos, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son también huéspedes adecuados para la clonación o la expresión de vectores de codificación de anticuerpos, inclusive las cepas de hongos y levaduras cuyas vías de glicosilación se han “humanizado”, lo que da lugar a la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcialmente o totalmente humano (por ejemplo, Gerngross *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004); y Li *et al. Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006)).

[0334] También se pueden derivar células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado a partir de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Entre los ejemplos de células de invertebrados se encuentran las células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirales que pueden utilizarse junto con células de insectos, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Los cultivos de células de plantas también

pueden utilizarse como huéspedes (ver por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de América Nos. 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, y 6417429, donde se describe la tecnología de PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas.

[0335] También se pueden usar las células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, pueden resultar útiles las líneas de células de mamíferos que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos que pueden ser útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón de embriones humanos (293 o células 293 como se la describe, por ejemplo, en Graham *et al. J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); las células de riñón de hámster bebé (BHK); las células sertoli de ratón (células TM4 como se las describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); las células de riñón de mono (CV1); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76); las células de carcinoma cervical humano (HELA); las células de riñón canino (MDCK); las células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A); las células de pulmón humano (W138); las células de hígado humano (Hep G2); el tumor mamario de ratón (MMT 060562); las células TRI, como se describe, por ejemplo en Mather *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); las células MRC 5; y las células FS4. Otras líneas de células huésped útiles de mamíferos son las células de ovario de hámster chino (CHO), inclusive las células DHFR- CHO (Urlaub *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y las líneas de células de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para analizar determinadas líneas de células huésped de mamíferos para la producción de anticuerpos, remitirse, por ejemplo a Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

IV. Composiciones / formulaciones farmacéuticas

[0336] Se proporcionan aquí composiciones y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0337] En algunas formas de realización, los portadores farmacéuticamente aceptables son preferiblemente no tóxicos para los receptores en las dosis y con las concentraciones empleadas. Los anticuerpos que aquí se describen pueden ser formulados en preparaciones sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas. Los ejemplos de tales formulaciones incluyen, entre otros, pastillas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, y aerosoles. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir, según la formulación deseada, portadores no tóxicos de diluyentes farmacéuticamente aceptables, que son vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para su administración a animales o seres humanos. En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica puede incluir materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad,

la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición.

[0338] En determinadas formas de realización, los portadores farmacéuticos aceptables incluyen, entre otros, a aminoácidos (tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina); a antimicrobianos; a antioxidantes (como el ácido ascórbico, el sulfito de sodio o el sulfito de hidrógeno de sodio); a sustancias reguladoras o búfer (como el borato, el bicarbonato, el Tris-HCl, los citratos, los fosfatos u otros ácidos orgánicos); a agentes de carga (como el manitol o la glicina); a agentes quelantes (como el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); a agentes complejantes (como la cafeína, la polivinilpirrolidona, la beta-ciclodextrina o la hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (como la glucosa, la manosa o las dextrinas); proteínas (como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas); colorantes, saborizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (como la polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contrafuertes formadores de sal (como el sodio); conservantes (como el cloruro de benzalconio, el ácido benzoico, el ácido salicílico, el timerosal, el alcohol fénico, el metilparabeno, el propilparabeno, la clorhexidina, el ácido sórbico o el peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como la glicerina, el propilenglicol o el polietilenglicol); alcoholes de azúcar (como el manitol o el sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos como el polisorbato 20, el polisorbato 80, el tritón, la trometamina, la lecitina, el colesterol, el tyloxapal); agentes que aumentan la estabilidad (tales como la sucrosa o el sorbitol); agentes que aumentan la tonicidad (como los haluros metálicos alcalinos, preferiblemente el cloruro de sodio o de potasio, el manitol sorbitol); vehículos de entrega; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Más ejemplos de formulaciones aptas para diversos tipos de administración se pueden encontrar en *Remington: The Science y Practice of Pharmacy*, Pharmaceutical Press 22nd ed. (2013). Para una breve reseña de los métodos de administración de fármacos, véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990)

[0339] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables acuosas y no acuosas, isotónicas y estériles, que pueden comprender antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen que la formulación resulte isotónica con la sangre del receptor a quien va dirigida, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden abarcar a agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores, y conservantes.

[0340] Las formulaciones pueden ser optimizadas para su retención y estabilización en el cerebro o en el sistema nervioso central. Cuando el agente se administra en el compartimiento craneal, es ideal que quede retenido en dicho compartimiento, y no se esparza o de otra manera cruce la barrera hematoencefálica. Las técnicas de estabilización incluyen la reticulación, la multimerización o la

vinculación a grupos como el polietilenglicol, la poliacrilamida, los portadores de proteínas neutras, etc., a fin de lograr un aumento del peso molecular.

[0341] Otras estrategias para aumentar la retención incluyen el atrapamiento del anticuerpo, como ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación, en un implante biodegradable o bioerodible. La tasa de liberación del agente terapéutico activo está controlada por la tasa de transporte a través de la matriz polimérica, y la biodegradación del implante. Los implantes pueden ser partículas, láminas, parches, placas, fibras, microcápsulas y similares y pueden ser de cualquier tamaño o forma que resulten compatibles con el lugar seleccionado para la inserción. Las composiciones poliméricas biodegradables que pueden emplearse pueden ser ésteres o éteres orgánicos que, al degradarse, dan lugar a productos de degradación fisiológicamente aceptables, incluidos los monómeros. Se pueden utilizar anhídridos, amidas, ortoésteres o similares, por sí solos o en combinación con otros monómeros. Los polímeros serán polímeros de condensación. Los polímeros pueden ser reticulados o no reticulados. De particular interés son los polímeros de ácidos carboxílicos hidroxialifáticos, ya sean homo o copolímeros, y polisacáridos. Entre los poliésteres de interés figuran los polímeros de ácido D-láctico, ácido L-láctico, ácido láctico racémico, ácido glicólico, policaprolactona, y combinaciones de ellos. Entre los polisacáridos de interés se encuentran el alginato de calcio, y las celulosas funcionalizadas, en particular los ésteres de carboximetilcelulosa que se caracterizan por ser insolubles en el agua, un peso molecular de aproximadamente 5 kD a 500 kD, etc. También pueden emplearse hidrogeles biodegradables en los implantes de la presente revelación. Los hidrogeles son típicamente un material copolímero, caracterizado por la capacidad de embeber un líquido.

V. Usos terapéuticos

[0342] Como aquí se revela, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención se pueden usar para prevenir, reducir riesgos o tratar enfermedades y trastornos. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención resulta efectivo para la prevención, reducción de riesgos o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, y el deterioro cognitivo.

MS4A4A como objetivo de patología

[0343] Según estudios de asociación del genoma se han identificado varios miembros de la familia MS4A asociados con la enfermedad de Alzheimer. Estos son MS4A2, MS4A3, MS4A4A, MS4A4E, MS4A6A, y MS4A6E. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados se encuentran en la región no traducida 3' (UTR) de MS4A6A (rs610932) y la región intergénica entre MS4A4E y MS4A6A (rs670139). Hay tres SNP en el grupo de genes MS4A que se han asociado con un mayor riesgo de la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía. Estos son rs4938933 en MS4A4A, rs670139 en MS4A4E, y rs610932 en MS4A6A (Hollingworth *et al*, 2011, Nat Genetics, 43:429-435; Naj *et al*, 2011, Nature

Genetics, 43:436-441; Antunez *et al*, 2011, Genome Medicine, 3, artículo 33). Por otra parte, los SNP en la ubicación MS4A4A (rs2304933 y rs2304935) están asociados con niveles superiores de MS4A4A y mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer, incluida la Enfermedad de Alzheimer de Aparición Tardía (LOAD, en inglés) (Allen *et al*, 2012, Neurology, 79:221-228).

- 5 **[0344]** Los métodos aquí provistos encuentran uso en la prevención, reducción del riesgo, o tratamiento de individuos con enfermedades, trastornos o condiciones neurodegenerativas. En algunas formas de realización, la presente invención brinda un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a individuos con un trastorno neurodegenerativo, en donde dicho método comprende la administración al individuo que lo necesita, de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A anticuerpo.
- 10 **[0345]** En algunas formas de realización, la presente invención brinda un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a individuos con enfermedad de Alzheimer, en donde dicho método comprende la administración al individuo que lo necesita, de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A anticuerpo.
- [0346]** En algunas formas de realización, la presente invención brinda un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a individuos con enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, en donde dicho método comprende la administración al individuo que lo necesita, de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A anticuerpo.
- 15 **[0347]** En algunas formas de realización, la presente invención brinda un método para la prevención, reducción de riesgos o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, y el deterioro cognitivo, donde dicho método comprende la administración al individuo que lo necesita, de una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A.
- 20 **[0348]** En algunas formas de realización, la presente invención brinda un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a individuos con una enfermedad, trastorno, o condición asociada con la sobre-expresión o mayor actividad de MS4A4A, donde el método comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-MS4A4A.
- 25 **[0349]** En algunas formas de realización, la presente invención brinda un método para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que padece una enfermedad o trastorno de deficiencia de CSF1R, cuyo método comprende administrar al individuo que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-MS4A4A. En algunas formas de realización, la enfermedad o trastorno de deficiencia del
- 30 CSF1R (receptor del factor estimulante de colonias 1) es la leucoencefalopatía del adulto con esferoides axonales y células gliales pigmentadas (ALSP, en inglés) o leucoencefalopatía difusa hereditaria con esferoides (HDLS, en inglés).
- [0350]** Otros aspectos de la presente invención se refieren a un método de prevenir, reducir el riesgo, o tratar a un individuo que padece una enfermedad, trastorno, o lesión seleccionados de entre el grupo

que consiste en demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, ataques, convulsiones, distrofia retinal, lesión cerebral traumática, lesión en la médula espinal, depresión prolongada, enfermedades ateroscleróticas vasculares, síntomas indeseables de envejecimiento normal, demencia, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de taupatía, accidente cerebrovascular, traumatismo agudo, traumatismo crónico, lupus, colitis aguda y crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, paludismo, temblor esencial, lupus del sistema nervioso central, enfermedad de Behcet, Enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad degenerativa del disco, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, degeneración ganglionar basal cortical, encefalomielitis aguda diseminada, trastornos granulomatosos, sarcoidosis, enfermedades de la vejez, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración de la retina, infección de las vías respiratorias, sepsis, infección ocular, infección sistémica, trastornos inflamatorios, artritis, esclerosis múltiple, trastorno metabólico, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, daño tisular o vascular, una lesión, restos de células inflamatorias o agregados de proteínas, células mieloides circulantes anormales, envejecimiento no saludable, deterioro cognitivo relacionado con la edad, atrofia cerebral relacionada con la edad, rasgos asociados con la edad, incluyendo, entre otros, inflamación, pérdida neuronal, y déficits cognitivos, tales como por ejemplo déficits cognitivos en ausencia de enfermedad cerebral conocida, inclusive los déficits cognitivos de la corteza cerebral frontal de un individuo mayor y, uno o más síntomas indeseables de envejecimiento normal, que comprenden la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes. Otros aspectos de la presente exposición se refieren a un anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes para su uso en la prevención, la reducción del riesgo o el tratamiento de un individuo que padezca una enfermedad, un trastorno o una lesión seleccionada del grupo que consiste en demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, convulsiones, distrofia retinal, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, depresión prolongada, enfermedades vasculares ateroscleróticas, síntomas indeseables de envejecimiento normal, demencia, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de taupatia, accidente cerebrovascular, traumatismo agudo, traumatismo crónico, lupus, colitis aguda y crónica, Enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, paludismo, temblor esencial, lupus del sistema nervioso central, enfermedad de Behcet, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad degenerativa del disco, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva,

degeneración ganglionar basal cortical, encefalomiелitis aguda diseminada, trastornos granulomatosos, sarcoidosis, enfermedades de la vejez, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentaria, degeneración de la retina, infección de las vías respiratorias, sepsis, infección ocular, infección sistémica, trastornos inflamatorios, artritis, esclerosis múltiple, trastornos metabólicos, 5 obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, daños tisulares o vasculares, una lesión, restos de células inflamatorias o agregados de proteínas, células mieloides circulantes anormales, envejecimiento no saludable, deterioro cognitivo relacionado con la edad, atrofia cerebral relacionada con la edad, rasgos asociados con la edad, incluyendo sin limitación la inflamación, pérdida neuronal, y déficits cognitivos, como los déficits cognitivos en ausencia de enfermedad cerebral conocida, incluyendo 10 déficits cognitivos de la corteza cerebral frontal de un individuo mayor, y uno o más síntomas indeseables de envejecimiento normal. Otros aspectos de la presente revelación se relacionan con un anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes para su uso en la prevención o reducción de la metástasis. Otros aspectos de la presente revelación se relacionan con un anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes para su uso en la 15 prevención, reducción del riesgo o tratamiento de un individuo con cáncer.

[0351] Otros aspectos de la presente revelación se refieren al uso de un anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes en la producción de un medicamento para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que padece una enfermedad, trastorno o lesión seleccionada del grupo consistente en demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, 20 enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, convulsiones, distrofia retinal, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, depresión prolongada, enfermedades vasculares ateroscleróticas, síntomas indeseables de envejecimiento normal, demencia, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de taupatia, accidente cerebrovascular, 25 traumatismo agudo, traumatismo crónico, lupus, colitis aguda y crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, paludismo, temblor esencial, lupus del sistema nervioso central, enfermedad de Behcet, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad degenerativa del disco, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, degeneración ganglionar basal cortical, encefalomiелitis aguda diseminada, 30 trastornos granulomatosos, sarcoidosis, enfermedades del envejecimiento, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración de la retina, infección de las vías respiratorias, sepsis, infección ocular, infección sistémica, trastornos inflamatorios, artritis, esclerosis múltiple, trastorno metabólico, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes de tipo 2, daño tisular o vascular, una lesión, restos de células inflamatorias o agregados de proteínas, células mieloides

circulantes anormales, envejecimiento no saludable, deterioro cognitivo relacionado con la edad, atrofia cerebral relacionada con la edad, rasgos asociados con la edad, incluyendo, entre otros, inflamación, pérdida neuronal, y los déficits cognitivos, tales como, por ejemplo, los déficits cognitivos en ausencia de enfermedad cerebral conocida, inclusive los déficits cognitivos de la corteza cerebral frontal del individuo mayor y uno o más síntomas indeseables de envejecimiento normal. Otros aspectos de la presente revelación se relacionan con un método de prevención, reducción del riesgo o tratamiento de un individuo que padece una enfermedad, trastorno o lesión seleccionado del grupo que consiste en demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, convulsiones, distrofia retinal, esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, demencia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, encefalomiелitis aguda diseminada, degeneración de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, esclerosis múltiple, shock séptico, infección bacteriana, artritis y osteoartritis, que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes. Otros aspectos de la presente revelación se refieren a un anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes para su uso en la prevención, la reducción del riesgo o el tratamiento de un individuo que padezca una enfermedad, trastorno o lesión seleccionada del grupo que consiste en demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, convulsiones, distrofia de retina, esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, demencia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, encefalomiелitis aguda diseminada, degeneración de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, esclerosis múltiple, shock séptico, infección bacteriana, artritis y osteoartritis. Otros aspectos de la presente revelación se relacionan con el uso de un anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes en la producción de un medicamento para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que padece una enfermedad, trastorno o lesión seleccionada del grupo consistente en demencia frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, convulsiones, distrofia de retina, esclerosis lateral amiotrófica, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, demencia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, encefalomiелitis aguda diseminada, degeneración de la retina, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, esclerosis múltiple, shock séptico, infección bacteriana, artritis y osteoartritis.

[0352] En algunas formas de realización, el sujeto o individuo es un mamífero. Los mamíferos abarcan, entre otros, a animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gtos, perros, y caballos), primates (por

ejemplo, primates humanos y no humanos como, por ejemplo, monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En algunas formas de realización, el sujeto o individuo es un humano.

5 **[0353]** Un anticuerpo de los aquí dispuestos (y cualquier agente terapéutico adicional) se pueden administrar por cualquier medio adecuado, incluidas las vías parenteral, intrapulmonar, intranasal, intralesional, intracerebroespinal, intracraneal, intraespinal, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa en bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, la administración intraarterial, intraarticular, intraperitoneal o subcutánea. En algunas formas de realización, la administración es intravenosa. En algunas formas de realización, la administración es subcutánea. La dosificación puede realizarse por
10 cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, como las intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. En el presente documento se contemplan varios programas de dosificación, entre ellos, pero no exclusivamente, la administración única o múltiple en diversos puntos temporales, la administración en bolo, y la infusión en pulso.

[0354] Los anticuerpos que aquí se proporcionan se formulan, dosifican y administran de forma
15 consistente con la buena práctica médica. Entre los factores que deben tenerse en cuenta en este contexto figuran el trastorno concreto que se trata, el mamífero en particular al que se trata, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, el lugar en que se administra al agente, el método de administración, el cronograma de la administración y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario que lo sea, pero el anticuerpo opcionalmente está formulado con uno o más agentes que se
20 utilizan actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores que se han examinado anteriormente. Éstos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con las vías de administración aquí descritas, o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis aquí descritas, o en cualquier dosis y por cualquier vía que empírica/clínicamente se
25 determine como apropiada.

[0355] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se utiliza solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia
30 previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico interviniente. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente en una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

[0356] Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg de anticuerpo puede ser la dosis inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, en una o más

administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosis diaria típica puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En el caso de administraciones repetidas durante varios días o más, según la afección, el tratamiento se mantendrá por lo general hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis ejemplar de el anticuerpo estaría en la gama de unos 0,05 mg/kg a unos 150 mg/kg, que pueden administrarse al paciente de manera intermitente, por ejemplo, todas las semanas o cada tres semanas (por ejemplo, de manera tal que el paciente reciba de dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo, unas seis dosis del anticuerpo). En determinadas formas de realización, la frecuencia de las dosis es de tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez al día día por medio, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, o una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o más. Se puede administrar una dosis inicial más alta seguida de una o más dosis más bajas. Sin embargo, otros regímenes de dosis podrían resultar útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas convencionales y ensayos.

VI. Usos diagnósticos

[0357] En algunas formas de realización de algunos de los anticuerpos, cualquiera de los anticuerpos anti-MS4A4A aquí dispuestos resulta útil para detectar la presencia de MS4A4A en una muestra o individuo. El término “detector” como se lo emplea aquí abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Se presentan aquí métodos de empleo de los anticuerpos de la presente invención con propósitos diagnósticos, tales como por ejemplo la detección de MS4A4A en un individuo o en muestras de tejido derivados de un individuo. En algunas formas de realización, el individuo es un humano.

[0358] El método de detección puede comprender la cuantificación del anticuerpo unido al antígeno. La detección de anticuerpos en muestras biológicas puede ocurrir con cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la microscopía de inmunofluorescencia, la inmunocitoquímica, la inmunohistoquímica, el método ELISA, el análisis FACS, la inmunoprecipitación o la tomografía por emisión de micro-positrones. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es radiomarcado, por ejemplo con ¹⁸F y posteriormente detectado mediante análisis de tomografía de emisión de micro-positrones. La unión de los anticuerpos también puede cuantificarse en un paciente mediante técnicas no invasivas como la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía computarizada de rayos X, la tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT), la tomografía computarizada (CT) y la tomografía axial computarizada (CAT).

VII. Artículos de Fabricación

[0359] En este documento se indican artículos de fabricación (por ejemplo, kits) que comprenden anticuerpos anti-MS4A4A como los que aquí se describen. El artículo de fabricación puede incluir uno o más envases con un anticuerpo de los aquí descritos. Los envases pueden ser cualquier tipo de embalaje adecuado, entre otros, viales, frascos, tarros, contenedores flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico), y similares. Los envases pueden ser para dosis unitarias, o a granel (por ejemplo, envases multidosis) o sub-unidades de dosis.

[0360] En algunas formas de realización, los kits pueden además incluir un segundo agente. En algunas formas de realización, el segundo agente es un búfer farmacéuticamente aceptable o un agente diluyente, incluyendo, entre otros, agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. En algunas formas de realización, el segundo agente es un agente farmacéuticamente activo.

[0361] En algunas formas de realización de cualquiera de los artículos de fabricación, el artículo incluye además instrucciones de uso de acuerdo con los métodos de la presente invención. Las instrucciones comprenden generalmente información sobre dosis, cronograma de las dosis y vía de administración para el tratamiento previsto. En algunas formas de realización, estas instrucciones proveen una descripción de la administración del anticuerpo aislado de la presente invención (por ejemplo un anticuerpo anti-MS4A4A como los aquí descritos) para prevenir, reducir el riesgo o tratar a un individuo que padece una enfermedad, trastorno o lesión seleccionada de entre demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Alzheimer de aparición tardía, deterioro o declive cognitivo, deterioro cognitivo leve, demencia vascular, convulsiones, distrofia retinal, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, depresión prolongada, enfermedades vasculares ateroscleróticas, síntomas indeseables de envejecimiento normal, demencia, demencia mixta, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, hidrocefalia de presión normal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de taupatia, derrame cerebral, traumatismo agudo, traumatismo crónico, lupus, colitis aguda y crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, malaria, temblor esencial, lupus del sistema nervioso central, enfermedad de Behcet, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, enfermedad degenerativa de los discos, síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, degeneración ganglionar basal cortical, encefalomielitis aguda diseminada, trastornos granulomatosos, sarcoidosis, enfermedades de la vejez, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración de la retina, infección de las vías respiratorias, sepsis, infección ocular, infección sistémica, trastornos inflamatorios, artritis, esclerosis múltiple, trastorno metabólico, obesidad, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, daño tisular o vascular, una lesión, restos de células

inflamatorias o agregados de proteínas, células mieloides circulantes anormales, envejecimiento no saludable, deterioro cognitivo relacionado con la edad, atrofia cerebral relacionada con la edad, rasgos asociados con la edad, incluyendo entre otros inflamación, pérdida neuronal, y déficits cognitivos, tales como por ejemplo déficits cognitivos en ausencia de una enfermedad cerebral conocida, inclusive los déficits cognitivos de la corteza cerebral frontal de un individuo mayor y, uno o más síntomas indeseables de envejecimiento normal, y que comprende la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-MS4A4A de cualquiera de las formas de realización precedentes.

[0362] En algunas formas de realización, las instrucciones están dirigidas al uso del anticuerpo anti-MS4A4A y del segundo agente (por ejemplo, segundo agente farmacéuticamente activo).

[0363] La presente invención se entenderá mejor a través de la referencia a los Ejemplos que aparecen a continuación. No obstante ello, dichos ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención. Todas las citas que se hagan en la invención quedan expresamente incorporadas a modo de referencia.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Humanización de anticuerpos de ratón anti-MS4A4A murino

[0364] El propósito de este ejemplo fue el de generar variants humanizadas de determinados anticuerpos parentales de ratón anti-MS4A4A revelados en la solicitud internacional de la patente con número de serie PCT/US2019/016156.

[0365] El anticuerpo de ratón anti-MS4A4A parental 4A-202 contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de: QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVKQRPQGQLEWIGATHPGHGDTRYTQKFKG KATLSADKSSSTAYMQLSNLASEDSAVYYCAREEVYGFGRSYWYFDVWGRGTLTVSS (SEQ ID NO:164), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGVSFMNWFQKPGQPPKLLIYGASNQGSQGVPARFSG SGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:165).

[0366] El anticuerpo de ratón anti-MS4A4A parental 4A-18 contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de: QVQLQQPGTELKPGASVKLSCKASGYTFTSYWIHWVKQRPQGQLEWIGNINPTNGGTNYNERFKSK ATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARAYYYGSSSLFAYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:166), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWSQKPGQSPKLLIYSASYRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTITNMQSEDLADYFCQQYSTYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:167).

[0367] El anticuerpo de ratón anti-MS4A4A parental 4A-21 contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de: QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTSYGLSWVKQTPGKGLKWMGWINTYSGVPTYANDFKGRF AFSLETSASTTYLRINNLKNDTATYFCARSLVDYWGQGTPLTVSS (SEQ ID NO:168), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: DVVMTQTPFTLSVTIGQSASISCKSSQSLLYSDGKTYLSWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGIDFHQTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:169).

[0368] El anticuerpo de ratón anti-MS4A4A parental 4A-25 contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de: QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLRTSDMGVGVWRQPSGEGLEWLADIWWDDNKYYNPSLKS RLTKSDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARRANYGNLFDYWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 170), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de: DIVMTQSLKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRSVAWAYQQKPGQSPKVLIIWASNRHTGVPDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:171).

[0369] Un método de humanizar los anticuerpos no humanos es trasplantar las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) a un marco que acepte al anticuerpo humano. Ese trasplante de CDR puede dar lugar a la atenuación o a la pérdida completa de la afinidad del anticuerpo humanizado con su objetivo debido a perturbaciones en su marco. Como resultado de ello, podrá ser necesario reemplazar determinados residuos de aminoácidos en la estructura humana por residuos de aminoácidos de las posiciones correspondientes de la estructura murina del anticuerpo (retro-mutaciones) para restablecer la afinidad atenuada o perdida. Por consiguiente, deben determinarse los residuos de aminoácidos que han de sustituirse en el contexto del marco del seleccionado del anticuerpo humano de quien acepta la línea germinal de modo que el anticuerpo humanizado conserve sustancialmente las funciones y parátomos. Además, es de desear que se mantenga o mejore la estabilidad y solubilidad térmica para una buena producción y desarrollo posterior.

[0370] En consecuencia, se aplicó el modelo de anticuerpo basado en estructuras en el proceso de humanizar los anticuerpos monoclonales 4A-202, 4A-18, 4A-21 y 4A-25 anti-MS4A4A del ratón utilizando el módulo BioMOE del MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canadá). Brevemente, las secuencias de aminoácidos VH y VL de los anticuerpos monoclonales de ratón a ser humanizados se compararon con las secuencias de aminoácidos funcionales de línea germinal VL, VH, LJ, HJ humanas tomadas de IMGT (<http://www.imgt.org/>). Se excluyeron del análisis los seudogenes y los marcos abiertos de lectura (ORF). Por cada anticuerpo monoclonal de ratón (en la consulta), se seleccionaron las cinco secuencias de aminoácidos de línea

germinal VL y VH más similares y se combinaron con los genes VJ y HJ más similares, produciendo 25 secuencias de aminoácidos humanizados. Los CDR a ser transplantados a la estructura humana se definieron de acuerdo con la definición de AbM (<http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrdef>).

[0371] Se utilizó la consulta y las 25 secuencias de aminoácidos humanizados para crear modelos de homología Fv empleando el módulo BioMOE o el módulo de modelización de anticuerpos del MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canadá). El análisis de campo de fuerza AMBER10: EHT se usó para la minimización de la energía a través de todo el proceso de modelado de homología del anticuerpo. En base a los modelos de homología de Fv obtenidos, se calcularon, analizaron y clasificaron los descriptores moleculares tales como la energía de interacción entre VL y VH, el punto isoelectrico basado en coordenadas (3D pI), el parche hidrofóbico, y el área de superficie cargada, mediante la métrica de puntuación proporcionada por MOE. Estos descriptores moleculares se utilizaron para priorizar los anticuerpos monoclonales humanizados para procedimientos experimentales posteriores, incluyendo la expresión de proteínas, purificación, estudios de afinidad de unión, y ensayos funcionales.

[0372] El módulo BioMOE de MOE provee una herramienta, las Propiedades del Sitio de la Mutación, para visualizar y clasificar los residuos potenciales para la retro-mutación. En este contexto, la retro-mutación se define como la sustitución de aminoácidos que se revierte a la secuencia original de aminoácidos de la consulta sustituyendo a la secuencia de aminoácidos humanizada. Utilizando esta herramienta, la consulta original (referencia) se comparó individualmente con las variantes humanizadas seleccionadas tanto para la secuencia de aminoácidos primarios como para la estructura 3D del modelo de homología de Fv 3D.

[0373] Los cambios entre el anticuerpo de referencia (es decir, parental) y la variante humanizada se clasificaron sobre la base de la diferencia de tipo de aminoácido, el potencial de interacción con los residuos de CDR, el potencial de impacto para el emparejamiento VL / VH, y el cambio potencial en la superficie hidrofóbica y cargada en y cerca de los CDR.

[0374] Las mutaciones cercanas a los CDR o a la interfaz VL/VH con una diferencia de carga significativa o con fuertes interacciones de enlaces H fueron evaluadas individualmente y las mutaciones significativamente perturbadoras fueron revertidas a los residuos de la consulta original. Como resultado, las secuencias de aminoácidos humanizados pueden contener hasta cinco retro-mutaciones. A continuación, en las **Tablas 1-4** se indican las secuencias de aminoácidos para la cadena pesada variable y anticuerpos monoclonales del ratón de la consulta de cadena ligera variable (ratón anti-MS4A4A anticuerpo 4A-202, ratón anti-MS4A4A anticuerpo 4A-18, ratón anti-MS4A4A anticuerpo 4A-21, y ratón anti-MS4A4A anticuerpo 4A-25) y los anticuerpos monoclonales humanizados con o sin retro-mutaciones. En las **Tablas 1-4**, las secuencias CDR (Kabat) aparecen subrayadas.

TABLA 1

Anti cuer po	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A- 202	QVQLQQSGAELARPGASVKL SCKASGYTFT <u>NYWMQWVKQ</u> RPGQGLEWIGATHPGHGDTR <u>YTQKF</u> KGKATLSADKSSSTAY MQLSNLASEDSAVYYCAREE <u>VYYGFRSYWYFDVWGR</u> GTL VTVSS	4	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMNWFQQKPG QPPKLLIY <u>GASNQGS</u> GVPARFSG SGSGTD ¹ DFSLNIHPMEEDDTAMYF <u>CQQSKEVPPT</u> FGGGTKLEIK	16
4A- 301	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGR</u> VTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDVWGR</u> G TLTVSS	5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN ² WYQQKPG QPPKLLIY <u>GASNQGS</u> GV ³ PDRFSG SGSGTDFTLTIS ⁴ SLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	17
4A- 302	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGR</u> VTMTRDTSTST VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDVWGR</u> G TLTVSS	5	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN ² WYQQKPG QAPRLLIY <u>GASNQGS</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTIS ⁴ SLEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	18
4A- 303	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYTFT <u>NYWMQWVRQM</u> PGKGLEWMGATHPGHGDTR <u>YSPSFQ</u> QVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCAREEV	6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN ² WYQQKPG QPPKLLIY <u>GASNQGS</u> GV ³ PDRFSG SGSGTDFTLTIS ⁴ SLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	17

Anti cuer po	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
	<u>YYGFRSYWYFDV</u> WGRGTLVT VSS			
4A- 304	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTMTRDTSTST</u> VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDV</u> WGRG TLVTVSS	5	EIVLTQSPGTL ~~SL~~ SPGERATLSCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN ~~WY~~ QQKPG QAPRLLIY <u>GASNQGS</u> GIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	19
4A- 305	EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS CKVSGYTFT <u>NYWMQWVQQA</u> PGKGLEWMGATHPGHGDT <u>YAEKFQGRVTITADTSTDTAY</u> MELSSLRSEDTAVYYCAREE <u>VYYGFRSYWYFDV</u> WGRGTL VTVSS	7	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN ~~WY~~ QQKPG QPPKLLIY <u>GASNQGS</u> GV ~~PDR~~ FSG SGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	17
4A- 306	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTMTRDTSTST</u> VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDV</u> WGRG TLVTVSS	5	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC <u>RASESVDNYGV</u> SFMN ~~WY~~ QQK GKAPKLLIY <u>GASNQGS</u> GVPSRFS SGSGTDFTLTIS ~~SL~~ QPEDFATYY C <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	20
4A- 307	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT	8	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN ~~WY~~ QQKPG QPPKLLIY <u>GASNQGS</u> GV ~~PDR~~ FSG	17

Anti cuer po	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
	<u>RYAQKFQGRVTMTADKSTST</u> VYMELSSLRSEDVAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDVWGRG</u> TLVTVSS		SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPTFGGGTKVEIK</u>	
4A- 308	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTMTADKSTST</u> AYMELSSLRSEDVAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDVWGRG</u> TLVTVSS	9	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASESVDNYGVSFMNWYQQKPG</u> QPPKLLIYGASNQGSVPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPTFGGGTKVEIK</u>	17
4A- 309	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTLTADKSISTA</u> YMELSRRLSDDTVVYYCARE <u>EVYYGFRSYWYFDVWGRGT</u> LVTVSS	10	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASESVDNYGVSFMNWYQQKPG</u> QAPRLLIYGASNQGSVIPARFSG SGSGTDFTLTISLQEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPTFGGGTKVEIK</u>	18
4A- 310	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIS CKGSGYTFT <u>NYWMQWVRQM</u> PGKGLEWMGATHPGHGDT <u>YSPSFQGV</u> QVTISADKSSSTAY LQWSSLKASDTAMYVCAREE <u>VYYGFRSYWYFDVWGRGT</u> LVTVSS	11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR <u>ASESVDNYGVSFMNWYQQKPG</u> QPPKLLIYGASNQGSVPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPTFGGGTKVEIK</u>	17
4A-	EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS	12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR	17

Anti cuer po	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
311	CKVSGYTFT <u>NYWMQWVQQA</u> PGKGLEWMGATHPGHGDTR <u>YAEKFQGRVTITADKSTSTAY</u> MELSSLRSEDTAVYYCAREE <u>VYYGFRSYWYFDVWGRGTL</u> VTVSS		<u>ASESVDNYGV</u> SFMN <u>WYQQKPG</u> QPPKLLIY <u>GASNQGS</u> GV <u>PDRFSG</u> SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	
4A- 312	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTMTRDTSTST</u> VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVDYGFRSYWYFDVWGRG</u> TLVTVSS	13	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASESVDNYGV</u> SFMN <u>WYQQKPG</u> QAPRLLIY <u>GASNQGS</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	21
4A- 313	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGATHPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTMTRDTSTST</u> VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDLWGRG</u> TLVTVSS	14	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASESVDNYGV</u> SRMN <u>WYQQKPG</u> QAPRLLIY <u>GASNQGS</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	22
4A- 314	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>NYWMQWVRQ</u> APGQGLEWMGTTLPGHGDT <u>RYAQKFQGRVTMTRDTSTST</u> VYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EEVYYGFRSYWYFDVWGRG</u> TLVTVSS	15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASESVDNYGV</u> SRMN <u>WYQQKPG</u> QAPRLLIY <u>GASNQGS</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC <u>QQSKEVPPT</u> FGGGTKVEIK	22

Anti cuer po	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:

TABLA 2

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-18	QVQLQQPGTELVKPGASVKL SCKASGYTFTSYWIHWVKQR PGQGLEWIGNINPTNGGTNY <u>NERFKSKATLTVDKSSSTAYM</u> QLSSLTSEDSAVYYCARAYYY <u>GSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	23	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSIT <u>CKASQNVGTAVAWSQQKPGQ</u> SPKLLIYSAS ^Y RHTGVPDRFTG SGSGTDFTLTITNMQSEDLADY FCQQYSTYPWTFGGGTKLEIK	31
4A-315	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY</u> MELSSLRSED ^T AVYYCARAYY <u>YGSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	24	DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSAS ^Y RHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	32
4A-316	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTMTVDKSTSTVY</u> MELSSLRSED ^T AVYYCARAYY <u>YGSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	25	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSAS ^Y RHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIKR</u>	33

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-317	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTMTVDKSTSTVY</u> MELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~ <u>AYY</u> <u>YGSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	25	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	32
4A-318	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTMTVDKSTSTAY</u> MELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~ <u>AYY</u> <u>YGSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	26	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIKR</u>	33
4A-319	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTMTVDKSTSTAY</u> MELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~ <u>AYY</u> <u>YGSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	26	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	32
4A-320	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTSTRDTSISTAYM</u> ELSRLRSD ~~TVVYYCAR~~ <u>AYYY</u> <u>GSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	27	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYC <u>Q</u> <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	32

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-321	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTSTRDTSISTAYM</u> ELSRLRSDDTVYYCARAYYY <u>GSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	27	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPEKAP</u> KSLIYSASYRHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	34
4A-322	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTSTVDKSISTAYM</u> ELSRLRSDDTVYYCARAYYY <u>GSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	28	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSASYRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIKR</u>	33
4A-323	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTSTVDKSISTAYM</u> ELSRLRSDDTVYYCARAYYY <u>GSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	28	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSASYRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	32
4A-324	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY <u>AQKFQGRVTSTVDKSISTAYM</u> ELSRLRSDDTVYYCARAYYY <u>GSSLFAYWGQGLTVTVSS</u>	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT <u>CKASQNVGTAVAWYQQKPEKA</u> PKSLIYSASYRHTGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYSTYPWTFGGGTKVEIK</u>	35

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-325	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQGLEWMGNINPTNGGTNY AQKFQGRVTSTVDKSISTAYM ELSRLRSDDTVYYCARAYYY GSSLFAYWGQGLTVTVSS	28	DIVMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPEKAP</u> KSLIYSASyrHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	34
4A-326	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQRLEWMGNINPTNGGTNY SQKFQGRVTITRDTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAYYY GSSLFAYWGQGLTVTVSS	29	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSASyrHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	32
4A-327	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQRLEWMGNINPTNGGTNY SQKFQGRVTITRDTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAYYY GSSLFAYWGQGLTVTVSS	29	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSASyrHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	36
4A-328	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQRLEWMGNINPTNGGTNY SQKFQGRVTITVDKSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARAYYY GSSLFAYWGQGLTVTVSS	30	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIYSASyrHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	37

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-329	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQRLEWMGNINPTNGGTNY SQKFQGRVTITVDKSASTAYM ELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~ YYY GSSLFAYWGQGT ~~LVTV~~ SS	30	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITIC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTEFTLTIS ~~SLQPEDFATYYCQ~~ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	32
4A-330	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQRLEWMGNINPTNGGTNY SQKFQGRVTITVDKSASTAYM ELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~ YYY GSSLFAYWGQGT ~~LVTV~~ SS	30	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITIC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTIS ~~SLQPEDFATYYCQ~~ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	38
4A-331	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYWIHWVRQA PGQRLEWMGNINPTNGGTNY SQKFQGRVTITVDKSASTAYM ELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~ YYY GSSLFAYWGQGT ~~LVTV~~ SS	30	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC <u>KASQNVGTAVAWYQQKPGKAP</u> KLLIY <u>SAS</u> YRHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTIS ~~SLQPEDFATYYCQ~~ <u>QYSTYPWTFGGG</u> TKVEIK	36

TABLA 3

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
----------------	------------------------------	------------------	----------------------------	------------------

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-21	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYIFT <u>SYGLSWVKQ</u> TPGKGLKWMG <u>WINTYSGV</u> <u>PTYANDFKGRFAFSLETS</u> A STTYLRINNKNDDTATYFC AR <u>SLVDY</u> WGQGTPLTVSS	39	DVVMQTPTPFTLSVTIGQSASIS <u>CKSSQSLLYSDGKTYLSWLL</u> QRPQGSPKRLIY <u>LVS</u> KLDSGV PDRFTGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYC <u>WQGIDFHQT</u> FG GGTKLEIK	54
4A-332	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGTPLVTV SS	40	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVS</u> KLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGYYC <u>WQGIDFHQT</u> F GGGKVEIK	55
4A-333	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTTYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGTPLVTV SS	41	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVS</u> KLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGYYC <u>WQGIDFHQT</u> F GGGKVEIK	55
4A-334	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGTPLVTV SS	40	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASIS <u>CKSSQSLLYSDGKTYLSWLQ</u> QRPQGPPRLIY <u>LVS</u> KLDSGV PDRFSGSGAGTDFTLKISRVE AEDVGYYC <u>WQGIDFHQT</u> FG GGTKVEIK	56

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-335	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGT ^{LV} TV SS	40	DVVMQTPLSSPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWL</u> QQRPGQPPRLLIYLVSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGAGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGKVEIK	57
4A-336	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGT ^{LV} TV SS	40	DVVMQTPLSSPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWL</u> QQRPGQPPRLLIYLVSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGAGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGKVEIK	58
4A-337	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTTYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGT ^{LV} TV SS	41	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASIS C <u>KSSQSLLYSDGKTYLSWLQ</u> QRPQGQPPRLLIYLVSKLD <u>SGV</u> PDRFSGSGAGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTFG</u> GGTKVEIK	56
4A-338	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTTYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGT ^{LV} TV SS	41	DVVMQTPLSSPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWL</u> QQRPGQPPRLLIYLVSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGAGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGKVEIK	57

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-339	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTTYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLVDY</u> WGQGTLVTV SS	41	DVVMQTPLSSPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWL</u> QQRPGQPPRRLIY <u>L</u> VSKLDSG VPDRFSGSGAGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	58
4A-340	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQRLEWMGWINTYS <u>GVPTYSQKFQGRVTIT</u> LDT SASTTYMELSSLRSED TAV YYCAR <u>SLVDY</u> WGQGTLVT VSS	42	DVVMQTPLSLSVTPGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWY</u> LQKPGQPPQLLIY <u>L</u> VSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	59
4A-341	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQRLEWMGWINTYS <u>GVPTYSQKFQGRVTIT</u> RDT SASTAYMELSSLRSED TAV YYCAR <u>SLVDY</u> WGQGTLVT VSS	43	DVVMQTPLSLSVTPGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWY</u> LQKPGQPPQLLIY <u>L</u> VSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	59
4A-342	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFT <u>SYGLSWVR</u> QAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTM</u> TRD TSTSTVYMELSSLRSED TAV VYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGTLV TVSS	44	DVVMQTPLSLSVTPGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWY</u> LQKPGQPPQRLLIY <u>L</u> VSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTE</u> GGGTKVEIK	60

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-343	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFT <u>SYGLSWVR</u> QAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTMTLD</u> TSTSTTYMELSSLRSEDTA VYYCARSLVDYWGQGTLV TVSS	45	DVVMQTPLSLSVTPGQPASI SCKSSQSLLYSDGKTYLSWY LQKPGQPPQRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	60
4A-344	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTMTRD</u> TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSLVDYWGQGTLV TVSS	46	DVVMQTPLSLSVTPGQPASI SCKSSQSLLYSDGKTYLSWY LQKPGQPPQRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	60
4A-345	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQRLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTITRDT</u> SASTAYMELSSLRSEDTAV YYCARSLVDYWGQGTLVT VSS	43	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSSQSLLYSDGKTYLSWYL QKPGQPPQLLIYLVSKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGIDFHQTFG GGGTKVEIK	61
4A-346	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTMTRD</u> TSTSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSLVDYWGQGTLV TVSS	46	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSSQSLLYSDGKTYLSWYL QKPGQPPQLLIYLVSKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCWQGIDFHQTFG GGGTKVEIK	61

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-347	QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQRLEWMGWINTYS <u>GVPTY</u> <u>SQKFQGRVTITLDT</u> SASTTYMELSSLRSED TAV YYCAR <u>SLVDY</u> WGQGT LTVSS	42	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS <u>CKSSQSLLYSDGKTYLSWYL</u> QKPGQPPQLLIY <u>L</u> SKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTFG</u> GGTKVEIK	61
4A-348	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFT <u>SYGLSWVR</u> QAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTMTRD</u> TSTSTVYMELSSLRSED TAV VYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGT LTVSS	44	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS <u>CKSSQSLLYSDGKTYLSWYL</u> QKPGQPPQLLIY <u>L</u> SKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTFG</u> GGTKVEIK	61
4A-349	QIQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYIFT <u>SYGLSWVR</u> QAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQKFQGRVTMTLD</u> TSTSTTYMELSSLRSED TAV VYYCAR <u>SLVDY</u> WGQGT LTVSS	45	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS <u>CKSSQSLLYSDGKTYLSWYL</u> QKPGQPPQLLIY <u>L</u> SKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTFG</u> GGTKVEIK	61
4A-350	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGT LTVSS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI <u>SCKSSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> SKLDSG V PDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	55

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-351	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	62
4A-352	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSGGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	63
4A-353	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSEGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	64
4A-354	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSAGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	65

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-355	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSSG</u> KTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	66
4A-356	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSQG</u> KTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	67
4A-357	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDG</u> KTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>EVSKLDS</u> GV PDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	68
4A-358	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>TLADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDG</u> KTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIRFHQTF</u> GGGTKVEIK	69

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-359	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>ASQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGADFTLKISRV EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	70
4A-360	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SGQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSRL <u>DS</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	71
4A-361	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSKLE <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	72
4A-362	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSRL <u>DS</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQT</u> FGGGTKVEIK	73

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-363	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LADY</u> WGQGTLVTV SS	47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLSSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	74
4A-364	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFT <u>SYGLSWI</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>MVDY</u> WGQGTLVTV SS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>ASQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLD</u> SG VPDRFSGSGSGADFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	70
4A-365	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFT <u>SYGLSWI</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>MVDY</u> WGQGTLVTV SS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLSSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	74
4A-366	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFT <u>SYGLSWI</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>MVDY</u> WGQGTLVTV SS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLD</u> SG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	62

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-367	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFSLD T SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARTMVDYWGQGTLVTV SS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKSSQSLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	55
4A-368	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFSLD T SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARTMVDYWGQGTLVTV SS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKSSQSLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIYLVSKLESG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	72
4A-369	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYTFTSYGLSWI RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFSLD T SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARTMVDYWGQGTLVTV SS	48	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKSSQSLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCWQGIRFHQTF GGGTKVEIK	69
4A-370	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFTSYGLSWV RQAPGQGLEWMGWINTYS GVPTYAQGFTGRFVFSLD T SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARTLGDYWGQGTLVTV SS	49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKSGQSLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIYLVSR LDS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCWQGIDFHQT FGGGTKVEIK	71

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-371	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQGFTGRFV</u> SLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LG</u> DYWGQGT <u>LV</u> TV SS	49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQ</u> SLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LV</u> SKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQ</u> GIDFHQTF GGGKVEIK	55
4A-372	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQGFTGRFV</u> SLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LG</u> DYWGQGT <u>LV</u> TV SS	49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSQ</u> SLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LV</u> SRLDS GV PDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQ</u> GIDFHQT FGGKVEIK	73
4A-373	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQGFTGRFV</u> SLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LV</u> DYWGQGT <u>LV</u> TV SS	50	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSR</u> SLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LV</u> SKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQ</u> GIDFHQTF GGGKVEIK	62
4A-374	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMG <u>WINTYS</u> <u>GVPTYAQG</u> FAGRFVSLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCART <u>LV</u> DYWGQGT <u>LV</u> TV SS	51	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSR</u> SLLYSDGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIY <u>LV</u> SKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQ</u> GIDFHQTF GGGKVEIK	62

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-375	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SLADY</u> WGQGTTLVTV SS	52	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	62
4A-376	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SMADY</u> WGQGTTLVTV SS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSDGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	62
4A-377	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SMADY</u> WGQGTTLVTV SS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSGGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	63
4A-378	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SMADY</u> WGQGTTLVTV SS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSEGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>LVSKLDSG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	64

Anticue rpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-379	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SMADY</u> WGQGTTLVTV SS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSAGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	65
4A-380	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SMADY</u> WGQGTTLVTV SS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSSGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	66
4A-381	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYIFT <u>SYGLSWV</u> RQAPGQGLEWMGWINTYS <u>GVPTYAQGFTGRFVFS</u> LDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCAR <u>SMADY</u> WGQGTTLVTV SS	53	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCK <u>SSRSLLYSQGKTYLSWF</u> QQRPGQSPRRLIY <u>L</u> VSKLD <u>SG</u> VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYC <u>WQGIDFHQTF</u> GGGTKVEIK	67

TABLA 4

Anticu erpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:

Anticuerpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-25	QVTLKESGPGILQPSQTLSTL CSFSGFSLRTSDMGVGVWR QPSGEGLEWLADIWWDDNKY YNPSLKSRLTISKDTSSNQVFL KITSVDTADTATYYCARRANY GNLFDYWGQGTAVTVSS	75	DIVMTQSLKFMSTSVGDRVSI TCKASQNVRSAVAWYQQKP GQSPKVLIIYWASNRHTGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQSE DLADYFCLQHWNLYLTFGSGT KLEIK	85
4A-382	QVTLKESGPALVQPTQTLTLT CTFSGFSLRTSDMGVSWIRQ PPGEALEWLALIWWDDNKYY STSLKTRLTISKDTSSNQVLT MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTAVTVSS	76	DIVLTQSPSSLSASVGDRVIT CRASQNVRSAWYQQKPG QAPKVLIIYWASNRHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQHWNLYLTFGGGTK VEIK	86
4A-383	QVTLKESGPTLVQPTQTLTLT CTFSGFSLRTSDMGVGVIRQ PPGKALEWLALIWWDDNKYY SPSLKSRLTISKDTSSNQVLT MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTTLTVSS	77	DIVLTQSPSSLSASVGDRVIT CRASQNVRSAWYQQKPG QAPKLLIYWASNRHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQHWNLYLTFGGGTKV EIK	87
4A-384	QVTLRESGPALVQPTQTLTLT CTFSGFSLRTSDMGVSWIRQ PPGEALEWLALIWWDDNKYY STSLKTRLTISKDTSSNQVLT MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTTLTVSS	78	DIVMTQSPSSMSASVGDRVIT TCQASQNVRSAVAWYQQKP GKAPKLLIYWASNRHTGVPSR FSGSGSGTDFTFTISLQPED ATYYCQQHWNLYLTFGGGTKV EIK	88

Anticuerpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-385	QVTLKESGPTLVKPTQTLTLT CTFSGFSLRTSDMGVSWIRQ PPGKALEWLALIIWWDDNKYY SPSLKSRLTITKDTSSNQVVL MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTLVTVSS	79	DIVMTQSPSSLSTSVGDRVIT CRASQNVRSALAWYQQKPEK APKSLIYWASNRHSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQHWNLYLTFGGGKVE IK	89
4A-386	QVTLKESGPGLVQPTETLTLT CTFSGFSLRTSDMGVSWIRQ PPGKALEWLAHIWWDDNKSY STSLKSRLTISKDTSSNQVVL MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTLVTVSS	80	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRASQNVRSALAWYQQKPE QAPKSLIYWASNRHSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQHWNLYLTFGGGK VEIK	90
4A-387	QVTLKESGPVLVKPTETLTLT CTFSGFSLRTSDMGVSWIRQ PSGKALEWLAHIWWDDNKSY STSLKSRLTISKDTSKNQVVL MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTLVTVSS	81	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT TCQASQNVRSALNWKYQQKP GKAPKLLIYWASNRHTGVPSR FSGSGSGTDFTFTISLQSEDI ATYYCQQHWNLYLTFGGGK VEIK	91
4A-388	QVTLKESGPVLVKPTETLTLT CTFSGFSLRTSDMGVSWIRQ PSGEGLEWLAHIWWDDNKSY STSLKSRLTISKDTSKNQVVL MTNMDPVDATATYYCARRANY GNLFDYWGQGTLVTVSS	82	DIVMTQSPSSLSASVGDRVIT TCQASQNVRSALNWKYQQKP GKAPKLLIYWASNRHTGVPSR FSGSGSGTDFTFTISLQSEDI ATYYCQQHWNLYLTFGGGK VEIK	91

Anticuerpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Liviana	SEQ ID NO:
4A-389	QVTLQESGPGLVKPSETLSLT CAVSGFSLRTSDMGVGWIRQ PPGEGLEWIGSIWWDDNKYY NPSLKSRVTISKDTSKNQVSL KLSSVDAADTAVYYCARRAN YGNLFDYWGQGTTLTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITI TCRASQNVRSALAWYQQKPE QAPKSLIYWASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISNRHPEDF ATYYCQQHWNLYLTFGGGTKV EIK	92
4A-390	QVQLQESGPGLVQPSETLSLT CAVSGFSLRTSDMGVGWIRQ PPGKGLEWIGSIWYDDNKYY NPSLKSRVTISKDTSSNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARRANY GNLFDYWGQGTTLTVSS	84	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVITI TCQASQNVRSALNWKYQQK GKAPKLLIYWASNRHTGVPSR FSGSGSGTDFTFTISLQSEDI ATYYCQQHWNLYLTFGGGTKV EIK	93

[0375] Las secuencias de Región Determinante de la Complementariedad (CDR) acuerdo con Kabat para los anticuerpos de anti-MS4A4A de la presente revelación, se indican a continuación en las Tablas 5-8.

TABLA 5

Anticu erpo	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	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYT QKFKG	95	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
4A-301	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
4A-302	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
4A-303	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA PSFQG	97	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
4A-304	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
4A-305	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA EKFQG	98	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
4A-306	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107

	Anticu erpo	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:
5	4A-307	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
	4A-308	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
	4A-309	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
10	4A-310	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA PSFQG	97	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
15	4A-311	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA EKFQG	98	EEVYYG FRSYWY FDV	100	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
	4A-312	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVDYG FRSYWY FDV	101	RASESVD NYGVFSM N	103	GASNQG S	106	QQSKE VPPT	107
20	4A-313	NYWM Q	94	ATHPGH GDTRYA QKFQG	96	EEVYYG FRSYWY FDL	102	RASESVD NYGVSR MN	104	GASNQG S	105	QQSKE VPPT	107
	4A-314	NYWM	94	TTLPGH	99	EEVYYG	100	RASESVD	104	GASNQG	105	QQSKE	107

Anticu erpo	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:
	Q		GDTRYA QKFQG		FRSYWY FDV		NYGVSR MN		S		VPPT	

5 **TABLA 6**

Anticu erpo	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-18	SYWIH	108	NINPTNGGT NYNERFKS	109	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-315	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-316	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-317	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-318	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-319	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-320	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-321	SYWIH	108	NINPTNGGT	110	AYYYGS	112	KASQNV	113	SASYRHT	114	QQYSTYP	115

5

10

15

20

Anticuerpo	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:
			NYAQKFQG		SLFAY		GTAVA				WT	
4A-322	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-323	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-324	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-325	SYWIH	108	NINPTNGGT NYAQKFQG	110	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-326	SYWIH	108	NINPTNGGT NYSQKFQG	111	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-327	SYWIH	108	NINPTNGGT NYSQKFQG	111	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-328	SYWIH	108	NINPTNGGT NYSQKFQG	111	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-329	SYWIH	108	NINPTNGGT NYSQKFQG	111	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-330	SYWIH	108	NINPTNGGT NYSQKFQG	111	AYYYGS SLFAY	112	KASQNV GTAVA	113	SASYRHT	114	QQYSTYP WT	115
4A-331	SYWIH	108	NINPTNGGT	111	AYYYGS	112	KASQNV	113	SASYRHT	114	QQYSTYP	115

Anticuerpo	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:
			NYSQKFQG		SLFAY		GTAVA				WT	

5 **TABLA 7**

10

15

20

Anticuerpo	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-21	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA NDFKG	117	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-332	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-333	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-334	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-335	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144

5

10

15

20

Anticu erpo	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 NO:	ID
4A-336	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-337	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-338	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-339	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-340	SYGLS	116	WINTYS GVPTYS QKFQG	119	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-341	SYGLS	116	WINTYS GVPTYS QKFQG	119	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-342	SYGLS	116	INTYSGV PTYAQK FQG	120	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	

5

10

15

20

Anticu erpo	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:	ID
4A-343	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QKFQG	121	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-344	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QKFQG	121	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-345	SYGLS	116	WINTYS GVPTYS QKFQG	119	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-346	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QKFQG	121	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-347	SYGLS	116	WINTYS GVPTYS QKFQG	119	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-348	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QKFQG	121	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-349	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QKFQG	121	SLVDY	123	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	

5

10

15

20

Anticu erpo	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:	ID
4A-350	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-351	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSRSLLY SDGKTYLS	131	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-352	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSRSLLY SGGKTYL S	132	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-353	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSRSLLY SEGKTYLS	133	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-354	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSRSLLY SAGKTYLS	134	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-355	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSRSLLY SSGKTYLS	135	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-356	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSRSLLY SQGKTYL S	136	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	

5

10

15

20

Anticu erpo	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:	ID
4A-357	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	EVSKLDS	140	WQGIDF HQT	144	
4A-358	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	139	WQGIRF HQT	145	
4A-359	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KASQSLLY SDGKTYLS	137	LVSCLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-360	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSGQSLLY SDGKTYLS	138	LVSRLDS	141	WQGIDF HQT	144	
4A-361	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLDS	142	WQGIDF HQT	144	
4A-362	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSRLDS	141	WQGIDF HQT	144	
4A-363	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLADY	124	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSCLSS	143	WQGIDF HQT	144	

5

10

15

20

Anticu erpo	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:	ID
4A-364	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TMVDY	125	KASQSLLY SDGKTYLS	137	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-365	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TMVDY	125	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLSS	143	WQGIDF HQT	144	
4A-366	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TMVDY	125	KSSRSLLY SDGKTYLS	131	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-367	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TMVDY	125	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-368	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TMVDY	125	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLES	142	WQGIDF HQT	144	
4A-369	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TMVDY	125	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSKLDS	139	WQGIRF HQT	145	
4A-370	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLGDY	126	KSGQSLLY SDGKTYLS	138	LVSRLDS	141	WQGIDF HQT	144	

5

10

15

20

Anticu erpo	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:	ID
4A-371	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLGDY	126	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-372	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLGDY	126	KSSQSLLY SDGKTYLS	130	LVSRLDS	141	WQGIDF HQT	144	
4A-373	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	TLVDY	127	KSSRSLLY SDGKTYLS	131	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-374	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFAG	122	TLVDY	127	KSSRSLLY SDGKTYLS	131	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-375	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SLADY	128	KSSRSLLY SDGKTYLS	131	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-376	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SMADY	129	KSSRSLLY SDGKTYLS	131	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	
4A-377	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SMADY	129	KSSRSLLY SGGKTYL S	132	LVS KLDS	139	WQGIDF HQT	144	

5

10

15

Anticu erpo	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-378	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SMADY	129	KSSRSLLY SEGKTYLS	133	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-379	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SMADY	129	KSSRSLLY SAGKTYLS	134	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-380	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SMADY	129	KSSRSLLY SSGKTYLS	135	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144
4A-381	SYGLS	116	WINTYS GVPTYA QGFTG	118	SMADY	129	KSSRSLLY SQGKTYL S	136	LVSKLDS	139	WQGIDF HQT	144

TABLA 8

20

Anticu erpo	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	TSDMG VG	146	DIWWDDNK YYNPSLKS	148	RANYGN LFDY	154	KASQNV RSAVA	155	WASNRHT	159	QHWNYLT	162
4A-382	TSDMG VS	147	LIWWDDNK YYSTSLKT	149	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRHS	160	QQHWNYL T	163

5

10

15

4A-383	TSDMG VG	146	LIWWDDNK YYSPSLKS	150	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRHS	160	QQHWNYL T	163
4A-384	TSDMG VS	147	LIWWDDNK YYSTSLKT	149	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSAVA	157	WASNRHT	159	QQHWNYL T	163
4A-385	TSDMG VG	146	LIWWDDNK YYSPSLKS	150	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRHS	160	QQHWNYL T	163
4A-386	TSDMG VS	147	HIWWDDNK SYSTSLKS	151	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASNRHS	160	QQHWNYL T	163
4A-387	TSDMG VS	147	HIWWDDNK SYSTSLKS	151	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSALN	158	WASNRHT	159	QQHWNYL T	163
4A-388	TSDMG VS	147	HIWWDDNK SYSTSLKS	151	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSALN	158	WASNRHT	159	QQHWNYL T	163
4A-389	TSDMG VG	146	SIWWDDNK YYNPSLKS	152	RANYGN LFDY	154	RASQNV RSALA	156	WASSLQS	161	QQHWNYL T	163
4A-390	TSDMG VG	146	SIWYDDNK YYNPSLKS	153	RANYGN LFDY	154	QASQNV RSALN	158	WASNRHT	159	QQHWNYL T	163

20

EJEMPLO 2: Preparación de polipéptidos recombinantes MS4A4A solubles

[0376] Se analizó la secuencia de aminoácidos primarios del MS4A4A humano (SEQ ID NO: 1) a fin de proporcionar información sobre su estructura secundaria y terciaria. La proteína MS4A4A humana tiene cuatro dominios transmembrana (TMD, en inglés) y cada TMD está compuesto de 21 aminoácidos. Según las predicciones de la composición de los aminoácidos, el número de residuos, y el grosor de la bicapa lipídica, se prevé que MS4A4A comprenda un haz de cuatro hélices (4HB) con dos bucles extracelulares (ECL), que conecten los TMD1 y TMD2, y TMD3 y TMD4 desde el terminal N al terminal C, respectivamente (véase FIG. 1). La FIG. 1 muestra la secuencia de aminoácidos primarios del MS4A4A humano; los dominios intracelulares están en cursiva, los dominios transmembrana están subrayados, y los dos bucles extracelulares están en cursiva y negrita.

[0377] Se identificaron dos estructuras modelo de proteínas solubles del andamiaje 4HB (que se predice imitan la configuración geométrica y de MS4A4A) utilizando el Banco de Datos de Proteínas RCSB ([http://www \(dot\)rcsb\(dot\)org/](http://www.rcsb.org/)). Los identificadores del Banco de Datos de Proteínas (PDB_ID) de estos andamiajes de proteínas son 1P68 y 1M6T. Las FIG. 2A, FIG. 2B, y FIG. 2C muestran la estructura y secuencia de aminoácidos primarios de dos andamiajes de cuatro hélices solubles (PDB_ID:1P68 y PDB_ID:1M6T). En la FIG. 2A, los dominios transmembrana se representan como helicoidales en la estructura; en la FIG. 2B y FIG. 2C, los dominios transmembrana están subrayados en las correspondientes secuencias de aminoácidos de 1P68 y 1M6T.

[0378] Las secuencias de aminoácidos de las dos ECL de MS4A4A humanas se colocaron en forma recombinante dentro de 1P68, dando como resultado el polipéptido JS1 y el polipéptido JS4 (control negativo para el polipéptido JS1) y en 1M6T, dando como resultado el polipéptido JS5, el polipéptido JS6; y el polipéptido JS10 (que sirven como controles negativos para el polipéptido JS5 y el polipéptido JS6). (Ver FIG. 3.) La FIG. 3A muestra las secuencias de aminoácidos del polipéptido JS1, polipéptido JS5, y polipéptido JS6. FIG. 3B muestra las secuencias de aminoácidos del polipéptido de control negativo JS4 y el polipéptido de control negativo JS10. El ácido nucleico que codifica estos andamios de proteínas/polipéptidos se insertó en el vector de expresión pcDNA3.4 con un 3' his-tag y Avi-tag, respectivamente. Los clones resultantes se expresaron en células Expi293 y se purificaron con agarosa Ni-NTA (QIAGEN cat#30230) utilizando el protocolo del fabricante. Estos polipéptidos recombinantes solubles MS4A4A (también conocidos como antígenos injertados en bucle) se produjeron con el fin de obtener proteínas solubles que imitan la estructura y función de los dos Bucles Extra Celulares (ECL, en inglés) de MS4A4A para usarlos como reactivos solubles para la caracterización de la unión anticuerpo.

EJEMPLO 3: Determinación del epítipo de anticuerpos anti-MS4A4A por unión peptídica

[0379] Las características de unión del epítipo del anticuerpo 4A-21 anti-MS4A4A se determinaron de la siguiente manera. Un panel de péptidos superpuestos derivados de los bucles extracelulares (ECL) de MS4A4A humano (SEQ ID NO: 1) fueron sintetizados por los péptidos JPT (Berlín, Alemania). Estos péptidos tenían 15 aminoácidos de longitud, cada uno compensado por 2 aminoácidos. Los péptidos fueron biotinilados en el terminal N. Los péptidos 4A.1 a 4A.4 fueron derivados de MS4A4A ECL1 humano y las regiones circundantes. Los péptidos 4A.5 a 4A.12 fueron derivados de MS4A4A ECL2 humanos y regiones circundantes.

[0380] La biblioteca de péptidos fue impresa en un chip recubierto de estreptavidina (Xantec SAD50M, Dusseldorf, Alemania) usando el Microspotter de Flujo Continuo (CFM). Primero, el chip fue activado con 100mM MES, pH 5,5, 100 µL EDC (133mM final), 100µL de S-NHS (33,3mM final). La biblioteca de péptidos fue inmovilizada en el chip a 250nM por péptido diluido en búfer HBS-EP+ (Teknova Cat # H8022) con 1mg/ml de BSA y 1µg/ml de IgG-Biotina de ratón. Después de la inmovilización, la superficie del chip fue desactivada con 1M de etanolamina a pH 8,5 durante 10 minutos. Los sobrenadantes del hibridoma y los anticuerpos anti-MS4A4A purificados se diluyeron en el búfer HBS-EP+ con 1mg/ml de BSA y se inyectaron en el chip. Se tomaron medidas duplicadas para cada anticuerpo anti-MS4A4A para asegurar la reproducibilidad. Se determinaron las características de unión para cada combinación péptido-anticuerpo, permitiendo el mapeo de la región peptídica lineal con la que cada anticuerpo interactúa.

[0381] El anticuerpo 4A-21 anti-MS4A4A y el anticuerpo 5C12 anti-MS4A4A disponible en el mercado mostraron una sólida unión a los péptidos correspondientes a las regiones de la MS4A4A ECL2 humana, como se indica en negrita en la **Tabla 9**, a continuación. El anticuerpo 4A-21 anti-MS4A4A se une a los péptidos 4A.5 a 4A.9, abarcando los residuos de aminoácidos 155 a 177 de la MS4A4A humana. El anticuerpo 5C12 anti-MS4A4A se une a los péptidos 4A.6 a 4A.9, abarcando los residuos de aminoácidos 157 a 177 de MS4A4A humana. Las regiones de unión de estos dos anticuerpos se superponen pero no son idénticas, lo que indica que interactúan con diferentes residuos dentro del ECL2 de la MS4A4A humana. Ninguno de estos dos anticuerpos mostró unión con el ECL1 de MS4A4A humana usando la metodología descrita anteriormente.

TABLA 9

Péptido	Secuencia	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

Péptido	Secuencia	4A-21	5C12
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
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

EJEMPLO 4: Unión del anticuerpo anti-MS4A4A a péptidos correspondientes a dominios extracelulares humanos MS4A4A

[0382] Los sobrenadantes (puros) de hibridomas anti-MS4A4A o como mIgG purificado (5µg/ml) fueron sometidos a prueba para unirse a los péptidos MS4A4A humanos correspondientes al ECL1 (residuos de aminoácidos 86-98 de MS4A4A humanos del SEQ ID NO: 1) y ECL2 (residuos de aminoácidos 159-179 de MS4A4A humanos del SEQ ID NO: 1) utilizando un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Brevemente, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos con 2 o 10µg/ml de péptidos sintéticos libres o conjugados con BSA en búfer de recubrimiento (búfer de carbonato de 0,05M, pH9,6, Millipore Sigma Cat#C3041) durante la noche a 4°C. Las placas recubiertas se bloquearon con diluyente ELISA (PBS + 0,5% BSA + 0,05% Tween20) durante 1 hora, se lavaron 3x300µL en PBST (PBS + 0,05% Tween20, Thermo Cat#28352), y luego se añadieron los anticuerpos a la placa (50µl/well). Después de 30 minutos de incubación (a

temperatura ambiente, con agitación), las placas se lavaron 3x300μL en PBST. Un anticuerpo secundario anti-ratón HRP (Jackson Immunoresearch Cat#115-035-003) se añadió a una dilución de 1:1000 en diluyente ELISA (50μl/well) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después de un conjunto final de lavados (3x300μL en PBST), se añadió 50μL de sustrato TMB (BioFx Cat#TMBW-1000-01) y la reacción se apagó después de 5-10 minutos con 50μL de solución de parada (BioFx Cat#BSTP-1000-01). Los pocillos de reacción apagados fueron detectados por absorbancia a 650nm con un lector de microplacas BioTek Synergy usando el software GEN5 2,04.

[0383] Se sometieron a prueba anticuerpos murinos anti-MS4A4A purificados y 3 anticuerpos murinos anti-MS4A4A disponibles en el mercado (5C12, 3F2, y 4H2). Los anticuerpos murinos anti-MS4A4A (4A-21, 4A-25, 4A-202, y 4A-214) demostraron una fuerte unión al péptido libre huMS4A4A-ELC2 comparado con el observado para el ratón BSA DAP12, un control peptídico negativo irrelevante. Los tres anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado no mostraron unión a los péptidos humanos MS4A4A ECL1 y ECL2.

EJEMPLO 5: Determinación de epítomos de los anticuerpos anti-MS4A4A

[0384] La secuencia primaria de aminoácidos de MS4A4A brinda información importante acerca de su estructura secundaria y terciaria. La proteína MS4A4A posee cuatro dominios transmembrana (TMD) y cada TMD está compuesto por 21 aminoácidos. Un TMD típico está compuesto por un fosfodiéster lípido bicapa con aproximadamente 40 Å de espesor. La porción de cabeza de fosfato crea una capa hidrofílica que interactúa con el entorno hidrófilo ya sea en el espacio extracelular o citosólico y la cola de lípidos crea una bicapa lipídica interna que interactúa con los residuos lipofílicos de los TMD. El grosor de la bicapa lipídica del TMD es aproximadamente de 32 a 34 Å. Según las predicciones de la composición de los aminoácidos, los números de residuos, y el espesor de la bicapa lipídica, se prevé que el MS4A4A comprenda un haz de cuatro hélices (4HB) con dos bucles extra celulares (ECL), que conecten los TMD1 y TMD2, y TMD3 y TMD4 desde la terminal N a la terminal C, respectivamente. El haz de 4 hélices estabiliza el MS4A4A en la membrana mediante una importante ganancia de entalpía obtenida de las interacciones bicapa entre hélices y lípidos y las interacciones entre hélices y hélices.

[0385] La composición de la secuencia de aminoácidos primarios y de los ECL del MS4A4A indica importantes características asociadas a las propiedades dinámicas de los epítomos. El ECL1 está compuesto por 13 aminoácidos, entre ellos una cisteína, una metionina, una alanina, tres serinas, una treonina, dos asparaginas, una tirosina, una prolina, una isoleucina, y sólo un residuo o residuos de glicina. El ECL2 está compuesto por 21 aminoácidos, inclusive dos residuos de cisteína que están separados por 8 aminoácidos, tres serinas, una treonina, una fenilalanina, tres

histidinas, una prolina, tres tirosinas, cuatro asparaginas, una metionina, y sólo dos residuos de glicina. En los ECL1 y ECL2 se encuentran muy pocos residuos de glicina, pero varios residuos grandes de aminoácidos beta-ramificados y un residuo de prolina. Además, el ECL2 contiene dos residuos de cisteína que se prevé crean un enlace de disulfuro intra-bucle, lo que reduce aún más la entropía conformacional. Como resultado, el ECL1 y el ECL2 tienden a emplear un número significativamente reducido de isómeros conformacionales que interactúan entre sí en los movimientos internos de tipo corporal rígido.

[0386] Se adquirió en Origene (cat# RG223557) una expresión plásmida que codifica el MS4A4A humano (NM_024021) y que contiene una etiqueta GFP C-terminal y se usó como modelo para generar mutaciones de escaneo de alanina simple en la región de codificación del bucle extracelular 1 (ECL1) del MS4A4A humano (4A.Ala1-Ala13 en la **Tabla 10** a continuación; C67 a S79 del SEQ ID NO:1 correspondiente al ECL1; CMASNTYGSNPIS; en la región codificante del bucle extracelular 2 (ECL2) del MS4A4A humano (4A.Ala14-Ala34 en la **Tabla 10** a continuación; S140 a S160 del SEQ ID NO:1 correspondiente al ECL2; SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS; y mutaciones de eliminación ECL2 (4A.Ala35 (eliminación de residuos de aminoácidos 150-152 del SEQ ID NO:1 dentro del ECL2) y 4A.Ala36 (eliminación de residuos de aminoácidos 148-152 del SEQ ID NO:1 dentro del ECL2) en la **Tabla 11** a continuación). Las mutaciones se realizaron usando técnicas estándar en la técnica de reacciones en cadena de polimerasa superpuesta. Cada fragmento ácido polinucleico de reacción en cadena de polimerasa se purificó y se volvió a subclonar al vector de expresión usando los sitios de restricción MluI y AsiSI.

[0387] Antes de realizar la determinación de epítomos mediante técnicas de exploración con alanina, se determinaron los EC50 relativos de los anticuerpos anti-MS4A4A de la siguiente manera, utilizando transfecciones transitorias de los constructos de expresión descritos anteriormente en las células HEK293T. Las células HEK293T fueron sembradas en placas de 6 pocillos y crecieron durante la noche. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con Eugene HD (Promega) o Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 4:1 de Eugene a ADN o en una proporción de 3:1 de Lipofectamina a ADN, siguiendo los protocolos del fabricante. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, las células fueron cosechadas usando Trypsin-EDTA y procesadas para la el teñido FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia).

[0388] Para el teñido FACS, se agregaron 150.000 células a cada uno de los 96 pocillos en las placas y se agregó una titulación de anticuerpos anti-MS4A4A en el búfer FACS (PBS + 2% FBS) y se incubaron sobre hielo durante 60 minutos. Se centrifugaron las placas (a 1400 rpm, durante 3 minutos), se decantó el sobrenadante, y se lavaron las células tres veces con 200 µl búfer FACS,

en cada oportunidad seguido de un paso de girar y decantar. Los anticuerpos fueron sometidos a prueba como mslgG1 o hulgG1 quimera y se agregaron ya sea ficoeritrina (PE, en inglés) anti-humano de cabra (Southern Biotech, Cat#2040-09, 1:200) o anticuerpo de proteína de poliposis coli adenomatosa (APC, en inglés) anti-ratón de cabra (BD Biosciences, Cat#550826, 1:100) en 5 búfer FACS sobre hielo durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron las células dos veces con 200 µl de búfer FACS y se hicieron imágenes en un citómetro iQue. La intensidad mediana de fluorescencia (MFI) se midió en la población positiva GFP, representando a las células que expresaban MS4A4A.

[0389] Seis de los anticuerpos anti-MS4A4A inicialmente probados se unieron a las células 10 HEK293T que expresan el tipo silvestre (WT) MS4A4A-GFP: estos incluyeron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-18, 4A-21, 4A-202, así como anticuerpos monoclonales murinos publicados anti-MS4A4A 4H2 (Kerafast), 5C12 (Biolegend), 3F2 (Millipore). Se determinaron las curvas de titulación de cada anticuerpo para establecer las concentraciones óptimas de los anticuerpos anti-MS4A4A para posteriores estudios de mapeo de epítomos.

15 [0390] Para los experimentos de mapeo de epítomos, se transfirieron células HEK293T con los diferentes constructos de expresión de MS4A4A humanos (como se describiera anteriormente; véase la **Tabla 10** a continuación), y se determinó la unión de anticuerpos utilizando seis anticuerpos anti-MS4A4A diferentes: 4A-21, 4A-18, 4A-202, 4H2, 5C12, y 3F5. La unión anticuerpo anti-MS4A4A fue calculada como el % de la MFI de la unión a las células transfectadas con el 20 constructo de la expresión humana de tipo silvestre MS4A4A. Si una mutación de aminoácido en el polipéptido MS4A4A resultaba en una disminución de la unión del anticuerpo a menos del 20% de la unión a la proteína MS4A4A de tipo silvestre, el aminoácido mutado se consideraba un aminoácido crítico necesario para la unión de los anticuerpos anti-MS4A4A a la proteína MS4A4A. Algunas mutaciones de aminoácidos en la proteína MS4A4A dieron lugar a una disminución de la 25 unión del anticuerpo anti-MS4A4A por debajo del 51% pero por encima del 20% (en comparación con la unión a la proteína MS4A4A de tipo silvestre); esos aminoácidos se definieron como aminoácidos que contribuyen a la unión del anticuerpo anti-MS4A4A a la proteína MS4A4A.

[0391] Algunos aminoácidos en MS4A4A afectaron la unión de todos los anticuerpos sometidos a prueba, tales como las dos cisteínas, C165 y C174, que se piensa forman un puente de cisteína en 30 las proteínas de tipo MS4. Dichos aminoácidos fueron considerados como aminoácidos estructurales.

[0392] Los resultados de estos experimentos se indican en la **Tabla 10** a continuación. Como antes se estableciera, Ala.1 a Ala.13 se refieren a mutaciones MS4A4A mutations en ECL1; Ala.14 a Ala.36 se refieren a mutaciones MS4A4A en ECL2. Los datos se muestran como porcentajes de

union de los anticuerpos anti-MS4A4A a las varias mutaciones con escaneo de alanina en comparación a la unión de los anticuerpos anti-MS4A4A a la proteína silvestre MS4A4A. Los experimentos de mapeo fueron repetidos en forma independiente dos veces con resultados muy similares. Una diferencia fue que los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21 y 4A-18 fueron sometidos a prueba en una oportunidad como hulgG1 y luego como mslgG1 en dos concentraciones. La **Tabla 11** a continuación muestra los resultados de la prueba mslgG1 para estos anticuerpos. Para todos los otros anticuerpos la **Tabla 10** muestra la unión promedio de anticuerpos en ambos experimentos. Los valores que muestran la unión de anticuerpos anti-MS4A4A a proteína MS4A4A debajo del 20% de aquella medida para la unión a MS4A4A de tipo silvestre aparecen en negrita en la **Tabla 10** a continuación.

[0393] Todas las mutaciones mostraron eficiencias de transfecciones equivalentes de entre aproximadamente 22-33% (no se indican datos). No se observe correlación entre la union promedio de anticuerpos y los niveles GFP en las células, lo que sugiere que los niveles GFP no se pueden usar como indicadores de la expresión de MS4A4A en la superficie celular.

TABLE 10

Constructo	Secuencia de bucle	4A-21	4A-18	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> ASNTYGSNPIS (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	CMASN <u>A</u> YGSNPIS (SEQ ID NO:260)	100,4	87,5	83,22	77,29	78,57	78,38
4A.Ala.7	CMASNT <u>A</u> GSNPIS (SEQ ID NO:261)	114,5	15,8	98,41	93,36	94,96	92,91

Constructo	Secuencia de bucle	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
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	CMASNTY <u>G</u> ANPIS (SEQ ID NO:263)	99,6	106,0	102,06	85,83	89,83	94,67
4A.Ala.10	CMASNTYGS <u>A</u> PIS (SEQ ID NO:264)	102,3	103,2	124,27	91,27	93,95	89,57
4A.Ala.11	CMASNTYGSN <u>A</u> IS (SEQ ID NO:265)	28,7	14,8	35,06	20,53	32,79	25,29
4A.Ala.12	CMASNTYGSNP <u>A</u> S (SEQ ID NO:266)	66,4	91,4	57,21	48,93	56,33	49,19
4A.Ala.13	CMASNTYGSNP <u>I</u> A (SEQ ID NO:267)	38,4	41,8	32,34	27,38	36,36	28,92
WT ECL2	SFHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:290)	100					
4A.Ala.14	<u>A</u> FHHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:268)	94,3	87,8	78,14	83,99	81,28	85,27
4A.Ala.15	S <u>A</u> HHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:269)	118,7	116,9	111,77	84,71	98,51	87,20
4A.Ala.16	SF <u>A</u> HHPYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:270)	71,0	48,1	76,87	58,00	71,46	64,58
4A.Ala.17	SFH <u>A</u> PYCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:271)	102,8	99,4	125,37	77,01	82,95	85,21
4A.Ala.18	SFH <u>H</u> A ₁ YCNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:)	101,4	103,7	89,39	36,92	46,13	42,33
4A.Ala.19	SFHHP <u>A</u> CNYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:272)	83,8	16,3	26,68	1,66	42,27	1,08
4A.Ala.20	SFHHPY <u>S</u> NYYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:273)	5,0	2,8	8,66	1,94	1,74	1,60
4A.Ala.21	SFHHPYC <u>A</u> YYGNSNNCHGTMS (SEQ ID NO:274)	1,8	73,3	93,33	70,08	73,76	80,30
4A.Ala.22	SFHHPYCN <u>A</u> YGNSNNCHGTMS	1,8	3,0	31,23	1,10	0,99	0,88

Constructo	Secuencia de bucle	4A-21	4A-18	4A-202*	4H2	5C12	3F2
	(SEQ ID NO:275)						
4A.Ala.23	SFHHPYCNYY <u>A</u> NSNNCHGTMS (SEQ ID NO:276)	1,4	2,7	50,05	1,19	0,96	0,95
4A.Ala.24	SFHHPYCNYY <u>A</u> NSNNCHGTMS (SEQ ID NO:277)	57,5	63,0	75,76	27,67	18,20	33,76
4A.Ala.25	SFHHPYCNYYG <u>A</u> SNNNCHGTMS (SEQ ID NO:278)	69,2	40,0	100,54	37,09	25,55	45,60
4A.Ala.26	SFHHPYCNYYGN <u>A</u> NNCHGTMS (SEQ ID NO:279)	89,3	96,5	90,84	68,48	81,73	68,38
4A.Ala.27	SFHHPYCNYYGNS <u>A</u> NCHGTMS (SEQ ID NO:)	98,3	118,6	98,39	99,46	91,60	94,25
4A.Ala.28	SFHHPYCNYYGNSN <u>A</u> CHGTMS (SEQ ID NO:280)	87,3	116,4	98,61	86,22	85,94	83,37
4A.Ala.29	SFHHPYCNYYGNSNN <u>S</u> HGTMS (SEQ ID NO:281)	8,4	2,7	4,54	1,09	1,01	0,91
4A.Ala.30	SFHHPYCNYYGNSNNC <u>A</u> GTMS (SEQ ID NO:282)	87,5	62,6	92,83	72,87	80,56	82,45
4A.Ala.31	SFHHPYCNYYGNSNNCH <u>A</u> TMS (SEQ ID NO:283)	147,8	158,6	142,81	123,13	124,19	135,58
4A.Ala.32	SFHHPYCNYYGNSNNCHG <u>A</u> MS (SEQ ID NO:284)	61,6	42,9	63,28	44,61	56,19	45,14
4A.Ala.33	SFHHPYCNYYGNSNNCHGT <u>A</u> S (SEQ ID NO:285)	81,8	36,1	73,09	62,83	59,85	60,45
4A.Ala.34	SFHHPYCNYYGNSNNCHGT <u>M</u> A (SEQ ID NO:286)	113,4	91,0	117,02	102,44	99,15	103,80
4A.Ala.35	SFHHPYCNYY---NNCHGTMS (SEQ ID NO:287)	107,3	2,7	73,14	1,08	1,00	0,88
4A.Ala.36	SFHHPYCN-----NNCHGTMS (SEQ ID NO:288)	1,3	2,6	0,07	0,99	0,93	0,83

*anticuerpo sometido a prueba como hulG1 quimera

[0394] Los resultados indicados anteriormente sugieren que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención reconocen distintos epítopos lineales y/o estructurales 3D estructural dentro de MS4A4A.

[0395] En base a los datos sobre la unión anticuerpo anti-MS4A4A obtenidos en estos experimentos, los siguientes residuos de aminoácidos de bucle dentro de la MS4A4A humana se consideraron aminoácidos estructurales dentro de la proteína MS4A4A, ya que cada uno de ellos afectaba a la unión de los anticuerpos anti-MS4A4A probados: M87, C165, Y167, Y168, C174 (En base a la proteína MS4A4A humana; SEQ ID NO: 1). Se predice que los residuos de aminoácidos C165 y C174 establecen un puente de cisteína formando un bucle en el ECL2. En ausencia de este puente de cisteína, los anticuerpos anti-MS4A4A no se unieron a la proteína MS4A4A, sugiriendo que la estructura de bucle dentro del ECL2 de la MS4A4A es importante para la unión de anticuerpos. Más evidencia de que la estructura de bucle es importante proviene de los dos mutantes de supresión de bucle (Ala.35 y Ala.36) que también afectan fuertemente a la unión de los anticuerpos.

[0396] Los resultados mostraron además que los residuos de aminoácidos Y167 y Y168 afectaron fuertemente la unión de los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21, 4A-18, 4H2, 5C12, y 3F2. Estos residuos de aminoácidos también afectaron la unión de los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-202 en menor grado. Además, los residuos de aminoácidos P96, I97, y S98 en el ECL1 redujeron la unión a cierto grado de todos los anticuerpos anti-MS4A4A sometidos a prueba. Estos resultados sugirieron o bien que las mutaciones en cualquiera de estos cinco residuos de aminoácidos alteraron la estructura de los dominios extracelulares importantes para el reconocimiento y la unión del anticuerpo, o bien que estos residuos de aminoácidos son importantes para la interacción y la unión de cada uno de los seis anticuerpos anti-MS4A4A listados. La prolina es el residuo de aminoácido más restringido, que es crítico para la estructura secundaria y terciaria de un polipéptido. Por ejemplo, la prolina actúa como un disruptor en medio de los elementos regulares de la estructura secundaria, incluida la de las hélices alfa y las hojas beta; sin embargo, la prolina se encuentra comúnmente como el primer residuo de aminoácido de una hélice alfa y en los soportes de borde de las hojas beta. Los residuos de tirosina, isoleucina y serina proporcionan múltiples interacciones antígeno-anticuerpo, incluidas, por ejemplo, las interacciones de Van der Waals, el apilamiento pi-pi y las interacciones de enlace de hidrógeno pi-facial, y/o los enlaces de hidrógeno. En consecuencia, los residuos de tirosina, prolina, isoleucina o serina pueden crear epítopos estructurales bien definidos. Cualquier cambio sutil en estos cuatro residuos de aminoácidos tiene el potencial de perturbar significativamente la afinidad de unión de los anticuerpos.

- 5 **[0397]** La mutación en el residuo de aminoácido M87A en el MS4A4A redujo enormemente o abolió la unión de todos los anticuerpos anti-MS4A4A sometidos a prueba. En base a la predicción de que los ECL1 y ECL2 emplean estructuras corporales rígidas bien definidas y pueden interactuar entre sí, el resultado de la unión de M87A mostrado indicó que se predice que el residuo de aminoácido M87 es uno de los residuos más críticos en el mantenimiento de la estructura de bucle rígido de MS4A4A, ya que la cadena lateral de M87 puede interactuar con uno o más aminoácidos bifurcados en los ECL1 y/o ECL2 por los contactos de Van de Waals y las uniones de hidrógeno a través de la cadena lateral de la espina dorsal y/o las interacciones entre espina dorsal y espina dorsal.
- 10 **[0398]** La **Tabla 11** a continuación indica los residuos únicos de unión de aminoácidos para anticuerpos anti-MS4A4A aquí revelados. El anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21 requiere N166 en el ECL2 para unirse al MS4A4A humano. Los datos mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-18 y 5C12 se unen al ECL1 así como al ECL2 de la MS4A4A humana. El anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 tuvo alguna contribución de unión mediante el residuo de aminoácido Y164.
- 15 **[0399]** Los tres anticuerpos de venta comercial anti-MS4A4A se unen al P163, mientras que ninguno de los anticuerpos anti-MS4A4A aquí revelados y sometidos a prueba en este estudio lo hicieron. Esta prolina P163 de la MS4A4A humana es reemplazada por arginina en la proteína MS4A4A de los monos cynomolgus. Tal observación sugiere que este cambio de prolina a arginina es importante para determinar la reactividad cruzada del cino, o la falta de ella, como se muestra
- 20 en las características de unión de los anticuerpos de venta comercial MS4A4A. La prolina es el aminoácido de mayor restricción estructural y la arginina (en el cino MS4A4A) es un aminoácido con carga positiva en el pH fisiológico. La diferencia entre la prolina y la arginina en el MS4A4A humano frente a la cino puede afectar profundamente la conformación de la proteína MS4A4A, evitando así que los anticuerpos de venta comercial del MS4A4A se unan. Los anticuerpos anti-
- 25 MS4A4A 4A-18, 4A-21, y 4A-202 no parecían ser dependientes de este aminoácido para su unión, y por lo tanto su unión a la proteína cynomolgus no se veía afectada.
- [0400]** En síntesis, los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21, 4A-18, y 4A-202 se unieron a epítomos en MS4A4A que son diferentes de aquella que se encuentra en los anticuerpos anti-MS4A4A disponible en el mercado (**Tabla 11** a continuación). Los anticuerpos anti-MS4A4A 4H2 y 3F2
- 30 exhibieron epítomos idénticos, que se sobrepusieron significativamente con la del anticuerpo anti-MS4A4A 5C12. Por el contrario, cada uno de 4A-18, 4A-21, y 4A-202 de los anticuerpos anti-MS4A4A exhibieron características únicas de unión a los epítomos que fueron diferentes entre sí y también se distinguieron de los anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado. Estas diferencias relacionadas con las propiedades de unión se muestran en la **Tabla 10**. Por otra parte,

los resultados demostraron que no hubieron dos anticuerpos anti-MS4A4A sometidos a prueba que se unieran a epítomos idénticos dentro del MS4A4A humano; no obstante ello, existen residuos de unión de aminoácidos compartidos en algunos o en todos los anticuerpos (por ejemplo, en los residuos de aminoácidos Y167 y Y168, Y164, N170, T177).

5 **TABLA 11**

Anticuerpo	Residuos en el ECL1	Residuos en el ECL2
4A-21		N166 (crítico)
4A-18	Y92 (crítico)	Y164 (crítico) H161, N170, T177, M178 (contribución)
4A-202		Y164 (contribución)
4H2		Y164 (crítico) P163, G169, N170, T177 (contribución)
5C12	G93 (crítico)	G169 (crítico) P163, Y164, N170 (contribución)
3F2		Y164 (crítico) P163, G169, N170, T177 (contribución)

EJEMPLO 6: Unión de anticuerpos anti-MS4A4A a polipéptidos recombinantes MS4A4A solubles

[0401] Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención fueron sometidos a prueba en cuanto a su capacidad de unirse a los diferentes polipéptidos recombinantes solubles MS4A4A, como se describe en el Ejemplo 2, de la siguiente manera. El ácido nucleico que codifica los dominios VH y VL de los anticuerpos humanizados anti-MS4A4A de la presente revelación se clonó en el vector pcDNA3.4 que contiene el dominio constante de la cadena pesada IgG1 humana o en el dominio constante kappa humana. Los anticuerpos humanizados anti-MS4A4A fueron expresados en células Expi293 y fueron purificados por la resina de purificación anticuerpo seleccionada Mab (GE Healthcare Life Science, cat#17519902) siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó el ensayo ELISA a fin de medir la unión de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación y los polipéptidos recombinantes solubles MS4A4A. Se preincubaron 1 µg/ml de antígenos biotinilados en las placas ELISA recubiertas con streptavidina (Thermo Scientific, cat# PI15120) durante una hora. Se lavaron las placas 3 veces, seguido del agregado de anticuerpos (1 µg/ml, 0,33 µg/ml, y 0,11 µg/ml). Las placas se incubaron a temperature ambiente y

se agitaron durante 1 hora, se las lavó 3 veces y luego se agregó la dilución 1/2500 de los conjugados HRP anticuerpos kappa de cabra anti humanos (SigmaAldrich cat#. A7164-1ML).

[0402] La **FIG. 4** muestra los resultados del ensayo ELISA sobre la unión de determinados anticuerpos humanizados anti-MS4A4A que se ligan a los polipéptidos recombinantes solubles MS4A4A JS1, JS4, JS5, JS6, y JS10. Como se puede ver en la **FIG. 4**, determinados anticuerpos anti-MS4A4A (4A-18.hFc, 4A-21.hFc, 4A-202.hFc, 4A-220.mFc, 4A-214.mFc, 4A-204.mFc' hFc se refiere a Fc humano; mFc se refiere a Fc murino)) mostraron uniones a través del ensayo ELISA, a polipéptidos recombinantes solubles JS1, JS5, y JS6, que contienen los dos ECL de MS4A4A. Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención no se unieron a los polipéptidos recombinantes solubles JS4 y JS10, que son polipéptidos de control negativo y no contienen la secuencia de la región ECL de MS4A4A. Dos anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado, 5C12 y 4H2, no demostraron unirse a ninguno de los polipéptidos recombinantes solubles MS4A4A (ver la **FIG. 4**). En la **FIG. 4**, el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-214 fue previamente revelado en la solicitud internacional de patente No. PCT/US2019/016156, y posee una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada EVKLEESGGGLVQPGRSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYATHYA ESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCSSMIIVDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:179) y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASQSVSSSTYSYLHWYQQRPGQPPKLLIKYASNLESGVPARF SGSGSGTVFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPLTFGAGTKLEMK (SEQ ID NO:180).

[0403] Los resultados presentados en la **FIG. 4** fueron derivados de datos que se indican a continuación en la **Tabla 12**:

TABLA 12

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

[0404] La **FIG. 5** muestra los resultados del ensayo ELISA sobre la unión de las versiones humanizadas del anticuerpo anti-MS4A4A murino 4A-21 al polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS1. Los anticuerpos fueron usados en una concentración de 1 µg/ml. Como se muestra en la **FIG. 5**, muchas de las versiones humanizadas del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21 conservaron su capacidad de unirse a este polipéptido recombinante. Ciertas versiones humanizadas del

anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21 mostraron una reducción de la unión al polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS1.

[0405] Los resultados presentados en la **FIG. 5** fueron derivados de los datos que se indicant a continuación en la **Tabla 13**:

5 **TABLA 13**

Anticuerpo	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
Isotipo	0,113

[0406] La **FIG. 6** muestra los resultados del ensayo ELISA sobre la union de las versions humanizadas del anticuerpo murino anti-MS4A4A 4A-202 al polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS1. Los anticuerpos se usaron a una concentración de 1 µg/ml. Como se muestra en la **FIG. 6**, las versiones humanizadas del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 fueron capaces de ligarse a este polipéptido recombinante.

10

[0407] Los resultados presentados en la **FIG. 6** fueron derivados de los datos que se indicant a continuación en la **Tabla 14**:

TABLA 14

Anticuerpo	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
Isotipo	0,113

- 5 **[0408]** Varias versiones humanizadas del anticuerpo murino anti-MS4A4A 4A-202 y del anticuerpo murino anti-MS4A4A 4A-21 fueron sometidas a nuevas pruebas a fin de comprobar su capacidad de unirse a los polipéptidos recombinantes MS4A4A solubles. El anticuerpo humanizado anti-MS4A4A 4A-332 y el anticuerpo humanizado anti-MS4A4A 4A-302 mostraron una unión razonable y fueron seleccionados para mejorar su afinidad de la siguiente manera. Se introdujeron
- 10 mutaciones aleatorias en las 6 regiones CDR del anticuerpo 4A-322 y del anticuerpo 4A-302 utilizando una técnica PCR superpuesta. El polipéptido biotinilado recombinante MS4A4A soluble JS5 se utilizó para el paneo de la pantalla de fagos de estas variantes del anticuerpo. Después de 3 rondas de paneo, se seleccionaron aproximadamente 190 variantes mutantes de anticuerpo anti-MS4A4A y se expresaron en células TG1, cuyos lisados fueron examinados por el método ELISA.
- 15 Se seleccionaron veintidós variantes humanizadas del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21 y quince variantes humanizadas del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202, convertidas recombinantemente a IgG humana completa, y expresadas en células Expi293. Los anticuerpos anti-MS4A4A fueron purificados mediante Resina de Purificación de Anticuerpos MabSelect (GE Healthcare Life Science, cat#17519902) según las indicaciones del protocolo del fabricante. Los experimentos de
- 20 ELISA y de Citometría de Flujo fueron posteriormente repetidos.

[0409] Los anticuerpos humanizados y madurados por afinidad anti-MS4A4A 4A-312, 4A-313, y 4A-314 mostraron unirse al polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS5 en el ensayo ELISA (ver **FIG. 7**) en varias concentraciones del anticuerpo (1 µg/ml, 0,33 µg/ml, y 0,11 µg/ml), y fueron seleccionados para posteriores análisis funcionales.

- 5 **[0410]** Los resultados presentados en la **FIG. 7** fueron derivados de los datos que se indican a continuación en la **Tabla 15**:

TABLA 15

Anticuerpo	1 ug/ml	0,33 ug/ml	0,11 ug/ml
4A-312	0,184	0,11	0,097
4A-313	1,262	1,05	0,741
4A-314	1,142	0,682	0,399
4A-302	0,128	0,103	0,091
4A-202	0,188	0,111	0,079

- 10 **[0411]** Los anticuerpos humanizados y madurados por afinidad anti-MS4A4A 4A-351 y 4A-376 (0,4 µg/ml) mostraron una buena unión con el polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS5 bajo el ensayo ELISA (ver **FIG. 8**). Estos anticuerpos anti-MS4A4A antibodies fueron luego seleccionados para ser utilizados como modelos para lo cual se hicieron sustituciones de aminoácidos a aminoácido D28 en la región CDR-L1; dichas sustituciones de aminoácidos fueron D28G, D28E, D28S, D28A, y D28Q.

- 15 **[0412]** Los resultados presentados en la **FIG. 8** fueron derivados de los datos que se indican a continuación en la **Tabla 16**:

TABLA 16

Anticuerpo	OD450
4A-350	0,939
4A-351	0,99
4A-357	0,892
4A-358	0,901
4A-359	0,892
4A-360	0,797
4A-361	0,79
4A-362	0,908

4A-363	0,833
4A-364	0,959
4A-365	0,845
4A-366	0,875
4A-367	0,961
4A-368	0,901
4A-369	0,852
4A-370	0,822
4A-371	0,955
4A-372	0,873
4A-373	0,907
4A-374	0,833
4A-375	0,996
4A-376	0,977
4A-332	0,821
4A-21	0,925

[0413] Estos anticuerpos adicionales anti-MS4A4A incluyeron anticuerpo anti-MS4A4A 4A-352, 4A-353, 4A-354, 4A-355, 4A-356, 4A-377, 4A-378, 4A-379, 4A-380, y 4A-381, y fueron sometidos al ensayo ELISA para controlar su unión al polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS5 en tres concentraciones diferentes de anticuerpo (1 µg/ml, 0. 33 µg/ml, y 0,11 µg/ml). Los resultados de estos estudios se muestran en la **FIG. 9**. Como se muestra en la **FIG. 9**, estos anticuerpos adicionales anti-MS4A4A mostraron su unión al polipéptido recombinante MS4A4A soluble JS5.

[0414] Los resultados presentados en la **FIG. 9** fueron derivados de los datos que se indican a continuación en la **Tabla 17**:

10 **TABLA 17**

Anticuerpo	1 ug/ml	0,33 ug/ml	0,11 ug/ml
4A-21	1,027	1,063	0,927
4A-332	0,997	0,851	0,677
4A-351	0,953	0,898	0,816
4A-352	0,985	0,885	0,655
4A-353	0,996	0,85	0,63

4A-354	0,98	0,874	0,701
4A-355	0,961	0,878	0,721
4A-356	0,927	0,85	0,746
4A-21	1,114	1,121	0,865
4A-376	1,037	1,031	0,83
4A-377	0,928	0,873	0,577
4A-378	0,944	0,848	0,636
4A-379	0,893	0,812	0,543
4A-380	0,981	0,916	0,654
4A-381	1,002	0,94	0,685

EJEMPLO 7: Unión de anticuerpos humanizados y madurados por afinidad anti-MS4A4A a células U937 que sobreexpresan MS4A4A humana

[0415] Se evaluaron versiones humanizadas y maduradas por afinidad de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en relación con su unión a a células humanas U937 que expresan MS4A4A, de la siguiente manera.

[0416] Los anticuerpos anti-MS4A4A sometidos a prueba fueron o bien IgGs de ratón purificados del sobrenadante del hibridoma o bien quimeras IgG1 Fc humanas producidas recombinantemente en células Expi293. La liga por afinidad con las células se determinó de la siguiente manera. Brevemente, las células fueron cosechadas, lavadas, y etiquetadas con Aqua Live/Dead para discriminarlas por viabilidad. Después de un lavado con PBS, se repartieron alícuotas de 2×10^4 células por pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos y se incubaron con 50µL del anticuerpo purificado anti-MS4A4A a varias concentraciones (3 x diluciones comenzando con 10µg/mL) en búfer FACS (PBS + 2% FBS + 1mM EDTA). Después de esta incubación primaria, el sobrenadante se retiró por centrifugación, se lavó 2 veces con 150µL de búfer FACS helado, y se incubó con el anticuerpo secundario apropiado en hielo durante 15 minutos. Después de la incubación del anticuerpo secundario, las células se lavaron de nuevo 2 veces con búfer FACS helado y se resuspendieron en un volumen final de 200µL de búfer FACS. El análisis de citometría de flujo se realizó en un sistema FACSCanto (BD Biosciences). Los datos de unión se expresaron como Mediana de la Intensidad de Fluorescencia (MFI).

[0417] Los resultados de estos experimentos de unión se indican a continuación en la **Tabla 18** y en la **Tabla 19**. La **Tabla 18** muestra la unión de determinados anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación a células U937 que sobreexpresan la MS4A4A humana recombinante. Estos experimentos se realizaron usando anticuerpos anti-MS4A4A a una concentración de 5 µg/ml y fueron sometidos a ensayo para determinar la unión celular por citometría de flujo.

TABLA 18

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

4A-348	47,8
4A-349	142
Isotype control	33,4

[0418] La Tabla 19 muestra la unión de determinados anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación a células U937 que sobreexpresan la MS4A4A humana recombinante. Estos experimentos se realizaron usando anticuerpos anti-MS4A4A a una concentración de 5 µg/ml y fueron sometidos a ensayo para determinar la unión celular por citometría de flujo. En este ensayo, el valor MFI de las células teñidas solo con el anticuerpo secundario fue de aproximadamente 200.

TABLA 19

Anticuerpo	MFI
4A-21	18779
4A-332	8821
4A-350	11581
4A-351	12175
4A-358	12107
4A-360	10277
4A-362	10023
4A-369	10079
4A-373	11874
4A-376	16664
4A-352	10955
4A-353	10363
4A-354	13682
4A-355	13418
4A-356	11974
4A-377	12243
4A-378	9913
4A-379	10567
4A-380	11809
4A-381	12588
4A-202	31745

4A-302	24450
4A-312	17715
4A-313	41794
4A-314	15289

EJEMPLO 8: Anticuerpos anti-MS4A4A modulan la proteína del TREM2 en las células mieloides primarias humanas

[0419] Se ha reportado que los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP) en el lugar MS4A afectan los niveles del TREM2 soluble (sTREM2) en humanos, la vía del TREM2 en general, y la susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer. Los alelos protectores MS4A4A de la enfermedad de Alzheimer están relacionados con el aumento de los niveles del sTREM2 en los líquidos cerebroespinales. Juntas, estas vías pueden jugar un papel en la prevención de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades neurodegenerativas. Además, el tratamiento de los macrófagos humanos en cultivo con macrófagos humanos en cultivo con anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado redujo los niveles del sTREM2 (Piccio et.al. Acta Neuropathol 2016, 131:925-933). A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación que modulan los niveles de sTREM2 y de la membrana-plasma/superficie celular TREM2 (mTREM2) en los macrófagos, se realizaron los siguientes estudios.

[0420] Los macrófagos primarios humanos se colocaron en placas de 96 pocillos y se trataron con el panel de anticuerpos anti-MS4A4A (10 µg/ml) en RPMI completo. Después de 48 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se determinaron los niveles del sTREM2 usando el Meso Scale Discovery (MSD). Brevemente, se incubaron los pocillos de una placa MSD (Cat# L15XA-3) con anticuerpo de captura en 1µg/ml, durante la noche en un agitador orbital a 500 RPM y a una temperatura de 4°C. Los pocillos se lavaron y luego se bloquearon en búfer de unión (1% BSA de alto grado inactivado por calor) en PBS) durante una hora en un agitador orbital a 500 RPM y a una temperatura de 20°C. Se prepararon estándares (Recombinant Human Trem2 Fc 1828-T2 (R&D Systems)) y muestras desconocidas a concentraciones adecuadas en un búfer de unión, se añadieron a los pocillos, y luego se incubaron durante una hora en un agitador orbital a 500 RPM y a una temperatura de 20°C. Los pocillos se lavaron y luego se incubaron con el anticuerpo secundario (TREM2 biotinilado de cabra antihumano (R&D Systems Cat#BAF1828)) a 100ng/ml durante 1 hora en un agitador orbital a 500 RPM y a una temperatura de 20°C. Los pocillos se lavaron y luego se incubaron con un reactivo de detección (Sulfo Tag-Streptavidin; MSD Cat#R32AD) a 0,2 µg/ml en búfer de unión. Luego se lavaron los pocillos, se agregaron 150 µl de buffer de lectura (1x, MSD) a cada pocillo, y se leyeron las placas en un Sector Imager.

[0421] Separadamente, se recogieron células tratadas con anticuerpos anti-MS4A4A (arriba) y se las sometió a citometría de flujo a fin de determinar los niveles de mTREM2 levels empleando un anticuerpo anti-TREM2 (Alector) conjugado a aloficocianina o fluoroforos similares.

[0422] Como se muestra en la **Tabla 20**, los anticuerpos anti-MS4A4A aumentaron el nivel de sTREM2 en los sobrenadantes de macrófagos humanos primarios cultivados obtenidos de varios donantes. Los resultados aquí descriptos demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron o regularon hacia arriba los niveles del sTREM2 en los sobrenadantes de macrófagos humanos primarios. Los números en la **Tabla 20** son relativos a los obtenidos usando un anticuerpo de control de isotipo, que fue fijado en 100.

10 **TABLA 20**

Anticuerpo	Donante		
	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
hulgG1	100	100	100

[0423] Como se muestra en la **Tabla 21**, los anticuerpos anti-MS4A4A aumentaron el nivel de del TREM2 (mTREM2) membrana- plasma / superficie celular en macrófagos humanos primarios cultivados obtenidos de varios donantes. Estos resultados fueron coherentes con el correspondiente aumento en el sTREM2 observado en los sobrenadantes de estas células, como se pudo ver en la **Tabla 20**. Los números en la **Tabla 21** son relativos a los obtenidos usando un anticuerpo de control de isotipo, que fue fijado en 100.

15

TABLA 21

Anticuerpo	Donante		
	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
hlgG1	100,0	100,0	100,0

[0424] Estos datos indicaron que el tratamiento de macrófagos humanos primarios con anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención aumentaron tanto los niveles de sTREM2 como de mTREM2 en estas células de linaje mieloide. Estos resultados contrastan con un informe previo que muestra que el anticuerpo anti-MS4A4A 5C12 disponible en el mercado redujo los niveles de sTREM2 en los sobrenadantes de macrófagos humanos cultivados (Deming et al, *supra*).

[0425] Los experimentos anteriores que examinaban el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A en el TREM2 de membrana y soluble se repitieron usando anticuerpos anti-MS4A4A preparados para tener bajos niveles de endotoxina. En la **Tabla 22** se muestran los niveles de sTREM2 medidos en los sobrenadantes de cultivo. La mayoría de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, al estar altamente purificados y esencialmente libres de endotoxina, indujeron un aumento de los niveles de sTREM2 en diversos grados. Los anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado 3F2, 4H2, y 5C12 también aumentaron los niveles de sTREM2, pero en menor grado. Estos resultados contrastan con los datos publicados anteriormente, que mostraban que estos anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado redujeron los niveles de sTREM2 en el cultivo; esto se debe probablemente a la contaminación de la endotoxina, las impurezas y los agregados presentes en las preparaciones de venta comercial. Los datos de la **Tabla 22** muestran que los niveles de sTREM2 están expresados en ng/ml y están normalizados a los observados con el anticuerpo de control del isotipo.

[0426] El aumento observado en el sTREM2 guarda un paralelismo con el aumento de los niveles del TREM2 ligado a la membrana (mTREM2) después del tratamiento del anticuerpo anti-MS4A4A (**Tabla 23**, a continuación). A pesar de la variación en la capacidad de respuesta de los donantes, la mayoría de los anticuerpos anti-MS4A4A aumentaron el nivel de mTREM2 en 2 ó 3 de los tres donantes sometidos a prueba. Cuando se los compara con los anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado (3F2, 4H2 y 5C12), varios anticuerpos en la presente revelación muestran una actividad equivalente o superior. Los niveles que se muestran en la **Tabla 23** a continuación se expresan como Intensidad Media de Fluorescencia, determinada por citometría de flujo y están normalizados con respecto a los observados utilizando el anticuerpo de control de isotipo.

TABLA 22

	Donante		
Anticuerpo	753	754	755
4A-202	50,5	15,1	16,1
4A-18	54,9	-2,4	-0,3

	Donante		
Anticuerpo	753	754	755
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

TABLA 23

	TREM2 MFI, delta sobre control		
Anticuerpo	Donante 753	Donante 754	Donante 755
4A-202	5258	1171	6591
4A-18	3531	-76	4289
4A-21	5585	2097	6334
4A-25	687	888	2528
4A-214	6017	1774	6009
3F2	2176	103	2423
4H2	1625	207	2444
5C12	926	499	1803

[0427] Como los estudios genéticos han vinculado el alelo protector de la enfermedad de Alzheimer MS4A4A con el aumento de los niveles de sTREM2 en pacientes con enfermedad de Alzheimer, estos resultados sugirieron que los anticuerpos anti-MS4A4A resultan un tratamiento eficaz para la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos mediante la modulación (es decir, el aumento) de la actividad y la función del TREM2.

[0428] También se determinó el efecto de anticuerpos humanizados anti-MS4A4A de la presente revelación en el sTREM2 y en el TREM2 unido a membrana (mTREM2). Para examinarlo, macrófagos humanos primarios de dos donantes fueron tratados con anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación durante 48 horas. Se recogieron y sometieron a ensayo sobrenadantes de cultivo para niveles de TREM2 soluble usando ensayos de Mesoscale Discovery. Se midió la superficie celular de TREM2 en células tratadas por separado mediante citometría de flujo después

de realizar un teñido con anticuerpos anti-TREM2 conjugados con fluoróforos. Se midió el TREM2 soluble en el sobrenadante de cultivo de macrófagos utilizando el sistema Mesoscale Discovery system (MSD, Rockville, MD, USA).

[0429] La **Tabla 24** a continuación muestra los resultados del efecto de anticuerpos anti-MS4A4A en cambios de niveles del TREM2 soluble. En la **Tabla 24**, los niveles de TREM2 soluble se indican como ng/ml. Como se muestra en la **Tabla 24**, la mayoría de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de TREM2 soluble en macrófagos humanos primarios. Los anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado 5C12, 4H2, y 3F2 no mostraron un aumento en los niveles de TREM2 soluble a ningún grado significativo en comparación con los observados con muchos de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, y los efectos de 5C12, 4H2, y 3F2 fueron comparables al control del isotipo.

TABLA 24

Anticuerpo	Donante 888	Donante 904
hIgG1 isotipo	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 isotipo	25,9	28,8
5C12	29,7	30,0
4H2	28,9	30,6
3F2	29,4	28,8

[0430] La **Tabla 25** a continuación muestra los resultados del efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A respecto de los cambios en los niveles de la superficie celular (por ejemplo, membrana) del TREM2. En la **Tabla 25**, los niveles de superficie celular TREM2 se muestran como la intensidad media de la fluorescencia (MFI) medida en el procedimiento de citometría de flujo. Como se muestra en la **Tabla 25**, la mayoría de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención aumentaron los niveles TREM2 de superficie celular en los macrófagos humanos primarios. Los anticuerpos anti-MS4A4A disponibles en el mercado 5C12, 4H2, y 3F2 no mostraron un aumento en los niveles TREM2 de superficie celular en ningún grado significativo comparado con el observado con muchos de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, y los efectos de 5C12, 4H2, y 3F2 fueron comparables al control de isotipo.

TABLA 25

Anticuerpo	Donante	Donante
------------	---------	---------

	888	904
hlgG1 isotipo	2566,5	2637,5
4A-202	4045,5	4100
4A-21	3329	3325
4A-25	2967,5	3191
4A-302	5336	4741,5
4A-312	5492	4672
4A-313	3645,5	3345,5
4A-314	4335	4070
4A-332	3257	3061
4A-350	3552	3192,5
4A-351	3464	3235,5
4A-352	3247,5	3227,5
4A-353	2835	3133
4A-354	2940	3092,5
4A-355	3319	3891,5
4A-356	2971,5	3328,5
4A-358	3659	3273,5
4A-360	3421,5	3154,5
4A-362	3759,5	3240
4A-369	3558,5	3256
4A-373	3430	3313
4A-376	3521	3398,5
4A-377	3376,5	3553,5
4A-378	3920,5	3804,5
4A-379	3847,5	3745
4A-380	4070	3754
4A-381	4070,5	3952,5
4A-382	2618,5	2621,5
4A-383	2611,5	2812,5
4A-384	2524,5	2601
4A-385	2576,5	2560,5
4A-386	2546	2614

4A-387	2534	2601
4A-388	2589,5	2624,5
4A-390	2561	2639,5
mIgG1 isotipo	2459,5	2690,5
5C12	2596	2683,5
4H2	2611,5	2780
3F2	2629	2629,5

[0431] Como se muestra en las **Tabla 24** y **Tabla 25**, ambos niveles de TREM2 membrana y soluble fueron regulados hacia arriba con el tratamiento de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación. Los anticuerpos anti-MS4A4A que se comercializan en el mercado 5C12, 4H2, y 3F2 no indujeron la expresión del TREM2 a ningún grado significativo.

EJEMPLO: 9: Efecto de anticuerpos anti-MS4A4A en marcadores de superficies de células macrófagas

[0432] El efecto de anticuerpos anti-MS4A4A en varios marcadores de superficies de células macrófagas M1 y M2 fue examinado de la siguiente manera. Se trató a los macrófagos humanos primarios con varios anticuerpos anti-MS4A4A (10 µg/ml) en RPMI1640 completo durante 48 horas. Las células fueron luego cosechadas y sometidas a citometría de flujo, usando anticuerpos específicos para los marcadores M1 (CD16, MHC Class II, CD86), los marcadores M2 (CD200R, Dectin-1, CD163), y un marcador pan-macrófago CD14.

[0433] En la **Tabla 26** a continuación se ven los resultados de estos estudios. Los niveles de expresión de marcadores de superficies celulares se sometieron a ensayos por citometría de flujo y fueron normalizados con respecto a los obtenidos en células tratadas con un anticuerpo de control de isotipo, que se fijó al 100%. La expresión de la superficie celular de determinados marcadores M1, inclusive CD86 y MHC-II, no sufrieron alteraciones o se vieron solamente afectados por el tratamiento con anticuerpos anti-MS4A4A. Por el contrario, expresión de la superficie celular de determinados marcadores M2 markers, inclusive CD200R, CD163, y Dectin-1 se vió significativamente reducida por el tratamiento con anticuerpos anti-MS4A4A.

TABLA 26

Anticuerpo	CD200R (M2)	CD14 (Pan)	Dectin-1 (M2)	CD16 (M1)	CD163 (M2)	MHC-II (M1)	CD86 (M1)
hulgG1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4A-202	35,2	60,2	47,3	171,0	39,1	73,6	121,8

Anticuerpo	CD200R (M2)	CD14 (Pan)	Dectin-1 (M2)	CD16 (M1)	CD163 (M2)	MHC-II (M1)	CD86 (M1)
4A-214	89,5	98,1	108,3	106,5	112,8	144,2	131,6
4A-18	29,0	56,6	46,6	239,3	33,6	45,6	112,3
4A-21	67,9	39,4	22,9	75,5	65,0	81,3	177,0

[0434] Juntos, estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación afectan la polarización de los macrófagos, alejando a las células de un fenotipo M2. Estos resultados sugirieron que dentro del Sistema Nervioso Central, el tratamiento con anticuerpos anti-MS4A4A puede proporcionar una mejora beneficiosa de la actividad microglial potenciando, aumentando o restaurando su función neuroprotectora en el contexto de las enfermedades y trastornos neurodegenerativos. Dado que las microglías homeostáticas en condiciones saludables expresan más marcadores M2, tales como CD200R, CD163 y CD115, estos resultados sugirieron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son afectos a alterar el estado fisiológico de las células microgliales hasta el de un fenotipo más protector, incluso hasta un estado más proinflamatorio o activado. Como la Microglia Asociada a la Enfermedad (DAM, en inglés) en los modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer y en la enfermedad de Alzheimer humana están en un estado proinflamatorio o activado, lo que se considera beneficioso en la enfermedad de Alzheimer, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación resultan útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos.

EJEMPLO 10: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan la expresión de osteopontina y gelsolina

[0435] Se han identificado las variantes genéticas asociadas a la enfermedad de Alzheimer (SNP) asociadas al grupo de genes MS4A. Uno de esos alelos variantes es rs1582763, al que se lo relaciona con niveles elevados de CSF del sTREM2 y con la reducción del riesgo de la enfermedad de Alzheimer y el retraso de la edad de inicio. (Deming et al, 2018, bioRxiv, doi: dx doi org / 10.1101/352179). El alelo rs1582763 disminuye los niveles de ARNm MS4A4A en sangre. Estos hallazgos sugieren que el alelo rs1582763 desempeña un papel protector al reducir los niveles de MS4A4A, disminuyendo potencialmente el riesgo o la gravedad de la enfermedad de Alzheimer.

[0436] Un perfil de expresión de ARN que muestra el efecto de este alelo protector en los macrófagos humanos se derivó de los datos publicados sobre expresión de ARN. El ARNm para SPP1 (osteopontina) y GSN (gelsolina) mostraron el aumento más significativo de la expresión,

como se indica en los valores de cambio en cantidad de veces (“FC”, según las siglas en inglés) y valores-p (véanse las columnas bajo el título “rs1582763” en la **Tabla 27** y duplicadas en la **Tabla 28** a continuación), en comparación con otros marcadores que muestran una mayor expresión (no se muestran). Los datos indicaron que SPP1 y GSN son marcadores farmacodinámicos de la actividad biológica protectora asociada al alelo rs158273.

[0437] Los anticuerpos parentales MS4A4A fueron sometidos a ensayo para comprobar su capacidad de fenocopiar el alelo protector. Los macrófagos humanos derivados de PBMC fueron tratados con anticuerpos anti-MS4A4A como se indica en la **Tabla 27** y en la **Tabla 28** durante 24 horas (hasta tres repeticiones). Se extrajo el ARN y se prepararon y secuenciaron bibliotecas de ARN, seguidas de un mapeo y cuantificación del genoma. Los resultados indicaron que todos menos uno (4A-220) de los anticuerpos parentales anti-MS4A4A indicados fenocopian el alelo protector rs1582763 con respecto a aumentar la expresión de SPP1 y GSN (**Tabla 27** y **Tabla 28**). Estos resultados sugirieron que los anticuerpos MS4A4A de la presente revelación que son efectivos para aumentar la expresión de SPP1 y GSN son biológicamente activos para disminuir el riesgo y/o la severidad de la enfermedad de Alzheimer, de manera similar al alelo protector.

TABLA 27

	rs1582763		4A-18		4A-18+4A-21		4A-25		4A-214	
Gen	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

TABLA 28

	rs1582763		4A-220		4A-21		4A-202	
Gen	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

EJEMPLO 11: Derivación y estimulación de células microgliales derivadas de iPSC con anticuerpos anti-MS4A4A

[0438] Las células adultas de cualquier origen tisular pueden convertirse en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) mediante la introducción de una mezcla de factores de transcripción asociados a las células madre (analizados extensamente en [https://www\(dot\).cell\(dot\).com/iPSC](https://www(dot).cell(dot).com/iPSC)).

Las iPSCs se pueden mantener en forma indefinida y, con los factores de crecimiento apropiados, pueden ser impulsadas a diferenciarse en varios tipos de células maduras. Hace tiempo que se

han establecido métodos para derivar neuronas de iPSC (Salimi et al., Mol. Bio. Rep. 2014; 41: 1717-1721; Engle et.al., Neuron 2018; 100: 783-797). Más recientemente, se han utilizado las iPSC para derivar astrocitos (Julia et.al., Stem Cell Report 2017; 9:600-614) y microglías (revisión a cargo de Pocock y Piers, Nat. Rev. Neurosci. 2018; 19: 445-452). Estos sistemas de cultivo permiten investigar la biología y función de estas células en entornos controlados, lo que de otra manera no sería posible. Por otro lado, las iPSC pueden ser manipuladas genéticamente por diversos métodos, tales como la edición genética CRISPR, que permite una disección más profunda de la relevancia funcional de los genes de interés en estos tipos de células.

[0439] Después de la derivación de las iPSC, las microglías se cultivan solas *in vitro*, donde se someten a estimulación con anticuerpos anti-MS4A4A en la presente revelación. Después de la estimulación, la viabilidad celular se evalúa mediante la cuantificación de los niveles de ATP intracelular. El efecto sobre los cambios en la expresión del TREM2 de la superficie celular o sobre los cambios en los niveles del TREM2 soluble se mide como se ha descrito anteriormente. Los sobrenadantes de estos cultivos se analizan en busca de cambios en la expresión o en los niveles de varias citoquinas y quimioquinas como resultado del tratamiento con anticuerpos anti-MS4A4A, utilizando métodos como ELISA, ensayos Mesoscale Discovery (MSD, Rockville, MD, EE.UU.), Legendplex (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.), o CBA (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Los cambios en la capacidad de fagocitosis, la tasa de autofagia, la expresión de marcadores de superficie, y el perfil de expresión génica en estas microglías iPSC resultantes del tratamiento con anticuerpos anti-MS4A4A se miden y comparan con los obtenidos de macrófagos derivados de monocitos tratados con anticuerpos anti-MS4A4A, utilizando varios métodos, incluyendo la citometría de flujo, el western blot (inmunoblot o electrotransferencia), imágenes fijas y en tiempo real, y análisis de secuencias ARNseq.

EJEMPLO 12: Efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A en los marcadores de superficie de células macrófagos

[0440] Las células mieloides en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en los órganos periféricos son inherentemente plásticas en su fenotipo y función. Esto puede ser modelado por macrófagos *in vitro*, que pueden ser divididos en macrófagos de tipo M1 y M2, mostrando diferentes potenciales fagocíticos e inflamatorios, fenotipos y actividades. En los órganos periféricos, se piensa que los macrófagos asociados con el fenotipo M1 son más pro-inflamatorios y antimicrobianos, mientras que los macrófagos de tipo M2 son más homeostáticos y anti-inflamatorios. Dentro del SNC, las microglías en condiciones homeostáticas también expresan marcadores M2 tales como CD200R, CD163, sugiriendo funciones reguladoras en este tipo de células. La expresión de MS4A4A es elevada en los macrófagos M2 *in vitro*.

[0441] El efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A en varios marcadores de superficie de células macrófagos M1 y M2 se examina de la siguiente manera. Los macrófagos primarios humanos son tratados con varios anticuerpos anti-MS4A4A (por ejemplo, 10 µg/ml) en RPMI1640 completo durante 48 horas. A continuación, las células se cosechan y se someten a citometría de flujo, utilizando anticuerpos específicos para los marcadores M1 (como CD16, MHC Clase II, CD86), los marcadores M2 (como CD200R, Dectin-1, CD163), y un marcador pan-macrófago que incluye CD14 y otros.

EJEMPLO 13: Caracterización cinética de anticuerpos anti-MS4A4A

[0442] La caracterización cinética de anticuerpos purificados a péptidos MS4A4A de ECL1 y ECL2 la realiza Carterra (San Francisco Sur, California) utilizando un instrumento de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) de arreglo patentado (MX-96), como se indica a continuación. Se imprimen los anticuerpos en un chip CMD500D (Xantec # SPMX CMD500D lot# SC CMD500D0117.a Exp. 31.12.18) usando un Microspotter de Flujo Continuo (CFM). Primero, el chip se activa con 100mM MES pH 5,5, 100µL EDC (133mM final), 100µL de S-NHS (33,3mM final), durante 7 minutos. Se inyecta IgG-Fc anti-ratón (Jackson ImmunoResearch cat#115-005-071) durante 15 minutos para establecer una densidad superficial de 10000-12000 RU, después de lo cual la superficie del chip se desactiva con 1M de etanolamina a pH 8,5 durante 10 minutos. Los anticuerpos anti-MS4A4A en cuestión se diluyen en una proporción de 2:1 con HBS-EP+ búfer (Teknova Cat # H8022) y luego se imprimen como duplicados con una impresión de 20 minutos y una impresión de 5 minutos a partir de la misma solución de la muestra. Los anticuerpos de control se diluyen en 20µg/ml para la impresión.

[0443] Para realizar el análisis cinético, los péptidos en cuestión se preparan en HBS-EP+ búfer con 1mg/ml de BSA a concentraciones finales de ensayo de 2000nM, 400nM, 80nM, 16nM, y 3,2nM. Luego se los inyecta en el chip durante cinco minutos, seguidos de un período de disociación de siete minutos a 8uL por segundo en una serie cinética no regenerativa. Se toman medidas duplicadas para cada anticuerpo anti-MS4A4A para asegurar la reproducibilidad.

EJEMPLO 14: Medición de afinidad de anticuerpos MS4A4A a líneas celulares de expresión transitoria y nativa

[0444] Los anticuerpos anti-MS4A4A purificados son evaluados con respect a su afinidad con varias líneas celulares que expresan MS4A4A. Estas incluyen células transfectadas como se describe en el anterior Ejemplo 8, así como líneas celulares mieloides y células primarias que expresan endógenamente MS4A4A. Los anticuerpos anti-MS4A4A sometidos a prueba son o bien IgG de ratón purificadas del sobrenadante del hibridoma o bien quimeras de IgG1 Fc humanas producidas en forma recombinante en células Expi293. La unión por afinidad a las células se

determina de la siguiente forma. Brevemente, las células son cosechadas, lavadas y etiquetadas con Aqua Live/Dead para la discriminación de la viabilidad. Después de un lavado con PBS, se distribuyen alícuotas de 2×10^5 células por pocillo en placas de fondo en U de 96 pocillos y se incuban con 50 μ L de anticuerpo anti-MS4A4A purificado a varias concentraciones (3x diluciones empezando en 10 μ g/mL) en búfer FACS (PBS + 2% FBS + 1mM EDTA). Después de la incubación primaria, el sobrenadante se retiró por centrifugación, se lavó 2 veces con 150 μ L de búfer FACS helado y se incubó con el anticuerpo secundario apropiado en hielo durante 30 minutos. Tras la incubación secundaria, las células se lavan de nuevo 2 veces con búfer FACS helado y se resuspenden en un volumen final de 200 μ L de búfer FACS. El análisis de citometría de flujo se realiza en un sistema FACSCanto (BD Biosciences). Los datos de unión se analizaron utilizando una mediana de la intensidad de fluorescencia y las curvas se ajustaron Prisma (regresión no lineal: inhibidor de logaritmo vs. respuesta a la dosis con cuatro parámetros) para determinar los valores de EC50.

EJEMPLO 15: Regulación hacia abajo de la proteína MS4A4A

[0445] Se evalúa la capacidad de los anticuerpos anti-MS4A4A para reducir la superficie celular y los niveles celulares totales proteicos de MS4A4A en varias líneas celulares y células primarias. La reducción de la proteína MS4A4A en cada compartimento indica una reducción de la actividad MS4A4A en las células.

[0446] Las células se incuban con anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación durante varios períodos de tiempo y luego se evalúan los niveles de la proteína MS4A4A que permanecen asociados con las células, ya sea por FACS (superficie celular) o por Western blot (nivel total de proteína celular). En los ensayos FACS, la detección de la MS4A4A restante se lleva a cabo con anticuerpos conjugados de alofocianina directa (APC), que no compiten entre sí. Para la detección de Western blot, las células se lisan mediante la adición de búfer lisis 50 μ L (búfer lisis RIPA (ThermoFischerScientific Cat#89900) + 1:100 cóctel de inhibidores de proteasa HALT (ThermoFischerScientific Cat#87786), y se eliminan los residuos insolubles mediante centrifugación a 14.000xg durante 15 minutos. La fracción soluble es analizada con el reactivo de ácido bicinonínico (BCA) para la cuantificación de la proteína. Se cargan cantidades iguales de proteínas de cada muestra en un gel de poliacrilamida Bis-Tris Plus de 4-12% (ThermoFisher Scientific NW04120) y se someten a una separación por electroforesis, tras la cual las proteínas del gel se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando iBlot2 (ThermoFisher Scientific IM21001) y Transfer Stacks (ThermoFisher Scientific IB24002). La membrana se bloquea con un 1% de albúmina de suero bovino o con un 5% de leche descremada para evitar una liga no específica. Luego se incuba con anticuerpos de detección propios o venta

comercial, se lavan, y se incuban con anticuerpo secundario conjugado con HRP (conejo, Abcam #205718; ratón, Abcam #205719). La unión se visualiza desarrollando un sustrato quimioluminiscente con SuperSignal West Pico Plus (ThermoFisher Scientific #34577) y se registra digitalmente con iBright FL1000 (ThermoFisher Scientific A32752) u otros sistemas compatibles.

- 5 **[0447]** El descenso de los niveles proteicos de MS4A4A también puede lograrse mediante la regulación hacia abajo de la expresión o los niveles de ácido nucleico de MS4A4A, por ejemplo, mediante el uso de metodologías antisentido, terapia génica, etc., utilizando métodos conocidos y disponibles para los expertos en la técnica.

10 **EJEMPLO 16: Caracterización de la actividad de anticuerpos anti-MS4A4A utilizando modelos animales para envejecimiento, convulsiones, lesiones de la médula espinal, distrofia retiniana, demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer**

- [0448]** La utilidad terapéutica de los anticuerpos anti-MS4A4A puede asimismo ser sometida a prueba en modelos animales en relación con envejecimiento, convulsiones, lesiones de la médula espinal, distrofia retiniana, demencia frontotemporal y enfermedad de Alzheimer, como se describiera anteriormente (por ejemplo en Beattie, MS *et al.*, (2002) *Neuron* 36, 375-386; Volosin, M *et al.*, (2006) *J. Neurosci.* 26, 7756-7766; Nykjaer, A *et al.*, (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 49-57; Jansen, P *et al.*, (2007) *Nat. Neurosci.* 10, 1449-1457; Volosin, M *et al.*, (2008) *J. Neurosci.* 28, 9870-9879; Fahnstock, M *et al.*, (2001) *Mol. Cell Neurosci.* 18, 210-220; Nakamura, K *et al.*, (2007) *Cell Death. Differ.* 14, 1552-1554; Yune, T *et al.*, (2007) *Brain Res.* 1183, 32-42; Wei, Y *et al.*, (2007) *Neurosci. Lett.* 429, 169-174; Provenzano, MJ *et al.*, (2008) *Laryngoscope* 118, 87-93; Nykjaer, A *et al.*, (2004) *Nature* 427, 843-848; Harrington, AW *et al.*, (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6226-6230; Teng, HK *et al.*, (2005) *J. Neurosci.* 25, 5455-5463; Jansen, P *et al.*, (2007) *Nat. Neurosci.* 10, 1449-1457; Volosin, M *et al.*, (2008) *J. Neurosci.* 28, 9870-9879; Fan, YJ *et al.*, (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2380-2390; Al-Shawi, R *et al.*, (2008) *Eur. J. Neurosci.* 27, 2103-2114; y Yano, H *et al.*, (2009) *J. Neurosci.* 29, 14790-14802).

EJEMPLO 17: Caracterización de los efectos de los anticuerpos anti-MS4A4A utilizando modelos de animales para oncología

- [0449]** Las células mieloides representan un componente importante de las células inmunes presentes en la mayoría de los tumores sólidos. Su papel en la biología de los tumores depende del contexto- aunque estas células tienen el potencial de desempeñar un papel clave en la erradicación de los tumores, la mayoría de las veces son cooptadas por el tumor huésped para ayudar a proporcionar un fenotipo pro-tumor. Esto se logra principalmente mediante la polarización de las células mieloides hacia un fenotipo M2, que es típicamente inmunosupresor y, de este modo, impide que el sistema inmunológico pueda erradicar el tumor. Los anticuerpos anti-

MS4A4A, a través de la repolarización de las células mieloides, pueden revertir este fenotipo inmunosupresor y promover una respuesta inmune anti-tumoral.

[0450] Existen numerosos modelos de tumores animales. Entre los ejemplos de modelos animales relevantes se encuentran los modelos de ratones humanizados, en los que el sistema inmunológico de los ratones se elimina genéticamente, tal y como se tipifica en los ratones NSG (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Estos ratones actúan como huéspedes receptivos de las células inmunitarias humanas, lo que conduce al injerto de células inmunitarias innatas y adaptables humanas. A estos animales se les inoculan células tumorales, generalmente bajo la piel de los flancos. El tamaño del tumor a lo largo del tiempo representa el equilibrio entre el crecimiento de las células tumorales y su erradicación por el sistema inmunológico del huésped. A lo largo del tiempo los animales son tratados con anticuerpos anti-MS4A4A, lo que modifica la progresión del tumor cuando se compara con los animales tratados con isotipo. Al final del período de tratamiento se extraen los tumores y se someten a varios análisis para determinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A en las células tumorales y en las células inmunes infiltradas. Los tumores pueden ser seccionados, montados en portaobjetos y analizados bajo el microscopio para detectar cambios histológicos. El ARNm puede ser analizado por RT-PCR, RNASeq o micromatriz para determinar los cambios en la expresión de los genes. Se pueden preparar suspensiones unicelulares de células inmunes infiltradas en el tumor, teñidas con anticuerpos frente a varios marcadores de superficie celular y analizadas por citometría de flujo, para delinear los cambios en el fenotipo de la superficie celular, especialmente en células inmunes como los macrófagos y las células T. Los cambios observados como resultado del tratamiento anti-MS4A4A en cualquiera de estos análisis indicarán una función inmunomoduladora para estos anticuerpos.

EJEMPLO 18: Efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A sobre la transcripción del TREM2 y ARNm

[0451] El efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A en el nivel de transcripción TREM2 y ARNm se evalúa de la siguiente manera. Las células cultivadas son tratadas con varias concentraciones de un anticuerpo anti-MS4A4A de la presente invención durante varios períodos de tiempo. Después, los cambios en los niveles de ARNm TREM2 dentro de las células se determinan usando metodologías estándar para medir y/o cuantificar los niveles de ARNm conocidos por quienes son expertos en la técnica.

EJEMPLO 19: Efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A en el reciclaje y degradación del TREM2

[0452] Para entender mejor el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A sobre los niveles aumentados de sTREM2 y mTREM2, se realizan los siguientes estudios para examinar el reciclaje

y/o la degradación del TREM2. En estos estudios, se utiliza el tratamiento con cicloheximida de las células para prevenir nuevas síntesis de TREM2 en asociación con el tratamiento con anticuerpos anti-MS4A4A. Se dispone de varios métodos conocidos en la técnica para examinar el reciclaje y la degradación del TREM2 en las células de control en comparación con las células tratadas con anticuerpos anti-MS4A4A.

EJEMPLO 20: Otros anticuerpos anti-MS4A4A

[0453] Otros dos anticuerpos anti-MS4A4A fueron humanizados y la afinidad maduró a partir del anticuerpo parental 4A-21, como ya se describió en el Ejemplo 1, dando como resultado el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450 y el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-419. Las secuencias variables de cadena pesada y ligera de cada uno de estos anticuerpos se muestran a continuación en la **Tabla 29**, con sus correspondientes regiones CDR (según Kabat) subrayadas. Las secuencias de la CDR de cadena pesada se muestran en la **Tabla 30**; las secuencias de CDR de cadena ligera se muestran en la **Tabla 31**.

TABLA 29

Anticuerpo	Variable de Cadena Pesada	SEQ ID NO:	Variable de Cadena Ligera	SEQ ID NO:
4A-450	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYAFTSYGLSW VRQAPGQGLEWMGWINT YSGVPTYAQGFTGRFVFS LDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCARTMADYWGQG TLVTVSS	304	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKSSRSLLYSAGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIYLVSCLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	305
4A-419	QVQLVQSGSELKKPGASV KVSCKASGYRFTSYGLS WVRQAPGQGLEWMGW INTYSGVPTYAQGFKGRFV FSLDTSVSTAYLQISSLKA EDTAVYYCARTMADYWG QGTLVTVSS	306	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCKSSRSLLYSAGKTYLSWF QQRPGQSPRRLIYLVSCLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISR V EAEDVGVYYCWQGIDFHQTF GGGTKVEIK	307

TABLA 30

Anticuerpo	CDR-H1	SEQ ID NO:	CDR-H2	SEQ ID NO:	CDR-H3	SEQ ID NO:
4A-450	SYGLS	308	WINTYSGVP TYAQGFTG	309	TMADY	310
4A-419	SYGLS	311	WINTYSGVP TYAQGFKG	312	TMADY	313

TABLA 31

Anticuerpo	CDR-L1	SEQ ID NO:	CDR-L2	SEQ ID NO:	CDR-L3	SEQ ID NO:
4A-450	KSSRSLLY SAGKTYLS	314	LVSKLDS	315	WQGIDFHQT	316
4A-419	KSSRSLLY SAGKTYLS	317	LVSKLDS	318	WQGIDFHQT	319

EJEMPLO 21: Efecto de anticuerpos anti-MS4A4A en los niveles de sTREM *in vivo*

5 **[0454]** Para examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación sobre los niveles de sTREM en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) *in vivo*, se realizaron los siguientes estudios.

10 **[0455]** Se administró a monos *Cynomolgus* anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 o control de isotipo (hulgG1) en una dosis única de 80 mg/ml por infusión intravenosa. Se recogieron muestras de suero de los animales en predosis, 0,5, 4, 10, 24, 48, 96, 192, 312, 480, y 648 horas después de la administración del anticuerpo; se recogieron muestras de LCR de los animales en predosis, 48, 96, 192, y 336 horas después de la administración del anticuerpo.

15 **[0456]** Los niveles de sTREM en suero y en LCR se midieron de la siguiente manera. Se cubrieron placas Meso Scale Discovery (MSD) (Rockville, MD) con un anticuerpo de captura en PBS a 4°C durante la noche. Las muestras de suero y LCR de mono (así como los estándares TREM2-Fc de mono) se diluyeron en búfer de unión y se añadieron a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió un anticuerpo biotinilado policlonal TREM2 anti-humano de cabra (Sistemas de R+D) a una dilución de 1:2000 en búfer de unión y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la detección con estreptavidina sulfo tag (MSD). Se añadió a las placas 150
20 µl de 1x Read Buffer y las placas fueron entonces analizadas en un Sector Imager (MSD).

[0457] En el suero, los niveles de sTREM2 se incrementaron aproximadamente 1,5 veces desde la línea base (aproximadamente 50% de incremento desde la línea base) después de la

administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-202 (**FIGS. 10A-10B**). Los niveles séricos de sTREM2 se mantuvieron elevados (por encima de los niveles de referencia) durante al menos 480 horas (20 días) tras la administración de una dosis única de anticuerpo 4A-202 anti-MS4A4A en monos cynomolgus.

- 5 **[0458]** En el LCR, los niveles de sTREM2 aumentaron aproximadamente de 2 a 4 veces por encima de los niveles de referencia (aproximadamente un aumento del 300% con respecto a los niveles de referencia) tras la administración del anticuerpo 4A-202 anti-MS4A4A (**FIGS. 11A-11B**). Los niveles de sTREM2 en LCR se mantuvieron elevados (por encima de los niveles de referencia) durante al menos 96 horas (4 días) después de una única dosis del anticuerpo 4A-202 anti-MS4A4A en monos cynomolgus.

[0459] Estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son efectivos para aumentar los niveles de sTREM2 en el suero y en el LCR *in vivo*.

EJEMPLO 22: Unión de anticuerpos anti-MS4A4A a células U937 que sobreexpresan MS4A4A recombinante

- 15 **[0460]** Los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación fueron evaluados por su afinidad de unión con las células recombinantes humanas que expresan MS4A4A U937 (la generación de estas células se ha descrito anteriormente). La afinidad de unión de los anticuerpos anti-MS4A4A con las células se determinó de la siguiente manera. Brevemente, las células U937 que expresan MS4A4A humana recombinante fueron cosechadas, lavadas y etiquetadas con Aqua Live/Dead para la discriminación de la viabilidad. Después de lavar las células con PBS, se distribuyeron alícuotas de 2×10^4 células por pocillo en placas de fondo U de 96 pocillos y se incubaron con 50 μ L de anticuerpo anti-MS4A4A purificado a varias concentraciones en búfer FACS (PBS + 2% FBS + 1mM EDTA). Después de esta incubación primaria, el sobrenadante se retiró por centrifugación, las células se lavaron 2 veces con 150 μ L de búfer FACS helado, y luego se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado en hielo durante 15 minutos. Después de la incubación del anticuerpo secundario, las células se lavaron de nuevo 2 veces con búfer FACS helado y se resuspendieron en un volumen final de 200 μ L de búfer FACS. A continuación se realizó un análisis de citometría de flujo utilizando el sistema FACSCanto (BD Biosciences). Los datos vinculantes se expresaron como Mediana de la Intensidad de Fluorescencia (MFI). Los valores de MFI medidos por el citómetro de flujo se analizaron en el software Prism (Graphpad), utilizando la siguiente ecuación (o se podría utilizar un ajuste similar de 4 parámetros) basada en Kuek, et al, 2016, Immunology y Cell Biology. 94:11-23:

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

[0461] En estos análisis, los siguientes valores fueron limitados según las condiciones experimentales: C = número de células por pocillo (20.000); V = volumen total de tinción en microlitros; n = número de receptores en la superficie de la célula, estimado en 100.000 receptores por célula. Los resultados de estos estudios de unión se muestran en la **Figura 12**.

- 5 [0462] Como se muestra en la **Figura 12**, el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 WT hulgG1 mostró una afinidad de unión con la MS4A4A humana recombinante expresada en las células U937 de aproximadamente $2,8 \times 10^{-10}$, mientras que el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450 WT hulgG1 mostró una afinidad de unión de $3,8 \times 10^{-9}$ en este ensayo.

EJEMPLO 23: Generación de línea celular con sobreexpresión de MS4A4A

- 10 [0463] Dada la dificultad de generar líneas celulares HEK293 transfectadas de forma estable que expresen MS4A4A humana recombinada, se examinaron otros vectores de ADN y líneas celulares para determinar si serían más compatibles para la expresión de MS4A4A humana recombinada. Para la transfección estable, se introdujo la secuencia de codificación de MS4A4A en los vectores de expresión pD2533-G418 o pD3539-puro (Atum, Newark, CA, EE.UU.).
- 15 [0464] MS4A4A se expresa nativamente en células mieloides *in vivo*. Por lo tanto, para superar la toxicidad observada utilizando las células descritas anteriormente, se ensayaron varias líneas celulares derivadas de mieloides para determinar su capacidad de expresar el MS4A4A humano recombinante observando una toxicidad mínima o nula. El panel de líneas celulares derivadas de mieloides utilizado en estos estudios incluyó células THP-1 (ATCC TIB202), células U937 (ATCC
- 20 CRL-1593.2), células K562 (ATCC CCL243), células HL60 (ATCC CCL240), y células Kasumi-1 (ATCC CRL-2724). También se ensayaron 300,19 células (Universidad de Tufts T000710), una línea de células pre-B de ratón, ya que estas células se utilizan comúnmente para fines de expresión de proteínas recombinantes. Cada una de estas líneas celulares fue examinada en cuanto a su susceptibilidad a los antibióticos, a fin de determinar una dosis adecuada de G418 o
- 25 puromicina para la selección y la eficacia de la transfección. Se encontró que los transformantes de las células U937, las células K562 y 300,19 eran viables después de la transfección de plásmidos de expresión humana recombinada MS4A4A y la selección de antibióticos. Después de clonar estas células por dilución limitante, se generaron clones individuales y posteriormente se analizó la expresión de la superficie de la célula de la proteína MS4A4A humana mediante citometría de flujo.

- 30 **EJEMPLO 24: Anticuerpos anti-MS4A4A humanizados y madurados por afinidad modulan la proteína de TREM2 en células mieloides humanas primarias.**

[0465] Los datos de los estudios de genética humana han identificado vínculos entre MS4A4A, la vía de TREM2, y la susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer (AD) (Piccio et al., 2016, Acta Neuropathol, 131:925-933; doi: <https://dx.doi.org/10.1101/352179>). Por ejemplo, los alelos

protectores de AD MS4A4A, están vinculados al aumento de los niveles de sTREM2 en el líquido cefalorraquídeo. Para comprender mejor estas vías protectoras, se realizaron los siguientes estudios. Los macrófagos primarios humanos fueron tratados con varias concentraciones de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación durante 48 horas. En estos estudios, se probaron los siguientes anticuerpos anti-MS4A4A: 4A-450 con hulgG1 Fc (WT) de tipo silvestre, 4A-450 con hulgG1 Fc N325S y L328F (NSLF), 4A-450 con hulgG1 Fc K322A, 4A-313 WT hulgG1, 4A-313 NSLF hulgG1, y 4A-313 K322A hulgG1. La expresión de la superficie celular (unida a la membrana) de TREM2 se midió entonces por citometría de flujo después de que las células se tiñeran con un anticuerpo anti-TREM2 conjugado con fluoróforos. Los niveles de TREM2 soluble se midieron en el sobrenadante de cultivo de las células utilizando el sistema de descubrimiento de mesoescala (MSD, Rockville, MD, EE.UU.).

[0466] Como se muestra en las **Figuras 13 y 14**, los niveles de TREM2 membrana se incrementaron en los macrófagos primarios humanos tras la adición a las células de anticuerpos anti-MS4A4A en forma de dosis dependiente. Los anticuerpos anti-MS4A4A en diferentes secuencias hulgG1 Fc - sustituciones de aminoácidos de tipo silvestre hulgG1, N325S/L328F en hulgG1, y K322A en hulgG1 fueron todos capaces de aumentar los niveles de expresión del TREM2 de membrana. En las **Tablas 32 y 33** que figuran a continuación se presentan los valores numéricos de la proporción de MFI observada en las células tratadas con anti-MS4A4A para los cambios en los niveles de TREM2 unidos a la membrana en comparación con la observada en las células de control no tratadas obtenidas de las **Figuras 13 y 14**, respectivamente.

[0467] Las **Figuras 15 y 16** muestran que los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-450 y 4A-313 en una espina dorsal de tipo silvestre hulgG1 Fc (respectivamente) aumentaron los niveles de TREM2 soluble en los sobrenadantes de los macrófagos humanos primarios de manera dependiente de la dosis. Las **Tablas 34 y 35** a continuación presentan los valores numéricos de la cantidad de veces que se produjo el aumento del TREM2 soluble observado en las células tratadas con anti-MS4A4A sobre el medido como niveles de base de placa obtenidos de las **Figuras 15 y 16**, respectivamente.

TABLA 32

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

TABLA 33

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

TABLA 34

4A-450 WT IgG1 (µg/ml)	sTREM2 (veces que aumentó por sobre el fondo de la placa)
0,0256	0,250851509
0,064	0,337610359
0,16	0,453324666
0,4	0,60750507
1	0,838142928
2,5	1,452549482

5 TABLA 35

4A-313 WT IgG1 (µg/ml)	sTREM2 (veces que aumentó por sobre el fondo de la placa)
0,0256	0,690304672
0,064	0,942481014
0,16	1,64173901
0,4	1,690748748
1	1,687668894
2,5	1,52381547

[0468] Estos resultados mostraron que el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450 WT hulgG1 (2,5µg/ml) aumentó los niveles de sTREM en macrófagos humanos primarios alrededor de 1,4 veces en comparación con las células no tratadas. Estos resultados también mostraron que el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 WT hulgG1 aumentó los niveles de sTREM en macrófagos humanos

primarios en alrededor de 1,5 veces, y hasta cerca de 1,7 veces, en comparación con las células no tratadas. Estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son eficaces para aumentar los niveles de sTREM *in vitro* y, por lo tanto, pueden proporcionar un medio efectivo para aumentar los niveles de sTREM en plasma y en el LCR *in vivo*, imitando el efecto de los alelos MS4A4A protectores en la enfermedad de Alzheimer en desarrollo.

EJEMPLO 25: Efecto de anticuerpos anti-MS4A4A en los niveles celulares de ATP

[0469] Se aislaron monocitos humanos de sangre entera utilizando el cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos de RosetteSep (Stemcell Technologies) y centrifugación Ficoll según los protocolos del fabricante. Después de lisar los glóbulos rojos con el búfer de lisado ACK, los monocitos fueron resuspendidos en medios completos (RPMI, 10% FBS, Pen/Strep, L-glutamina, HEPES, aminoácido no esencial, piruvato de sodio). Para obtener macrófagos de estos monocitos aislados, se añadieron 100 ng/ml de M-CSF humano y 8% v/v de suero humano a las células durante 5-7 días. Luego las células se colocaron en placas a 50.000 células/pocillo en RPMI-1640 y se cultivaron durante 2 días en presencia o ausencia de varias concentraciones de anticuerpos anti-MS4A4A (4A-313 NSLF, 4A-313 PS, 4A-450 NSLF, y 4A-450 PS) o del anticuerpo de control de isotipo a varias concentraciones en solución durante 48 horas. A continuación se cuantificó el contenido de Trifosfato de Adenosina (ATP, en inglés) en las células utilizando el kit de viabilidad celular CellTiter-Glo Luminiscente (Promega, Cat#G7571) siguiendo el protocolo del fabricante.

[0470] Como se muestra en la **Figura 17**, los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313 NSLF hulgG1, 4A-313 PS hulgG1, 4A-450 NSLF hulgG1, y 4A-450 PS hulgG1 aumentaron los niveles de ATP en macrófagos humanos primarios de manera dependiente de la dosis. Los anticuerpos anti-MS4A4A con hulgG1 Fc que contiene sustituciones de aminoácidos N325S/L328F, que suprimen la unión FcγRIIIa (Journal of Biological Chemistry 2014, 289: 15309-15318), o con hulgG1 Fc que contiene sustitución de aminoácidos P331S, que suprimen la unión C1q (Journal of Immunology 2000, 164: 4178-4184), resultaron en ambos casos eficaces para aumentar los niveles de ATP en macrófagos humanos. El aumento de los niveles de ATP indica una mayor viabilidad de los macrófagos humanos.

[0471] En la **Tabla 36** a continuación se presentan los valores numéricos de los niveles de ATP determinados en esos estudios (asociados con la **Figura 17**), que se normalizaron con los observados en los macrófagos no tratados. Estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación fueron eficaces para aumentar los niveles de ATP en los macrófagos humanos de manera dependiente de la dosis. Los niveles de ATP aumentaron alrededor de 1,2 veces (con 0,016µg/ml anti-MS4A4A anticuerpo) hasta alrededor de 1,4 veces (con 1,0µg/ml anti-MS4A4A anticuerpo) por encima de lo observado en las células no tratadas

que utilizan anti-MS4A4A anticuerpo 4A-450. Los niveles de ATP aumentaron alrededor de 1,3 veces (con 0,008µg/ml de anticuerpo anti-MS4A4A) hasta alrededor de 1,7 veces (con 1,0µg/ml de anticuerpo anti-MS4A4A) por encima de los observados en las células no tratadas utilizando el anticuerpo 4A-313.

5 **TABLA 36**

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

EJEMPLO 26: Efecto de anticuerpos anti-MS4A4A en marcadores de superficies de células macrófagos

10 **[0472]** Las células mieloides tanto en el SNC como en los órganos periféricos son inherentemente plásticas en su fenotipo y función. En los órganos periféricos, los macrófagos con un fenotipo similar a M1 son más pro-inflamatorios y anti-microbianos, mientras que los macrófagos que tienen un fenotipo similar a M2 son más homeostáticos y anti-inflamatorios. Dentro del SNC, las microglías en condiciones homeostáticas también expresan marcadores similares a M2, como por ejemplo, CD200R y CD163. La expresión de MS4A4A se eleva en macrófagos similares a M2 *in vitro*, y se

15 ha sugerido que MS4A4A es un novedoso marcador de superficie celular para macrófagos similares a M2 (Immunology y Cell Biology 2017, 95: 611-619).

[0473] Se examinó el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en varios marcadores de superficie de células macrófagos de la siguiente manera. Los macrófagos primarios humanos fueron tratados con varias concentraciones (10µg/ml, 1,0µg/ml, 0,1µg/ml) de anticuerpos

20 anti-MS4A4A 4A-313 NSLF hulgG1 o 4A-419 de tipo silvestre (WT) hulgG1 en RPMI1640 completo durante 48 horas. A continuación, las células fueron cosechadas y sometidas a citometría de flujo, utilizando anticuerpos específicos para marcadores similares a M1 (por ejemplo, CD16, MHC Clase II, CD86), marcadores similares a M2 (por ejemplo, CD200R, Dectin-1, CD163), y un marcador pan-macrófago CD14.

[0474] Como se muestra en las **Figuras 18A, 18B, y 18C**, la adición de anticuerpos anti-MS4A4A a macrófagos humanos primarios dio lugar a una disminución de los marcadores de superficie de las células CD14 y CD163 de manera dependiente de la dosis en comparación con la observada en las células sin tratamiento (anti-MS4A4A anticuerpo 4A-313 NSLF hulgG1 Fc (barras a la derecha en cada par), anti-MS4A4A anticuerpo 4A-419 tipo salvaje hulgG1 Fc (WT) (barras a la izquierda en cada par). La adición del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 NSLF a los macrófagos humanos primarios dio como resultado niveles de marcador de superficie celular CD200R inferiores a los observados en las células no tratadas. En cambio, la adición del anticuerpo 4A-419 anti-MS4A4A a macrófagos humanos primarios dio lugar a un aumento del marcador de la superficie de las células CD200R en comparación con el observado en las células no tratadas. Este resultado se considera una anomalía de este experimento específico en vista de los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 NSLF, anteriormente, y en vista de los resultados obtenidos con otros anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, que redujeron los marcadores de superficie celular similares a M2 como el CD200R (véase el **Ejemplo 9** y la **Tabla 26**). En la **Tabla 37** se presentan los valores numéricos del cambio en la cantidad de veces (por encima de las células no tratadas) en los formadores de superficie celular obtenidos de los gráficos de las **Figuras 18A, 18B y 18C**. Los datos se promediaron con respecto a pocillos triplicados de dos donantes.

TABLA 37

Anticuerpo (µg/ml)	4A-419.WT	4A-313.NSLF
	CD14	
10	0,40	0,41
1	0,54	0,34
0,1	0,86	0,36
Sin tratamiento	1,00	1,08
	CD163	
10	0,25	0,28
1	0,32	0,30

Anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$)	4A-419.WT	4A-313.NSLF
0,1	0,70	0,36
Sin tratamiento	0,63	0,75
	CD200R	
10	1,17	0,75
1	1,20	0,56
0,1	1,24	0,41
Sin tratamiento	0,80	0,96

[0475] Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación resultan efectivos en disminuir los marcadores de superficies de células macrófagas tipo M2.

EJEMPLO 27: Variantes de IgG1 Humano Fc en el Ensayo sobre Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC)

[0476] . El dominio Fc de un anticuerpo humano IgG1 afecta las funciones efectoras por su interacción con múltiples moléculas efectoras descendentes, como por ejemplo, C1q, receptores gamma Fc, y receptores Fc neonatales. Se midió la capacidad de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación con regiones variantes de hulgG1 Fc para afectar a la deposición del complemento utilizando un ensayo de deposición/eliminación de células C3b como se indica a continuación.

[0477] Las células U937 que sobreexpresan el MS4A4A humano recombinante, generadas como se describió anteriormente, se utilizaron como células objetivo en estos estudios. Las células fueron cosechadas, lavadas 1x en PBS, y diluidas a 2×10^6 células/mL en medios RPMI 1640. Se distribuyeron en alícuotas de 50 μL de células objetivo por pocillo (1×10^5 células por pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Falcon #351177). A estas células se les añadieron 25 μL de anticuerpos anti-MS4A4A preparados en el mismo medio a cuatro veces las concentraciones predeterminadas. La mezcla de células y anticuerpo se incubó a 37°C durante 15 minutos, luego se añadieron 25 μL de suero humano con complemento (Innovative Research, IPLA-CSER) por pocillo como fuente de complemento y las placas se incubaron durante otras 2h a 37°C. Después, las células se lavaron 2 veces con búfer FACS (PBS + 2% FBS + 1mM EDTA) y se añadieron 100 μL de anticuerpo anti-C3b-APC diluido 1:50 (Biolegend 846106) por pocillo y se incubó en hielo

durante 30 minutos. Las células se lavaron 2 veces con búfer FACS y se resuspendieron en 80µL de búfer FACS + 0,25µL/pocillo de yoduro de propidio (Fischer Scientific, BD 556463) antes del análisis en un citómetro de flujo iQue (IntelliCyt). La actividad del complemento se midió de dos maneras, ya sea por el porcentaje de células con un alto nivel de PI para identificar el alcance de la matanza celular mediada por CDC, o por el MFI de las células en el canal APC para medir la deposición C3b.

[0478] La **Figura 19** muestra el porcentaje de captación de PI (yoduro de propidio) en células U937 que expresan MS4A4A humanas recombinantes tratadas con anti-MS4A4A anticuerpo 4A-313 con varias variantes de hulG1 Fc. Como se muestra en la **Figura 19**, el anticuerpo 4A-313 anti-MS4A4A con hulG1 tipo silvestre es altamente capaz de conducir la deposición del complemento y la muerte de las células que expresan el objetivo, lo que se observa como un aumento de la captación de PI por parte de las células. Este efecto fue dependiente de la dosis. El anticuerpo 4A-313 anti-MS4A4A con sustituciones de aminoácidos hulG1 N325S/L328F en la región Fc (que reduce significativamente la unión C1q), la CDC fue casi completamente eliminada en este ensayo. Por otra parte, el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 con sustitución de aminoácidos hulG1 K322A en la región Fc tuvo un efecto similar de falta de actividad CDC en el presente ensayo.

[0479] La **Tabla 38** a continuación muestra los valores numéricos asociados con los gráficos correspondientes a la **Figura 19**.

TABLA 38

Anticuerpo (ng/mL)	4A- 313.NSLF	4A- 313.K322A	4A- 313.IgG1	Isotipo Ctrl IgG1
20.000,0	6,35	4,42	90,93	8,51
6.666,7	9,27	5,96	90,53	8,08
2.222,2	13,48	9,82	92,19	4,38
740,7	24,70	18,79	88,78	5,36
246,9	13,64	16,27	46,49	6,15
82,3	7,39	5,43	11,95	5,08
27,4	7,15	4,72	4,72	7,14
9,1	9,04	3,89	4,38	9,01
3,0	8,96	4,95	3,63	9,13
0,0	7,58	5,49	7,09	9,29

[0480] Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-MS4A4A con región IgG1 Fc tipo silvestre humana resultan efectivos con la citotoxicidad dependiente del complemento mientras que los anticuerpos anti-MS4A4A con variante IgG1 Fc humana de sustituciones de aminoácidos N325S/L328F o bien de sustituciones de aminoácidos K322A no son efectivas con respecto a la citotoxicidad dependiente de complemento.

EJEMPLO 28: Variantes de IgG1 Humana Fc en Fagocitosis Celular Anticuerpo - Dependiente (ADCP)

[0481] La capacidad de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación para mediar la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) fue evaluada usando el sistema ADCH Reporter Bioassay (Promega #G9901). Este sistema utiliza una línea celular Jurkat T que expresa de forma estable el receptor FcγRIIIa (variante H131) y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de la luciferasa de las luciérnagas. La actividad en este ensayo se correlaciona con la actividad ADCP de las células efectoras (en este caso, células mieloides). Las células objetivo utilizadas aquí fueron o bien células U937 sobreexpresando MS4A4A humana recombinante o macrófagos humanos primarios derivados de monocitos y polarizados con hIL-4 (20ng/ml) y dexametasona (20nM).

[0482] Se diluyeron las células en un búfer de ensayo (RPMI + 4% Suero de baja IgG) a una concentración de $1,2 \times 10^6$ por mL, y 25μL de células (30.000 por pocillo) se distribuyeron por alícuotas en pocillos internos de una placa de ensayo blanca de 96 pocillos (Costar 3922). Los pocillos exteriores de la placa se llenaron con 75 μl de búfer de ensayo sin células o anticuerpo. A los pocillos que contenían células se les añadieron 25 μl de anticuerpo anti-MS4A4A a una concentración 3 veces mayor que la deseada, también diluido en la solución reguladora del ensayo. Tras la adición del anticuerpo a las células objetivo, las células efectoras proporcionadas en el sistema de ensayo (congeladas a 2×10^7 por mL) se descongelaron a 37°C, y se añadieron 630μL a 3,6mL de búfer de ensayo precalentado (37°C) y se mezclaron suavemente. Veinticinco μL de células efectoras (75.000 por pocillo, para una relación E:T de 2,5) se añadieron inmediatamente a los pocillos que contenían las células objetivo y anticuerpo. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante seis horas para permitir la activación de las células receptoras y la expresión de la luciferasa. Después de esta incubación, la placa se equilibró a temperatura ambiente (15min), tras lo cual se añadieron 75μL del reactivo del ensayo de luciferasa a cada pocillo. La placa se incubó durante 20 minutos en un agitador de placas y se midió la luminiscencia en un lector de placas BioTek.

[0483] Como se muestra en la **Figura 20**, hulgG1 de tipo silvestre (Iso Ctrl IgG1) fue sólida para impulsar la actividad de la luciferasa en este ensayo, lo que es una indicación de la activación de

Fc γ RIIa-H131. El anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 con hulgG1 Fc y sustituciones de aminoácidos N325S/L328F mostró una pérdida sustancial de activación Fc γ RIIa-H131 en comparación con la observada con Iso Ctrl IgG1; el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 con hulgG1 Fc y sustitución de aminoácidos K322A tuvo un efecto similar en este ensayo.

- 5 **[0484]** La **Tabla 39** a continuación brinda los valores numéricos asociados con los gráficos correspondientes a la **Figura 20**.

TABLA 39

Anticuerpo (ng/mL)	4A- 313.NSLF	4A- 313.K322A	4A- 313.IgG1	Isotipo Ctrl 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

- 10 **[0485]** Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A que tienen una región Fc IgG1 humana de tipo Silvestre resultan efectivos en la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo. Además, estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A que tienen una variante humana IgG1 Fc de sustituciones de aminoácidos N325S/L328F o sustituciones de aminoácidos K322A también son efectivos en la fagocitosis celular anticuerpo dependiente, aunque en menor grado.

15 **EJEMPLO 29: Variantes de IgG1 Humana Fc en Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC)**

- 20 **[0486]** Los anticuerpos unidos a sus células objetivo pueden mediar la ADCC, una actividad que se cree que es impulsada principalmente por la activación de Fc γ RIIIa en las células asesinas o destructoras naturales (NK, en inglés). La capacidad de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación para causar citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente (ADCC) fue evaluada usando un sistema de ensayo Reporter Bioassay ADCC (Promega #G7010). Este sistema de

ensayo utiliza una línea celular Jurkat T que expresa de forma estable el receptor FcγRIIIa (variante V158) y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de la luciferasa de las luciérnagas. Las células objetivo aquí utilizadas fueron o bien células U937 que sobreexpresan el MS4A4A humano recombinante o macrófagos humanos primarios derivados de monocitos y polarizados con hIL-4 (20ng/ml) y dexametasona (20nM). Las células objetivo se diluyeron en búfer de ensayo (RPMI + 4% Suero de baja IgG) a una concentración de $1,2 \times 10^6$ por mL y 25μL de células (30.000 por pocillo) se distribuyeron por alícuotas en pocillos internos de una placa de ensayo blanca de 96 pocillos (Costar 3922). Los pocillos exteriores de la placa se llenaron con 75μL de búfer de ensayo sin células o anticuerpo. A los pocillos que contenían las células se les añadieron 25 μl de anticuerpo a una concentración tres veces superior a la deseada, también diluido en la solución reguladora del ensayo. Tras la adición del anticuerpo a las células objetivo, las células efectoras suministradas (congeladas a 2×10^7 por mL) fueron descongeladas a 37°C, y se les añadió 630μL a 3,6mL de solución reguladora del ensayo tibia (37°C), suavemente mezclada, y 25μL de células efectoras (75.000 por pocillo, para una relación de E:T de 2,5) se añadieron inmediatamente a los pocillos que contenían las células objetivo y el anticuerpo. La placa fue entonces incubada a 37°C y 5% de CO₂ durante seis horas para permitir la activación de las células receptoras y la expresión de la luciferasa. Después de esta incubación, la placa se equilibró a temperatura ambiente (15 minutos), tras lo cual se añadieron 75μL del reactivo del ensayo de luciferasa a cada pocillo. La placa se incubó durante 20 minutos en un agitador de placas y se midió la luminiscencia en un lector de placas BioTek.

[0487] Como se muestra en la **Figura 21**, hu IgG1 de tipo Silvestre (Iso Ctrl IgG1) fue sólida para impulsar la actividad de la luciferasa en este ensayo, una indicación de la activación de FcγRIIIa - V158. El anticuerpo 4A-313 anti-MS4A4A con huIgG1 Fc con sustituciones de aminoácidos N325S/L328F mostró una pérdida sustancial de activación FcγRIIIa -H131 en comparación con la observada con Iso Ctrl IgG1; el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 con huIgG1 Fc y sustitución de aminoácidos K322A tuvo un efecto similar en este ensayo.

[0488] La **Tabla 40** a continuación brinda los valores numéricos asociados con los gráficos correspondientes a la **Figura 21**.

TABLA 40

Anticuerpo (ng/mL)	4A-313.NSLF	4A-313.K322A	4A-313.IgG1	Isotipo Ctrl IgG1
20.000	442	1222	4397	399
6.666,667	415	1182	4891	431

Anticuerpo (ng/mL)	4A-313.NSLF	4A- 313.K322A	4A-313.IgG1	Isotipo Ctrl IgG1
2.222,222	431	1017	5133	373
740,7407	363	623	4346	379
246,9136	332	508	2063	381
82,30453	360	426	839	377
27,43484	347	341	473	340
9,144947	356	338	367	329
3,048316	324	338	346	314
0	328	343	348	368

[0489] Estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A que tienen una región hu IgG1 Fc de tipo silvestre son efectivos con respecto a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, mientras que los anticuerpos anti-MS4A4A que tienen una variante humana IgG1 Fc de sustituciones de aminoácidos N325S/L328F o sustituciones de aminoácidos K322A no son efectivos en dicha citotoxicidad celular anticuerpo dependiente.

EJEMPLO 30: Efecto knockout de MS4A4A en los niveles de TREM2 membrana y soluble en macrófagos humanos primarios

[0490] El efecto knockout de MS4A4A sobre los niveles de TREM2 membrana y soluble en macrófagos fue examinado de la siguiente manera. Se usó la tecnología CRISPR para la disrupción (knockout) de la expresión de MS4A4A en macrófagos humanos primarios. En breve, se generaron macrófagos knockout mediante electroporación con la proteína Cas9 (IDT), en complejo con gARN no objetivos (NT, en inglés) o específicos de MS4A4A que consisten en crARN (ARN crujiente) específicos del lugar (IDT; NT1, IDT control negativo crARN #1 y #2; NT2, GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC (SEQ ID NO:345) y AACCCCTGATTGTATCCGCA (SEQ ID NO:346); MS4A4A #1, AATTGTGTACCCGATATACA (SEQ ID NO:347); MS4A4A #2, AACCATGCAAGGAATGGAAC (SEQ ID NO:348); MS4A4A #3, TATTCATTCTAGACTACCT (SEQ ID NO:349); MS4A4A #4, GCTCTGTACTGGCTGCATCA (SEQ ID NO:350)) recombinado a un tracrARN (ARN transactivador crujiente) (IDT). La eficiencia de knockout de MS4A4A fue evaluada por análisis citométrico de flujo y fue mayor al 90% (datos no mostrados).

[0491] Las **Figuras 22A y 22B** muestran el efecto de knockout de MS4A4A sobre los niveles de TREM2 membrana (mTREM2) y TREM2 soluble (sTREM2). En las Figuras 22A y 22B, NT1 y NT2 son controles no objetivos CRISPR; gARN 2+3 y gARN 1+4 hacen referencia a diferentes guías para disrumpir MS4A4A.

[0492] Como se muestra en las **Figuras 22A y 22B**, el knockout de MS4A4A en macrófagos primarios humanos derivaron en un aumento en los niveles de mTREM2 y sTREM2. Los niveles aumentados de mTREM2 y sTREM2 observados en el knockout de MS4A4A fueron comparables al aumento de los niveles de mTREM2 y sTREM2 con el agregado del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313 a las células de control NT1 y NT2. Una vez realizado el tratamiento con anticuerpo anti-MS4A4A para el knockout de MS4A4A en macrófagos primarios humanos, no se volvió a observar otros aumentos de los niveles en mTREM2 o sTREM2, lo que sugiere que el aumento de los niveles en mTREM2 y sTREM2 observados con el agregado del anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación a macrófagos humanos es el resultado de la unión del anticuerpo anti-MS4A4A a MS4A4A en las células.

EJEMPLO 31: Cinética de la modulación de TREM2 membrana y soluble por parte de anticuerpos anti-MS4A4A

[0493] La expresión de la superficie celular de la proteína del TREM2 está regulada por la endocitosis/exocitosis de TREM2 hacia y desde la membrana plasmática y por la división regulada de TREM2 por las proteasas ligadas a la membrana (Thornton et al., 2017, EMBO Mol. Med. 9: 1366-1378; doi: 10.15252/emmm.201707673). Como se describe en los Ejemplos anteriores, el tratamiento de macrófagos humanos con anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentó los niveles de TREM2 tanto membrana como soluble. Los siguientes estudios se realizaron para comprender mejor la cinética de los cambios en los niveles de TREM2 membrana y soluble.

[0494] Para evaluar los cambios en los niveles de TREM2 soluble (sTREM2), los macrófagos humanos primarios fueron colocados en placas de 24 o 96 pocillos seguido de la adición de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-450.NSLF, o anticuerpo de control de isotipo (todos a 1 µg/ml). Después de 0,5, 1, 4, 24, y 48 horas de cultivo celular en presencia de los anticuerpos, se recolectaron sobrenadantes y se determinaron los niveles de sTREM2 empleando para ello el método Meso Scale Discovery.

[0495] La cinética del aumento de los niveles de TREM2 membrana (mTREM2) en macrófagos humanos primarios tras el agregado de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación se evaluó de la siguiente manera. Los macrófagos humanos primarios fueron colocados en placas de fondo en U de 96 pocillos a 100.000 células/pocillo 3 días antes del análisis (T menos 72hrs). En varios puntos de tiempo (T menos 48 horas, T menos 24 horas, T menos 4 horas, T menos 1 hora), se agregaron anticuerpos a las células en las placas que incluían un anticuerpo de control de isotipo (IsoControl.NSLF) y un anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF. Setenta y dos horas después de haberlas puesto en las placas, se midieron los niveles de expresión de TREM2 en la

superficie celular (unida por membrana) mediante citometría de flujo después de teñir las células con un anticuerpo conjugado con fluoróforo anti-TREM2.

[0496] Como se muestra en la **FIG. 23A**, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron rápidamente los niveles de sTREM2 en los sobrenadantes de los macrófagos humanos primarios cultivados obtenidos de varios donantes. El anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF aumentó los niveles de sTREM2 aproximadamente 0,5 veces por encima de los observados en las células tratadas con el anticuerpo de control del isotipo (aproximadamente un 50% de aumento). El anticuerpo 4A-450.NSLF aumentó los niveles de sTREM2 aproximadamente 2,5 veces por encima de los observados en las células tratadas con el anticuerpo de control del isotipo (aproximadamente 250% de aumento).

[0497] Como se muestra en la **FIG. 23B**, a 1 hora y 4 horas después de la adición del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF a macrófagos humanos primarios, los niveles de TREM2 de la membrana disminuyeron en comparación con los observados después de la adición de un anticuerpo de control de isotipo. En la **FIG. 23B**, la línea de puntos representa el nivel de mTREM2 en las células tratadas con anticuerpo de control del isotipo. En los puntos temporales de 24 y 48 horas después de la adición del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF, los niveles de mTREM2 aumentaron por encima de los observados en las células tratadas con anticuerpo de control del isotipo. La disminución temprana de la membrana TREM2 es consistente con el aumento de la descamación de TREM2 en todos los puntos de tiempo examinados, como se muestra en la **FIG. 23A**.

[0498] Como los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles proteicos TREM2 en macrófagos humanos primarios, se realizaron los siguientes experimentos a fin de examinar los efectos en los niveles de ARNm en TREM2 después de la adición del anticuerpo anti-MS4A4A. Los macrófagos humanos primarios fueron colocados en placas de 24 o 96 pocillos y tratados con anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF e isotipo (1 µg/ml) en RPMI completo. Después de 0,5, 1, 4, 24, y 48 horas de incubación, se recogieron los pellets de células, y se determinaron los niveles de ARNm en TREM2 mediante el análisis cuantitativo de PCR (qPCR). Brevemente, el ARN se extrajo usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen), el cADN se preparó a partir de ARN total usando el Kit QuantiNova Reverse Transcription (Qiagen). Los niveles de expresión génica se analizaron mediante PCR en tiempo real utilizando los ensayos TaqMan para TREM2 (Hs00219132_m1) y GAPDH (Hs027886624_g1). Los valores ciclo umbral (CT, en inglés) para cada muestra se normalizaron a los valores de CT para el gen constitutivo y de mantenimiento GAPDH.

[0499] Como se muestra en la **FIG. 23C**, el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF no afectó los niveles de ARNm en TREM2 en macrófagos primarios humanos cultivados obtenidos de diversos donantes; se observaron algunas fluctuaciones menores en los niveles de ARNm (menos de 0,5 veces superiores a las observadas en el control del isotipo). Estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles proteicos en TREM2 sin afectar a los niveles de ARNm de TREM2 en macrófagos primarios humanos cultivados.

EJEMPLO 32: Anticuerpos Anti-MS4A4A aumentan la secreción de SPP1 y IL1RN en macrófagos primarios humanos

[0500] Se examinó el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación con respecto a los niveles secretados de osteopontina (SPP1) y antagonista del receptor de interleucina-1 (IL1RN) en macrófagos primarios humanos y se lo comparó con el observado en macrófagos primarios humanos genéticamente modificados para bloquear o inactivar (knockout) la expresión de MS4A4A, de la siguiente manera.

[0501] El knockout de MS4A4A en macrófagos primarios humanos se generó mediante electroporación con proteína Cas9, complejada con ARN guía (gARN) en la forma de moléculas simples de gARN o bien de duplex gARN consistentes en crARN templadas hasta tracrARN: sin objetivo NT1 (IDT control negativo ARN #1 y #2); NT2 (GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC [SEQ ID NO:345] y AACCCCTGATTGTATCCGCA [SEQ ID NO:346]); MS4A4A #1 (AATTGTGTACCCGATATACA [SEQ ID NO:347]); MS4A4A #2 (AACCATGCAAGGAATGGAAC [SEQ ID NO:348]); MS4A4A #3 (TATTCATTCTAGACTACCT [SEQ ID NO:349]); MS4A4A #4, GCTCTGTACTGGCTGCATCA [SEQ ID NO:350]) (todos de IDT, Coralville, Iowa, EE.UU.) con empleo de procedimientos estándar. Luego las células se colocaron en placas a razón de 50.000 células/pocillo en RPMI-1640 completo y se cultivaron durante 48 horas en presencia de anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF (0,1µg/ml), anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF (0,1µg/ml), o anticuerpo control de isotipo. Se recogieron los sobrenadantes de las células y se analizaron los niveles de IL1RN y SPP1 usando kits R&D DuoSet ELISA (IL1RN Cat# DY280, SPP1 Cat# DY1433).

[0502] El tratamiento de las células de control NT con el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF o bien 4A-450.NSLF resultó en un aumento del nivel de SPP1 secretado. El bloqueo o knockout genético de MS4A4A en estas células también resultó en un aumento en los niveles de SPP1 secretado comparable al observado con el tratamiento de anticuerpo MS4A4A. Los niveles de SPP1 en estos estudios fueron: aproximadamente 100 ng/ml tras la adición del anticuerpo de control de isotipo en las células de control NT; aproximadamente 200 ng/ml tras la adición del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF en las células de control NT; aproximadamente 275 ng/ml

tras la adición del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF en las células de control NT; y aproximadamente 225 ng/ml en las células MS4A4A bloqueadas. El aumento de los niveles de SPP1 secretado tras la adición de cualquiera de los dos anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación fue comparable al observado en las células en las que la expresión de MS4A4A fue genéticamente bloqueada o inactivada.

[0503] El tratamiento de las células de control NT con el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF o 4A-450.NSLF resultó en un aumento del nivel de IL1RN secretado. El bloqueo genético (knockout) de MS4A4A en estas células también resultó en un aumento en los niveles de IL1RN secretado comparable al observado con el tratamiento anticuerpo MS4A4A. Los niveles de IL1RN en estos estudios fueron: aproximadamente 8 ng/ml tras la adición del anticuerpo de control de isotipo en las células de control NT; aproximadamente 12 ng/ml tras la adición del anticuerpo 4A-313.NSLF anti-MS4A4A en las células de control NT; aproximadamente 16 ng/ml tras la adición del anticuerpo 4A-450.NSLF anti-MS4A4A en las células de control NT; y aproximadamente 14 ng/ml en las células MS4A4A bloqueadas. El aumento de los niveles de IL1RN secretados tras la adición de cualquiera de los dos anticuerpo anti-MS4A4A de la presente revelación fue comparable al observado en las células en las que la expresión de MS4A4A fue genéticamente bloqueada o inactivada.

[0504] Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son efectivos para aumentar los niveles de secreción de SPP1 y IL1RN en macrófagos humanos primarios. Además, estos resultados mostraron que el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación sobre el aumento del nivel de SPP1 y de IL1RN secretados fue similar al observado cuando la expresión de MS4A4A fue genéticamente bloqueada, sugiriendo que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación bloquearon la actividad de MS4A4A en estas células, dando como resultado los aumentos observados en los niveles de SPP1 y de IL1RN.

EJEMPLO 33: La viabilidad inducida por el anticuerpo anti-MS4A4A en macrófagos humanos es independiente de TREM2

[0505] Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación resultaron eficaces para aumentar la viabilidad de los macrófagos humanos primarios (medida por el aumento del ATP celular total) tras la adición del anticuerpo anti-MS4A4A. Además, como se viera anteriormente, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de TREM2 membrana, en células. A medida que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaban los niveles de TREM2 membrana, y a medida que los anticuerpos anti-MS4A4A aumentaban la viabilidad celular, se realizaron una serie de experimentos para

examinar si el aumento de la viabilidad celular observado en respuesta a la adición de anticuerpo anti-MS4A4A era, al menos en parte, dependiente de TREM2. Para explorar esto, TREM2 fue genéticamente bloqueado en los macrófagos primarios humanos utilizando la tecnología CRISPR para examinar los efectos de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en la viabilidad celular en macrófagos primarios humanos que carecen genéticamente de la expresión de TREM2.

[0506] Los macrófagos knockout de TREM2 fueron generados mediante electroporación con proteína Cas9, que fue complejada con ARN guía (gARN) en la forma de moléculas gARN simples o gARN dúplex que consisten en crARN templadas hasta tracrARN: sin objetivo 1 (NT1) (IDT control negativo crARN #1 y #2); NT2 (GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC [SEQ ID NO:345] y AACCCCTGATTGTATCCGCA [SEQ ID NO:346]); TREM2 #1 (GCCATCACAGACGATACCCT [SEQ ID NO:351]); TREM2 #2 (ATAGGGGCAAGACACCTGCA [SEQ ID NO:352]); TREM2 #3 (CAGCATCCCGGTGATCCAGG [SEQ ID NO:353]); TREM2 #4, TGGAGATCTCTGGTTCCCCG [SEQ ID NO:354]) (todos de IDT, Coralville, Iowa, EE.UU.).

[0507] Luego las células se colocaron en placas a razón de 50.000 células/pocillo en RPMI-1640 completo y se cultivaron durante 48 horas en presencia de anticuerpos anti-MS4A4A (4A-313 NSLF, 4A-450 NSLF), o anticuerpo control de isotipo (todos a 0,1 µg/ml) en solución por 48 horas. El contenido de ATP dentro de las células fue luego cuantificado usando el kit de viabilidad celular CellTiter-Glo Luminescent (Promega, Cat#G7571) siguiendo el protocolo del fabricante.

[0508] El agregado de anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF o de anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF aumentaron los niveles de ATP en las células de control NT en aproximadamente 20% comparados con los observados con el anticuerpo control de isotipo. Por otra parte, el agregado del anticuerpo anti-MS4A4A a las células knockout de TREM2 resultaron en niveles aumentados de ATP por aproximadamente 15% - 20% por sobre los observados con el anticuerpo control de isotipo. Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentan los niveles celulares de ATP (y por ende la viabilidad celular), al menos en parte, de manera independiente de TREM2.

EJEMPLO 34: La modificación genética (knockdown) del siARN de MS4A4A aumenta los niveles TREM2 membrana y soluble en macrófagos primarios humanos

[0509] Como se indicara anteriormente, la ablación genética de la expresión de MS4A4A usando la tecnología CRISPR dio como resultado un aumento de los niveles de TREM2 membrana y TREM2 soluble en macrófagos humanos. Para respaldar más aún estos hallazgos, se evaluó el efecto de la pérdida de expresión de MS4A4A en los niveles de TREM2 utilizando un enfoque

experimental independiente. En estos estudios, se realizó un knockdown (modificación genética para tener una expresión reducida) del siARN (ARN de interferencia pequeña o de silenciamiento) de MS4A4A en macrófagos humanos primarios y se midió su efecto sobre los niveles de TREM2 membrana y TREM2 soluble.

5 **[0510]** Los macrófagos knock-down de MS4A4A fueron generados transfiriendo control (Millipore Sigma, SIC001) y dirigiéndose a los siARN de MS4A4A (Millipore Sigma, SASI_Hs01_00150955) usando el Sistema de Transfección de siARN de nanopartículas N-TER (Millipore Sigma). La eficiencia de la modificación genética en MS4A4A fue evaluada por análisis citométrico de flujo (no se muestran los datos). La expresión de la superficie celular (unida a la membrana) de TREM2 se
10 midió por citometría de flujo después de teñir las células con un anticuerpo anti-TREM2 conjugado con fluoróforo.

[0511] Como se muestra en las **FIG. 24A y FIG. 24B**, el knockdown de siRNA de la expresión de MS4A4A llevó a un aumento de los niveles de TREM2 membrana y de los niveles de TREM2 soluble, respectivamente. En las **FIG. 24A y FIG. 24B**, cada conjunto de puntos conectados
15 representa el resultado promedio de un donante individual (para un total de 6 donantes) con y sin knockdown de siRNA. Estos datos están alineados con resultados similares que muestran el aumento de los niveles de mTREM2 y sTREM2 en las células bloqueadas (knockout) MS4A4A, genéticamente modificadas, que se han descrito anteriormente. Tomado en conjunto, estos resultados indicaron que la pérdida de expresión o actividad de MS4A4A aumentó tanto los niveles
20 de TREM2 membrana como los niveles de TREM2 soluble en los macrófagos humanos primarios.

EJEMPLO 35: Potencia del anticuerpo anti-MS4A4A para aumentar los niveles de mTREM2, sTREM2, y ATP *in vitro*

[0512] El efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación para aumentar los niveles de mTREM2, sTREM2, y ATP (como ya se describiera anteriormente en los Ejemplos 24 y
25 25) se examinó más a fondo en macrófagos humanos primarios obtenidos de tres donantes distintos. Los macrófagos humanos primarios fueron tratados con varias concentraciones de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF y 4A-450.NSLF durante 48 horas. Luego se midieron los cambios en los niveles de mTREM2, sTREM2, y ATP.

[0513] Como se muestra en las **FIG. 25A, FIG. 25B, y FIG. 25C**, el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF y el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF aumentaron los niveles de mTREM2 de
30 manera dependiente de la dosis en macrófagos humanos primarios obtenidos de tres donantes diferentes, respectivamente. Los datos en las **FIG. 25A, FIG. 25B, y FIG. 25C** se presentan como un incremento multiplicado de los niveles de mTREM2 por sobre los observados utilizando un anticuerpo de control de isotipo (el eje x muestra las concentraciones de anticuerpo (µg/ml) y el eje

y muestra un incremento de los niveles por encima del control, que se fijó en 1,0). Los datos de estos gráficos se analizaron a fin de determinar los valores de EC50 y la respuesta máxima; estos resultados se muestran a continuación en la **Tabla 41** (aparecen indicados como valor medio +/- SEM).

5 **TABLA 41**

Anticuerpo	EC50 (µg/ml)	Respuesta Max mTREM2 (aumento multiplicado por sobre el control isotipo)
4A-313.NSLF	0,028 +/- 0,013	2,45 +/- 0,23
4A-450.NSLF	0,039 +/- 0,014	2,36 +/- 0,27

10 **[0514]** Como se muestra en las **FIG. 26A, FIG. 26B, y FIG. 26C**, el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF y el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF aumentaron los niveles de sTREM2 de manera dependiente de la dosis en macrófagos humanos primarios obtenidos de tres donantes diferentes, respectivamente. Los datos de las **FIG. 26A, 26B y 26C** se presentan como un aumento de los niveles de sTREM2 por encima de los observados en el anticuerpo de control de isotipo (el eje x muestra las concentraciones de anticuerpo (µg/ml) y el eje y muestra un aumento de los niveles por encima del control, que se fijó en 1,0). Los datos de estos gráficos se analizaron a fin de determinar los valores EC50 y la respuesta máxima; estos resultados se muestran a

15 continuación en la **Tabla 42** (aparecen indicados como valor medio +/- SEM).

TABLA 42

Anticuerpo	EC50 (µg/ml)	Respuesta Max sTREM2 (aumento multiplicado por sobre el control isotipo)
4A-313.NSLF	0,025 +/- 0,007	6,17 +/- 1,90
4A-450.NSLF	0,069 +/- 0,006	5,74 +/- 1,65

20 **[0515]** Como se muestra en **FIG. 27A, FIG. 27B, y FIG. 27C**, anti-MS4A4A anticuerpo 4A-313.NSLF y anti-MS4A4A anticuerpo 4A-450.NSLF aumentaron los niveles de ATP celular de manera dependiente de la dosis en macrófagos humanos primarios obtenidos de tres donantes diferentes, respectivamente. Los datos de la **FIG. 27A, FIG. 27B, y FIG. 27C** se presentan como un incremento de los niveles de ATP celular por encima de los observados utilizando un anticuerpo de control de isotipo (el eje x muestra las concentraciones de anticuerpo (µg/ml) y el eje y muestra un incremento de los niveles por encima del control, que se fijó en 1,0). Los datos de estas gráficas se

analizaron para determinar los valores de EC50 y la respuesta máxima; estos resultados se muestran a continuación en la Tabla 43 (mostrados como media +/- SEM).

TABLA 43

Anticuerpo	EC50 (µg/ml)	Respuesta Max ATP Celular (aumento multiplicado por sobre el control isotipo)
4A-313.NSLF	0,010 +/- 0,001	1,76 +/- 0,10
4A-450.NSLF	0,021 +/- 0,006	1,43 +/- 0,10

- 5 **[0516]** Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación indujeron cambios funcionales en macrófagos humanos primarios como se evidenció a través de los niveles incrementados de mTREM2, sTREM2, y ATP celular luego de haberse agregado el anticuerpo.

10 **EJEMPLO 36: Los anticuerpos anti-MS4A4A rescatan muerte celular inducida por inhibición de CSF1R**

- 15 **[0517]** A fin de evaluar la capacidad de MS4A4A de sostener la supervivencia de macrófagos humanos después de la inhibición del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R), se estudiaron los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación a fin de mejorar la supervivencia celular en presencia de un inhibidor CSF1R, PLX3397 (Véase DeNardo et al., Cancer Discov (2011) 1(1):54-67. 22039576); Peng, et al., J. of Exp Canc Res (2019) 38(1):372. PMID: 31438996).

- 20 **[0518]** Los monocitos humanos fueron aislados de la sangre entera usando el Protocolo de Enriquecimiento de Monocitos Humanos RosetteSep (Stem Cell Technologies). Para preparar los macrófagos derivados de monocitos humanos, se contaron los monocitos y se colocaron en medios completos RPMI (RPMI complementado con Glutamax, penicilina/estreptomicina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, y 10% de suero bovino inactivado por calor) y 50 ng/ml MCSF (Peprotech). Después de 6 días, se cosecharon los monocitos diferenciados (macrófagos) y se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de $0,1 \times 10^6$ células/pocillo en un medio completo RPMI con 50 ng/ml M-CSF. Se permitió que los macrófagos se recuperaran durante la noche. El día 7, se añadieron a los macrófagos cultivados los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF y 4A-450.NSLF con y sin PLX3397 (1 µM). Todos los anticuerpos se añadieron a una concentración final de 1g/ml. La viabilidad de las células se determinó utilizando reactivo rojo de citotóxico, un colorante de ADN que marca las células moribundas (Essen Bioscience). El nivel

de reactivo rojo citotóxico se determinó midiendo la señal de fluorescencia durante varios días utilizando el sistema de imágenes de células vivas IncuCyte (Essen Bioscience).

[0519] Como se mostrara en la **FIG. 28A**, los macrófagos humanos tratados con PLX3397 y anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF mostraron una disminución en el recuento rojo citotóxico en comparación con el observado en células tratadas con PLX3397 más anticuerpo de control de isotipo. Los datos de la **FIG. 28A** se grafican como valor medio $\pm$ SEM; N = 3 de tres donantes humanos.

[0520] Como se mostrara en la **FIG. 28B**, los macrófagos humanos tratados con PLX3397 y anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF mostraron una disminución en el recuento rojo citotóxico en comparación con el observado en células tratadas con PLX3397 más anticuerpo de control de isotipo. Los datos de la **FIG. 28B** se grafican como valor medio $\pm$ SEM; N = 3 de tres donantes humanos.

[0521] Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación redujeron la muerte celular y la supervivencia sostenida de macrófagos humanos después de la inhibición del CSF1R. Por consiguiente, los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación se consideran útiles para tratar a un individuo con una enfermedad o trastorno relacionada con deficiencia de CSF1R, tal como leucoencefalopatía de inicio en edad adulta con esferoides axonales y glía pigmentada (ALSP) o la leucoencefalopatía difusa hereditaria (HDLS).

EJEMPLO 37: Farmacocinética de anticuerpos anti-MS4A4A en suero de monos cynomolgus

[0522] A fin de examinar la farmacocinética (PK, en inglés) de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en suero *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0523] Se administró a monos Cynomolgus (cyno) anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT, o control de isotipo (hulgG1) en dosis de 80 mg/kg por inyección de bolo intravenoso. Cada grupo animal fue administrado un total de cinco dosis; las dosis primera y segunda separadas por un intervalo de 28 días y las cuatro dosis restantes separadas por un intervalo de 7 días entre cada dosis.

[0524] Se recogieron muestras de suero de los animals antes de la dosis y 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, y 1224 horas después de la administración del anticuerpo.

[0525] Se midieron los niveles de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT y 4A-18.WT en suero de mono cynomolgus utilizando un ensayo de Gyrolab personalizado basado en un formato

sándwich escalonado con IgG anti-humana de cabra etiquetada con biotina (Cat no. NBP1-74983; Novus Biologicals) como reactivo de captura e IgG antihumana etiquetada Alexa fluor® 647 (Cat no. 2049-31; Southern Biotech) como reactivo de detección. Los estándares, los controles de calidad y las muestras se diluyeron en búfer Rxxip HN (Cat no. P0004996, Gyrolab). Los anticuerpos anti-MS4A4A presentes en las muestras fueron capturados por la IgG antihumana biotinilada unida a la columna de afinidad recubierta de estreptavidina de Gyrolab Bioaffy 200 CD. Los anticuerpos anti-MS4A4A capturados fueron detectados por el anticuerpo IgG anti-humano etiquetado con fluorescencia. La intensidad de las señales fluorescentes producidas fue proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-MS4A4A presentes en la muestra. Los datos fueron analizados usando Gyrolab xP y Excel.

[0526] Luego de administrada una dosis de 80 mg/kg a los animales, las concentraciones del anticuerpo anti-MS4A4A en el suero disminuyeron constantemente después de haber alcanzado una concentración media máxima observada (C_{max}), con un valor promedio de vida útil ($t_{1/2}$) (valor medio $\pm$ SD) de $140 \pm 54,5$ horas para el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT, 269 ± 114 horas para el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-25.WT, y $193 \pm 26,8$ horas para el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-18.WT después del día 1 (día de la primera dosis) de administración. El clearance (CL) fue inversamente proporcional a $t_{1/2}$ con un promedio de CL (valor medio $\pm$ DS) de $0,625 \pm 0,107$ mL/hr/kg para el anticuerpo 4A-21.WT, $0,124 \pm 0,025$ mL/hr/kg para el anticuerpo 4A-25.WT, y $0,402 \pm 0,09$ mL/hr/kg para el anticuerpo 4A-18.WT en el Día 1. Los valores de volumen de distribución constante (V_{ss}) en el día 1 oscilaron de entre 30,8 a 51,4 mL/kg, 22,6 a 41,7 mL/kg, y 24,9 a 41,3 mL/kg para los grupos de anticuerpos 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT, respectivamente.

[0527] La exposición fue evaluada por C_{max} y por área debajo de la curva de tiempo de concentración de 0 a 168 horas posteriores a la dosis (AUC_{0-168}). En el día 1, el anticuerpo 4A-25.WT tuvo la C_{max} media más alta ($6,26 \times 10^6$ ng/mL), seguido por el anticuerpo 4A-18.WT ($4,81 \times 10^6$ ng/mL). El anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT ($3,53 \times 10^6$ ng/mL) tuvo la C_{max} más baja entre los artículos del ensayo.

[0528] Los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-25.WT y 4A-18.WT tuvieron AUC_{0-168} similares ($3,47 \times 10^8$ ng*hr/mL y $3,35 \times 10^8$ ng*hr/mL, respectivamente), que fueron significativamente superiores a los del anticuerpo 4A-21 ($1,15 \times 10^8$ ng*hr/mL).

EJEMPLO 38: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan niveles de suero y LCR en sTREM2 *in vivo*

[0529] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en los niveles de sTREM2 en suero y en líquido céfalo raquídeo (LCR) *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0530] Se administró a monos *Cynomolgus* anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT, o control de isotipo (hulgG1) en dosis de 80 mg/kg mediante inyección de bolo intravenoso. Se administró a cada grupo un total de cinco dosis; las dosis primera y segunda separadas por un intervalo de 28 días y las cuatro dosis restantes separadas por un intervalo de 7 días entre cada dosis.

[0531] Se recogieron muestras de suero de los animales antes de la dosis y en las horas 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, y 1224 después de la administración del anticuerpo. También se recogieron muestras de LCR de los animales antes de la dosis y 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, y 1224 horas después de la administración del anticuerpo.

[0532] En el suero, tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-25.WT, 4A-18.WT, y 4A-21.WT, los niveles de sTREM2 aumentaron más del doble desde la línea de base, con niveles máximos del 232%, 261%, y 287%, respectivamente, de sus niveles de base previos a la dosis, 48 a 96 horas después de la administración de la primera dosis de anticuerpo. Además, los niveles de sTREM2 en suero se mantuvieron elevados con la repetición de la dosis semanal de anticuerpos anti-MS4A4A los días 29, 36, 43 y 50, con unos niveles medios de sTREM2 aproximadamente el doble (214%, 4A-25.WT; 226%, 4A-18.WT; 199%, 4A-21.WT) por encima de los observados en los niveles de referencia previos a la dosis. El control del isotipo se mantuvo cercano a los niveles de predosis (107% de la línea de base) durante todo el período de dosificación.

[0533] En el LCR, los niveles de sTREM2 aumentaron significativamente a las 24 y 96 horas después de la administración de anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21.WT ($p=0,0008$, ANOVA de 2 vías) y 4A-25.WT ($p=0,004$, ANOVA de 2 vías), respectivamente, en comparación con lo observado en los animales tratados con control de isotipo. Los niveles de sTREM2 en el grupo tratado con 4A-18.WT se mantuvieron similares a los observados en el grupo de control de isotipo.

[0534] Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación resultan eficaces para aumentar los niveles de sTREM2 tanto en suero como en el LCR *in vivo*.

EJEMPLO 39: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles de osteopontina en LCR *in vivo*

[0535] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación con respecto a los niveles de osteopontina en LCR, *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

5 [0536] A los monos *Cynomolgus* se les administraron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT, o control de isotipo (hulgG1) en dosis de 80 mg/kg por inyección de bolo intravenoso. A cada grupo se le administró un total de cinco dosis; las primeras y segundas dosis se separaron con un intervalo de 28 días y las cuatro dosis restantes se separaron con un intervalo de 7 días entre cada dosis. Se recogieron muestras de LCR de los animales antes de la dosis y
10 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, y 1224 horas después de la administración del anticuerpo.

[0537] Los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-25.WT, 4A-18.WT, y 4A-21.WT aumentaron significativamente los niveles de osteopontina en el LCR en comparación con los observados con
15 el anticuerpo de control de isotipo. La administración repetida del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT dio lugar a un aumento significativo de los niveles de osteopontina en el LCR, que alcanzaron su punto máximo a las 12 horas después de la primera dosis, hasta aproximadamente 280 ng/ml ($p < 0,0001$, ANOVA bidireccional), en comparación con el control del isotipo y siguieron mostrando niveles máximos a las 12 y hasta las 24 horas después de las dosis subsiguientes. La
20 administración repetida del anticuerpo 4A-25.WT y del anticuerpo 4A-18.WT anti-MS4A4A mostró una tendencia al aumento de los niveles de osteopontina en el LCR entre 12 y 24 horas (a niveles de aproximadamente 50-80 ng/ml) después de cada dosis en comparación con el control del isotipo.

[0538] Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación
25 resultan eficaces para aumentar los niveles de osteopontina en el LCR *in vivo*.

EJEMPLO 40: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles de osteopontina en varias regiones del cerebro *in vivo*

[0539] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación con respecto a los niveles de osteopontina en la corteza frontal e hipocampo de monos *cynomolgus*, *in*
30 *vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0540] Los monos *Cynomolgus* recibieron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-21.WT, 4A-25.WT, 4A-18.WT, o control de isotipo (hulgG1) a dosis de 80 mg/ml por inyección de bolo intravenoso. A cada grupo se le administró un total de cinco dosis; las primeras y segundas dosis se separaron con un intervalo de 28 días entre cada dosis, y las cuatro dosis restantes se separaron con un

intervalo de 7 días entre cada dosis. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la quinta dosis y la corteza frontal y el hipocampo fueron retirados y congelados.

[0541] Los niveles de osteopontina en el tejido cerebral se midieron de la siguiente manera. Muestras congeladas de cerebro fueron lisadas con Reactivo de Extracción de Proteína Neuronal N-Per (cat #87792, Thermo Scientific) y con Inhibidor de Proteasa Halt (cat # 1861278) en hielo durante 20 minutos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se almacenaron a -80° C hasta su posterior análisis. La concentración total de proteína en cada muestra se midió con el kit de análisis de proteína BCA (cat# 23225, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Los valores de concentración de proteínas se utilizaron para normalizar las concentraciones de analito medidas en los tejidos cerebrales.

[0542] Los niveles de osteopontina en el tejido cerebral de los monos cynomolgus aumentaron después del tratamiento con el anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT. La administración repetida del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT a los monos cynomolgus dio como resultado un aumento significativo ($p < 0,035$ y $p = 0,0003$, respectivamente; ANOVA unidireccional) de los niveles de osteopontina en la corteza frontal de los monos cynomolgus en comparación con el observado con el anticuerpo de control de isotipo. En particular, los niveles medios de osteopontina medidos en la corteza frontal después de la administración del anticuerpo fueron los siguientes: aproximadamente 0,6 ng/mg (anticuerpo de control de isotipo); aproximadamente 1,2 ng/mg (4A-21.WT); aproximadamente 0,7 ng/mg (4A-25.WT y 4A-18.WT). La administración repetida de anticuerpos anti-MS4A4A dio lugar a una tendencia al aumento de los niveles de osteopontina en el hipocampo de los monos cynomolgus en comparación con la observada con el anticuerpo de control de isotipo. En particular, los niveles medios de osteopontina medidos en el hipocampo tras la administración del anticuerpo fueron los siguientes: aproximadamente 1,3 ng/mg (anticuerpo de control de isotipo); aproximadamente 1,8 ng/mg (4A-21.WT y 4A-18.WT); y aproximadamente 2,4 ng/mg (4A-25.WT). Estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación resultan eficaces para aumentar los niveles de osteopontina en la corteza frontal e hipocampo en primates no humanos.

EJEMPLO 41: Efecto de anticuerpos anti-MS4A4A sobre biomarcadores de proteína en LCR

[0543] El líquido cefalorraquídeo obtenido de monos cynomolgus a los que se les administró una inyección periférica de anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT (80 mg/kg) se analizó en mayor profundidad a fin de determinar los cambios en la expresión de los biomarcadores de proteínas *in vivo*. En estos estudios, los cambios en los niveles de expresión de las proteínas en el LCR se

midieron mediante el ensayo Somalogic Somascan 1,3k realizado en muestras de LCR obtenidas de los animales 24 horas después de la inyección del anticuerpo.

[0544] Se observaron cambios proteínicos en el LCR tras la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT a los monos cynomolgus. La **FIG. 29** es un gráfico de un volcán que presenta los efectos a nivel de la proteoma de tres muestras de LCR tomadas de monos cynomolgus después de la inyección periférica del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-21.WT (80 mg/kg). Cada punto del gráfico del volcán representa una proteína. Para cada proteína medida, los valores en el eje x representan la diferencia de cambio multiplicador en los niveles de una proteína en el LCR entre los animales tratados con anticuerpo y los animales de control; los valores en el eje y representan la importancia de estas diferencias observadas, expresadas como el log10 minus del valor p para la expresión diferencial, evaluado por ANOVA. Los símbolos de las proteínas de la **FIG. 29** se presentan para las proteínas expresadas diferencialmente en los animales tratados con anticuerpo frente a los animales de control con un valor p de $<1E-3$.

[0545] Como se muestra en la **FIG. 29**, se observó un aumento en los niveles de de osteopontina (SSP1) y de IL1RN (2 marcadores microgliales) en el LCR de los animales a los que se les administró el anticuerpo anti-MS4A4A. Tomados en conjunto, estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación aumentaron los niveles de IL1RN y de osteopontina proteicos tanto en el LCR como en el suero de primates no humanos.

EJEMPLO 42: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles de suero de sTREM2 *in vivo*

[0546] El efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación con respecto a los niveles de suero y LCR en sTREM2 *in vivo* fue examinado con mayor profundidad en otra serie de experimentos desarrollados en primates no-humanos.

[0547] A monos Cynomolgus se les administraron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, y 4A-450.NSLF en dosis de 80 mg/ml; anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF en dosis de 250 mg/ml, o control vehicular por inyección de bolo intravenoso. A cada grupo se le administró un total de cuatro dosis; la primera y la segunda dosis separadas con un intervalo de 7 días, la segunda y tercera dosis separadas con un intervalo de 14 días, y la tercera y cuarta dosis separadas con un intervalo de 28 días.

[0548] Las muestras de suero fueron recogidas de los animals antes de la dosis y 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, y 1224 horas después de administrado el anticuerpo; También se recogieron muestras de LCR de los animales antes de la dosis y 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, y 1224 horas después de administrado el anticuerpo.

[0549] Los niveles sTREM en suero se midieron de la siguiente manera. Se recubrieron placas de un solo punto Meso Scale Discovery (MSD) (Rockville, MD) con un anticuerpo de captura en PBS a 4°C durante la noche. Las muestras de suero de mono (así como los estándares TREM2-Fc de mono) se diluyeron en búfer de unión y se añadieron a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo policlonal TREM2 biotinilado de cabra antihumano (R&D Systems) a una dilución de 1:2000 en búfer de unión y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la detección con Streptavidin Sulfo Tag (MSD). Se añadió 150 µl de 1x búfer de lectura a las placas, las que fueron entonces analizadas.

[0550] Los resultados de estos estudios aparecen en la **FIG. 30**. En el suero, los niveles de sTREM2 aumentaron aproximadamente 1,5 veces por encima de los observados en la línea de base (~150% de los niveles de base de la predosis) tras la administración del anticuerpo 4A-313.NSLF anti-MS4A4A a 80 mg/kg, 24 horas posteriores a la dosis. Los niveles de sTREM2 siguieron aumentando con el tiempo, alcanzando niveles máximos tres veces superiores a los observados en la línea de base (~300% de los niveles de base de la predosis) después de la administración de múltiples dosis a 80 mg/kg.

[0551] A dosis de 250 mg/kg de anticuerpo 4A-313.NSLF anti-MS4A4A, los niveles séricos de sTREM2 aumentaron aproximadamente 1,5 veces con respecto a los observados en la línea de base a las 24 horas posteriores a la dosis y siguieron aumentando con el tiempo, alcanzando niveles máximos de 4,8 veces con respecto a los observados en la línea de base después de dosis múltiples de 250mg/kg.

[0552] Tras la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.WT a 80 mg/kg, los niveles séricos de sTREM2 aumentaron aproximadamente 1,5 veces con respecto a los observados en la línea de base a partir de las 24 horas posteriores a la dosis. Con dosis repetidas de 4A-313.WT a 80 mg/kg, los niveles séricos de sTREM2 aumentaron hasta un máximo de 3 veces con respecto a los observados en la línea de base.

[0553] Tras la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF a 80 mg/kg, los niveles de sTREM2 en suero se multiplicaron aproximadamente por dos con respecto a los observados en la línea de base a las 24 horas posteriores a la dosis y siguieron aumentando con el tiempo, alcanzando niveles máximos del triple de los observados en la línea de base tras múltiples dosis de 4A-450.NSLF a 80 mg/kg.

[0554] Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención resultaron eficaces para aumentar los niveles de sTREM2 en suero en primates no humanos.

EJEMPLO 43: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles de osteopontina en LCR

5 *in vivo*

[0555] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención con respecto a los niveles de osteopontina en líquido céfalloarraquideo (LCR) *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0556] Monos *Cynomolgus* recibieron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, 4A-450.NSLF en dosis de 80 mg/ml, 4A-313.NSLF en dosis de 250 mg/ml, o control vehicular por inyección de bolo intravenoso. A cada grupo se le administró un total de cuatro dosis; la primera y la segunda dosis separadas con un intervalo de 7 días, la segunda y tercera dosis separadas con un intervalo de 14 días, y la tercera y cuarta dosis separadas con un intervalo de 28 días.

[0557] Se recogieron las muestras de LCR de los animals con anterioridad a la dosis y 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, y 1224 horas después de la administración del anticuerpo.

[0558] Los niveles de osteopontina en el LCR se midieron de la siguiente manera. Se recubrieron placas de un solo punto Meso Scale Discovery (MSD) (Rockville, MD) con un anticuerpo de captura en PBS a 4°C durante la noche. Las muestras de LCR de los monos se diluyeron en búfer aglutinante y se añadieron a los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió un anticuerpo policlonal biotinilado de Osteopontina de cabra antihumana (R&D Systems) a una dilución de 1:2000 en búfer de unión y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de la detección con Streptavidin Sulfo Tag (MSD). Se añadió 150 µl de 1x búfer de lectura a las placas, y éstas fueron entonces analizadas en un Sector Imager (MSD).

[0559] Los niveles de osteopontina en el LCR de monos *cynomolgus* aumentaron tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación. Tras la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF en dosis de 80 mg/kg y de 250 mg/kg, los niveles de osteopontina en el LCR alcanzaron un máximo en promedio de aproximadamente 13 veces y 6 veces el observado en la línea de base, respectivamente, 24 horas después de la primera dosis, seguido de una disminución a 1,5 veces los niveles de la línea de base (**FIGS. 31A y 31B**). Con una dosis repetida del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF a 80 mg/kg, los niveles de osteopontina en el LCR alcanzaron su punto máximo entre 10 y 24 horas después de cada dosis, llegando a niveles máximos de entre 3 y 5 veces los observados en los niveles de referencia (**FIG.**

31A). Con una dosis repetida de 250 mg/kg de anticuerpo 4A-313.NSLF anti-MS4A4A, los niveles de osteopontina en LCR aumentaron, y alcanzaron niveles máximos de 14 veces los observados en la línea de base 168 horas después de la segunda dosis (**FIG. 31B**) y niveles máximos de 4 a 5 veces los observados en la línea de base 24 a 48 horas después de las dosis subsiguientes (**FIG. 31B**).

[0560] Tras la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF a 80 mg/kg, los niveles de osteopontina en el LCR alcanzaron un máximo de aproximadamente 13 veces el observado en la línea de base, 24 horas después de la primera dosis, seguido de un descenso a los niveles de base (**FIGS. 31C y 31D**). Con una dosis repetida de 4A-450.NSLF a 80mg/kg, los niveles de osteopontina en LCR alcanzaron su punto máximo a las 24 horas después de cada dosis, llegando a niveles máximos de 6 a 9 veces superiores a los observados en los niveles de referencia (**FIGS. 31C**).

[0561] Tras la administración repetida del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.WT a 80 mg/kg, los niveles de osteopontina en el LCR alcanzaron un máximo de aproximadamente 1,5 veces el observado en la línea de base, 24 horas después de cada dosis, seguido de una disminución a los niveles de base (**FIGS. 31D**).

[0562] Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención resultaron eficaces para aumentar los niveles de osteopontina en LCR en primates no humanos.

EJEMPLO 44: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles de osteopontina en varias regiones del cerebro *in vivo*

[0563] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación, con respecto a los niveles de osteopontina en la corteza frontal e hipocampo *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0564] Monos *Cynomolgus* recibieron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, y 4A-450.NSLF en dosis de 80 mg/kg, y anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF en dosis de 250 mg/kg, o control vehicular por inyección en bolo intravenoso. A cada grupo se le administró un total de cuatro dosis; la primera y segunda dosis separadas por un intervalo de 7 días, la segunda y tercera dosis separadas por un intervalo de 14 días, y la tercera y cuarta dosis separadas por un intervalo de 28 días. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la cuarta dosis y la corteza frontal y el hipocampo les fueron retirados y luego congelados.

[0565] Los niveles de osteopontina en el tejido cerebral se midieron de la siguiente manera. Se lisaron muestras congeladas de cerebro con el Reactivo de Extracción de Proteína Neuronal N-Per (cat #87792, Thermo Scientific) y el inhibidor de Proteasa Halt (cat # 1861278) en hielo durante 20

minutos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis. La concentración total de proteína en cada muestra se midió con el kit de análisis de proteína BCA (cat# 23225, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Los valores de concentración de proteínas se utilizaron para normalizar las concentraciones de analito medidas en los tejidos cerebrales.

[0566] Los niveles de osteopontina en el tejido cerebral de monos cynomolgus aumentaron tras la administración del anticuerpo 4A-450.NSLF anti-MS4A4A. La administración repetida del anticuerpo 4A-450.NSLF a 80 mg/kg, dio como resultado un aumento significativo ($p = 0,027$, prueba t) de los niveles de osteopontina en la corteza frontal de los monos cynomolgus en comparación con el observado en los animales de control (**FIG. 32A**). De manera similar, la administración repetida del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF a 80 mg/kg dio como resultado un aumento significativo ($p = 0,027$, prueba t) de los niveles de osteopontina en el hipocampo de monos cynomolgus en comparación con el observado en los animales de control tratados (**FIG. 32B**).

[0567] Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención resultaron eficaces para aumentar los niveles de osteopontina en los tejidos del cerebro (por ejemplo, la corteza frontal y el hipocampo) en primates no humanos.

EJEMPLO 45: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles de CSF1R en varias regiones del cerebro *in vivo*

[0568] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en los niveles de CSF1R (receptor del factor estimulante de colonias 1) en la corteza frontal e hipocampo *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0569] Monos Cynomolgus recibieron anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, y 4A-450.NSLF en dosis de 80 mg/kg, anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF en dosis de 250 mg/kg, o control vehicular mediante infusión intravenosa. A cada grupo se le administró un total de cuatro dosis; la primera y segunda dosis separadas por un intervalo de 7 días, la segunda y tercera dosis separadas por un intervalo de 14 días, y la tercera y cuarta dosis separadas por un intervalo de 28 días. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la cuarta dosis y la corteza frontal y el hipocampo les fueron retirados y luego congelados.

[0570] Los niveles de CSF1R en el tejido cerebral se midieron de la siguiente forma. Se lisaron muestras congeladas de cerebro con el Reactivo de Extracción de Proteína Neuronal N-Per (cat #87792, Thermo Scientific) y el inhibidor de Proteasa Halt (cat# 1861278) sobre hielo durante 20 minutos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se centrifugaron y los

sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis. La concentración total de proteína en cada muestra se midió con el kit de análisis de proteína BCA (cat# 23225, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Los valores de concentración de proteínas se utilizaron para normalizar las concentraciones de analito medidas en los tejidos cerebrales.

[0571] Los niveles de CSF1R en el tejido cerebral de monos cynomolgus aumentaron después de la administración del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF. La administración repetida del anticuerpo 4A-313.NSLF a 250 mg/kg resultó en un aumento significativo ($p = 0,046$, prueba t) de los niveles de CSF1R en la corteza frontal de los monos cynomolgus en comparación con el observado en los animales tratados con el control (**FIG. 33A**). De manera similar, la administración repetida del anticuerpo anti-MS4A4A 4A-450.NSLF a 80 mg/kg dio como resultado un aumento significativo ($p = 0,013$, prueba t) de los niveles de CSF1R en el hipocampo de los monos cynomolgus en comparación con el observado en los animales de control (**FIG. 33B**).

[0572] Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención resultaron eficaces para aumentar los niveles de CSF1R en el tejido cerebral (por ejemplo, la corteza frontal y el hipocampo) en primates no humanos.

EJEMPLO 46: Los anticuerpos anti-MS4A4A aumentan los niveles totales de TREM2 en varias regions del cerebro *in vivo*

[0573] A fin de examinar el efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación con respecto a los niveles en TREM2 en soluble y TREM2 membrana (total TREM2) en la corteza frontal cortex y el hipocampo *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes estudios.

[0574] Monos Cynomolgus recibieron anticuerpos anti-MS4A4A, 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, 4A-450.NSLF en dosis de 80 mg/kg, 4A-313.NSLF en dosis de 250 mg/kg, o control vehicular por inyección de bolo intravenoso. A cada grupo se le administró un total de cuatro dosis; la primera y segunda dosis separadas por un intervalo de 7 días, la segunda y tercera dosis separadas por un intervalo de 14 días, y la tercera y cuarta dosis separadas por un intervalo de 28 días. Los animales fueron sacrificados 48 horas después de la cuarta dosis y la corteza frontal y el hipocampo fueron retirados y congelados. Los niveles totales de TREM2 fueron medidos en estas regiones del cerebro.

[0575] Los niveles totales de TREM2 en el tejido cerebral de los monos cynomolgus aumentaron después del tratamiento con los anticuerpos anti-MS4A4A, 4A-313.NSLF, 4A-313.WT, y 4A-450.NSLF. La administración repetida del anticuerpo 4A-313.NSLF a 250 mg/kg dio como resultado un aumento estadísticamente significativo ($p=0,014$, ANOVA unidireccional) de los niveles totales de TREM2 en el hipocampo de los monos cynomolgus en comparación con el

observado en los animales tratados de control (**FIG. 34A**). La administración repetida del anticuerpo 4A-313.NSLF a 250 mg/kg y del anticuerpo 4A-313.WT a 80 mg/kg dio lugar a una tendencia al aumento de los niveles de TREM2 en la corteza frontal de los monos cynomolgus, en comparación con la observada en los animales tratados de control (**FIG. 34B**).

- 5 **[0576]** Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente invención resultaron eficaces para aumentar los niveles de TREM2 en el tejido cerebral (por ejemplo, la corteza frontal y el hipocampo) en primates no humanos.

EJEMPLO 47: El efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A sobre el perfil de la expresión genética en microglías *in vivo*

- 10 **[0577]** Los cambios en la expresión genética medidos por el análisis del ARNseq de microglías tras la administración de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación a monos cynomolgus como ya se ha descrito anteriormente se realizó de la siguiente manera. Los anticuerpos anti-MS4A4A comprendían al anticuerpo 4A-313.WT (80 mg/kg), al 4A-313.NSLF (80mg/kg y 250 mg/kg), y al 4A-450.NSLF (80mg/kg). Tras la etapa terminal y retiro de los animales, se disociaron
- 15 las muestras de la corteza frontal siguiendo un delicado protocolo de disociación manual seguido de una separación en gradiente de Percoll para eliminar los restos. El sedimento celular se tiñó con anticuerpos Cd11b durante 20 minutos, se lavó, se etiquetó con DAPI y se procesó para el aislamiento FACS de las microglías. Las células DAPI⁺:CD11b⁺ se clasificaron directamente en 350ul o RLT más búfer (Qiagen) y las células se procesaron inmediatamente para el aislamiento
- 20 del ARN. La calidad del ARN se determinó utilizando una estación de cinta y se generaron bibliotecas utilizando el protocolo de baja entrada para Lexogen QuantSeq con ligeras modificaciones. Se cuantificaron las bibliotecas utilizando la estación de cinta y se secuenciaron utilizando Next Seq. Los datos secuenciados se demultiplexaron usando la herramienta de corrección de errores múltiples de Lexogen y se analizaron.
- 25 **[0578]** Como se muestra en las **FIGS. 35A, 35B, y 35C**, la inyección periférica de anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación en monos cynomolgus dio lugar a cambios en la expresión génica de las microglías según se midió mediante análisis RNAseq en microglías clasificadas por FACS y aisladas de la corteza frontal de estos primates no humanos. Entre los genes que muestran una fuerte inducción por el tratamiento con anti-MS4A4A en las microglías están los marcadores de
- 30 activación de las microglías (dominio de lectina de tipo C de la familia 7 miembro A, CLEC7A), la migración de microglías (receptor 2 del inositol 1,4,5–trifosfato, ITPR2), y la proliferación de microglías (antígeno KI-67 (MKI67)) (**FIG. 35A**). También se observaron cambios en los marcadores adicionales de activación de las microglías, y se incluyeron los marcadores de activación de las microglías IL1RN, SPP1, y 1–fosfatidilinositol–4,5–fosfato fosfodiesterasa gamma–

2 (PLCG2) como se muestra en las **FIG. 35B. FIG. 35C**. El efecto de los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación sobre dos marcadores homeostáticos de microglías (receptor purinérgico P2RY12 y receptor 1 de quimiocina CX3C (CX3CR1)) se muestra en la **FIG. 35C**, donde los niveles de expresión de estos dos productores de microglías homeostáticas disminuyeron después del tratamiento con el anticuerpo anti-MS4A4A. Los datos en las **FIGS. 35A, 35B, y 35C** se presentan como valores medios en escala log2, las barras de error son SEM, y N=5 por grupo experimental y por punto de tiempo.

[0579] Tomados en conjunto, estos resultados mostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación resultan eficaces para la activación de microglías *in vivo*, como lo demuestra el aumento de varios niveles de ARNm de proteínas asociadas con la activación, migración y proliferación de microglías; y la disminución de varios niveles de ARNm de proteínas asociadas con la homeostasis de las microglías.

EJEMPLO 48: Los anticuerpos anti-MS4A4A reducen la expresión de superficie de MS4A4A marcada con HA-Snorkel en células U937

[0580] Las células U937 (ATCC CRL-1593.2) fueron transfectadas con un plásmido de expresión codificado para MS4A4A humano marcado con una etiqueta de snorkel (un dominio transmembrana seguido de una etiqueta HA se le adjuntó al citoplasma C-terminal de la MS4A4A humana). De esta manera la etiqueta se muestra extracelularmente, pero estructuralmente separada de la proteína de la membrana. Las células U937 transfectadas resultaron viables después de la transfección de plásmidos y la selección de antibióticos. Las células fueron entonces examinadas para encontrar la expresión de la superficie celular de la proteína MS4A4A humana usando citometría de flujo, y sólo el 5% de las células más positivas fueron recogidas para su empleo en los siguientes estudios.

[0581] En estos estudios se utilizaron como células objetivo a las células U937 que sobreexpresan el snorkel recombinante humano MS4A4A, generadas como se ha descrito anteriormente. Las células fueron pretratadas durante 24 horas con PMA (25 ng/ml), luego cosechadas y sembradas a 100.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo, en medios RPMI 1640 completos, con PMA y anticuerpos anti-MS4A4A y anticuerpo de control de isotipo a las concentraciones finales de 0,01, 0,1, y 1ug/ml. Las células fueron incubadas durante 48 horas. Las células se lavaron con búfer FACS frío (PBS + 2% FBS) y se añadieron 50 µL de anticuerpo monoclonal anti-HA Tag diluido 1:200 (ThermoFisher, A-21287) por pocillo y se incubaron en hielo durante 30 minutos, las células también se etiquetaron con Aqua Live/Dead para la discriminación de la viabilidad. Las células se lavaron 2 veces con búfer FACS frío y se resuspendieron en 200µL

de búfer FACS. El análisis de citometría de flujo se realizó en un sistema FACSCanto (BD Biosciences). Los datos de unión se analizaron usando la Mediana de intensidad fluorescente.

[0582] Como se muestra en la **FIG. 36**, los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF y d4A-450.NSLF disminuyeron el nivel de la membrana plasmática MS4A4A en las células U937 que expresan la proteína humana MS4A4A marcada con snorkel en una dosis relacionada. En la concentración más alta del anticuerpo anti-MS4A4A de 1 µg/ml, los anticuerpos anti-MS4A4A 4A-313.NSLF y 4A-450.NSLF disminuyeron los niveles de MS4A4A en superficie en aproximadamente un 50% en comparación con el observado en las células tratadas con anticuerpo de control de isotipo. Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación disminuyeron o bajaron los niveles de MS4A4A de superficie celular en las células U937 que expresan el snorkel de MS4A4A recombinante humano.

EJEMPLO 49: Los anticuerpos anti-MS4A4A modulan niveles proteicos de glicoproteína de la proteína B del melanoma no metastásico (GPNMB) en células mieloides primarias humanas

[0583] GPNMB es una glicoproteína de superficie expresada en múltiples tipos de células, inclusive macrófagos de tejido y microglías. Varias variantes genéticas han sido asociadas con el riesgo de la enfermedad de Parkinson (PD, en inglés). Los niveles proteicos de GPNMB se elevan en la *substantia nigra* de los pacientes con PD y los niveles de GPNMB aumentan tras el estrés lisosómico (Moloney y otros, 2018, *Neurobio Dis.* 120: 1-11). Además, el aumento de la expresión de GPNMB se relacionó con el SNP rs199347, y este SNP de riesgo se localiza con el gen GPNMB (Murthy et al, 2017, 18:121-133). Para determinar si MS4A4A puede modular los niveles de expresión del GPNMB, se trató a los macrófagos primarios humanos de dos donantes (donantes #1117 y #1118) con varias concentraciones de anticuerpo anti-MS4A4A 4A-313.NSLF durante 48 horas. La superficie celular (unida a la membrana) de GPNMB fue medida por citometría de flujo después de que las células fueran teñidas con un anticuerpo anti-GPNMB conjugado con fluoróforos.

[0584] Como se muestra en la **FIG. 37**, los niveles de la membrana de GPNMB levels se redujeron en macrófagos humanos primarios luego de que se agregaran a las células el anticuerpo anti-MS4A4A 4A.313.NSLF. La disminución en los niveles de GPNMB en respuesta al tratamiento con anticuerpo anti-MS4A4A dependió de la dosis. Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-MS4A4A de la presente revelación son eficaces para reducir los niveles de expresión en superficies celulares de GPNMB en células mieloides, por ejemplo, macrófagos.

[0585] *Secuencias ejemplares de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo anti-MS4A4A con hulgG1 de tipo silvestre o variantes de Fc de hulgG1 tipo silvestre:*

4A-450 (cadena pesada de hulgG1) (SEQ ID NO:320)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
5 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

4A-450 (cadena pesada de hulgG1 sin C-terminal K) (SEQ ID NO:321)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
15 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 (cadena pesada de hlgG1; P331S) (SEQ ID NO:322)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
25 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-450 (cadena pesada de hlgG1 P331S sin C-terminal K) (SEQ ID NO:323)

30 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA

LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 (cadena pesada de hulgG1 N325S/L328F) (SEQ ID NO:324)

5 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKA
10 FPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-450 (cadena pesada de hlgG1 N325S/L328F sin C-terminal K) (SEQ ID NO:325)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
15 FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKA
FPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
20 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-450 (cadena pesada de hulgG1 K322A) (SEQ ID NO:326)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
25 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

4A-450 (cadena pesada de hulgG1 K322A sin C-terminal K) (SEQ ID NO:327)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYAFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT

YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

5

4A-419 (cadena pesada de hulgG1) (SEQ ID NO:328)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
10 FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
15 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (cadena pesada de hulgG1 sin C-terminal K) (SEQ ID NO:329)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
20 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

25

4A-419 (cadena pesada de hlgG1 P331S) (SEQ ID NO:330)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
30 YICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (cadena pesada de hlgG1 P331S sin C-terminal K) (SEQ ID NO:331)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
5 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10 4A-419 (cadena pesada de hulgG1 N325S/L328F) (SEQ ID NO:332)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
15 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKA
FPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (cadena pesada de hlgG1 N325S/L328F sin C-terminal K) (SEQ ID NO:333)

20 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSSKA
25 FPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

4A-419 (cadena pesada de hulgG1 K322A) (SEQ ID NO: 334)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
30 FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA

LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

4A-419 (cadena pesada de hulg1 K322A sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 335)

5 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYRFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQG
FKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARTMADYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
10 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

15 4A-313 (región constante de cadena pesada de hulg1) (SEQ ID NO: 336)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
20 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

4A-313 (región constante de cadena pesada de hulg1 sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 337)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
25 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

30

4A-313 (región constante de cadena pesada de hlg1 P331S) (SEQ ID NO: 338)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

5 **4A-313 (región constante de cadena pesada de hlgG1 P331S sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 339)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
10 WLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

4A-313 (región constante de cadena pesada de hulgG1 N325S/L328F) (SEQ ID NO: 340)

15 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSSKAFFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
20 SPGK

4A-313 (región constante de cadena pesada de hlgG1 N325S/L328F sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 341)

25 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSSKAFFAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

30

4A-313 (región constante de cadena pesada de hulgG1 K322A) (SEQ ID NO: 342)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNKEYKCAVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

5 **4A-313 (región constante de cadena pesada de hulgG1 K322A sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 343)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
10 WLNKEYKCAVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG

15 **Región Constante de Cadena Ligera de IgG1 Humana (SEQ ID NO: 344)**
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 *****

4A-313 (cadena pesada hulgG1) (SEQ ID NO: 355)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVVSSA
25 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
30 PGK

4A-313 (cadena pesada hulgG1 sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 356)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVVSSA

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
5 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG

4A-313 (cadena pesada hlgG1 P331S) (SEQ ID NO: 357)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
10 QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
15 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

4A-313 (cadena pesada hlgG1 P331S sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 358)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
20 QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
25 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG

4A-313 (cadena pesada hulgG1 N325S/L328F) (SEQ ID NO: 359)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
30 QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCAREEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSSKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

4A-313 (cadena pesada hlgG1 N325S/L328F sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 360)

5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREEEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVTSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
10 NGKEYKCKVSSKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG

4A-313 (cadena pesada hulgG1 K322A) (SEQ ID NO: 361)

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREEEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVTSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
20 NGKEYKCAVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

4A-313 (cadena pesada hulgG1 K322A sin C-terminal K) (SEQ ID NO: 362)

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWMGATHPGHGDTRYA
QKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREEEVYYGFRSYWYFDLWGRGTLTVTSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
30 NGKEYKCAVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG

4A-450 – cadena ligera de extension completa (SEQ ID NO: 363)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD SGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGIDFHQT FGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
5 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

4A-419 – cadena ligera de extension completa (SEQ ID NO: 364)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSRSLLYSAGKTYLSWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLD SGVPDR
10 FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGIDFHQT FGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

4A-313 – cadena ligera de extension completa (SEQ ID NO: 365)

15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASESDNYGVSRMNWYQQKPGQAPRLLIYGASNQGS GIPAR
FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC QQSKEVPPT FGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC