

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-522668

(P2022-522668A)

(43)公表日 令和4年4月20日(2022.4.20)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 4
C 4 0 B	40/08 (2006.01)	C 4 0 B	40/08	Z N A	4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全72頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2021-549710(P2021-549710)		(71)出願人 516040017			
(86)(22)出願日 令和2年2月26日(2020.2.26)		ツイスト バイオサイエンス コーポレー			
(85)翻訳文提出日 令和3年10月25日(2021.10.25)		ション			
(86)国際出願番号 PCT/US2020/019988		アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォル			
(87)国際公開番号 WO2020/176680		ニア州 サウス・サンフランシスコ ゲー			
(87)国際公開日 令和2年9月3日(2020.9.3)		トウェイ・ブルバード 6 8 1			
(31)優先権主張番号 62/810,379		(74)代理人 100082072			
(32)優先日 平成31年2月26日(2019.2.26)		弁理士 清原 義博			
(33)優先権主張国・地域又は機関		(72)発明者			
米国(US)		サトー, アーロン			
(31)優先権主張番号 62/830,296		アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォル			
(32)優先日 平成31年4月5日(2019.4.5)		ニア州 サウス・サンフランシスコ ゲー			
(33)優先権主張国・地域又は機関		トウェイ・ブルバード 6 8 1			
米国(US)		F ターム (参考)			
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		4B064 AG27			
最終頁に続く		4C085 AA13 AA14 AA15 AA16			
		BB41 BB43 DD62 EE01			
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 抗体を最適化するための変異体核酸ライブラリ

(57)【要約】

【解決手段】本明細書には、修飾配列を含む抗体をコードする核酸を有する、最適化された抗体のライブラリに関連する方法と組成物が提供される。本明細書に記載のライブラリは、それぞれ少なくとも1つの所定の参照核酸配列の所定の変異体をコードする核酸を含む、多様な (variegated) ライブラリを含む。さらに本明細書には、前記核酸ライブラリの翻訳時に生成されるタンパク質ライブラリが記載される。さらに本明細書には、本明細書に記載の多様な核酸ライブラリを発現する細胞ライブラリが記載される。

【選択図】図1

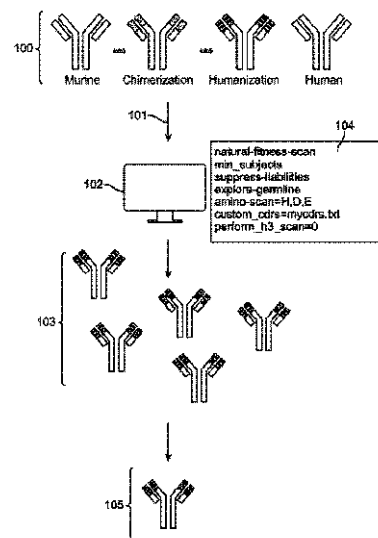


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸ライブラリであって、

該核酸ライブラリは、翻訳時に抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む複数の配列を含み、前記複数の配列はそれぞれ、抗体の入力配列に対して C D R 内に所定数の突然変異を含み、

前記ライブラリは少なくとも 50,000 の変異体配列を含み、各配列は 1.5 倍の平均頻度内にある量で存在し、

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限よりも少なくとも 2.5 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリ。

10

【請求項 2】

前記ライブラリは少なくとも 100,000 の変異体配列を含む、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 3】

前記配列の少なくとも一部は抗体軽鎖をコードする、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 4】

前記配列の少なくとも一部は抗体重鎖をコードする、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 5】

前記複数の配列の各配列は、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の C D R に少なくとも 1 つの突然変異を含む、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

20

【請求項 6】

前記複数の配列の各配列は、入力配列に対して重鎖または軽鎖の C D R に少なくとも 2 つの突然変異を含む、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 7】

前記突然変異の少なくとも 1 つは少なくとも 2 つの個体に存在する、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 8】

前記突然変異の少なくとも 1 つは少なくとも 3 つの個体に存在する、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 9】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 5 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

30

【請求項 10】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 2.5 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 11】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 50 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

40

【請求項 12】

前記複数の配列の各配列は、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖の C D R に少なくとも 1 つの突然変異を含む、請求項 1 に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 13】

前記 C D R は、重鎖上の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 である、請求項 1 から 12 のいずれか 1 つに記載の核酸ライブラリ。

【請求項 14】

前記 C D R は、軽鎖上の C D R 1、C D R 2、および C D R 3 である、請求項 1 から 13 のいずれか 1 つに記載の核酸ライブラリ。

50

【請求項 15】

翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列より少なくとも70倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 16】

翻訳時に少なくとも1つの配列は、 K_D が50 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 17】

翻訳時に少なくとも1つの配列は、 K_D が25 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 18】

翻訳時に少なくとも1つの配列は、 K_D が10 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 19】

翻訳時に少なくとも1つの配列は、 K_D が5 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 20】

前記ライブラリは、配列番号1～6または9～70のいずれか1つのCDR配列を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 21】

前記ライブラリは、配列番号1～6または9～70のいずれか1つのCDRH1、CDRH2、またはCDRH3配列を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 22】

前記ライブラリは、10 nM未満の K_D でPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも1つの配列を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 23】

前記ライブラリは、5 nM未満の K_D でPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも1つの配列を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 24】

前記ライブラリは、10 nM未満の K_D でPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも5つの配列を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 25】

前記ライブラリは少なくとも100,000の変異体配列を含む、請求項1に記載の核酸ライブラリ。

【請求項 26】

配列番号1～6または9～70のいずれか1つの配列を含む抗体。

【請求項 27】

配列番号1～6または9～34のいずれか1つの配列を含む抗体であって、該抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、グラフト抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、単ドメイン抗体、単離された相補性決定領域(CDR)、ダイアボディ、単一モノマー可変ドメインのみで構成されるフラグメント、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、イントラボディ、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、またはそれらのab抗原結合フラグメントである、抗体。

【請求項 28】

請求項26または27に記載の抗体を投与する工程を含む、PD-1活性を阻害する方法。

【請求項 29】

請求項26または27に記載の抗体を対象に投与する工程を含む、増殖性障害を処置する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

前記増殖性障害が癌である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記癌が、肺癌、頭頸部癌、大腸癌、黒色腫、肝臓癌、古典的ホジキンリンパ腫、腎臓癌、胃癌、子宮頸癌、メルケル細胞、B 細胞リンパ腫、または膀胱癌である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

抗体を最適化するためのコンピュータ化システムであって、

(a) 汎用コンピュータと、

(b) 前記汎用コンピュータに対する命令を含む機能モジュールを含むコンピュータ可読媒体と

10

を含み、

前記コンピュータ化システムは、

(i) 操作命令の受け取りであって、該操作命令は抗体または抗体フラグメントをコードする複数の配列を含む、受け取り、

(i i) 翻訳時に抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む複数の配列を含む核酸ライブラリの生成であって、前記複数の配列はそれぞれ、抗体の入力配列に対して C D R 内に所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも 50,000 の変異体配列を含み、各配列は 1.5 倍の平均頻度内にある量で存在し、翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限よりも少なくとも 2.5 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、生成、および

20

(i i i) 少なくとも 50,000 の変異体配列の合成

の方法において作動するように構成される、コンピュータ化システム。

【請求項 33】

前記核酸ライブラリは少なくとも 100,000 の配列を含む、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

【請求項 34】

前記変異体配列の部分集合を濃縮する工程をさらに含む、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

【請求項 35】

前記変異体配列に対応する抗体または抗体フラグメントを発現することをさらに含む、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

30

【請求項 36】

前記ポリヌクレオチド配列は、マウス、ヒト、またはキメラ抗体配列である、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

【請求項 37】

前記複数の変異体配列の各配列は、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の C D R に少なくとも 1 つの突然変異を含む、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

【請求項 38】

前記複数の変異体配列の各配列は、入力配列に対して重鎖または軽鎖の C D R に少なくとも 2 つの突然変異を含む、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

40

【請求項 39】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 5 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

【請求項 40】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 2.5 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 32 に記載のコンピュータ化システム。

【請求項 41】

50

翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも50倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項32に記載のコンピュータ化システム。

【請求項42】

前記複数の変異体配列の各配列は、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも1つの突然変異を含む、請求項32に記載のコンピュータ化システム。

【請求項43】

前記CDRは、重鎖上のCDR1、CDR2、およびCDR3である、請求項32から42のいずれか1つに記載のコンピュータ化システム。

【請求項44】

前記CDRは、軽鎖上のCDR1、CDR2、およびCDR3である、請求項32から43のいずれか1つに記載のコンピュータ化システム。

【請求項45】

前記抗体ライブラリの理論上の多様性は少なくとも 10^{12} の配列である、請求項32に記載のコンピュータ化システム。

【請求項46】

前記抗体ライブラリの理論上の多様性は少なくとも 10^{13} の配列である、請求項32に記載のコンピュータ化システム。

【請求項47】

抗体を最適化する方法であって、

(a) 抗体または抗体フラグメントをコードする複数のポリヌクレオチド配列を提供する工程と、

(b) 翻訳時に抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む複数の配列を含む核酸ライブラリを生成する工程であって、前記複数の配列はそれぞれ、抗体の入力配列に対してCDR内に所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも50,000の変異体配列を含み、各配列は1.5倍の平均頻度内にある量で存在し、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限よりも少なくとも2.5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、工程と、

(c) 少なくとも50,000の変異体配列を合成する工程と

を含む、方法。

【請求項48】

前記抗体ライブラリは少なくとも100,000の配列を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記変異体配列の部分集合を濃縮する工程をさらに含む、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

前記変異体配列に対応する抗体または抗体フラグメントを発現する工程をさらに含む、請求項47に記載の方法。

【請求項51】

前記ポリヌクレオチド配列は、マウス、ヒト、またはキメラ抗体配列である、請求項47に記載の方法。

【請求項52】

前記複数の変異体配列の各配列は、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項53】

前記複数の変異体配列の各配列は、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも2つの突然変異を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項54】

翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも5倍高い結合

10

20

30

40

50

親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 55】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 25 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 56】

翻訳時に少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも 50 倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 57】

各配列は、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖の各 CDR に少なくとも 1 つの突然変異を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 58】

前記抗体ライブラリの理論上の多様性は少なくとも 10¹² の配列である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 59】

前記抗体ライブラリの理論上の多様性は少なくとも 10¹³ の配列である、請求項 47 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2019 年 2 月 26 日出願の米国仮特許出願第 62/810,379 号と 2019 年 4 月 5 日出願の米国仮特許出願第 62/830,296 号に基づく利益を主張するものであり、その各々は全体を参照することで本明細書に引用される。

【背景技術】

【0002】

抗体は、高い特異性と親和性をもって生物標的に結合する能力を持つ。しかし、治療用抗体の設計は、免疫学的作用と効果との釣り合いに起因して困難なものである。そのため、抗体特性を最適化するための組成物と方法を開発する必要がある。

【0003】

参照による引用

本明細書で言及される刊行物、特許、および特許出願はすべて、あたかも個々の刊行物、特許、または特許出願がそれぞれ参照により引用されるように具体的かつ個々に指示されるのと同じ程度にまで、参照により本明細書に引用される。

【発明の概要】

【0004】

本明細書には、抗体を最適化するための方法、組成物、およびシステムが提供される。

【0005】

本明細書には、抗体または抗体フラグメントをコードする複数の核酸を含む核酸ライブラリが提供され、前記複数の配列の各配列は、入力配列に対して所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも 5,000 の変異体配列を含み、前記少なくとも 5,000 の変異体配列の各配列は、前記ライブラリ中の他の変異体配列量の 50% 以下の量で表され、少なくとも 1 つの配列は、前記入力配列よりも高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも 50,000 の変異体配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも 100,000 の変異体配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記配列の少なくとも一部が抗体軽鎖をコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記配列の少なくとも一部が抗体重鎖をコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各 CDR に少なくとも 1 つの突然変異を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の配列の各配列が、前記入力配

10

20

30

40

50

列に対して重鎖または軽鎖の各 C D R に少なくとも 2 つの突然変異を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記突然変異の少なくとも 1 つが少なくとも 2 つの個体に存在する、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記突然変異の少なくとも 1 つが少なくとも 3 つの個体に存在する、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の配列の各配列が、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖の各 C D R に少なくとも 1 つの突然変異を含む、核酸ライブラリが提供される。

【0006】

本明細書には、配列番号 1 ～ 35 のいずれか 1 つの配列を含む C D R - H 3 を含む、抗体が提供される。本明細書には、配列番号 1 ～ 35 のいずれか 1 つの配列を含む C D R - H 3 を含む、抗体が提供され、前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、グラフト抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、一本鎖 F v (s c F v)、一本鎖抗体、F a b フラグメント、F (a b ') 2 フラグメント、F d フラグメント、F v フラグメント、単ドメイン抗体、単離された相補性決定領域 (C D R)、ダイアボディ (d i a b o d y)、単一モノマー可変ドメインのみで構成されるフラグメント、ジスルフィド結合 F v (s d F v)、イントラボディ (i n t r a b o d y)、抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体、またはそれらの a b 抗原結合フラグメントである。

【0007】

本明細書には、P D - 1 活性を阻害する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載されるような抗体を投与する工程を含む。本明細書には、増殖性障害を処置する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載されるような抗体を対象に投与する工程を含む。本明細書ではさらに、前記増殖性障害が癌である、増殖性障害を処置する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記癌が、肺癌、頭頸部癌、大腸癌、黒色腫、肝臓癌、古典的ホジキンリンパ腫、腎臓癌、胃癌、子宮頸癌、メルケル細胞、B 細胞リンパ腫、または膀胱癌である、増殖性障害を処置する方法が提供される。

【0008】

本明細書には、複数の核酸を含む核酸ライブラリが提供され、前記複数の核酸の各核酸は、翻訳時に抗体をコードする配列をコードし、前記抗体は、P D - 1 結合ドメインを含む C D R - H 3 ループを含み、前記複数の核酸の各核酸は、前記 P D - 1 結合ドメインの配列変異体をコードする配列を含む。本明細書にはさらに、翻訳時の C D R - H 3 ループの長さが約 20 ～ 約 80 のアミノ酸である、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記 C D R - H 3 ループの長さが約 80 ～ 約 230 の塩基対である、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記抗体が、軽鎖 (V L) 可変ドメイン、重鎖 (V H) 可変ドメイン、軽鎖 (C L) 定常ドメイン、および重鎖 (C H) 定常ドメインから選択される 1 つ以上のドメインをさらに含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記 V H ドメインの長さが約 90 ～ 約 100 のアミノ酸である、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記 V L ドメインの長さが約 90 ～ 約 120 のアミノ酸である、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記 V H ドメインの長さが約 280 ～ 約 300 の塩基対である、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記 V L ドメインの長さが約 300 ～ 約 350 の塩基対である、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも 1010 の非同一核酸を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも 1012 の非同一核酸を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記抗体が単一の免疫グロブリンドメインを含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記抗体が多くとも 100 のアミノ酸のペプチドを含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記 P D - 1 結合ドメインがペプチド模倣物または小分子模倣物である、核酸ライブラリが提供される。

【0009】

本明細書には複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供され、前記複数のタン

10

20

30

40

50

パク質の各タンパク質は抗体を含み、前記抗体はPD-1結合ドメインの配列変異体を含むCDR-H3ループを含んでいる。本明細書にはさらに、前記CDR-H3ループの長さが約20～約80のアミノ酸である、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記抗体が、軽鎖(VL)可変ドメイン、重鎖(VH)可変ドメイン、軽鎖(CL)定常ドメイン、および重鎖(CH)定常ドメインから選択される1つ以上のドメインをさらに含む、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記VHドメインの長さが約90～約100のアミノ酸である、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記VLドメインの長さが約90～約120のアミノ酸である、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記複数のタンパク質がペプチド模倣ライブラリを生成するために使用される、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが抗体を含む、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。

10

【0010】

本明細書には複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供され、前記複数のタンパク質は異なるPD-1結合ドメインをコードする配列を含み、各PD-1結合ドメインの長さは約20～約80のアミノ酸である。本明細書にはさらに、前記タンパク質ライブラリがペプチドを含む、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記タンパク質ライブラリが免疫グロブリンを含む、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記タンパク質ライブラリが抗体を含む、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記複数のタンパク質がペプチド模倣ライブラリを生成するために使用される、複数のタンパク質を含むタンパク質ライブラリが提供される。

20

【0011】

本明細書には、本明細書に記載されるような核酸ライブラリを含むベクターライブラリが提供される。本明細書には、本明細書に記載されるような核酸ライブラリを含む細胞ライブラリが提供される。本明細書には、本明細書に記載されるようなタンパク質ライブラリを含む細胞ライブラリが提供される。

【0012】

本明細書には、抗体または抗体フラグメントをコードする複数の核酸を含む核酸ライブラリが提供され、前記複数の配列の各配列は、入力配列に対して所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも30,000の変異体配列を含み、前記抗体または抗体フラグメントの少なくとも一部は、50nM未満のKDでPD-1に結合する。本明細書ではさらに、前記ライブラリが配列番号1～35のいずれか1つのCDR配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、配列番号1～35のいずれか1つのCDRH1、CDRH2、CDRH3配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、10nM未満のKDでPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも1つの配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、5nM未満のKDでPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも1つの配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、10nM未満のKDでPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも5つの配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも50,000の変異体配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも100,000の変異体配列を含む、核酸ライブラリが提供される。

30

40

【0013】

本明細書には、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供され、該コンピュータ化システムは、(a)汎用コンピュータと、(b)前記汎用コンピュータに対する命令を含む機能モジュールを含むコンピュータ可読媒体とを含み、前記コンピュータ化シス

50

テムは、(i) 操作命令の受け取りであって、該操作命令は抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を含む、受け取り、(ii) 抗体ライブラリの生成であって、該抗体ライブラリはポリヌクレオチド配列の複数の変異体配列を含む、生成、および(iii) 複数の変異体配列の合成の方法において作動するように構成される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも30,000の配列を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも50,000の配列を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも100,000の配列を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列の部分集合を濃縮する工程をさらに含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列に対応する抗体または抗体フラグメントを発現することをさらに含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記ポリヌクレオチド配列がマウス、ヒト、またはキメラ抗体配列である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが、それぞれ前記抗体ライブラリ中の他の変異体配列量の50%以下で表される変異体配列を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも2つの突然変異を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリの理論上の多様性が少なくとも10¹²の配列である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリの理論上の多様性が少なくとも10¹³の配列である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。

10

20

【0014】

本明細書には、抗体を最適化する方法が提供され、該方法は、(a) 抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチド配列を提供する工程と、(b) 抗体ライブラリを生成する工程であって、該抗体ライブラリはポリヌクレオチド配列の複数の変異体配列を含む、工程と、(c) 複数の変異体配列を合成する工程とを含む。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも30,000の配列を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも50,000の配列を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも100,000の配列を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列の部分集合を濃縮する工程をさらに含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列に対応する抗体または抗体フラグメントを発現する工程をさらに含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記ポリヌクレオチド配列がマウス、ヒト、またはキメラ抗体配列である、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが、それぞれ前記抗体ライブラリ中の他の変異体配列量の50%以下で表される変異体配列を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも2つの突然変異を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、各配列が、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリの理

30

40

50

論上の多様性が少なくとも1012の配列である、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリの理論上の多様性が少なくとも1013の配列である、抗体を最適化する方法が提供される。

【0015】

本明細書には核酸ライブラリが提供され、該核酸ライブラリは、翻訳時に抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む複数の配列を含み、前記複数の配列はそれぞれ、抗体の入力配列に対してCDR内に所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも50,000の変異体配列を含み、各配列は1.5倍の平均頻度内にある量で存在し、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限よりも少なくとも2.5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも100,000の変異体配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記配列の少なくとも一部が抗体軽鎖をコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記配列の少なくとも一部が抗体重鎖をコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも1つの突然変異を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも2つの突然変異を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記突然変異の少なくとも1つが少なくとも2つの個体に存在する、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記突然変異の少なくとも1つが少なくとも3つの個体に存在する、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列の結合無限より少なくとも5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列の結合無限より少なくとも25倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列の結合無限より少なくとも50倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の配列の各配列が、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも1つの突然変異を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記CDRが重鎖上のCDR1、CDR2、およびCDR3である、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記CDRが軽鎖上のCDR1、CDR2、およびCDR3である、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列より少なくとも70倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、 K_D が50 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、 K_D が25 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、 K_D が10 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、 K_D が5 nM未満の抗体または抗体フラグメントをコードする、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが配列番号1~6または9~70のいずれか1つのCDR配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、配列番号1~6または9~70のいずれか1つのCDRH1、CDRH2、またはCDRH3配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、10 nM未満の K_D でPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも1つの配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、5 nM未満の K_D でPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なくとも1つの配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書ではさらに、前記ライブラリが、10 nM未満の K_D でPD-1に結合する抗体または抗体フラグメントをコードする少なく

10

20

30

40

50

とも5つの配列を含む、核酸ライブラリが提供される。本明細書にはさらに、前記ライブラリが少なくとも100,000の変異体配列を含む、核酸ライブラリが提供される。

【0016】

本明細書には、配列番号1～6または9～70のいずれか1つの配列を含む抗体が提供される。本明細書には、配列番号1～6または9～34のいずれか1つの配列を含む抗体が提供され、前記抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、グラフト抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Fv (scFv)、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、単ドメイン抗体、単離された相補性決定領域(CDR)、ダイアボディ、単一モノマー可変ドメインのみで構成されるフラグメント、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、イントラボディ、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、またはそれらのab抗原結合フラグメントである。

10

【0017】

本明細書には、PD-1活性を阻害する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載の抗体を投与する工程を含む。本明細書には、増殖性障害を処置する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載の抗体を対象に投与する工程を含む。本明細書ではさらに、前記増殖性障害が癌である方法が提供される。本明細書ではさらに、前記癌が、肺癌、頭頸部癌、大腸癌、黒色腫、肝臓癌、古典的ホジキンリンパ腫、腎臓癌、胃癌、子宮頸癌、メルケル細胞、B細胞リンパ腫、または膀胱癌である、方法が提供される。

20

【0018】

本明細書には、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供され、該コンピュータ化システムは、(a)汎用コンピュータと、(b)前記汎用コンピュータに対する命令を含む機能モジュールを含むコンピュータ可読媒体とを含み、前記コンピュータ化システムは、(i)操作命令の受け取りであって、該操作命令は抗体または抗体フラグメントをコードする複数の配列を含む、受け取り、(ii)翻訳時に抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む複数の配列を含む核酸ライブラリの生成であって、前記複数の配列はそれぞれ、抗体の入力配列に対してCDR内に所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも50,000の変異体配列を含み、各配列は1.5倍の平均頻度内にある量で存在し、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限よりも少なくとも2.5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、生成、および(iii)少なくとも50,000の変異体配列の合成の方法において作動するように構成される。本明細書ではさらに、前記核酸ライブラリが少なくとも100,000の配列を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列の部分集合を濃縮する工程をさらに含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列に対応する抗体または抗体フラグメントを発現することをさらに含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記ポリヌクレオチド配列がマウス、ヒト、またはキメラ抗体配列である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも2つの突然変異を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも25倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限より少なくとも50倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントを

30

40

50

コードする、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖のCDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記CDRが重鎖上のCDR1、CDR2、およびCDR3である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記CDRが軽鎖上のCDR1、CDR2、およびCDR3である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリの理論上の多様性が少なくとも 10^{12} の配列である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリの理論上の多様性が少なくとも 10^{13} の配列である、抗体を最適化するためのコンピュータ化システムが提供される。

10

【0019】

本明細書には、抗体を最適化する方法が提供され、該方法は、(a)抗体または抗体フラグメントをコードする複数のポリヌクレオチド配列を提供する工程と、(b)翻訳時に抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を含む複数の配列を含む核酸ライブラリを生成する工程であって、前記複数の配列はそれぞれ、抗体の入力配列に対してCDR内に所定数の突然変異を含み、前記ライブラリは少なくとも50,000の変異体配列を含み、各配列は1.5倍の平均頻度内にある量で存在し、翻訳時に少なくとも1つの配列は、前記入力配列の結合無限よりも少なくとも2.5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、工程と、(c)少なくとも50,000の変異体配列を合成する工程とを含む。本明細書ではさらに、前記抗体ライブラリが少なくとも100,000の配列を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列の部分集合を濃縮する工程をさらに含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記変異体配列に対応する抗体または抗体フラグメントを発現する工程をさらに含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記ポリヌクレオチド配列がマウス、ヒト、またはキメラ抗体配列である、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記複数の変異体配列の各配列が、前記入力配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも2つの突然変異を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列の結合無限より少なくとも5倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列の結合無限より少なくとも25倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、翻訳時に少なくとも1つの配列が、前記入力配列の結合無限より少なくとも50倍高い結合親和性を持つ抗体または抗体フラグメントをコードする、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、各配列が、前記入力配列の生殖系列配列に対して重鎖または軽鎖の各CDRに少なくとも1つの突然変異を含む、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記核酸ライブラリの理論上の多様性が少なくとも 10^{12} の配列である、抗体を最適化する方法が提供される。本明細書ではさらに、前記核酸ライブラリの理論上の多様性が少なくとも 10^{13} の配列である、抗体を最適化する方法が提供される。

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】抗体を最適化するためのワークフローを表す。

【図2A】免疫グロブリンスキャホールドの第1の概略図を表す。

【図2B】免疫グロブリンスキャホールドの第2の概略図を表す。

【図3A】ライブラリ中の最適化された抗体入力配列の例示的な配列を表し、配列の領域内の突然変異数が示されている。

50

- 【図 3 B】抗体を最適化するためのワークフローを示す。
- 【図 4 A】1～5 回のパニング（p a n n i n g）後の可変重鎖のリード長を表す。
- 【図 4 B】1～5 回のパニング後の可変重鎖のクローン頻度を表す。
- 【図 4 C】1～5 回のパニング後の可変重鎖のクローン蓄積を表す。
- 【図 4 D】様々なパニング条件に対する突然変異数のグラフである。
- 【図 4 E】PD-1 に結合するために濃縮されたクローンの配列解析のグラフである。
- 【図 5 A】5 回目のパニング時点での濃縮に対する抗 s c F v E L I S A のプロットである。
- 【図 5 B】PD-1 に結合する抗 s c F v E L I S A のグラフである。
- 【図 6 A-1】対照薬 PD-1 に結合する最適化された I g G の配列を表す。 10
- 【図 6 A-2】対照薬 PD-1 に結合する最適化された I g G の配列を表す。
- 【図 6 B】親の抗体（330 nM）と比較した場合の、最適化された抗体（4.5 nM）の親和性の増加を表す。
- 【図 6 C】CDR の配列アライメントを表す。
- 【図 6 D】CDR の配列アライメントを表す。
- 【図 6 E】用量依存型のファージ PD-1 E L I S A を表す。
- 【図 6 F】i s o-親和性プロットを表す。
- 【図 7 A】最適化された I g G の PD-1 / P D L-1 遮断アッセイのグラフである。
- 【図 7 B】最適化された I g G の結合親和性と効力を示す。
- 【図 7 C】最適化された I g G の S P R-価結合親和性（K d（nM）、X 軸上）に対する PD-1 / P D L-1 遮断 I C 5 0（nM、Y 軸上）のグラフである。 20
- 【図 7 D】様々な I g G（x 軸上）の B V P スコア（y 軸上）のグラフである。
- 【図 8】本明細書に開示されるような遺伝子合成の典型的なプロセスワークフローを実証する工程の略図を提示する。
- 【図 9】コンピュータシステムの例を図示する。
- 【図 10】コンピュータシステムの構造を図示するブロック図である。
- 【図 11】複数のコンピュータシステム、複数の携帯電話、個人用携帯情報端末、およびネットワーク接続ストレージ（N A S）を組み込むように構成されるネットワークを実証する図である。
- 【図 12】共有仮想アドレスメモリ空間を用いるマルチプロセッサ・コンピュータ・システムのブロック図である。 30
- 【発明を実施するための形態】
- 【0021】
- 本開示は、別段の定めのない限り、当該技術の範囲内にある従来の分子生物学的技法を採用する。別段の定めのない限り、本明細書で使用される技術用語と科学用語はすべて、当業者が一般に理解するものと同じ意味を有する。
- 【0022】
- 定義
- 【0023】
- 本開示の全体にわたり、様々な実施形態が範囲表示形式で提示される。範囲表示形式での記載は利便性と簡潔さのみを目的とするものであり、任意の実施形態の範囲に対する確固たる限定として解釈するべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、前後関係から明らかでない限り、可能な下位範囲すべて、ならびに下限値の単位の 10 分の 1 までその範囲内の個々の数値を具体的に開示したものと考慮する必要がある。例えば、1～6 などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6 などの下位範囲と、その範囲内の個々の数値、例えば 1.1、2、2.3、5、5.9 を具体的に開示したものと考慮する必要がある。このことは範囲の広さに関係なく適用される。これら介在する範囲の上限値と下限値は独立して、さらに小さな範囲に独立して含まれる場合があり、明示した範囲の任意の具体的に除外された限界値に従って、本開示内にも包含される。明示した範囲が 1 つまたは両方の限界値を含む場合、含まれたこれら限界値の一 40
- 50

方または両方を除外する範囲は、前後関係から明らかでない限り本開示にも含まれる。

【0024】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみの説明を目的とするものであり、任意の実施形態を制限することを意図していない。本明細書では、単数形「a」、「an」、および「the」は、前後関係から明らかでない限り、同様に複数形を含むことを意図している。本明細書では、用語「含む (comprises)」および／または「含むこと (comprising)」は、明示された特徴、整数、工程、操作、要素、および／または構成要素の存在を特定するが、1以上の他の特徴、整数、工程、操作、要素、構成要素、および／またはそれらの群の存在あるいは追加を妨げるものではないことが、さらに理解される。本明細書では、用語「および／または」は、関連する列記された項目の1つ以上のあらゆる組み合わせを含む。

10

【0025】

別段の定めのない限り、または前後関係から明らかでない限り、本明細書では、数または数の範囲に関連する用語「約」とは、明示された数およびその数の+/-10%、または、ある範囲で列記された値に対して列記された下限値の10%未満および列記された上限値の10%超を意味する。

【0026】

別段の定めのない限り、本明細書では用語「核酸」は、二本鎖または三本鎖の核酸のほか、一本鎖分子も包含する。二本鎖または三本鎖の核酸では、核酸の鎖は同一の広がりを持つ必要はない（二本鎖核酸は両方の鎖の全長に沿った二本鎖である必要はない）。他に明示されない限り、核酸配列は、提供されたときに5'~3'の方向に列記される。本明細書に記載の方法は、単離された核酸の生成を提供する。本明細書に記載の方法はさらに、単離かつ精製された核酸の生成を提供する。本明細書に言及されるように「核酸」は、長さが少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、またはそれ以上の塩基を含む場合がある。さらに本明細書には、ヌクレオチド配列をコードする任意数のポリペプチドセグメントの合成方法が提供され、前記ヌクレオチド配列は、非リボソームペプチド (NRP) をコードする配列、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) モジュールと合成変異体をコードする配列、抗体などの他の調節タンパク質のポリペプチドセグメント、例えば、プロモータ、転写因子、エンハンサー、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、マイクロRNA由来の核小体低分子RNA、または対象の任意の機能的もしくは構造的DNAまたはRNAユニットといった、調節配列などの非コードDNAまたはRNAを含む他のタンパク質ファミリー由来のポリペプチドセグメントを含む。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子もしくは遺伝子フラグメントのコード領域または非コード領域、遺伝子間DNA、連鎖解析から定められる遺伝子座、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA (mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA (siRNA)、小ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA)、核小体低分子RNA、リボザイム、通常はメッセンジャーRNA (mRNA) の逆転写もしくは増幅により得られるmRNAのDNA表現である相補的DNA (cDNA)、合成的または増幅により生成されるDNA分子、ゲノムDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。本明細書で言及される遺伝子または遺伝子フラグメントをコードするcDNAは、ゲノム等価配列に介入イントロン配列を含むことなくエクソン配列をコードする、少なくとも1つの領域を含む場合がある。

20

30

40

【0027】

抗体の最適化

【0028】

50

本明細書には、抗体を最適化するための方法、組成物、およびシステムが提供される。いくつかの例では、抗体は、入力抗体配列の変異体配列を含むインシリコのライブラリの設計により最適化される（図1）。いくつかの例では、入力配列（100）は、最適化された配列（103）のライブラリを生成する1つ以上の突然変異によりインシリコ（102）で修飾される。いくつかの例では、このようなライブラリは発現ベクターへと合成、クローン化され、翻訳産物（抗体）は活性について評価される。いくつかの例では、配列のフラグメントは合成されてから組み立てられる。いくつかの例では、発現ベクターは、ファージディスプレイなどの所望の抗体を表示かつ濃縮するために使用される。いくつかの例では、濃縮中に使用される選択圧（Selection pressures）は、結合親和性、毒性、免疫寛容、安定性、または他の因子を含む。このような発現ベクターにより、特異的な特性を持つ抗体を選択（「パニング」）することができ、かつその後のこのような配列の伝搬または増幅により、これら配列を伴うライブラリが濃縮される。パニングは、1、2、3、4、5、6、7回、または7回より多くなど、任意の回数繰り返すことができる。いくつかの例では、1回以上のシーケンシングは、どの配列（105）がライブラリにおいて濃縮されたのかを特定するために使用される。

10

【0029】

本明細書には、インシリコのライブラリを設計する方法とシステムが記載される。例えば、抗体または抗体フラグメントの配列は入力として使用される。いくつかの例では、任意の抗体配列が、本明細書に記載の方法とシステムでの入力のために使用される。生物体からの既知の突然変異を含むデータベース（102）が照会されると（101）、これら突然変異の組み合わせを含む配列のライブラリ（103）が生成される。いくつかの例では、本明細書に記載の抗体はCDR領域を含む。いくつかの例では、CDR由来の既知の突然変異は、配列ライブラリを構築するために使用される。いくつかの例では、フィルタ（104）、すなわち除外基準は、配列ライブラリのメンバーに対して特定種類の変異体を選択するために使用される。例えば、データベース中の最小数の生物体に突然変異がある場合、突然変異がある配列が加えられる。いくつかの例では、追加のCDRはデータベースへの包含のために特定される。いくつかの例では、特定の突然変異、または突然変異の組み合わせは、ライブラリ（例えば、既知の免疫原部位、構造部位など）から除外される。いくつかの例では、入力配列にある特定の部位は、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはそれらの組み合わせと系統的に置き換えられる。いくつかの例では、抗体の各領域に対して可能とされる最大数または最小数の突然変異が、特定される。いくつかの例では、突然変異は、入力配列または入力配列の対応する生殖系列配列に関連して記載される。例えば、最適化により生成される配列は、前記入力配列由来の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または16より多くの突然変異を含む。いくつかの例では、前記最適化により生成される配列は、前記入力配列由来の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または18以下の突然変異を含む。いくつかの例では、前記最適化により生成される配列は、前記入力配列に対して約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または18の突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、第1のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、第2のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、第3のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、重鎖の第1のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、重鎖の第2のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、重鎖の第3のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列

20

30

40

50

は、軽鎖の第1のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、軽鎖の第2のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、軽鎖の第3のCDR領域にある入力配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、第1のCDR領域はCDR1である。いくつかの例では、第2のCDR領域はCDR2である。いくつかの例では、第3のCDR領域はCDR3である。インシリコの抗体ライブラリは、いくつかの例では、所望の配列に対して合成、組み立て、および濃縮される。

【0030】

入力配列に対応する生殖系列配列も、ライブラリに配列を生成するために修飾される場合がある。例えば、本明細書に記載の最適化方法により生成される配列は、前記生殖系列配列由来の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または16より多くの突然変異を含む。いくつかの例では、前記最適化により生成される配列は、前記生殖系列配列由来の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または18以下の突然変異を含む。いくつかの例では、前記最適化により生成される配列は、前記生殖系列配列に対して約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または18の突然変異を含む。

【0031】

本明細書には、抗体を最適化するための方法、システム、および組成物が提供され、ここで、入力配列は抗体領域に突然変異を含む。抗体の典型的な領域として、相補性決定領域(CDR)、可変ドメイン、または定常ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例では、CDRはCDR1、CDR2、またはCDR3である。いくつかの例では、CDRは、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含むがこれらに限定されない、重ドメインである。いくつかの例では、CDRは、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むがこれらに限定されない、軽ドメインである。いくつかの例では、前記可変ドメインは、軽鎖可変(VL)ドメインまたは重鎖可変(VH)ドメインである。いくつかの例では、前記VLドメインはカップ鎖またはラムダ鎖を含む。いくつかの例では、前記定常ドメインは、軽鎖定常(CL)ドメインまたは重鎖定常(CH)ドメインである。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、第1のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、第2のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、第3のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、重鎖の第1のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、重鎖の第2のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、重鎖の第3のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、軽鎖の第1のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、軽鎖の第2のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、最適化により生成される配列は、軽鎖の第3のCDR領域にある生殖系列配列由来の約1、2、3、4、5、6、または7つの突然変異を含む。いくつかの例では、第1のCDR領域はCDR1である。いくつかの例では、第2のCDR領域はCDR2である。いくつかの例では、第3のCDR領域はCDR3である。

【0032】

抗体ライブラリ

【0033】

本明細書には、本明細書に記載の抗体最適化方法から生成されるライブラリが提供される。本明細書に記載の抗体は、機能活性、構造安定性、発現、特異性、またはそれらの組み合わせの改善をもたらす。

【0034】

本明細書では、抗体という用語は、典型的な抗体分子の特徴的な2群のY字形状を有するタンパク質のほか、抗原に特異的に結合する能力を持つ抗体の1つ以上のフラグメントを含むと理解される。典型的な抗体として、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、グラフト抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Fv s (s c F v) (合成または天然リンカーによる組換え方法を用いて、V LとV Hが結合されるフラグメントを含み、この方法によりフラグメントを単一タンパク質鎖として作製することが可能となり、その中でV L領域とV H領域が対になることで、一本鎖F a bおよびs c F a bを含む一価分子が形成される)、一本鎖抗体、F a bフラグメント (V L、V H、C L、およびC H 1のドメインを含む一価フラグメントを含む)、F (a b') 2フラグメント (ヒンジ領域でのジスルフィド架橋により結合される2つのF a bフラグメントを含む二価フラグメントを含む)、F dフラグメント (V HおよびC H 1フラグメントを含むフラグメントを含む)、F vフラグメント (抗体の単一群のV LおよびV Hドメインを含むフラグメントを含む)、単一ドメイン抗体 (d A bまたはs d A b) (V Hドメインを含むフラグメントを含む)、単離された相補性決定領域 (C D R)、ダイアボディ (互いに結合され、かつ2つの異なる抗原を認識するために、2つのV LおよびV Hドメインなどの二価二量体を含むフラグメントを含む)、単一モノマー可変ドメインのみで構成されるフラグメント、ジスルフィド結合F v (s d F v)、イントラボディ、抗イディオタイプ (抗I d) 抗体、またはそれらのa b抗原結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例では、本明細書に開示されるライブラリは抗体をコードする核酸を含み、該抗体は、完全抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントで構成されるF v抗体を含む、F v抗体である。いくつかの実施形態では、前記F v抗体は、密な非共有結合会合における1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体と、V H-V L二量体の表面上の抗原結合部位を定めるための各可変ドメイン相互作用の3つの超可変領域とで構成される。いくつかの実施形態では、6つの超可変領域は抗体に抗原結合特異性を与える。いくつかの実施形態では、単一可変ドメイン (またはV H H抗体もしくはナノボディなどの1つの重鎖可変ドメインを含むラクダ科動物から単離された単一ドメイン抗体を含む、抗原に特異的な3つの超可変領域しか含まないF vの半分) は、抗原を認識して結合する能力を持つ。いくつかの例では、本明細書に開示されるライブラリは抗体をコードする核酸を含み、該抗体は、V H、V L、またはV HとV L両方のドメインを含む抗体フラグメントを含む一本鎖F vすなわちs c F vであり、両ドメインは単一ポリペプチド鎖に存在する。いくつかの実施形態では、前記F vポリペプチドはさらに、V HドメインとV Lドメインとの間にポリペプチドリンカーを含み、これによりs c F vは抗原結合の所望の構造を形成することが可能になる。いくつかの例では、s c F vはF cフラグメントに結合され、または、V H HはF cフラグメント (ミニボディを含む) に結合される。いくつかの例では、前記抗体は免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、例えば抗原結合部位を含む分子、を含む。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ (例えばI g G、I g E、I g M、I g D、I g A、およびI g Y)、クラス (例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、およびI g A 2)、またはサブクラスの分子である。

【0035】

いくつかの実施形態では、ライブラリは意図した治療標的の種に適した免疫グロブリンを含む。全体的にこれらの方法は「哺乳動物化」を含むとともに、ドナー抗原結合情報を免疫原性の少ない哺乳動物抗体アクセプターに運んで有用な治療処置を生成する方法を含む

10

20

30

40

50

。いくつかの例では、哺乳動物は、マウス、ラット、ウマ、ヒツジ、ウシ、霊長類（例えばチンパンジー、ヒヒ、ゴリラ、オランウータン、サル）、イヌ、ネコ、ブタ、ロバ、ウサギ、およびヒトである。いくつかの例では、本明細書には、抗体をネコ化（*f e l i n i z a t i o n*）およびイヌ化（*c a n i n i z a t i o n*）する方法が提供される。

【0036】

非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体に由来する最小配列を包含するキメラ抗体の場合がある。ヒト化抗体は一般的に、1つ以上のCDRからの残基を非ヒト抗体（ドナー抗体）の1つ以上のCDRからの残基と置き換えるヒト抗体（レシピエント抗体）である。ドナー抗体は、所望の特異性、親和性、または生物学的効果のあるマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、または非ヒト霊長類の抗体など、任意の適切な非ヒト抗体の場合がある。いくつかの例では、レシピエント抗体の選択されたフレームワーク領域残基は、ドナー抗体の対応するフレームワーク領域残基と置き換えられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体のいずれかにはみられない残基も含む場合がある。いくつかの例では、これらの修飾は抗体パフォーマンスをさらに洗練させるために行われる。

10

【0037】

「イヌ化」は、イヌを対象とする治療として有用な処置を生成するために、非イヌ抗原結合情報をドナー抗体から免疫原性の少ないイヌ抗体アクセプターに運ぶ方法を含む場合がある。いくつかの例では、本明細書で提供される非イヌ抗体のイヌ化形態は、非イヌ抗体由来の最小の配列を含むキメラ抗体である。いくつかの例では、イヌ化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト霊長類、ヒト、ヒト化、組換え配列、または望ましい特性を持つ操作配列などの非イヌ種の超可変領域残基（「ドナー」抗体）と置き換えられるイヌ抗体配列（「アクセプター」または「レシピエント」抗体）である。いくつかの例では、イヌ抗体のフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非イヌFR残基と置き換えられる。いくつかの例では、イヌ化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体にみられない残基を含む。いくつかの例では、これらの修飾は抗体パフォーマンスをさらに洗練させるために行われる。イヌ化抗体は、イヌ抗体の免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部も含む場合がある。

20

【0038】

「ネコ化」は、ネコを対象とする治療として有用な処置を生成するために、非ネコ抗原結合情報をドナー抗体から免疫原性の少ないネコ抗体アクセプターに運ぶ方法を含む場合がある。いくつかの例では、本明細書で提供される非ネコ抗体のネコ化形態は、非ネコ抗体由来の最小の配列を含むキメラ抗体である。いくつかの例では、ネコ化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト霊長類、ヒト、ヒト化、組換え配列、または望ましい特性を持つ操作配列などの非ネコ種の超可変領域残基（「ドナー」抗体）と置き換えられるネコ抗体配列（「アクセプター」または「レシピエント」抗体）である。いくつかの例では、ネコ抗体のフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ネコFR残基と置き換えられる。いくつかの例では、ネコ化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体にみられない残基を含む。いくつかの例では、これらの修飾は抗体パフォーマンスをさらに洗練させるために行われる。ネコ化抗体は、ネコ抗体の免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部も含む場合がある。

30

40

【0039】

本明細書に記載されるような方法は、非免疫グロブリンをコードするライブラリを最適化するために使用されてもよい。いくつかの実施形態では、前記ライブラリは抗体模倣薬を含む。典型的な抗体模倣薬として、アンチカリン、アフィリン、アフィボディ（*a f f i b o d y*）分子、アフィマー、アフィチン、アルファボディ（*a l p h a b o d i e s*）、アビマー、アトリマー、DARPin、フィノマー、Kunitzドメイン系タンパク質、モノボディ（*m o n o b o d i e s*）、アンチカリン、ノッチン、アルマジロリピータンパク質系タンパク質、および二環式ペプチドが挙げられるが、これらに限定される

50

ものではない。

【0040】

抗体をコードする核酸を含む、本明細書に記載のライブラリは、抗体の少なくとも1つの領域に変異を含む。変異に対する抗体の典型的な領域として、相補性決定領域（CDR）、可変ドメイン、または定常ドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例では、CDRはCDR1、CDR2、またはCDR3である。いくつかの例では、CDRは、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含むがこれらに限定されない、重ドメインである。いくつかの例では、CDRは、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含むがこれらに限定されない、軽ドメインである。いくつかの例では、前記可変ドメインは、軽鎖可変（VL）ドメインまたは重鎖可変（VH）ドメインである。いくつかの例では、前記VLドメインはカップ鎖またはラムダ鎖を含む。いくつかの例では、前記定常ドメインは、軽鎖定常（CL）ドメインまたは重鎖定常（CH）ドメインである。

10

【0041】

本明細書に記載の方法は、抗体をコードする核酸を含むライブラリを合成し、各核酸は少なくとも1つの所定の参照核酸配列の所定の変異体をコードする。場合により、所定の参照配列はタンパク質をコードする核酸配列であり、変異体ライブラリは、合成した核酸によりコードされる後続するタンパク質における単一の残基の複数の様々な変異体が標準翻訳プロセスにより生成されるように、少なくとも1つのコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、抗体ライブラリは、複数の位置で変異を総体的にコードする変異核酸を含む。いくつかの例では、前記変異体ライブラリは、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、VLドメイン、またはVHドメインの少なくとも単一のコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、前記変異体ライブラリは、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、VLドメイン、またはVHドメインの複数のコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、前記位変異体ライブラリは、フレームワーク要素1（FW1）、フレームワーク要素2（FW2）、フレームワーク要素3（FW3）、またはフレームワーク要素4（FW4）の複数のコドンの変異をコードする配列を含む。変異に対するコドンの典型的な数は、少なくともまたは約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、225、250、275、300、または300より多くのコドンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0042】

いくつかの例では、変異に対する抗体の少なくとも1つの領域は、重鎖V遺伝子ファミリー、重鎖D遺伝子ファミリー、重鎖J遺伝子ファミリー、軽鎖V遺伝子ファミリー、または軽鎖J遺伝子ファミリーに由来する。いくつかの例では、前記軽鎖V遺伝子ファミリーは免疫グロブリンカッパ（IGK）遺伝子または免疫グロブリンラムダ（IGL）を含む。

【0043】

本明細書には、抗体をコードする核酸を含むライブラリが提供され、該ライブラリは様々な数のフラグメントにより合成される。いくつかの例では、前記フラグメントは、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、VLドメイン、またはVHドメインを含む。いくつかの例では、前記フラグメントは、フレームワーク要素1（FW1）、フレームワーク要素2（FW2）、フレームワーク要素3（FW3）、またはフレームワーク要素4（FW4）を含む。いくつかの例では、抗体ライブラリは、少なくともまたは約2つのフラグメント、3つのフラグメント、4つのフラグメント、5つのフラグメント、または5より多くのフラグメントにより合成される。合成される核酸の核酸フラグメントそれぞれの長さ、または核酸の平均長さは、少なくともまたは約50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、52

40

50

5、550、575、600、または600より多くの塩基対であってもよい。いくつかの例では、前記長さは、約50～600、75～575、100～550、125～525、150～500、175～475、200～450、225～425、250～400、275～375、または300～350の塩基対である。

【0044】

本明細書に記載されるような抗体をコードする核酸を含むライブラリは、翻訳時に様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、合成されるアミノ酸のアミノ酸フラグメントそれぞれの長さ、またはアミノ酸の平均長さは、少なくともまたは約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、または150より多くのアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、前記アミノ酸の長さは、約15～150、20～145、25～140、30～135、35～130、40～125、45～120、50～115、55～110、60～110、65～105、70～100、または75～95のアミノ酸である。いくつかの例では、前記アミノ酸の長さは約22～約75のアミノ酸である。いくつかの例では、前記抗体は、少なくともまたは約100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、または5000より多くのアミノ酸を含む。

10

【0045】

変異に対する前記抗体の少なくとも1つの領域に対する多数の変異体配列が、本明細書に記載されるような方法を使用してデノボ合成される。いくつかの例では、多数の変異体配列は、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、VL、VH、またはそれらの組み合わせに対してデノボ合成される。いくつかの例では、多数の変異体配列は、フレームワーク要素1 (FW1)、フレームワーク要素2 (FW2)、フレームワーク要素3 (FW3)、またはフレームワーク要素4 (FW4) に対してデノボ合成される。図2Aを参照。変異体配列の数は、少なくともまたは約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、または500より多くの配列であってもよい。いくつかの例では、変異体配列の数は、少なくともまたは約500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、または8000より多くの配列である。いくつかの例では、変異体配列の数は、約10～500、25～475、50～450、75～425、100～400、125～375、150～350、175～325、200～300、225～375、250～350、または275～325の配列である。

20

30

【0046】

いくつかの例では、前記抗体の少なくとも1つの領域に対する変異体配列の長さまたは配列は、変動する。いくつかの例では、デノボ合成される少なくとも1つの領域は、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、VL、VH、またはそれらの組み合わせを対象とする。いくつかの例では、デノボ合成される少なくとも1つの領域は、フレームワーク要素1 (FW1)、フレームワーク要素2 (FW2)、フレームワーク要素3 (FW3)、またはフレームワーク要素4 (FW4) を対象とする。いくつかの例では、前記変異体配列は、野生型と比較して、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50以上の変異体ヌクレオチドあるいはアミノ酸を含む。いくつかの例では、前記変異体配列は、野生型と比較して、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、または50の付加的なヌクレオチドあるいはアミノ酸を含む。いくつかの例では、前記変異体配列は、野生型と比較して、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、2

40

50

0、25、30、35、40、45、または50より少ないヌクレオチドあるいはアミノ酸を含む。いくつかの例では、前記ライブラリは、少なくともまたは約10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰、または10¹⁰より多くの変異体を含む。

【0047】

抗体ライブラリの合成後、抗体ライブラリはスクリーニングおよび解析に使用してもよい。例えば、抗体ライブラリは、ライブラリの表示能およびパニングについて解析される。いくつかの例では、表示能は選択可能なタグを使用して解析される。典型的なタグとしては、限定されないが、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、比色定量タグ、アフィニティータグ、または当該技術分野で既知のその他のラベルもしくはタグが挙げられる。いくつかの例では、タグは、ヒスチジン、ポリヒスチジン、myc、赤血球凝集素（HA）、またはFLAGである。いくつかの例では、抗体ライブラリは、限定されないが、単一分子リアルタイム（SMRT）シーケンシング、ポロニーシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、可逆的ターミネーターシーケンシング、プロトン検出シーケンシング、イオン半導体シーケンシング、ナノポアシーケンシング、電子シーケンシング、パイロシーケンシング、マクサムーギルバートシーケンシング、連鎖停止（例えば、サンガー）シーケンシング、+Sシーケンシング、または合成によるシーケンシングを含む、様々な方法を使用したシーケンシングにより解析される。いくつかの例では、抗体ライブラリは細胞またはファージの表面に表示される。いくつかの例では、抗体ライブラリは、ファージディスプレイを使用して、所望の活性を有する配列について濃縮される。

10

20

【0048】

いくつかの例では、抗体ライブラリは、機能的活性、構造安定性（例えば、熱安定性またはpH安定性）、発現、特異性、またはそれらの組み合わせについて解析される。いくつかの例では、抗体ライブラリは、フォールディング可能な抗体について解析される。いくつかの例では、抗体の領域は、機能的活性、構造安定性、発現、特異性、フォールディング、またはそれらの組み合わせについて解析される。例えば、VH領域またはVL領域は、機能的活性、構造安定性、発現、特異性、フォールディング、またはそれらの組み合わせについて解析される。

【0049】

本明細書に記載される方法によって生成される抗体またはIgGは、改善された結合親和性を含む。いくつかの例では、抗体は、1nM未満、1.2nM未満、2nM未満、5nM未満、10nM未満、11nM未満、13.5nM未満、15nM未満、20nM未満、25nM未満、または30nM未満の結合親和性（例えば、KD）を含む。いくつかの例では、抗体は1nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は1.2nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は2nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は5nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は10nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は13.5nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は15nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は20nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は25nM未満のKDを含む。いくつかの例では、抗体は30nM未満のKDを含む。

30

40

【0050】

いくつかの例では、本明細書に記載される方法によって生成される抗体またはIgGの親和性は、対照薬抗体と比較して、少なくともまたは約1.5倍、2.0倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、または200倍以上改善された結合親和性である。いくつかの例では、本明細書に記載される方法によって生成される抗体またはIgGの親和性は、対照薬抗体と比較して、少なくともまたは約1.5倍、2.0倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、または200倍以上改善された機能である。いくつかの例では、対照薬抗体は、類似する構造、配列、または抗原標的を有する抗体である。

50

【0051】

発現系

【0052】

結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含むライブラリが本明細書で提供され、ここで、ライブラリでは、特異性、安定性、発現、フォールディング、または下流活性が改善されている。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリは、スクリーニングおよび解析に使用される。

【0053】

結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含むライブラリが本明細書で提供され、核酸ライブラリはスクリーニングおよび解析に使用される。いくつかの例では、スクリーニングおよび解析は、インビトロ、インビボ、またはエクスピボのアッセイを含む。スクリーニング用の細胞には、生きた対象または細胞株から採取される初代細胞が含まれる。細胞は、原核細胞（例えば、細菌および真菌）または真核細胞（例えば、動物および植物）に由来する場合がある。典型的な動物細胞としては、マウス、ウサギ、霊長類、および昆虫由来の動物細胞が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例では、スクリーニング用の細胞としては、限定されないが、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、ヒト胚腎臓（HEK）細胞株、またはベビーハムスター腎臓（BHK）細胞株を含む細胞株が挙げられる。いくつかの例では、本明細書に記載される核酸ライブラリはまた、多細胞生物体へ送達される場合がある。典型的な多細胞生物体としては、限定されないが、植物、マウス、ウサギ、霊長類、および昆虫が挙げられる。

【0054】

本明細書に記載される核酸ライブラリは、様々な薬学特性または薬物動態特性についてスクリーニングされ得る。いくつかの例では、上記ライブラリは、インビトロアッセイ、インビボアッセイ、またはエクスピボアッセイを使用してスクリーニングされる。例えば、スクリーニングされるインビトロの薬学特性または薬物動態特性としては、限定されないが、結合親和性、結合特異性、および結合活性が挙げられる。スクリーニングされる本明細書に記載のライブラリの典型的なインビボの薬学特性または薬物動態特性としては、限定されないが、治療効果、活性、前臨床毒性特性、臨床的有効度特性、臨床的毒性特性、免疫原性、効力、および臨床的安全性特性が挙げられる。

【0055】

核酸ライブラリが本明細書で提供され、該核酸ライブラリはベクターで発現される場合がある。本明細書で開示される核酸ライブラリを挿入するための発現ベクターは、真核生物または原核生物の発現ベクターを含む場合がある。典型的な発現ベクターとしては、限定されることなく、哺乳動物発現ベクター：pSF-CMV-NEO-NH₂-PPT-3XFLAG、pSF-CMV-NEO-COOH-3XFLAG、pSF-CMV-PURO-NH₂-GST-TEV、pSF-OBX20-COOH-TEV-FLAG(R)-6His、pCEP4 pDEST27、pSF-CMV-Ub-KrYFP、pSF-CMV-FMDV-daGFP、pEF1a-mCherry-N1 Vector、pEF1a-tdTomato Vector、pSF-CMV-FMDV-Hygro、pSF-CMV-PGK-Puro、pMCP-tag(m)、およびpSF-CMV-PURO-NH₂-CMYC、細菌発現ベクター：pSF-OBX20-BetaGal、pSF-OBX20-Fluc、pSF-OBX20、およびpSF-Tac、植物発現ベクター：pRI 101-AN DNAおよびpCambia2301、ならびに酵母発現ベクター：pTYB21およびpKLAC2、ならびに昆虫ベクター：pAc5.1/V5-His AおよびpDEST8が挙げられる。いくつかの例では、ベクターはpcDNA3またはpcDNA3.1である。

【0056】

抗体を含む構築物を生成するためにベクター中で発現される核酸ライブラリが、本明細書に記載される。いくつかの例では、構築物のサイズは変動する。いくつかの例では、構築物は、少なくともまたは約500、600、700、800、900、1000、110

0、1300、1400、1500、1600、1700、1800、2000、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、4800、5000、6000、7000、8000、9000、10000、または10000より多くの塩基を含む。いくつかの例では、構築物は、約300～1,000、300～2,000、300～3,000、300～4,000、300～5,000、300～6,000、300～7,000、300～8,000、300～9,000、300～10,000、1,000～2,000、1,000～3,000、1,000～4,000、1,000～5,000、1,000～6,000、1,000～7,000、1,000～8,000、1,000～9,000、1,000～10,000、2,000～3,000、2,000～4,000、2,000～5,000、2,000～6,000、2,000～7,000、2,000～8,000、2,000～9,000、2,000～10,000、3,000～4,000、3,000～5,000、3,000～6,000、3,000～7,000、3,000～8,000、3,000～9,000、3,000～10,000、4,000～5,000、4,000～6,000、4,000～7,000、4,000～8,000、4,000～9,000、4,000～10,000、5,000～6,000、5,000～7,000、5,000～8,000、5,000～9,000、5,000～10,000、6,000～7,000、6,000～8,000、6,000～9,000、6,000～10,000、7,000～8,000、7,000～9,000、7,000～10,000、8,000～9,000、8,000～10,000、または9,000～10,000の塩基の範囲を含む。

10

20

【0057】

抗体をコードする核酸を含むライブラリが本明細書で提供され、ここで、核酸ライブラリは細胞で発現される。いくつかの例では、上記ライブラリはレポーター遺伝子を発現するように合成される。典型的なレポーター遺伝子としては、限定されないが、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（A H A S）、アルカリホスファターゼ（A P）、βガラクトシダーゼ（L a c Z）、βグルコロニダーゼ（G U S）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（C A T）、緑色蛍光タンパク質（G F P）、赤色蛍光タンパク質（R F P）、黄色蛍光タンパク質（Y F P）、シアン蛍光タンパク質（C F P）、濃青色蛍光タンパク質、淡黄色蛍光タンパク質、オレンジ色蛍光タンパク質、サクランボ色蛍光タンパク質、緑青色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（H R P）、ルシフェラーゼ（L u c）、ノパリンシンターゼ（N O S）、オクトピンシンターゼ（O C S）、ルシフェラーゼ、およびそれらの誘導体が挙げられる。レポーター遺伝子の調節を決定するための方法は、当該技術分野で周知であり、限定されないが、蛍光測定器方法（例えば、蛍光分光法、蛍光活性化細胞分類（F A C S）、蛍光顕微鏡検査法）、および抗生物質耐性測定（a n t i b i o t i c r e s i s t a n c e d e t e r m i n a t i o n）が挙げられる。

30

【0058】

P D - 1 ライブラリ

【0059】

P D - 1 抗体をコードする核酸を含むプログラム細胞死タンパク質1（P D - 1）結合ライブラリに関連する方法および組成物が、本明細書で提供される。いくつかの例では、そのような方法および組成物は、本明細書に記載される抗体最適化方法およびシステムによって生成される。本明細書に記載される抗体は、P D - 1 結合ドメインを安定して支持することができる。P D - 1 結合ドメインは、P D - 1 リガンドおよびP D - 1 の表面相互作用に基づいて設計される場合がある。本明細書に記載されるライブラリはさらに、それぞれが少なくとも1つのあらかじめ決められた参照核酸配列のあらかじめ決められた変異体をコードする核酸を含む、変異体ライブラリを提供するために変化させる（v a r i g a t e d）ことができる。本明細書ではさらに、核酸ライブラリの翻訳時に生成することのできるタンパク質ライブラリが記載される。いくつかの例では、本明細書に記載される

40

50

核酸ライブラリは、細胞ライブラリを生成するために細胞へと転写される。また本明細書には、本明細書に記載の方法を使用して合成されるライブラリの下流の適用が提供される。下流の適用として、向上した生物学的に関連する機能、例えば、安定性、親和性、結合、機能活性を持つとともに、PD-1シグナル伝達に関連する病状の処置または予防を目的とする、変異体核酸またはタンパク質配列の同定が挙げられる。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH1配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH1配列に少なくとも80%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH1配列に少なくとも85%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH1配列に少なくとも90%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH2配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH2配列に少なくとも80%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH2配列に少なくとも85%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH2配列に少なくとも90%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH2配列に少なくとも95%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH3配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH3配列に少なくとも80%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH3配列に少なくとも85%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH3配列に少なくとも90%同一の配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、配列番号：1-35のいずれか1つのCDRH3配列に少なくとも95%同一の配列を含む。

10

20

30

40

50

【0060】

「配列同一性」との用語は、2つのポリヌクレオチド配列が比較ウィンドウ上で（つまり、ヌクレオチドごとに）同一であることを意味する。用語「配列同一性の割合」は、最適に整列した2つの配列を比較ウィンドウ上で比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、またはI）が両配列に生じる位置の数を求めることで、一致した位置の数を得て、この一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の総数（つまり、ウィンドウサイズ）で割り、その結果に100を掛けることで配列同一性の割合を得ることによって、算出される。

【0061】

2つのタンパク質間における「相同性」または「類似性」との用語は、あるタンパク質配列のアミノ酸配列およびその保存アミノ酸置換を、別のタンパク質配列と比較することにより決定される。類似性は、当該技術分野で周知の手順、例えば、BLASTプログラム（National Center for Biological InformationのBasic Local Alignment Search Tool）により決定してもよい。

【0062】

PD-1抗体をコードする核酸を含むライブラリが本明細書で提供される。本明細書に記載される抗体により、PD-1結合ドメインをコードする配列の範囲の安定性を改善することができる。いくつかの例では、PD-1結合ドメインをコードする配列は、PD-1リガンドとPD-1との間の相互作用によって決定される。

【0063】

P D - 1 リガンドと P D - 1 との間の表面相互作用に基づく P D - 1 結合ドメインの配列は、様々な方法を使用して解析される。例えば、複数種の生物の計算解析が実行される。いくつかの例では、構造解析が実行される。いくつかの例では、配列解析が実行される。配列解析は、当該技術分野で既知のデータベースを使用して実行可能である。データベースの非限定的な例としては、限定されないが、NCBI BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)、UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu/)、UniProt (www.uniprot.org/)、および IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (guidetopharmacology.org/) が挙げられる。

【0064】

様々な生物体間の配列解析に基づいて設計された P D - 1 結合ドメインが、本明細書に記載される。例えば、配列解析は、異なる生物体の相同配列を同定するために実行される。典型的な生物体としては、限定されないが、マウス、ラット、ウマ、ヒツジ、ウシ、霊長類（例えば、チンパンジー、ヒヒ、ゴリラ、オランウータン、サル）、イヌ、ネコ、ブタ、ロバ、ウサギ、魚類、鳥類、およびヒトが挙げられる。いくつかの例では、相同配列は、個体間で同じ生物体において同定される。

【0065】

P D - 1 結合ドメインの同定後、P D - 1 結合ドメインをコードする核酸を含むライブラリが生成され得る。いくつかの例では、P D - 1 結合ドメインのライブラリは、立体構造リガンド相互作用、ペプチドリガンド相互作用、小分子リガンド相互作用、P D - 1 の細胞外ドメイン、または P D - 1 を標的とする抗体に基づき設計される、P D - 1 結合ドメインの配列を含む。P D - 1 結合ドメインのライブラリが翻訳されて、タンパク質ライブラリが生成される。いくつかの例では、P D - 1 結合ドメインのライブラリが翻訳されて、ペプチドライブラリ、免疫グロブリンライブラリ、それらの誘導体、またはそれらの組み合わせが生成される。いくつかの例では、P D - 1 結合ドメインのライブラリが翻訳されてタンパク質ライブラリが生成され、これをさらに修飾することでペプチド模倣ライブラリが生成される。いくつかの例では、P D - 1 結合ドメインのライブラリが翻訳されてタンパク質ライブラリが生成され、これを用いて小分子が生成される。

【0066】

本明細書に記載される方法は、それぞれが少なくとも1つのあらかじめ決められた参照核酸配列のあらかじめ決められた変異体をコードする核酸を含む、P D - 1 結合ドメインのライブラリの合成を提供する。場合によって、あらかじめ決められた参照配列はタンパク質をコードする核酸配列であり、変異体ライブラリは、合成した核酸によってコードされる後続するタンパク質における単一の残基の複数の異なる変異体が標準翻訳プロセスによって生成されるように、少なくとも1つのコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、P D - 1 結合タンパク質のライブラリは、複数の位置にて変異をまとめてコードする変異核酸を含む。いくつかの例では、変異体ライブラリは、P D - 1 結合ドメインの少なくとも単一のコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、変異体ライブラリは、P D - 1 結合ドメインの複数のコドンの変異をコードする配列を含む。変異のためのコドンの典型的な数としては、少なくともまたは約 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、225、250、275、300、または300より多くのコドンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0067】

本明細書に記載される方法は、P D - 1 結合ドメインをコードする核酸を含むライブラリの合成を提供し、該ライブラリは P D - 1 結合ドメインの長さの変異をコードする含む配列を含む。いくつかの例では、ライブラリは、あらかじめ決められた参照配列と比較して、少なくともまたは約 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、225、250、275、または300以上少ないコドンの長さの変異をコード

10

20

30

40

50

する配列を含む。いくつかの例では、ライブラリは、あらかじめ決められた参照配列と比較して、少なくともまたは約 1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、または 300 以上多いコドンの長さの変異をコードする配列を含む。

【0068】

PD-1 結合ドメインの同定後、抗体は、PD-1 結合ドメインを含むように設計および合成される場合がある。PD-1 結合ドメインを含む抗体は、結合、特異性、安定性、発現、フォールディング、または下流活性に基づいて設計されてもよい。いくつかの例では、PD-1 結合ドメインを含む抗体により、PD-1 との接触が可能になる。いくつかの例では、PD-1 結合ドメインを含む抗体により、PD-1 との高親和性結合が可能になる。PD-1 結合ドメインの典型的なアミノ酸配列は、配列番号：1-70 のいずれか 1 つを含む。

10

【0069】

いくつかの例では、PD-1 抗体は、1 nM 未満、1.2 nM 未満、2 nM 未満、5 nM 未満、10 nM 未満、11 nM 未満、13.5 nM 未満、15 nM 未満、20 nM 未満、25 nM 未満、または 30 nM 未満の PD-1 に対する結合親和性（例えば、kD）を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、1 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、1.2 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、2 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、5 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、10 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、13.5 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、15 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、20 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、25 nM 未満の kD を含む。いくつかの例では、PD-1 抗体は、30 nM 未満の kD を含む。

20

【0070】

いくつかの例では、本明細書に記載される方法によって生成された PD-1 抗体の親和性は、対照薬抗体と比較して、少なくともまたは約 1.5 倍、2.0 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、または 200 倍以上改善された結合親和性である。いくつかの例では、本明細書に記載される方法によって生成された PD-1 抗体は、対照薬抗体と比較して、少なくともまたは約 1.5 倍、2.0 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、または 200 倍以上改善された機能である。いくつかの例では、対照薬抗体は、類似する構造、配列、または抗原標的を有する抗体である。

30

【0071】

本明細書には、ドメインのタイプ、ドメイン長、または残基変異における変異を含む、PD-1 結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含む、PD-1 結合ライブラリが提供される。いくつかの例では、ドメインは PD-1 結合ドメインを含む抗体にある領域である。例えば、上記領域は、VH、CDR-H3、または VL ドメインである。いくつかの例では、上記ドメインは PD-1 結合ドメインである。

40

【0072】

本明細書に記載される方法は、それぞれが少なくとも 1 つのあらかじめ決められた参照核酸配列のあらかじめ決められた変異体をコードする核酸の PD-1 結合ライブラリの合成を提供する。場合によって、あらかじめ決められた参照配列はタンパク質をコードする核酸配列であり、変異体ライブラリは、合成した核酸によってコードされる後続するタンパク質における単一の残基の複数の異なる変異体が標準翻訳プロセスによって生成されるように、少なくとも 1 つのコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、PD-1 結合ライブラリは、複数の位置にて変異をまとめてコードする変異核酸を含む。いくつかの例では、変異体ライブラリは、VH、CDR-H3、または VL ドメインの少なくとも 1 つのコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、変異体ライブラリ

50

は、PD-1 結合ドメインの少なくとも1つのコドンの変異をコードする配列を含む。例えば、PD-1 結合ドメインの少なくとも1つの単一コドンは変化する。いくつかの例では、変異体ライブラリは、VH、CDR-H3、またはVLドメインの複数のコドンの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、変異体ライブラリは、PD-1 結合ドメインの複数のコドンの変異をコードする配列を含む。変異のためのコドンの典型的な数としては、少なくともまたは約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、225、250、275、300、または300より多くのコドンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0073】

本明細書に記載される方法は、それぞれが少なくとも1つのあらかじめ決められた参照核酸配列のあらかじめ決められた変異体をコードする核酸のPD-1 結合ライブラリの合成を提供し、上記PD-1 結合ライブラリは、ドメイン長の変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、上記ドメインは、VH、CDR-H3、またはVLドメインである。いくつかの例では、上記ドメインはPD-1 結合ドメインである。いくつかの例では、前記ライブラリは、所定の参照配列と比較して少ない、少なくともまたは約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、225、250、275、または300以上少ないコドンの長さの変異をコードする配列を含む。いくつかの例では、前記ライブラリは、所定の参照配列と比較して多い、少なくともまたは約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、または300以上多いコドンの長さの変異をコードする配列を含む。

【0074】

PD-1 結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含むPD-1 結合ライブラリが本明細書で提供され、ここで、PD-1 結合ライブラリは、様々な数のフラグメントで合成される。いくつかの例では、上記フラグメントは、VH、CDR-H3、またはVLドメインを含む。いくつかの例では、上記PD-1 結合ライブラリは、少なくともまたは約2つのフラグメント、3つのフラグメント、4つのフラグメント、5つのフラグメント、または5つより多くのフラグメントで合成される。合成される核酸の核酸フラグメントそれぞれの長さ、または核酸の平均長さは、少なくともまたは約50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、または600より多くの塩基対であってもよい。いくつかの例では、上記長さは、約50～600、75～575、100～550、125～525、150～500、175～475、200～450、225～425、250～400、275～375、または300～350の塩基対である。

【0075】

本明細書に記載されるPD-1 結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含むPD-1 結合ライブラリは、翻訳されると、様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、合成されるアミノ酸のアミノ酸フラグメントそれぞれの長さ、またはアミノ酸の平均長さは、少なくともまたは約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、または150より多くのアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、上記アミノ酸の長さは、約15～150、20～145、25～140、30～135、35～130、40～125、45～120、50～115、55～110、60～110、65～105、70～100、または75～95のアミノ酸である。いくつかの例では、上記アミノ酸の長さは約22～約75のアミノ酸である。

【0076】

P D - 1 結合ドメインを含む抗体をコードするデノボ合成された変異体配列を含む P D - 1 結合ライブラリは、多数の変異体配列を含む。いくつかの例では、多数の変異体配列は、C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3、V L、V H、またはそれらの組み合わせに対してデノボ合成される。いくつかの例では、多数の変異体配列は、フレームワーク要素 1 (F W 1)、フレームワーク要素 2 (F W 2)、フレームワーク要素 3 (F W 3)、またはフレームワーク要素 4 (F W 4) に対してデノボ合成される。いくつかの例では、多数の変異体配列は、P D - 1 結合ドメインに対してデノボ合成される。変異体配列の数は、少なくともまたは約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、または 500 より多くの配列であってもよい。いくつかの例では、変異体配列の数は、約 10 ~ 300、25 ~ 275、50 ~ 250、75 ~ 225、100 ~ 200、または 125 ~ 150 の配列である。

10

【0077】

P D - 1 結合ドメインを含む抗体をコードするデノボ合成された変異体配列を含む P D - 1 結合ライブラリは、改善された多様性を含む。いくつかの例では、変異体は親和性成熟変異体を含む。代替的に、または組み合わせて、変異体は、C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 を含むがこれらに限定されない、抗体の他の領域中の変異体を含む。いくつかの例において、P D - 1 結合ライブラリの変異体の数は、少なくともまたは約 104、105、106、107、108、109、1010、1011、1012、1013、1014、または 1014 を超える非同一配列である。

20

【0078】

P D - 1 結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含む P D - 1 結合ライブラリの合成後、ライブラリは、スクリーニングおよび解析のために使用され得る。例えば、ライブラリは、ライブラリの表示能およびパニングについて解析される。いくつかの例では、表示能は、選択可能なタグを使用して解析される。典型的なタグとしては、限定されないが、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、比色定量タグ、アフィニティータグ、または当該技術分野で既知のその他のラベルもしくはタグが挙げられる。いくつかの例では、タグは、ヒスチジン、ポリヒスチジン、m y c、赤血球凝集素 (H A)、または F L A G である。例えば、P D - 1 結合ライブラリは、G F P、F L A G、および L u c y などの複数のタグ、ならびに D N A バーコードを有する P D - 1 結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含む。いくつかの例では、ライブラリは、単一分子リアルタイム (S M R T) シーケンシング、ポロニーシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、可逆的ターミネーターシーケンシング、プロトン検出シーケンシング、イオン半導体シーケンシング、ナノポアシーケンシング、電子シーケンシング、パイロシーケンシング、マクサムーギルバートシーケンシング、連鎖停止 (例えば、サンガー) シーケンシング、+ S シーケンシング、または合成によるシーケンシングを含むがこれらに限定されない、様々な方法を使用したシーケンシングにより解析される。

30

40

【0079】

疾患および障害

【0080】

治療効果を有し得る、P D - 1 結合ドメインを含む抗体をコードする核酸を含む P D - 1 結合ライブラリが本明細書で提供される。いくつかの例では、P D - 1 結合ライブラリは、疾患または障害を処置するために使用されるタンパク質を翻訳時にもたらす。いくつかの例では、上記タンパク質は免疫グロブリンである。いくつかの例では、上記タンパク質はペプチド模倣体である。典型的な疾患としては、癌、炎症性疾患または炎症性障害、代謝疾患または代謝障害、循環器疾患または循環器障害、呼吸器疾患または呼吸器障害、疼痛、消化器疾患または消化器障害、生殖器疾患または生殖器障害、内分泌疾患または内分

50

泌障害、あるいは神経系疾患または神経系障害が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例では、癌は固形癌または血液癌である。いくつかの例では、癌は、肺、頭頸部扁平上皮細胞、結腸直腸、黒色腫、肝臓、古典的ホジキンリンパ腫、腎臓、胃、頸部、メルケル細胞、B細胞リンパ腫、または膀胱の癌である。いくつかの例では、癌はMSI H/dMMR癌である。いくつかの例では、本明細書に記載されるPD-1プログラム細胞死タンパク質1の阻害剤は、代謝異常の処置のために使用される。いくつかの例では、対象は哺乳動物である。いくつかの例では、対象は、マウス、ウサギ、イヌ、またはヒトである。本明細書に記載される方法によって処置される対象は、幼児、成人、または小児であってもよい。本明細書に記載される抗体または抗体フラグメントを含む医薬組成物は、静脈内投与または皮下投与することができる。いくつかの例では、医薬組成物は、配列番号：1-70のいずれか1つの配列を含むCDR-H3を含む、本明細書に記載の抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、肺癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、頭頸部扁平上皮癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、大腸癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、黒色腫性を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、肝臓癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、古典的ホジキンリンパ腫を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、腎癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、胃癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、子宮頸癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、メルケル細胞癌を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、B細胞リンパ腫を処置するために使用される。いくつかの例では、配列番号：1-70のいずれか1つの配列は、膀胱癌を処置するために使用される。

10

20

30

40

【0081】

変異体ライブラリ

【0082】

コドン変異

【0083】

本明細書に記載される変異体核酸ライブラリは複数の核酸を含み、ここで、各核酸は、参照核酸配列と比較して、変異体コドン配列をコードする。いくつかの例では、第1の核酸母集団の各核酸は、単一の変異体部位に1つの変異体を包含する。いくつかの例では、第1の核酸母集団は、同じ変異体部位に1より多くの変異体を包含するように単一の変異体部位に複数の変異体を含む。第1の核酸母集団は、同じ変異体部位で複数のコドン変異体をまとめてコードする核酸を含む場合がある。第1の核酸母集団は、同じ位置で最大19以上のコドンをまとめてコードする核酸を含む場合がある。前記第1の核酸母集団は、同じ位置で最大60の変異体トリプレットをまとめてコードする核酸を含むか、または、同じ位置でコドンの最大61の異なるトリプレットをまとめてコードする核酸を含む場合がある。各変異体は、翻訳中に異なるアミノ酸を生じさせるコドンをコードする場合がある。表1は、変異部位で可能性のあるそれぞれのコドン（および代表的なアミノ酸）のリストを提供する。

【0084】

50

【表 1 - 1】

表 1. コドンおよびアミノ酸のリスト

アミノ酸	1 文 字の コー ド	3 文 字の コー ド	コドン					
アラニン	A	Ala	GCA	GCC	GCG	GCT		
システイン	C	Cys	TGC	TGT				
アスパラギン酸	D	Asp	GAC	GAT				
グルタミン酸	E	Glu	GAA	GAG				
フェニルアラニン	F	Phe	TTC	TTT				
グリシン	G	Gly	GGA	GGC	GGG	GGT		
ヒスチジン	H	His	CAC	CAT				
イソロイシン	I	Iso	ATA	ATC	ATT			
リジン	K	Lys	AAA	AAG				
ロイシン	L	Leu	TTA	TTG	CTA	CTC	CTG	CTT

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

50

【表 1 - 2】

メチオニン	M	Met	ATG					
アスパラギン	N	Asn	AAC	AAT				
プロリン	P	Pro	CCA	CCC	CCG	CCT		
グルタミン	Q	Gln	CAA	CAG				
アルギニン	R	Arg	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGT
セリン	S	Ser	AGC	AGT	TCA	TCC	TCG	TCT
トレオニン	T	Thr	ACA	ACC	ACG	ACT		
バリン	V	Val	GTA	GTC	GTG	GTT		
トリプトファン	W	Trp	TGG					
チロシン	Y	Tyr	TAC	TAT				

10

20

30

【0086】

核酸母集団は、複数の位置で最大20のコドン変異をまとめてコードする様々な核酸を含む場合がある。このような場合、母集団中の各核酸は、同じ核酸中の1より多くの位置にコドン変異を含む。いくつかの例では、母集団の各核酸は、単一の核酸中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれより多くのコドンにコドン変異を含む。いくつかの例では、変異体の長い核酸はそれぞれ、単一の長い核酸中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くのコドンにコドン変異を含む。いくつかの例では、前記変異体の核酸母集団は、単一の核酸中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれより多くのコドンにコドン変異を含む。いくつかの例では、変異体の核酸母集団は、単一の核酸中の少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはそれより多くのコドンにコドン変異を含む。

40

50

【0087】

高並列核酸合成

【0088】

革新的な合成プラットフォームを作るための、シリコン上のナノウェル内のポリヌクレオチド合成から遺伝子アセンブリまでのエンド・ツー・エンドプロセスの小型化、並列化、および垂直的統合を利用するプラットフォームアプローチが本明細書で提供される。本明細書に記載される装置には96ウェルのプレートと同じフットプリントが設けられ、シリコン合成プラットフォームは、従来の合成方法と比較してスループットを最大1,000倍以上増加させることができ、単一の高度に並列したランで最大およそ1,000,000以上のポリヌクレオチド、または10,000以上の遺伝子を産生する。

10

【0089】

次世代シーケンシングの出現により、高解像度のゲノムデータは、正常な生態と病因の両方において様々な遺伝子の生物学的役割を深く探究する研究にとって重要な因子となった。この試験の核をなすのは、分子生物学のセントラルドグマおよび「配列情報の残基ごとの移動」の概念である。DNAにコードされたゲノム情報はメッセージへと転写され、該メッセージは後に、所与の生物学的経路内の活性産物であるタンパク質へと翻訳される。

【0090】

研究の別の刺激的な領域は、高特異的な細胞標的に焦点を置いた治療用分子の発見、開発、および製造に関するものである。高度な多様性を持つDNA配列ライブラリは、標的とした治療薬の開発パイプラインの中核である。治療標的に対する親和性が高いタンパク質の高度な発現のために最適化された遺伝子への到達が理想的な、設計、構造、および試験のタンパク質操作サイクルにおいてタンパク質を発現するために、遺伝子突然変異体が使用される。一例として、受容体の結合ポケットを考慮されたい。結合ポケット内のすべての残基の全配列順序を同時に試験できることにより、徹底的な診査が可能となり、成功する可能性が高まる。研究者が受容体内の特定部位に起こり得るすべての突然変異を生じさせようと試みる、飽和突然変異誘発は、この開発課題に対する1つの手法である。この手法は、費用がかかる上に、時間と労力を要するが、各変異体を各位置に導入することができる。対照的に、少数の選択位置または短い一続きのDNAが広範囲に改変される場合があるコンビナトリアル突然変異誘発は、表現が偏った(biased representation)変異体の不完全なレパートリーを生じさせる。

20

【0091】

薬物開発のパイプラインを促進するために、試験に利用可能な正しい位置において意図した頻度で利用可能な所望の変異体を有するライブラリ、言い換えれば、高精度ライブラリ(precision library)は、コストの削減に加えて、スクリーニングの所要時間の短縮を可能にする。所望の頻度で意図した変異体それぞれを正確に導入する核酸合成変異体ライブラリを合成するための方法が、本明細書で提供される。エンドユーザーにとって、このことは、配列空間を徹底的にサンプリングするだけでなく、効率的にこれらの仮説を問うことができる能力を意味し、コストおよびスクリーニング時間が削減される。ゲノムワイド編集は、重要な経路、各変異体と配列順序が最適な機能性について試験され得るライブラリを解明することができ、何千もの遺伝子を使用して全経路とゲノムを再構築して、創薬のために生物系を再設計することができる。

30

【0092】

第1の実施例では、薬物自体が、本明細書に記載される方法を使用して最適化され得る。例えば、抗体の特定機能を改善するために、抗体の一部をコードする変異体核酸ライブラリが設計され、合成される。その後、抗体に対する変異体核酸ライブラリを、本明細書に記載のプロセス(例えば、PCR突然変異誘発と、それに続くベクターへの挿入)によって生成することができる。次いで、抗体は生産細胞株(production cell line)に発現され、活性増強についてスクリーニングされる。スクリーニングの例としては、抗原に対する結合親和性、安定性、またはエフェクター機能(例えば、ADCC、補体、またはアポトーシス)の調節の検査が挙げられる。抗体を最適化する典型的な領

40

50

域としては、F c 領域、F a b 領域、F a b 領域の可変領域、F a b 領域の定常領域、重鎖または軽鎖の可変ドメイン（V_HまたはV_L）、およびV_HまたはV_Lの特異的な相補性決定領域（CDR）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0093】

本明細書に記載される方法によって合成された核酸ライブラリは、疾患状態に関連付けられた様々な細胞において発現され得る。疾患状態に関連付けられる細胞には、対象からの細胞株、組織試料、初代細胞、対象から拡張される培養細胞、またはモデル系の細胞が含まれる。典型的なモデル系としては、疾患状態の植物モデルおよび動物モデルが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0094】

疾患状態の予防、低減、または処置に関連付けられた変異体分子を特定するために、本明細書に記載される変異体核酸ライブラリが、疾患状態に関連付けられた細胞または疾患状態が誘発され得る細胞において発現される。いくつかの例では、細胞に疾患状態を誘導するための薬剤が使用される。疾患状態を誘導するための典型的なツールとしては、Cre／Lox組換えシステム、LPS炎症誘発、および低血糖症を誘発するストレプトゾトシンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。疾患状態に関連付けられる細胞は、モデル系の細胞または培養細胞のほか、特定の病状がある対象からの細胞であってもよい。典型的な病状としては、細菌性、真菌性、ウイルス性、自己免疫性、増殖性の障害（例えば、癌）が挙げられる。いくつかの例では、変異体核酸ライブラリは、対象由来のモデル系、細胞株、または初代細胞に発現され、少なくとも1つの細胞活性の変化についてスクリーニングされる。典型的な細胞活性としては、増殖、周期進行、細胞死、付着、遊走、再生産、細胞シグナル伝達、エネルギー産生、酸素利用、代謝活性、および老化、遊離基損傷に対する反応、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0095】

基板

【0096】

ポリヌクレオチド合成のための表面として使用される装置は、限定されることなく、均質アレイ表面、パターン化されたアレイ表面、チャンネル、ビーズ、ゲル等を含む基板の形態であってもよい。複数のクラスターを含む基板が本明細書で提供され、ここで、クラスターはそれぞれ、ポリヌクレオチドの結合および合成を支持する複数の座を含む。いくつかの例では、基板は均質アレイ表面を含む。例えば、均質アレイ表面は均質プレートである。本明細書で使用される場合、「座」という用語は、表面から伸長する単一のあらかじめ定められた配列をコードするポリヌクレオチドを支持する構造上の別個の領域を指す。いくつかの例では、座は、二次元表面、例えば、実質的に平らな表面上にある。いくつかの例では、座は、三次元表面、例えばウェル、マイクロウェル、チャンネル、またはポスト上にある。いくつかの例では、座の表面は、ポリヌクレオチド合成のための少なくとも1つのヌクレオチド、または、好ましくは、ポリヌクレオチドの集団の合成のための同一のヌクレオチドの集団に結合する、活発に官能化される物質を含む。いくつかの例では、ポリヌクレオチドとは、同じ核酸配列をコードするポリヌクレオチドの集団を指す。場合により、基板の表面は、基板の1つまたは複数の表面を包含する。提供されるシステムおよび方法を用いて、本明細書に記載されるライブラリ内で合成されるポリヌクレオチドに関する平均エラー率は、エラー補正を伴うことなく、1000分の1未満、2000分の1未満、3000分の1未満、またはそれよりも遥かに少ないことが多い。

【0097】

共通の支持体上のアドレス可能位置で異なる予め決められた配列を有している複数のポリヌクレオチドのパラレル合成を支持する表面が本明細書で提供される。いくつかの例では、基板は、50、100、200、400、600、800、1000、1200、1400、1600、1800、2,000；5,000；10,000；20,000；50,000；100,000；200,000；300,000；400,000；50

10

20

30

40

50

0, 000; 600, 000; 700, 000; 800, 000; 900, 000; 1, 000, 000; 1, 200, 000; 1, 400, 000; 1, 600, 000; 1, 800, 000; 2, 000, 000; 2, 500, 000; 3, 000, 000; 3, 500, 000; 4, 000, 000; 4, 500, 000; 5, 000, 000; 10, 000, 000またはそれ以上の非同ポリヌクレオチドの合成を支持する。場合により、表面は、別々の配列をコードする50、100、200、400、600、800、1000、1200、1400、1600、1800、2, 000; 5, 000; 10, 000; 20, 000; 50, 000; 100, 000; 200, 000; 300, 000; 400, 000; 500, 000; 600, 000; 700, 000; 800, 000; 900, 000; 1, 000, 000; 1, 200, 000; 1, 400, 000; 1, 600, 000; 1, 800, 000; 2, 000, 000; 2, 500, 000; 3, 000, 000; 3, 500, 000; 4, 000, 000; 4, 500, 000; 5, 000, 000; 10, 000, 000またはそれ以上のポリヌクレオチドの合成のための支持体を提供する。いくつかの例では、ポリヌクレオチドの少なくとも一部は、同一の配列を有しているか、または同一の配列で合成されるように構成される。いくつかの例では、基板は、少なくとも80、90、100、120、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、またはそれより多くの塩基を有するポリヌクレオチドの成長のために表面環境を提供する。

10

20

【0098】

基板の別個の座上でのポリヌクレオチド合成のための方法が本明細書で提供され、ここで、各座はポリヌクレオチドの集団の合成を支持する。場合により、各座は、別の座上で成長したポリヌクレオチドの集団とは異なる配列を有するポリヌクレオチドの集団の合成を支持する。いくつかの例では、各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド合成のための表面上の座の同じクラスター内の異なる座にわたって、1、2、3、4、5、6、7、8、9、またはそれ以上の重複性で合成される。いくつかの例では、基板の座は複数のクラスター内に位置する。いくつかの例では、基板は、少なくとも10、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、11000、12000、13000、14000、15000、20000、30000、40000、50000、またはそれより多くのクラスターを含む。いくつかの例において、基板は、2, 000; 5, 000; 10, 000; 100, 000; 200, 000; 300, 000; 400, 000; 500, 000; 600, 000; 700, 000; 800, 000; 900, 000; 1, 000, 000; 1, 100, 000; 1, 200, 000; 1, 300, 000; 1, 400, 000; 1, 500, 000; 1, 600, 000; 1, 700, 000; 1, 800, 000; 1, 900, 000; 2, 000, 000; 300, 000; 400, 000; 500, 000; 600, 000; 700, 000; 800, 000; 900, 000; 1, 000, 000; 1, 200, 000; 1, 400, 000; 1, 600, 000; 1, 800, 000; 2, 000, 000; 2, 500, 000; 3, 000, 000; 3, 500, 000; 4, 000, 000; 4, 500, 000; 5, 000, 000; または10, 000, 000あるいはそれより多くの別個の座を含む。いくつかの例では、基板は約10, 000の別個の座を含む。単一のクラスター内の座の量は、異なる例では変動する。場合により、各クラスターは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、130、150、200、300、400、500またはそれより多くの座を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約50～500の座を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約100～200の座を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約100～150の座を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約109、121、130、または137の座を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約19、20、61、64、またはそれより多くの座を含む。代替的に、または組み合わせて、ポリヌクレオチド合成は均質アレイ表面上に生じる

30

40

50

。

【0099】

いくつかの例では、基板上で合成される別個のポリヌクレオチドの数は、基板で利用可能な別個の座の数に依存する。いくつかの例では、基板のクラスターまたは表面内の座の密度は、 1 mm^2 あたり少なくともまたは約1、10、25、50、65、75、100、130、150、175、200、300、400、500、1,000、またはそれより大きな座である。場合により、基板は、10~500、25~400、50~500、100~500、150~500、10~250、50~250、10~200、または50~200 mm^2 を含む。いくつかの例では、クラスターまたは表面内の2つの隣接する座の中心間の距離は、約10~500、約10~200、または約10~100 μm である。いくつかの例では、隣接した座の2つの中心間の距離は、約10 μm 、20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 、60 μm 、70 μm 、80 μm 、90 μm 、または100 μm より長い。いくつかの例では、2つの隣接した座の中心間の距離は、約200 μm 、150 μm 、100 μm 、80 μm 、70 μm 、60 μm 、50 μm 、40 μm 、30 μm 、20 μm 、または10 μm 未満である。いくつかの例では、各座の幅は、約0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100 μm である。場合により、各座の幅は、約0.5~100、0.5~50、10~75、または0.5~50 μm である。

10

【0100】

いくつかの例では、基板内のクラスターの密度は、100 mm^2 あたり少なくともまたは約1のクラスター、10 mm^2 あたり1のクラスター、5 mm^2 あたり1のクラスター、4 mm^2 あたり1のクラスター、3 mm^2 あたり1のクラスター、2 mm^2 あたり1のクラスター、1 mm^2 あたり1のクラスター、1 mm^2 あたり2のクラスター、1 mm^2 あたり3のクラスター、1 mm^2 あたり4のクラスター、1 mm^2 あたり5のクラスター、1 mm^2 あたり10のクラスター、1 mm^2 あたり50のクラスター、またはそれ以上である。いくつかの例では、基板は、10 mm^2 あたり約1のクラスター~1 mm^2 あたり約10のクラスターを含む。いくつかの例では、2つの隣接したクラスターの中心間の距離は、少なくともまたは約50、100、200、500、1000、2000、あるいは5000 μm である。場合によっては、2つの隣接したクラスターの中心間の距離は、約50~100、50~200、50~300、50~500、または100~2000 μm の間である。場合によっては、2つの隣接したクラスターの中心間の距離は、約0.05~50、0.05~10、0.05~5、0.05~4、0.05~3、0.05~2、0.1~10、0.2~10、0.3~10、0.4~10、0.5~10、0.5~5、または0.5~2 mm の間である。場合によっては、各クラスターは、約0.5~約2、約0.5~約1、または約1~約2 mm の断面を有している。場合によっては、各クラスターは、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2 mm の断面を有している。場合によっては、各クラスターは、約0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.15、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2 mm の内部断面を有している。

20

30

40

【0101】

いくつかの例では、基板は標準の96ウェルプレートのサイズ、例えば、約100~約200 $\text{mm} \times$ 約50~約150 mm である。いくつかの例では、基板は、約1000、500、450、400、300、250、200、150、100、または50 mm 以下の直径を有している。いくつかの例では、基板の直径は、約25~1000、25~800、25~600、25~500、25~400、25~300、または25~200 mm である。いくつかの例では、基板は、少なくとも約100；200；500；1,000；2,000；5,000；10,000；12,000；15,000；20,000；30,000；40,000；50,000 mm^2 またはそれ以上の平面の表面積を有している。いくつかの例では、基板の厚さは、約50~2000、50~1000、10

50

0～1000、200～1000、または250～1000mmの間である。

【0102】

表面材料

【0103】

本明細書で提供される基板、装置、およびリアクターは、本明細書に記載される方法、組成物、およびシステムに適した様々な材料から製造される。ある例では、低レベルのヌクレオチド結合を示すように基板材料が製造される。いくつかの例では、基板材料は、高レベルのヌクレオチド結合を示す別々の表面を生成するように変更される。いくつかの例では、基板材料は、可視光および／またはUV光に対して透過性である。いくつかの例では、基板材料は、十分に導電性であり、例えば、基板のすべてまたは一部にわたって均一な電場を形成することができる。いくつかの例では、導電性材料は電気接地（electric ground）に接続される。いくつかの例では、基板は、熱伝導性であるか、または断熱される。いくつかの例では、材料は、化学的または生化学的な反応、例えば、ポリヌクレオチド合成反応プロセスを支持するために、耐薬品性および耐熱性である。いくつかの例では、基板は可撓性材料を含む。可撓性材料としては、限定されることなく：修飾されたおよび修飾されていないナイロン、ニトロセルロース、ポリプロピレンなどが挙げられ得る。いくつかの例では、基板は剛性材料を含む。剛性材料としては、限定されることなく：ガラス；石英ガラス；シリコン、プラスチック（例えば、ポリテトラフルオロエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、およびその混合物など）；金属（例えば金、白金など）が挙げられ得る。基板、固体支持体、またはリアクターは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロース酸ポリマー、ポリアクリルアミド、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、およびガラスからなる群から選択される材料から製造され得る。基板／固体支持体またはマイクロ構造、そのリアクターは、本明細書において列挙される材料の組み合わせ、または当該技術分野で既知の他の適切な材料で製造されてもよい。

10

20

30

40

50

【0104】

表面のアーキテクチャ

【0105】

本明細書に記載される方法、組成物、およびシステムのための基板が本明細書で提供され、ここで、基板は、本明細書に記載される方法、組成物、およびシステムに適した表面構造を有する。いくつかの例では、基板は、隆起した特徴および／または沈降した特徴を含む。そのような特徴を有する1つの利点は、ポリヌクレオチド合成を支持する表面積の増加である。いくつかの例では、隆起したおよび／または沈降した特徴を有する基板は、三次元基板と呼ばれる。場合によって、三次元基板は1つ以上のチャンネルを含む。場合によって、1つ以上の座はチャンネルを含む。場合によって、チャンネルは、材料堆積装置などの堆積装置による試薬の堆積に利用可能である。場合によって、試薬および／または流体は、1つ以上のチャンネルと流体連通するより大きなウェルに集まる。例えば、基板は、クラスターを有する複数の座に対応する複数のチャンネルを含み、複数のチャンネルは、クラスターの1つのウェルと流体連通している。いくつかの方法では、ポリヌクレオチドのライブラリは、クラスターの複数の座において合成される。

【0106】

本明細書に記載される方法、組成物、システムのための基板が本明細書で提供され、ここで、基板はポリヌクレオチド合成のために構成される。いくつかの例では、構造は、表面上でのポリヌクレオチド合成のための制御された流れおよび物質移動経路を可能にするように構成される。いくつかの例では、基板の構成により、ポリヌクレオチド合成中の物質移動経路、化学暴露時間、および／または洗浄効果の制御された均等な分配が可能になる。いくつかの例では、基板の構成は、成長しているポリヌクレオチドによって排除される体積が、ポリヌクレオチドの成長に利用可能なまたは適切な初期に利用可能な体積の50、45、40、35、30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1%、またはそれ以下を超えて占めることがないように、例

例えば、成長しているポリヌクレオチドに十分な体積を提供することによって、奏効率 (sweep efficiency) を高めることを可能にする。いくつかの例では、三次元構造は、化学暴露の急速な交換を可能にするために流体の流れの管理を可能にする。

【0107】

本明細書に記載される方法、組成物、およびシステムのための基板が本明細書で提供され、ここで、基板は、本明細書に記載される方法、組成物、およびシステムに適した構造を含む。いくつかの例では、物理的構造によって隔離が達成される。いくつかの例では、ポリヌクレオチド合成のための能動領域および受動領域を発生させる表面の差次的な官能化によって、隔離が達成される。いくつかの例では、差次的な官能化は、基板表面にわたって疎水性を変え、それによって、堆積した試薬の水滴 (beading) または湿りを引き起こす水接触角の効果を作り出すことによって達成される。より大きな構造を利用することで、飛散 (splashing) や、隣接するスポットの試薬での別々のポリヌクレオチド合成位置の相互汚染を減らすことができる。場合によって、材料堆積装置などの装置が、別々のポリヌクレオチド合成位置に試薬を堆積させるために使用される。三次元の特徴を有する基板は、低いエラー率 (例えば、約 1:500、1:1000、1:1500、1:2,000、1:3,000、1:5,000、または 1:10,000 未満) で、多数のポリヌクレオチド (例えば、約 10,000 を超える) の合成を可能にする様式で構成される。いくつかの例では、基板は、1 mm² 当たり約 1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、または 500、またはそれらを超える特徴の密度を備えた特徴を含む。

10

20

【0108】

基板のあるウェルは、その基板の別のウェルと同じあるいは異なる幅、高さ、および／または量を有し得る。基板のあるチャンネルは、その基板の別のチャンネルと同じあるいは異なる幅、高さ、および／または体積を有し得る。いくつかの例において、クラスターの直径、またはクラスターを含むウェルの直径、またはその両方は、約 0.05~50、0.05~10、0.05~5、0.05~4、0.05~3、0.05~2、0.05~1、0.05~0.5、0.05~0.1、0.1~10、0.2~10、0.3~10、0.4~10、0.5~10、0.5~5、または 0.5~2 mm である。いくつかの例において、クラスター、ウェル、またはその両方の直径は、約 5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.09、0.08、0.07、0.06、または 0.05 mm 以下である。いくつかの例において、クラスター、ウェル、またはその両方の直径は、約 1.0~1.3 mm である。いくつかの例において、クラスター、ウェル、またはその両方の直径は、約 1.150 mm である。いくつかの例において、クラスター、ウェル、またはその両方の直径は、約 0.08 mm である。クラスターの直径は、二次元または三次元の基板内のクラスターを指す。

30

【0109】

いくつかの例では、ウェルの高さは、約 20~1000、50~1000、100~1000、200~1000、300~1000、400~1000、または 500~1000 μ m である。場合によっては、ウェルの高さは、約 1000、900、800、700、または 600 μ m 未満である。

40

【0110】

いくつかの例では、基板は、クラスター内の複数の座に対応する複数のチャンネルを含み、ここで、チャンネルの高さまたは深さは、5~500、5~400、5~300、5~200、5~100、5~50、または 10~50 μ m である。場合によっては、チャンネルの高さは、100、80、60、40、または 20 μ m 未満である。

【0111】

いくつかの例では、チャンネル、座 (例えば、実質的に平面の基板における)、またはチャンネルと座の両方 (例えば、座がチャンネルに対応する三次元基板における) の直径は、約 1~1000、1~500、1~200、1~100、5~100、または 10~100 μ

50

m、例えば、約90、80、70、60、50、40、30、20、または10 μm である。いくつかの例では、チャンネル、座、またはチャンネルと座の両方の直径は、約100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10 μm 未満である。いくつかの例では、2つの隣接したチャンネル、座、またはチャンネルと座の中心間の距離は、約1~500、1~200、1~100、5~200、5~100、5~50、または5~30、例えば、約20 μm である。

【0112】

表面改質

【0113】

表面上でのポリヌクレオチド合成のための方法が本明細書で提供され、ここで、表面は様々な表面改質を含む。いくつかの例では、基板表面、または基板表面の選択部位あるいは選択領域の1つ以上の化学的および／または物理的な特性を変更するための加算あるいは減算のプロセスによって、表面の化学的および／または物理的に変更するために、表面改質が利用される。例えば、表面改質としては、限定されないが、(1)表面の湿潤性を変更すること、(2)表面を官能化すること、つまり、表面官能基を提供、修飾、または置換すること、(3)表面を脱官能基化すること、つまり、表面官能基を除去すること、(4)そうでなければ、例えば、エッチングによって、表面の化学組成を変更すること、(5)表面粗さを増大または低減すること、(6)表面上にコーティング、例えば、表面の湿潤性とは異なる湿潤性を示すコーティングを提供すること、および／または(7)表面上に粒子を堆積させることが挙げられる。

【0114】

いくつかの例では、表面上に化学層（接着促進剤と呼ばれる）を追加することで、基板の表面上の座の構造化したパターン化が促進される。接着促進の適用のための典型的な表面としては、限定されないが、ガラス、シリコン、二酸化ケイ素、および窒化ケイ素が挙げられる。場合によって、接着促進剤は、高い表面エネルギーを有する化学物質である。いくつかの例では、第2の化学層が基板の表面上に堆積される。場合によっては、第2の化学層は、低い表面エネルギーを有している。場合によっては、表面上にコーティングされた化学層の表面エネルギーは、表面上での液滴の局在化を支持する。選択されるパターン化の配置に応じて、座の近接性および／および座での流体接触の領域は変更可能である。

【0115】

いくつかの例では、例えば、ポリヌクレオチド合成のために、核酸または他の部分が堆積される基板表面あるいは分解された座は、滑らかまたは実質的に平面（例えば、二次元）であるか、あるいは隆起したもしくは沈降した特徴（例えば、三次元の特徴）などの不規則性を有している。いくつかの例では、基板表面は、化合物の1つ以上の異なる層で改変される。対象のそのような改変層としては、限定されないが、金属、金属酸化物、ポリマー、小さな有機分子などの無機層および有機層が挙げられる。

【0116】

いくつかの例では、基板の分解された座は、表面エネルギーを増加および／または減少させる1つ以上の部分で官能化される。場合によっては、部分は化学的に不活性である。場合によっては、部分は、望ましい化学反応、例えば、ポリヌクレオチド合成反応における1つ以上のプロセスを支持するように構成される。表面の表面エネルギー、すなわち、疎水性は、表面に結合するヌクレオチドの親和性を決定するための因子である。いくつかの例では、基板の官能化のための方法は、(a)二酸化ケイ素を含む表面を有する基板を提供する工程、および、(b)本明細書に記載されるか、さもなければ当該技術分野で知られている適切なシラン化剤、例えば、有機官能性アルコキシシラン分子を使用して、表面をシラン処理する工程を含む。方法および官能化剤は、米国特許第5,474,796号に記載され、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0117】

いくつかの例では、基板表面は、典型的に基板表面上に存在する反応性の親水性部分を介して、基板表面にシランを連結させるのに有効な反応条件下で、シランの混合物を含有し

ている誘導体化組成物との接触によって官能化される。シラン処理は、一般に、自己組織化を介して有機官能性アルコキシシラン分子で表面を覆う。当該技術分野において現在知られているように、例えば、表面エネルギーを減少または増加させるために、様々なシロキサン官能化試薬も使用することができる。有機官能性アルコキシシランは、その有機官能基に応じて分類される。

【0118】

ポリヌクレオチド合成

【0119】

ポリヌクレオチド合成のための本開示の方法は、ホスホラミダイト化学作用を含むプロセスを含み得る。いくつかの例では、ポリヌクレオチド合成は、塩基をホスホラミダイトとカップリングすることを含む。ポリヌクレオチド合成は、カップリング条件下でホスホラミダイトの堆積によって塩基をカップリングさせることを含んでもよく、ここで、同じ塩基が随意に、1回を超えて、すなわち、二重のカップリングでホスホラミダイトと堆積する。ポリヌクレオチド合成は未反応部位のキャッピングを含んでもよい。いくつかの例では、キャッピングは随意である。ポリヌクレオチド合成は、酸化、または、酸化工程あるいは複数の酸化工程を含んでもよい。ポリヌクレオチド合成は、脱ブロック化、脱トリチル化、および硫化を含んでもよい。いくつかの例では、ポリヌクレオチド合成は、酸化または硫化のいずれかを含む。いくつかの例では、ポリヌクレオチド合成反応中の1つの工程または各々の工程間で、装置は、例えば、テトラゾールまたはアセトニトリルを使用して洗浄される。ホスホラミダイト合成方法における任意の1工程に対する時間枠は、約2分、1分、50秒、40秒、30秒、20秒、および10秒未満であり得る。

【0120】

ホスホラミダイト方法を使用するポリヌクレオチド合成は、亜リン酸トリエステル結合の形成のために成長しているポリヌクレオチド鎖へのホスホラミダイトビルディングブロック（例えば、ヌクレオシドホスホラミダイト）のその後の付加を含んでもよい。ホスホラミダイトポリヌクレオチド合成は、3'方向から5'方向に進行する。ホスホラミダイトポリヌクレオチド合成は、1つの合成サイクル当たり、成長している核酸鎖への1つのヌクレオチドの制御された付加を可能にする。いくつかの例では、各合成サイクルはカップリング工程を含む。ホスホラミダイトカップリングは、活性化されたヌクレオシドホスホラミダイトと、例えば、リンカーを介して基板に結合されたヌクレオシドとの間の亜リン酸トリエステル結合の形成を含む。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトは、起動された装置に提供される。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトは、活性化因子（activator）とともに装置に提供される。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトは、基板に結合したヌクレオシドよりも、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100倍、またはそれ以上の過剰量で、装置に提供される。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトの付加は、無水環境において、例えば、無水アセトニトリルにおいて実行される。ヌクレオシドホスホラミダイトの付加に続いて、装置は随意に洗浄される。いくつかの例では、カップリング工程は、随意に、基板へのヌクレオシドホスホラミダイトの付加の間の洗浄工程とともに、さらに1回以上繰り返される。いくつかの例では、本明細書で使用されるポリヌクレオチド合成方法は、1、2、3、またはそれ以上の順次的なカップリング工程を含む。カップリング前に、多くの場合において、装置に結合されたヌクレオシドは、保護基の除去によって脱保護され、ここで、保護基は重合を防ぐように機能する。一般的な保護基は、4,4'-ジメトキシトリチル（DMT）である。

【0121】

カップリングの後、ホスホラミダイトポリヌクレオチド合成方法は、随意にキャッピング工程を含む。キャッピング工程では、成長しているポリヌクレオチドは、キャッピング剤で処理される。キャッピング工程は、さらなる鎖伸長からのカップリング後に未反応の基板に結合した5'-OH基をブロックするのに有用であり、これによって、内部塩基の欠

10

20

30

40

50

失を伴うポリヌクレオチドの形成を防ぐ。さらに、1 H-テトラゾールで活性化されたホスホラミダイトは、わずかな範囲で、グアノシンのO6位置と反応し得る。理論に縛られることなく、I₂/水による酸化で、この副産物は、おそらくO6-N7遊走を介して、脱プリン化を受けることもある。脱プリン部位は、結局、ポリヌクレオチドの最終的な脱保護の間に切断され、したがって、完全長の産物の収率を低下させる。O6修飾は、I₂/水での酸化前にキャッピング試薬による処理によって除去され得る。いくつかの例では、ポリヌクレオチド合成の間にキャッピング工程を含めることで、キャッピングのない合成と比較して、エラー率は低下する。一例として、キャッピング工程は、無水酢酸と1-メチルイミダゾールとの混合物で、基板に結合したポリヌクレオチドを処理することを含む。キャッピング工程後に、装置は随意に洗浄される。

10

【0122】

いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトの付加後に、および随意にキャッピングと1以上の洗浄工程後に、装置に結合した成長している核酸は酸化される。酸化工程は、亜リン酸トリエステルが自然発生のリン酸ジエステルヌクレオシド間結合の保護された前駆体である、四配位リン酸トリエステルへと酸化される。いくつかの例では、成長しているポリヌクレオチドの酸化は、随意に弱塩基（例えば、ピリジン、ルチジン、コリジン）の存在下で、ヨウ素および水による処理によって達成される。酸化は、例えば、tert-ブチルヒドロペルオキシドまたは(1S)-(+)-(10-カンファースルホニル)-オキサジリジン(CSO)を使用して、無水条件下で実行され得る。いくつかの方法では、キャッピング工程は、酸化に続いて実行される。持続する可能性のある酸化からの残留水がその後のカップリングを阻害する可能性があるため、第2のキャッピング工程は装置の乾燥を可能にする。酸化後に、装置と成長しているポリヌクレオチドは、随意に洗浄される。いくつかの例では、酸化の工程は、ポリヌクレオチドホスホロチオエートを得るために硫化工程に置き換えられ、ここで、いかなるキャッピング工程も硫化後に実行することができる。限定されないが、3-(ジメチルアミノメチリデン)アミノ-3H-1,2,4-ジチアゾール-3-チオン、DDTT、3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド(Beaucage試薬としても知られている)、およびN,N,N'-テトラエチルチウラムジスルフィド(TETD)を含む多くの試薬が、効率的な硫黄移動を行うことができる。

20

【0123】

ヌクレオシド取り込みのその後のサイクルがカップリングを介して生じるようにするために、装置に結合した成長しているポリヌクレオチドの保護された5'末端は除去され、一次ヒドロキシル基が次のヌクレオシドホスホラミダイトと反応する。いくつかの例では、保護基はDMTであり、脱ブロック化が、ジクロロメタン中でトリクロロ酢酸とともに生じる。長時間にわたる、または推奨された酸の溶液よりも強力な脱トリチル化を行うことで、固体支持体に結合したポリヌクレオチドの脱プリン化を増大させ、ゆえに、望ましい完全長の産物の収率を低下させることがある。本明細書に記載される本開示の方法および組成物は、望ましくない脱プリン化反応を制限する制御された脱ブロック化条件を提供する。いくつかの例では、装置に結合したポリヌクレオチドは、脱ブロック化後に洗浄される。いくつかの例では、脱ブロック化後の効率的な洗浄は、低いエラー率を有する合成されたポリヌクレオチドに寄与する。

30

40

【0124】

ポリヌクレオチドの合成のための方法は、典型的には以下の工程の一連の繰り返し(iterating sequence)を含む：活性化された表面、リンカー、または以前に脱保護された単量体と結合するために、保護された単量体の活発に官能化された表面（例えば、座）への適用、後に適用される保護された単量体と反応するような、適用された単量体の脱保護、および、結合のための別の保護された単量体の適用。1以上の中間工程は、酸化または硫化を含む。いくつかの例では、1以上の洗浄工程は、工程の1つまたはすべてに先行するかまたはその後に続く。

【0125】

50

ホスホラミダイトベースのポリヌクレオチド合成のための方法は、一連の化学的な工程を含む。いくつかの例では、合成方法の1以上の工程は、試薬のサイクリングを含み、ここで、方法の1以上の工程は、工程に有用な試薬の装置への適用を含む。例えば、試薬は、一連の液体堆積および真空乾燥の工程によって循環する。ウェル、マイクロウェル、チャネルなどの三次元の特徴を含む基板のために、試薬は、随意にウェルおよび／またはチャネルを介して装置の1つ以上の領域を通過する。

【0126】

本明細書に記載される方法およびシステムは、ポリヌクレオチドの合成のためのポリヌクレオチド合成装置に関する。合成は並行して行われ得る。例えば、少なくともまたはおよそ少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、10000、50000、75000、100000、またはそれ以上のポリヌクレオチドが並行して合成可能である。並行して合成され得るポリヌクレオチドの総数は、2-100000、3-50000、4-10000、5-1000、6-900、7-850、8-800、9-750、10-700、11-650、12-600、13-550、14-500、15-450、16-400、17-350、18-300、19-250、20-200、21-150、22-100、23-50、24-45、25-40、30-35の間であり得る。当業者は、並行して合成されたポリヌクレオチドの総数が、これらの値のいずれかによって制約される任意の範囲内（例えば、25-100）に含まれ得ることを認識する。並行して合成されたポリヌクレオチドの総数は、その範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内に含まれ得る。装置内で合成されたポリヌクレオチドの総モル質量またはポリヌクレオチドの各々のモル質量は、少なくともまたは少なくとも約10、20、30、40、50、100、250、500、750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、25000、50000、75000、100000ピコモル、またはそれ以上であり得る。装置内のポリヌクレオチドの各々の長さまたはポリヌクレオチドの平均長は、少なくともまたは少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、300、400、500ヌクレオチド、またはそれ以上であり得る。装置内のポリヌクレオチドの各々の長さまたはポリヌクレオチドの平均長は、最大でまたは最大で約500、400、300、200、150、100、50、45、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10ヌクレオチド、またはそれ以下であり得る。装置内のポリヌクレオチドの各々の長さまたはポリヌクレオチドの平均長は、10-500、9-400、11-300、12-200、13-150、14-100、15-50、16-45、17-40、18-35、19-25の間であり得る。当業者は、装置内のポリヌクレオチドの各々の長さまたはポリヌクレオチドの平均長が、これらの値のいずれかによって制約される任意の範囲内（例えば、100-300）に含まれ得ることを認識する。装置内のポリヌクレオチドの各々の長さまたはポリヌクレオチドの平均長は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内に含まれ得る。

【0127】

本明細書で提供される表面上のポリヌクレオチド合成のための方法は、高速での合成を可能にする。一例として、1時間あたり少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、125、150、175、200ヌクレオチド、またはそれ以上が合成される。ヌクレオチドは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウリジンのビルディングブロック、またはそれらのアナログ／修飾バージョンを含む。いくつかの例にお

10

20

30

40

50

いて、ポリヌクレオチドのライブラリは基板上で並行して合成される。例えば、約または少なくとも約100、1,000、10,000、30,000、75,000、100,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、または5,000,000の分解された座を含む装置は、少なくとも同じ数の別個のポリヌクレオチドの合成を支持することができ、ここで、別個の配列をコードするポリヌクレオチドは分解された座で合成される。いくつかの例において、ポリヌクレオチドのライブラリは、約3か月、2か月、1か月、3週、15日、14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日、2日、24時間未満で、本明細書に記載される低いエラー率で装置上に合成される。いくつかの例では、本明細書に記載される基板および方法を用いて低いエラー率で合成されるポリヌクレオチドライ

10

【0128】

いくつかの例において、本明細書に記載される方法は、複数のコドン部位で異なる変異体核酸を含む、核酸のライブラリの生成をもたらす。いくつかの例において、核酸は、1つの部位、2つの部位、3つの部位、4つの部位、5つの部位、6つの部位、7つの部位、8つの部位、9つの部位、10の部位、11の部位、12の部位、13の部位、14の部位、15の部位、16の部位、17の部位、18の部位、19の部位、20の部位、30の部位、40の部位、50の部位、またはそれ以上の部位の変異体コドン部位を有し得る。

20

【0129】

いくつかの例では、変異体コドン部位の1以上の部位は隣接することがある。変異体コドン部位の1以上の部位は隣接しないこともあり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のコドンによって分離されることもある。

【0130】

いくつかの例において、核酸は変異体コドン部位の複数の部位を含むことがあり、ここで、変異体コドン部位は互いに隣接しており、変異体コドン部位のストレッチを形成する。いくつかの例において、核酸は変異体コドン部位の複数の部位を含んでもよく、ここで、変異体コドン部位は互いに隣接していない。いくつかの例において、核酸は変異体コドン部位の複数の部位を含んでもよく、ここで、いくつかの変異体コドン部位は互いに隣接しており、変異体コドン部位のストレッチを形成し、変異体コドン部位の一部は互いに隣接していない。

30

【0131】

図面を参照すると、図8は、より短い核酸からの核酸（例えば、遺伝子）の合成のための例示的なプロセスのワークフローを示す。ワークフローは通常、以下の段階に分けられる：（1）一本鎖核酸ライブラリのデノボ合成、（2）より大きな断片を形成するための核酸の結合、（3）エラー補正、（4）品質管理、および（5）輸送。デノボ合成の前に、意図した核酸配列または核酸配列の群が、あらかじめ選択される。例えば、遺伝子の群が生成のためにあらかじめ選択される。

40

【0132】

いったん、生成のためにより大きな核酸が選択されると、核酸のあらかじめ決められたライブラリがデノボ合成のために設計される。高密度のポリヌクレオチドアレイを生成するための様々な適切な方法が知られている。ワークフローの例では、装置の表層が提供される。この例では、表面の化学的性質（chemistry）は、ポリヌクレオチド合成プロセスを改善するために改変される。低表面エネルギーの領域が液体を弾くように生成され、一方で高表面エネルギーの領域は液体を引き付けるように生成される。表面自体は平坦な表面の形態であってもよく、または、表面積を増加させる突起またはマイクロウェルなどの形状の変形を含んでもよい。ワークフローの例では、全体として参照により本明細書に組み込まれる国際特許出願公開WO／2015／021080で開示されるように、

50

選択された高表面エネルギー分子は、DNAの化学的性質を支援する二重の機能を果たす。

【0133】

ポリヌクレオチドアレイのインサイツ調製物は固体支持体上で生成され、並行して複数のオリゴマーを伸長させるために単一のヌクレオチド伸長プロセスを利用する。材料堆積装置などの堆積装置は、段階的な手法で試薬を放出するように設計され、複数のポリヌクレオチドが並行して、一度に1つの残基を伸長させ、それによりあらかじめ決められた核酸配列を有するオリゴマーを生成する(802)。いくつかの例では、ポリヌクレオチドはこの段階で表面から切断される。切断は、例えば、アンモニアまたはメチルアミンによる気相切断(gas cleavage)を含む。

10

【0134】

生成されたポリヌクレオチドライブラリは反応チャンバに配される。この例示的なワークフローでは、反応チャンバ(「ナノリアクター」とも呼ばれる)は、シリコンでコーティングされたウェルであり、PCR試薬を含み、ポリヌクレオチドライブラリ上に下げられる(803)。ポリヌクレオチドの密閉(804)の前または後に、試薬を加えて、基板からポリヌクレオチドを放出させる。例示的なワークフローでは、ポリヌクレオチドは、ナノリアクターの密閉後に放出される(805)。いったん放出されると、一本鎖ポリヌクレオチドの断片は、DNAの完全長範囲の配列に及ぶようにハイブリダイズする。合成されたポリヌクレオチドがそれぞれ、プール中の少なくとも1つの他のポリヌクレオチドと重なる小さな部分を持つように設計されるため、部分的なハイブリダイゼーション(805)が可能である。

20

【0135】

ハイブリダイゼーション後、PCA反応が始まる。ポリメラーゼサイクル中、ポリヌクレオチドは相補的断片にアニーリングされ、ギャップはポリメラーゼにより充填される。各サイクルは、どのポリヌクレオチドが互いに見出されるかに依存して、ランダムに様々な断片の長さを増加させる。断片間の相補性は、完全な大きなスパンの二本鎖DNAの形成を可能にする(806)。

【0136】

PCAが完了した後、ナノリアクターは装置から分離され(807)、PCRのためのプライマーを持つ装置との相互作用のために位置付けられる(808)。密閉後、ナノリアクターはPCRにかけられ(809)、より大きな核酸が増幅される。PCRの後(810)、ナノチャンバが開放され(811)、エラー補正試薬が加えられ(812)、チャンバは密閉され(813)、エラー補正反応が生じて、二本鎖PCR増幅産物からの相補性が乏しいミスマッチ塩基対および／または鎖を取り除く(814)。ナノリアクターが開放されて、分離される(815)。エラー補正された産物は次に、PCRおよび分子バーコーディングなどの付加的なプロセッシング工程にさらされ、その後、包装されて(822)、輸送される(823)。

30

【0137】

いくつかの例では、品質管理措置が取られる。エラー補正の後、品質管理工程は、例えば、エラー補正した産物の増幅のための配列決定プライマーを有するウェーハとの相互作用(816)、エラー補正した増幅産物を含むチャンバにウェーハを密閉すること(817)、および、増幅の追加の回を行うこと(818)を含む。ナノリアクターは開放され(819)、産物はプールされ(820)、配列決定される(821)。許容可能な品質管理の決定がなされた後、包装された産物(822)は輸送を承認される(823)。

40

【0138】

いくつかの例では、図8のものなどのワークフローによって生成される核酸は、本明細書に開示される重複プライマーを使用した突然変異誘発にさらされる。いくつかの例では、プライマーのライブラリは、固体支持体上でのインサイツの調製により生成され、並行して複数のオリゴマーを伸長させるための単一のヌクレオチド伸長プロセスを利用する。材料堆積装置などの堆積装置は、段階的な手法で試薬を放出するように設計され、複数のポ

50

リヌクレオチドが並行して、一度に1つの残基を伸長させ、それによりあらかじめ決められた核酸配列を有するオリゴマーを生成する（802）。

【0139】

コンピュータシステム

【0140】

本明細書に記載されるシステムのいずれかがコンピュータに操作可能に接続され、局所的にまたは遠隔的にコンピュータを介して自動化されてもよい。様々な例では、本開示の方法およびシステムはさらに、コンピュータシステム上のソフトウェアプログラム、およびその使用を含んでもよい。したがって、材料堆積装置の動作、分配行為、および減圧作動を編成および同期するなどの、分配／減圧／再充填の機能の同期のためのコンピュータ制御は、本開示の範囲内である。コンピュータシステムは、ユーザーに指定された塩基配列と材料堆積装置の位置との間に干渉するようにプログラムされ、基板の指定された領域に正しい試薬を送達する。

10

【0141】

図9で例証されるコンピュータシステム（900）は、媒体（911）、および／または固定された媒体（912）を有するサーバー（909）に随意に接続可能なネットワークポート（905）からの命令を読み取ることができる論理的な装置として理解されてもよい。図9に示されるものなどのシステムは、CPU（901）、ディスクドライブ（903）、キーボード（915）および／またはマウス（916）などの随意の入力装置、ならびに随意のモニター（907）を含んでもよい。データ通信は指示された通信媒体を介して局所位置または遠隔位置のサーバーまで達成され得る。通信媒体は、データを送信および／または受信する任意の手段を含むことができる。例えば、通信媒体は、ネットワーク接続、無線接続、またはインターネット接続であってもよい。そのような接続は、ワールド・ワイド・ウェブ上での通信を提供することができる。本開示に関するデータは、図9に例示されるように当事者（922）による受領および／または検討のためにそのようなネットワークまたは接続によって伝達され得ることが想定される。

20

【0142】

図10は、本開示の例と関連して使用可能なコンピュータシステム（1000）の第1の例のアーキテクチャを示すブロック図である。図10に表されるように、例示的なコンピュータシステムは、命令を処理するためのプロセッサ（1002）を含んでもよい。プロセッサの非限定的な例としては、Intel Xeon（商標）プロセッサ、AMD Opteron（商標）プロセッサ、Samsung 32-bit RISC ARM 1176JZ（F）-S v1.0（商標）プロセッサ、ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100（商標）プロセッサ、ARM Cortex-A8 Apple A4（商標）プロセッサ、Marvell PXA 930（商標）プロセッサ、または機能的に同等なプロセッサが挙げられる。実行の複数のスレッドが並列処理に使用可能である。いくつかの例では、複数のプロセッサ、または複数のコアを持つプロセッサも、単一のコンピュータシステム中であらうと、クラスターの中であらうと、または、複数のコンピュータ、携帯電話、および／または個人用携帯情報端末装置を含むネットワーク上のシステムにわたって分布されていても、使用可能である。

30

40

【0143】

図10に示されるように、高速キャッシュ（1004）は、プロセッサ（1002）に接続するか、または組み込まれることで、プロセッサ（1002）により近年使用されてきたまたは頻繁に使用されている命令またはデータのための高速メモリを提供することができる。プロセッサ（1002）は、プロセッサバス（1008）によりノースブリッジ（1006）に接続される。ノースブリッジ（1006）は、メモリバス（1012）によりランダムアクセスメモリ（RAM）（1010）に接続され、プロセッサ（1002）によりRAM（1010）へのアクセスを管理する。ノースブリッジ（1006）は、チップセットバス（1016）によりサウスブリッジ（1014）にも接続される。サウスブリッジ（1014）は次に、周辺バス（1018）に接続される。周辺バスは、例えば

50

、P C I、P C I-X、P C I E x p r e s s、または他の周辺バスであってもよい。ノースブリッジおよびサウスブリッジはしばしば、プロセッサチップセットと称され、周辺バス（１０１８）上でプロセッサと、R A Mと、周辺コンポーネントとの間のデータ転送を管理する。いくつかの代替的なアーキテクチャでは、ノースブリッジの機能性は、別のノースブリッジチップを使用する代わりにプロセッサに組み込まれることができる。いくつかの例では、システム（１０００）は、周辺バス（１０１８）に取り付けられたアクセラレータカード（１０２２）を含むことができる。アクセラレータは、フィールドプログラマブルゲートアレイ（F P G A）または特定の処理を促進するための他のハードウェアを含んでもよい。例えば、アクセラレータは、適応データの再構成のために、または拡張された設定処理に使用される代数式を評価するために使用され得る。

10

【０１４４】

ソフトウェアとデータは、外部記憶装置（１０２４）に記憶され、プロセッサにより使用されるR A M（１０１０）および／またはキャッシュ（１００４）へとロードすることができる。システム（１０００）は、システムリソースの管理のためのオペレーティングシステムを含み、オペレーティングシステムの非限定的な例としては、L i n u x（登録商標）、W i n d o w s（商標）、M A C O S（商標）、B l a c k B e r r y O S（商標）、i O S（商標）、および他の機能的に同等なO S、同様に、本開示の例に従ってデータの記憶と最適化を管理するためのオペレーティングシステム上で実行するアプリケーションソフトウェアが挙げられる。この例では、システム（１０００）はさらに、ネットワーク接続ストレージ（N A S）などの外部記憶装置、および分散並列処理に使用することができ他のコンピュータシステムにネットワークインターフェースを提供するために、周辺バスに接続されるネットワークインターフェースカード（N I C）（１０２０）および（１０２１）を含む。

20

【０１４５】

図１１は、複数のコンピュータシステム（１１０２ a）および（１１０２ b）、複数の携帯電話および個人用携帯情報端末（１１０２ c）、ならびにネットワーク接続ストレージ（N A S）（１１０４ a）および（１１０４ b）を備えたネットワーク（１１００）を示す略図である。例では、システム（１１０２ a）、（１１０２ b）、および（１１０２ c）は、データ記憶を管理し、ネットワーク接続ストレージ（N A S）（１１０４ a）および（１１０４ b）に記憶されたデータに対するデータアクセスを最適化することができる。数学モデルがこのデータに対して使用可能であり、コンピュータシステム（１１０２ a）および（１１０２ b）、ならびに携帯電話および個人用携帯情報端末システム（１１０２ c）にわたって分散並列処理を使用して評価可能である。コンピュータシステム（１１０２ a）および（１１０２ b）、ならびに携帯電話および個人用携帯情報端末システム（１１０２ c）は、ネットワーク接続ストレージ（N A S）（１１０４ a）および（１１０４ b）に記憶されたデータの適応データ再構築に対して並列処理を提供することもできる。図１１は一例のみを示しており、様々な他のコンピュータのアーキテクチャおよびシステムは、本開示の様々な例と共に使用され得る。例えば、ブレードサーバーは並列処理を提供するために使用することができる。プロセッサブレードは、並列処理を提供するためにバックプレーンを介して接続可能である。ストレージも、バックプレーンに接続することができるか、または別のネットワークインターフェースを介してネットワーク接続ストレージ（N A S）として接続可能である。いくつかの例では、プロセッサは、別のメモリ空間を維持し、ネットワークインターフェース、バックプレーン、または他のプロセッサによる並列処理のための他のコネクタを通じてデータを伝達することができる。他の例では、プロセッサのいくつかまたはすべてが、共有仮想アドレスメモリ空間を使用することができる。

30

40

【０１４６】

図１２は、例に従って共有仮想アドレスメモリ空間を使用するマルチプロセッサコンピュータシステムのブロック図である。上記システムは、共有メモリサブシステム（１２０４）にアクセス可能な複数のプロセッサ（１２０２ a-f）を含む。上記システムは、メモ

50

リサブシステム（１２０４）に複数のプログラマブルハードウェアメモリアルゴリズムプロセッサ（MAP）（１２０６a-f）を組み込む。各MAP（１２０６a-f）は、メモリ（１２０８a-f）および１以上のフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）（１２１０a-f）を含んでもよい。MAPは設定可能な機能ユニットを提供し、特定のアルゴリズムまたはアルゴリズムの一部は、各プロセッサと密接に協働して処理を行うためにFPGA（１２１０a-f）に提供可能である。例えば、MAPは、データモデルに関する代数式を評価し、かつ例における適応データの再構築を行うために使用することができる。この例では、各MAPは、このような目的のためにプロセッサすべてによって世界中からアクセス可能である。１つの構成では、各MAPは、関連するメモリ（１２０８a-f）にアクセスするためにダイレクトメモリアクセス（DMA）を使用することができ、それにより、各マイクロプロセッサ（１２０２a-f）から独立して、かつこれらから非同期的に、タスクを実行することができる。この構成では、MAPは、アルゴリズムのパイプライン処理（pipelining）および並列実行のために別のMAPに直接結果を供給することができる。

10

【０１４７】

上記のコンピュータのアーキテクチャおよびシステムは単なる例に過ぎず、様々な他のコンピュータ、携帯電話、および、個人用携帯情報端末のアーキテクチャおよびシステムは、一般的なプロセッサ、コプロセッサ、FPGA、および他のプログラマブルロジックデバイス、システムオンチップ（SOC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、ならびに他の処理要素と論理素子の任意の組み合わせを使用するシステムを含む例と共に使用することができる。いくつかの例では、コンピュータシステムのすべてまたは一部は、ソフトウェアまたはハードウェアに実装することができる。様々なデータ記憶媒体が、例えば、ランダムアクセスメモリ、ハードドライブ、フラッシュメモリ、テープドライブ、ディスクアレイ、ネットワーク接続ストレージ（NAS）、および他のローカルまたは分散データ記憶装置およびシステムを含む例と共に使用することができる。

20

【０１４８】

例では、コンピュータシステムは、上記のまたは他のコンピュータのアーキテクチャおよびシステムのいずれかで実行されるソフトウェアモジュールを使用して実施することができる。他の例では、システムの機能は、ファームウェア、図１０で言及されるようなフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）などのプログラマブルロジックデバイス、システムオンチップ（SOC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、または他の処理要素および論理素子において、部分的または完全に実装することができる。例えば、セットプロセッサおよびオペティマイザは、図１０に示されるアクセラレータカード（１０２２）などのハードウェアアクセラレータカードの使用によるハードウェアアクセラレーションで実施され得る。

30

【０１４９】

以下の実施例は、当業者に対し本明細書に開示される実施形態の原理および実践をより明白に示すために説明され、任意の請求された実施形態の範囲を制限するものとして解釈されるものではない。他に明示されない限り、全ての部分およびパーセンテージは重量基準である。

40

【実施例】

【０１５０】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を示すために与えられるものであり、任意の様式で本開示を制限することを目的としていない。本明細書に記載される方法とともに、本実施例は、好ましい実施形態を示すとともに典型的なものであり、本開示の範囲を限定するものとは意図されない。請求項の範囲によって定義される本開示の精神内に包含される本明細書での変化とその他の使用は当業者に想到される。

【０１５１】

実施例１：装置表面の官能化

【０１５２】

50

ポリヌクレオチドのライブラリの付着および合成を助けるために、装置を官能化した。装置表面をまず、20分間、90%の H_2SO_4 と10%の H_2O_2 を含むピラニア溶液を使用して湿式洗浄した。装置を、DI水を含む様々なビーカーの中ですすぎ、5分間DI水のグーズネック形状の蛇口の下で保持して、 N_2 で乾燥させた。装置をその後、5分間、 NH_4OH (1:100; 3mL:300mL) に浸し、ハンドガン (hand gun) を使用してDI水ですすぎ、DI水を含む3つの連続するビーカーの中で各々1分間浸し、その後、ハンドガンを使用してDI水で再びすすいだ。その後、装置表面を O_2 にさらすことにより装置をプラズマ洗浄した。SAMCO PC-300機器を使用して、下流モードで1分間、250ワットで O_2 をプラズマエッチングした。

【0153】

以下のパラメータ：0.5~1トール、60分、70℃、135℃の気化器を持つYES-1224P蒸着オープンシステムを使用して、洗浄した装置表面を、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミドを含む溶液で能動的に官能化した。Brewer Science 200Xスピンコータを使用して、装置表面をレジストコートした (resist coated)。SPR (商標) 3612フォトレジストを、40秒間2500rpmで装置上でスピンコートした。装置を、Brewerホットプレート上で90℃で30分間プリベイクした。Karl Suss MA6マスクアライナー機器を使用して、装置をフォトリソグラフィーにさらした。装置を2.2秒間露光し、MSF 26Aの中で1分間現像させた (developed)。残りの現像剤 (developer) をハンドガンですすぎ、装置を5分間水に浸した。装置をオーブン内で100℃で30分間ベイクし、その後、Nikon L200を使用してリソグラフィーの欠損に対する目視検査を行った。デスカム処理を使用し、SAMCO PC-300機器を用いて残りのレジストを取り除き、1分間250ワットで O_2 プラズマエッチングした。

【0154】

装置表面を、10 μ Lの軽油と混合した100 μ Lのペルフルオロオクチルトリクロロシラン溶液で受動的に官能化した。装置をチャンバに配し、10分間ポンプでくみ出し、その後、バルブを閉じてポンプを止め、10分間放置した。チャンバを通気した。最大パワー (Crestシステム上で9) での超音波処理によって70℃で500mLのNMPで5分間、2回の浸漬を行うことにより、装置をレジスト剥離した。その後、最大パワーでの超音波処理により室温で500mLのイソプロパノール中に5分間、装置を浸した。装置を、300mLの200プルーフエタノール (200 proof ethanol) に漬けて、 N_2 で送風乾燥した。官能化した表面を活性化させ、ポリゴヌクレオチド合成のための支持体として機能させた。

【0155】

実施例2：オリゴヌクレオチド合成装置上での50merの配列の合成

【0156】

二次元オリゴヌクレオチド合成装置をフローセルに組み入れ、これをフローセル (Applied Biosystems (ABI394 DNA Synthesizer)) に接続させた。N-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミド (Gelest) で二次元オリゴヌクレオチド合成装置を均一に官能化し、これを使用して、本明細書に記載されるポリヌクレオチド合成方法を用いて50bpの例示的なポリヌクレオチド (「50merのポリヌクレオチド」) を合成した。

【0157】

50merの配列は記載された通りであった。5' AGACAATCAACCAATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCAT##TTTTTTT3'、ここで、#は、チミジン-スクシニルヘキサミドCEDホスホラミダイト (ChemGenesのCLP-2244) を表し、これは、脱保護中に表面からのオリゴの放出を可能にする切断可能なリンカーである。

【0158】

10

20

30

40

50

表 2 のプロトコルおよび A B I シンセサイザーに従い、標準 D N A 合成化学（カップリング、キャッピング、酸化、および脱ブロック化）を使用して合成を行った。

【 0 1 5 9 】

【表 2 - 1】

表 2: 合成プロトコル

表 2		
一般的な DNA 合成プロセス名称	プロセス工程	時間 (秒)
洗浄 (アセトニトリル 洗浄フロー)	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	23
	N2 で系をさっと流す	4
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
DNA 塩基付加 (ホスホラミダイト + 活性化因子フロー)	活性化因子でマニホールドをさっと洗い流す	2
	活性化因子をフローセルへ	6
	活性化因子+ホスホラミダイトをフローセルへ	6
	活性化因子をフローセルへ	0.5
	活性化因子+ホスホラミダイトをフローセルへ	5
	活性化因子をフローセルへ	0.5
	活性化因子+ホスホラミダイトをフローセルへ	5
	活性化因子をフローセルへ	0.5
	活性化因子+ホスホラミダイトをフローセルへ	5
	25 秒間のインキュベーション	25
洗浄 (アセトニトリル 洗浄フロー)	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	15
	N2 で系をさっと流す	4
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
DNA 塩基付加 (ホスホラミダイト + 活性化因子フロー)	活性化因子でマニホールドをさっと洗い流す	2
	活性化因子をフローセルへ	5
	活性化因子+ホスホラミダイトをフローセルへ	18

10

20

30

40

【 0 1 6 0 】

50

【表 2 - 2】

一般的な DNA 合成プロセス名称	表 2	
	プロセス工程	時間 (秒)
	25 秒間のインキュベーション	25
洗浄 (アセトニトリル 洗浄フロー)	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	15
	N2 で系をさっと流す	4
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
キャッピング (CapA+B, 1:1, フロー)	CapA+B をフローセルへ	15
洗浄 (アセトニトリル 洗浄フロー)	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	15
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
酸化 (酸化剤 フロー)	酸化剤をフローセルへ	18
洗浄 (アセトニトリル 洗浄フロー)	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	N2 で系をさっと流す	4
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	15
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	15
	N2 で系をさっと流す	4
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	23
	N2 で系をさっと流す	4
脱ブロック化 (脱ブロック化フロー)	フローセルに対して脱ブロック化する	36
洗浄 (アセトニトリル 洗浄フロー)	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4

10

20

30

40

【0161】

50

【表 2 - 3】

一般的な DNA 合成プロセス名称	表 2	
	プロセス工程	時間 (秒)
	N2 で系をさっと流す	4
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4
	アセトニトリルをフローセルへ	18
	N2 で系をさっと流す	4.13
	アセトニトリルで系をさっと洗い流す	4.13
	アセトニトリルをフローセルへ	15

10

20

【0162】

ホスホラミダイト／活性化因子の組み合わせを、フローセルを介するバルク試薬の送達と同様に送達した。環境が時間全体にわたって試薬により「湿った」ままであるときには、いかなる乾燥工程も行わなかった。

30

【0163】

フローリストリクターを ABI 394 シンセサイザーから取り除き、より速い流れを可能した。フローリストリクターなしで、アミダイト (ACN 中で 0.1 M)、活性化因子 (ACN 中で 0.25 M のベンゾイルチオテトラゾール (「BT T」; Glen Research の 30-3070-xx))、および Ox (20% のピリジン、10% の水、および 70% の THF 中の 0.02 M の I2) の流量は、およそ ~100 uL / 秒、アセトニトリル (「ACN」) およびキャッピング試薬 (Cap A と Cap B の 1:1 の混合物、ここで、Cap A は THF / ピリジン中の無水酢酸であり、Cap B は THF 中の 16% の 1-メチルイミダゾール (methy limidizole)) についてはおよそ ~200 uL / 秒、および、Deblock (トルエン中の 3% のジクロロ酢酸) についてはおよそ ~300 uL / 秒 (フローリストリクターで全ての試薬に対し ~50 uL / 秒と比較して) であった。酸化剤 (Oxidizer) を完全に押し出す時間を観察し、化学フロー時間のタイミングを適宜調整し、余分な ACN 洗浄を異なる化学物質間に導入した。ポリヌクレオチド合成後、75 psi で一晩、ガス状のアンモニア中でチップを脱保護した。表面に水を 5 滴加えて、ポリヌクレオチドを再生させた。その後、回収したポリヌクレオチドを、BioAnalyzer 小型 RNA チップ上で分析した。

40

【0164】

実施例 3: オリゴヌクレオチド合成装置上での 100mer 配列の合成

【0165】

50mer の配列の合成について実施例 2 に記載されるのと同じプロセスを、100mer

50

r のポリヌクレオチド（「100mer のポリヌクレオチド」；5' CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTGCTGTCCACCAAGTCATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGA GAACCCCGCAT##TTTTTTTTTTT3'、ここで、#は、2つの異なるシリコンチップ上のチミジン-スクシニルヘキサミドCEDホスホラミダイト（ChemGenesのCLP-2244）を表し、第1のシリコンチップはN-（3-トリエトキシシリルプロピル）-4-ヒドロキシブチルアミドで均一に官能化され、第2のシリコンチップは11-アセトキシウンデシルトリエトキシシランとn-デシルトリエトキシシランの5/95の混合物で官能化された）に使用し、表面から抽出されたポリヌクレオチドを、BioAnalyzer機器で分析した。

10

【0166】

以下の熱サイクルプログラムを使用して、50 uLのPCR混合物（25 uLのNEB Q5 mastermix、2.5 uLの10 uMフォワードプライマー、2.5 uLの10 uMリバースプライマー、表面から抽出した1 uLのポリヌクレオチド、および最大50 uLの水）の中で、フォワードプライマー（5' ATGCGGGGTTCTCATCATC3'）およびリバースプライマー（5' CGGGATCCTTATCGTCATCG3'）を使用して、2つのチップからの10の試料すべてをさらに増幅した：

98℃、30秒

98℃、10秒；63℃、10秒；72℃、10秒；12のサイクルを繰り返す

72℃、2分

20

【0167】

PCR産物もBioAnalyzer上で実行され、100merの位置で鋭いピークを実証した。次に、PCR増幅試料をクローン化し、サンガーシーケンシングを行った。表3は、チップ1からのスポット1-5から得た試料、およびチップ2からのスポット6-10から得た試料に対するサンガーシーケンシングから生じる結果を要約する。

【0168】

【表3】

表 3: シーケンシング結果

スポット	エラー率	サイクル効率
1	1/763 bp	99.87%
2	1/824 bp	99.88%
3	1/780 bp	99.87%
4	1/429 bp	99.77%
5	1/1525 bp	99.93%
6	1/1615 bp	99.94%
7	1/531 bp	99.81%
8	1/1769 bp	99.94%
9	1/854 bp	99.88%
10	1/1451 bp	99.93%

30

40

【0169】

ゆえに、高品質および高均一性の合成ポリヌクレオチドを、異なる界面化学的性質を持つ2つのチップ上で繰り返した。全体的に見て、配列決定された100merの89%は、エラーなく、262のうち233に対応する、完全な配列であった。

50

【 0 1 7 0 】

表 4 は、スポット 1 - 1 0 からのポリヌクレオチド試料から得た配列に対するエラー特性を要約している。

【 0 1 7 1 】

【表 4】

表 4: エラー特性

試料 ID/ スポット no.	OSA_0 046/1	OSA_0 047/2	OSA_0 048/3	OSA_0 049/4	OSA_0 050/5	OSA_0 051/6	OSA_0 052/7	OSA_0 053/8	OSA_0 054/9	OSA_00 55/10
総配列	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
シーケン シング品 質	28 の 25	27 の 27	30 の 26	23 の 21	26 の 25	30 の 29	31 の 27	31 の 29	29 の 28	28 の 25
オリゴ品 質	25 の 23	27 の 25	26 の 22	21 の 18	25 の 24	29 の 25	27 の 22	29 の 28	28 の 26	25 の 20
ROI マッ チ数	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI 突然 変異	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI 多塩 基欠失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 短い 挿入	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 一塩 基欠失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
広範な欠 失数	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
突然変異: G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
突然変異: T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ROI エラ ー数	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
ROI エラ ー率	Err: 834 中 ~1	Err: 1350 中 ~1	Err: 1282 中 ~1	Err: 708 中 ~1	Err: 2500 中 ~1	Err: 2667 中 ~1	Err: 876 中 ~1	Err: 2900 中 ~1	Err: 1400 中 ~1	Err: 2349 中 ~1
ROI マイ ナスプラ イマーエ ラー率	MP Err: 763 中 ~1	MP Err: 824 中 ~1	MP Err: 780 中 ~1	MP Err: 429 中 ~1	MP Err: 1525 中 ~1	MP Err: 1615 中 ~1	MP Err: 531 中 ~1	MP Err: 1769 中 ~1	MP Err: 854 中 ~1	MP Err: 1451 中 ~1

10

20

30

40

【 0 1 7 2 】

実施例 4 : 抗体最適化

【 0 1 7 3 】

親配列から生成されたライブラリ

【 0 1 7 4 】

P D - 1 を標的とする抗体配列は、1 2 の個体からの突然変異を含むライブラリをインシリコで生成することにより設計された。重鎖と軽鎖の突然変異空間は、N G S データベ

50

スを生成するために、親配列および最も近い生殖系列配列から導き出された。NGSデータベースは、親の参照配列または生殖系列配列と比較して、突然変異を含む軽鎖CDR1-3および重鎖CDR1-3の配列で構成される。すべてのCDR配列は、NGSデータベースから2以上の個体で表現されていた。入力配列を図3Aに示す。ライブラリは、 5.9×10^7 の様々な重鎖、および 2.9×10^6 の軽鎖を含んでいた(図3B)。

【0175】

ビーズベースの選択

【0176】

5回の選択のために、C末端ビオチン化PD-1抗原をストレプトアビジンコートした磁気ビーズに結合させた。ビーズ結合変異体を各回の間に枯渇させた。選択のストリンジエンシーは個々のその後の回で増加し、濃縮比率はオンターゲット結合を追跡する。

【0177】

ELISAおよび次世代シーケンシング

【0178】

重鎖と軽鎖の組み合わせを発現する構築物を合成し、ファージディスプレイにかけることで、PD-1に対する改善した結合剤を同定した。このプールを1,000万のリードで配列決定し、40万の固有のクローンを同定した。リード長の分布は高度に均一であった(図4A)。各パニング回で、クローンの頻度と蓄積を測定した(図4Bおよび4C)。パニングは4つのストリンジエンシー条件を使用した(図4D)。高ストリンジエンシー選択により、繰り返しの選択でも同じプールの結合剤のプールが濃縮された。低ストリンジエンシー選択は、より広い範囲の低親和性結合剤を用いて、高ストリンジエンシー選択と同じクローン70個のうち44個(63%)を回収した。5回目には、scFv結合剤の大部分が濃縮された(図5A)。PD-1に対するscFvの結合を測定するELISA実験では、クローンの90%以上(68/75)がバックグラウンドの5倍の値で存在し、0.01%以上に濃縮されていた。

【0179】

3つの異なる初期選択条件で5回の選択を完了した。クローンの濃縮は、NGSによって各連続回を介して追跡された。オフターゲットまたはバックグラウンドの結合剤に対して濃縮された配列は除去される。5回目に表された約1000のクローンは母集団の0.01%以上に濃縮されていた。配列解析によれば、PD-1への結合について濃縮されたクローンの大部分(95%以上)は、異なる選択条件で均等にキャプチャーされた(図4E)。

【0180】

ハイスループットIgG特徴づけ

【0181】

クローンをExp293で一時的にトランスフェクションし、KingfisherおよびHamiltonオートメーションデッキによって精製した。収量および純度をPerkin Elmer LabChipおよび分析用HPLCで確認した。Carterra LSAシステムを使用して、170を超えるIgG変異体の結合親和性とエピトープのピニングを評価した(データは示されていない)。

【0182】

ペムプロリズマブに対応する配列(対照薬1)およびニボルマブに対応する配列(対照薬2)を有する対照薬抗体と同等または向上した親和性で結合した最適化されたIgG(データは示されていない)。図5Bに見られるように、PD-1に対するscFv結合も測定された。最適化された抗体の配列は、ペムプロリズマブに対応する配列(対照薬1)およびニボルマブに対応する配列(対照薬2)を有する対照薬抗体と比較して、生殖系列突然変異が少なかった(図6Aおよび表5A)。最適化された抗体の軽鎖は非常に多様であり、クローンの90%以上が、決して繰り返されない固有の軽鎖を含んでいた(表5B)。最適化されたIgGは、親の配列と比較して、一価結合親和性の100倍の改善を実証した。PD1-1クローンは4.52 nMのKDでPD-1に結合したが、他のいくつか

10

20

30

40

50

のクローンは10nM未満の結合親和性を示した。図6Bは、本明細書に記載される方法で最適化した後の親和性の増加を示している。これらの高親和性結合剤は、それぞれ固有のCDRH3を含んでおり、配列系統によってクラスター化されていなかった。図6C-6Dに見られるように、様々なCDR間の多様性も観察された。PD-1抗体は、野生型と比較して向上した結合親和性を示した（図6E-6Fおよび表5C）。

【0183】

【表5】

表 5A. PD-1 変異体配列

配列番号	クローン	配列
1	PD1-1	YTFSHYGISGWVSAYSGNTRYACARDATYSSGSGYW
2	PD1-15	YTFTDYGVSYTISPYSKTDYACARDADYSIGSGYW
3	PD1-91	YTFADYGISGWISAYNGNTNYACARDWDYSSGSGYW
4	PD1-2	YSFSNYGISGWVSAYSGNTNYACARDADYASGSGYW
5	PD1-7	YTFTHYGITGWISAYSGSTNYACARDADYSIGSGYW
6	PD1-75	YPFTNYGISGWISPYSGNTNYACARDFDYSSGSGYW
7	ニボルマブに対応する配列	YTFTNYMYGGINPSNGGTNFCARRDYRFDMGFDY
8	ペムプロリズマブに対応する配列	ITFSNSGMHVIWWYDGSKRYYACATNDDY
9	PD1-60	YDFSSYGISGWISAYSGNTRYACARDADYSVGSGYW
10	PD1-88	YTFNRYGISGWISAYSGNTRYACARDADYASGSGYW
11	PD1-4	YTFSTSGISGWISAYNGNTNYACARDFDYSSGSGYW
12	PD1-86	YTFDDYGISGWISAYNGNTNYACARDATYSSGSGYW
13	PD1-54	YAFSNYGISGWISPYSGNTKYACARDADYSIGSGYW
14	PD1-14	YPFTNYGISGWTSAYSGNTNYACARDFDYSSGSGYW
15	PD1-82	YRFTSYGISGWISAYNGNTNYACARDWDYSSGSGYW
16	PD1-10	YRFTSYGISGWISAYNGNTNYACARDADYASGSGYW
17	PD1-11	YTFSNYGFSGWISPYSGNTKYACARDADYSIGSGYW
18	PD1-76	YRFTSYGISGWISAYNGNTNYACARDFDYSSGSGYW
19	PD1-12	YTFNTYGVSGWISAYSGNTRYACARDFDYSSGSGYW
20	PD1-42	YTFNFGISGWISAYNGNTDYACARDMDYSSGSGYW
21	PD1-43	YTFSNYGISGWISAYSGNTKYACARDADYASGSGYW
22	PD1-17	YTFSKYGISGWISAYSGHTDYACARDFDYSSGSGYW
23	PD1-89	YSFTKYGISGWISAYSGNTRYACARDADYSIGSGYW
24	PD1-87	YTFDRYGISGWISAYSGNTRYACARDVDYSSGSGYW
25	PD1-48	YTFSHYGISGWISPYSGNTKYACARDADYWSGSGYW
26	PD1-59	YDFSSYGISGWISAYSGYTNACARDAVYSSGSGYW
27	PD1-18	YTFNNYGISGWISAYSGHTDYACARDWDYSSGSGYW
28	PD1-30	YTFNNYGVSGWVSAYSGNTNYACARDADYASGSGYW
29	PD1-23	YPFTSYGISGWISAYNGNTNYACARDVDYSSGSGYW
30	PD1-25	YSFTRYGISGWISPYSGNTKYACARDADYGS GSGYW
31	PD1-8	YTFSHYGISGWISPYSGNTKYACARDNDYSSGSGYW
32	PD1-36	YTFSSYGVSGWISAYSGSTNYACARDAVYSSGSGYW
33	PD1-50	YTFRNYGISGWTSAYNGNTNYACARDATYSSGSGYW
34	PD1-27	YPFTNYGITGWISAYNGNTNYACARDWDYSSGSGYW
35	親	YRFTSYGISGWISAYNGNTNYACARDADYSSGSGYW

【0184】

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 5B.

クローン	頻度	突然変異	K _D (nM)
PD1-1	0.05%	7	4.5
PD1-15	0.05%	10	7.3
PD1-91	0.09%	4	9.2
PD1-2	2.20%	6	9.8
PD1-7	0.05%	6	10.5
PD1-75	0.16%	5	11.1
PD1-60	0.00%	5	16.5
PD1-88	0.11%	6	27.5
PD1-4	0.09%	5	31.4
PD1-86	0.03%	4	42.6
PD1-54	0.00%	7	42.9
PD1-14	6.10%	5	45.9
PD1-82	0.07%	1	47
PD1-10	0.11%	1	47.4
PD1-11	0.38%	8	48.1
PD1-76	0.15%	1	52.6
PD1-12	0.03%	7	53.5
PD1-42	0.16%	6	53.6
PD1-43	0.59%	6	54.4
PD1-17	0.04%	7	60.1
PD1-89	0.10%	5	63.9
PD1-87	0.11%	6	63.9
PD1-48	0.12%	7	64.3
PD1-59	0.03%	5	65.9
PD1-18	0.21%	7	68.4
PD1-30	0.27%	7	68.8
PD1-23	0.14%	2	69.2
PD1-25	0.06%	6	76
PD1-8	0.13%	7	78.1
PD1-36	0.02%	6	84.9
PD1-50	0.09%	5	87.5
PD1-27	0.25%	4	88.6
PD1-21	0.96%	5	92
PD1-32	0.03%	5	92.2
PD1-56	0.08%	7	94.8
PD1-58	0.01%	6	96.7
PD1-51	0.35%	3	98.8
PD1-16	0.08%	1	100.8
PD1-77	0.08%	3	100.9
PD1-5	0.02%	7	101
PD1-84	0.09%	4	101.2
PD1-53	0.00%	7	102.8

10

20

30

40

【 0 1 8 5】

50

【表 6 - 2】

PD1-83	0.06%	7	105.7
PD1-13	0.57%	6	106.4
PD1-3	0.07%	6	107.3
PD1-20	0.24%	6	109.4
PD1-66	0.03%	3	118.9
PD1-80	0.04%	6	125.2
PD1-63	0.08%	5	125.8
PD1-79	0.12%	6	129.2
PD1-19	0.10%	7	129.5
PD1-22	0.21%	5	132.5
PD1-81	0.04%	5	134
PD1-46	0.12%	7	136.4
PD1-26	0.10%	7	137.5
PD1-35	0.05%	6	139.1
PD1-47	0.70%	5	139.1
PD1-9	0.30%	5	148.4
PD1-55	0.07%	7	149.3
PD1-52	0.06%	1	149.4
PD1-78	0.07%	5	152
PD1-71	0.73%	7	160.9
PD1-64	0.10%	7	166.9
PD1-73	0.11%	4	170.5
PD1-67	0.03%	6	171.5
PD1-68	0.07%	6	173.2
PD1-33	0.10%	3	173.6
PD1-90	0.09%	7	174.3
PD1-72	0.18%	7	188.1
PD1-24	1.10%	6	189.8
PD1-31	0.03%	5	194.5
PD1-61	0.06%	4	194.5
PD1-37	0.13%	6	198.6
PD1-49	0.03%	7	201.4
PD1-69	0.43%	4	201.5
PD1-38	0.06%	6	203.6
PD1-57	0.76%	5	204.3
PD1-85	0.11%	6	209.6
PD1-44	0.17%	6	226.5
PD1-92	0.09%	8	235.8
PD1-62	0.09%	3	240.2
PD1-39	0.13%	4	240.5
PD1-45	0.11%	5	242.9
PD1-65	0.05%	4	260.6
PD1-28	0.02%	8	267
PD1-74	0.16%	6	285.7
PD1-95	0.05%	0	325.5

10

20

30

40

【 0 1 8 6 】

50

【表 7】

表 5C.

配列番号	CDRH3	Page 上清 (uL)			
		0	10	40	160
36	CARDATYSSGSGYW	0.06	0.39	0.42	0.33
37	CARDADYASGSGYW	0.06	0.3	0.37	0.34
38	CARDADYGSGSGYW	0.06	0.29	0.35	0.23
39	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.26	0.34	0.26
40	CARDADYGSGSGYW	0.06	0.3	0.3	0.3
41	CARDADYSIGSGYW	0.06	0.23	0.26	0.27
42	CARDNDYSSGSGYW	0.06	0.15	0.25	0.33
43	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.19	0.25	0.28
44	CARDADYGSGSGYW	0.06	0.15	0.24	0.23
45	CARDADYASGSGYW	0.06	0.14	0.23	0.32
46	CARDADYSIGSGYW	0.06	0.17	0.23	0.3
47	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.13	0.22	0.31
48	CARDAVYSSGSGYW	0.06	0.16	0.22	0.2
49	CARDADYASGSGYW	0.06	0.16	0.22	0.31
50	CARDWDYSSGSGYW	0.06	0.14	0.22	0.28
51	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.13	0.21	0.34
52	CARDADYSIGSGYW	0.06	0.16	0.21	0.23
53	CARDAFYSSGSGYW	0.06	0.16	0.21	0.28
54	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.13	0.21	0.34
55	CARDWDYSSGSGYW	0.06	0.12	0.2	0.16
56	CARDWDYSSGSGYW	0.06	0.13	0.19	0.26
57	CARDADYWSGSGYW	0.06	0.13	0.17	0.15
58	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.1	0.17	0.29
59	CARDNDYSSGSGYW	0.06	0.11	0.16	0.3
60	CARDWDYSSGSGYW	0.06	0.1	0.16	0.3
61	CARDWDYSSGSGYW	0.06	0.09	0.15	0.29
62	CARDVDYSSGSGYW	0.06	0.08	0.15	0.31
63	CARDADYKSGSGYW	0.06	0.09	0.14	0.14
64	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.08	0.14	0.24
65	CARDADYGSGSGYW	0.06	0.08	0.14	0.27
66	CARDALYSSGSGYW	0.06	0.09	0.14	0.2
67	CARDWDYSSGSGYW	0.06	0.08	0.13	0.26
68	CARDFDYSSGSGYW	0.06	0.08	0.13	0.25
69	CARDADYASGSGYW	0.06	0.08	0.13	0.26
70	CARDADYSSGSGYW	0.06	0.06	0.06	0.07

10

20

30

40

【0187】

機能性および開発性アッセイ

【0188】

本明細書に記載される方法で最適化されたIgGを、PD-1/PD-L1相互作用の機能阻害について試験した。図7Aは、高親和性変異体が、野生型およびニボルマブに対応する配列を有する対照薬抗PD1抗体と比較して、改善されたIC50を示したことを示す。IC50と一価結合親和性は高い相関性があった。図7Bに見られるように、最適化されたIgGは結合親和性の向上（最大72倍）を示し、機能も9.5倍増加した。ニボルマブに対応する配列を有する抗体よりも高い結合親和性と機能を持つ6つの抗体が確認

50

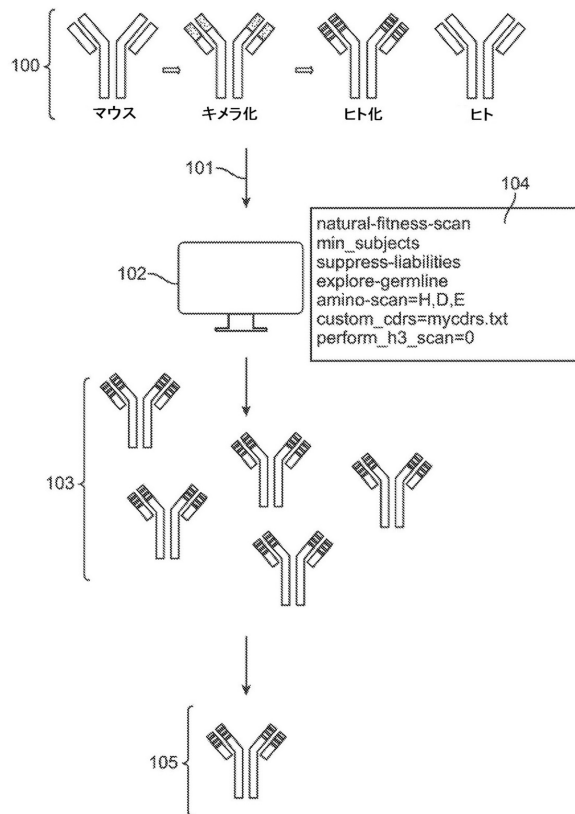
された。図 7 C に見られるように、抗 PD-1 IgG の付加により、PD-1 / PDL-1 の相互作用が阻害され、阻害シグナルが放出され、TCR の活性化と NFAT-R E を媒介とする発光 (RU) が生じた。さらに、すべての結合剤は cyno PD-1 との結合も保持していた。いくつかの高親和性 IgG は、BVP 結合 ELISA で測定された低い多特異性スコアを示した (図 7 D)。加えて、IgG は分析用 HPLC と同様に、Tm および Tagg 用の Unchained UNCLE マシンで試験された。

【0189】

本開示の好ましい実施形態が本明細書中で示され、記載されてきたが、このような実施形態はほんの一例として提供されているに過ぎないということは、当業者に明らかであろう。多くの変形、変更、および置き換えは、本開示から逸脱することなく、当業者によって
10
想到されるものである。本明細書に記載される本開示の実施形態の様々な代案が、本開示の実施に際して利用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本開示の範囲を定義するものであり、ならびに、この特許請求の範囲およびその同等物の範囲内の方法および構造はそれによって包含されることが、意図されている。

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

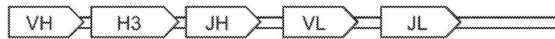
20

30

40

50

【図 2 B】



【図 3 A】

[illegible]

10

20

【図 3 B】

ソフトウェアへの抗体配列入力
ヒト生殖系列または親のフレームの使用を選択 1

IGHV1-18の自然多様性を走査、最大 SHM=3 最小被験者数=2

H1	406	liability free local to ref YRFTSYGIS
H2	114	liability free local to ref GWISAYNGNTNYA
H3	0	liability free local to ref CARDADYSSGSGYW
H1	561	liability free local to 生殖系列 IGHV1-18
H2	114	liability free local to 生殖系列 IGHV1-18

IGLV3-25の自然多様性を走査、最大 SHM=3 最小被験者数=2

L1	164 liability free local to ref SGDALPKQYAY
L2	105 liability free local to ref KDTERPS
L3	41 liability free local to ref CQSADNSITYRVF
L1	164 liability free local to 生殖系列 IGLV3-25
L2	105 liability free local to 生殖系列 IGLV3-25

IGHV-18 QVQLVQSGAEVKKPGASVKISDKA 98 WYQAPGQGLEVM 228 QKLGPRVMTTDTSTSTAHMELRSLSDSYNY 267 WGQGLTVIS
IGLV-25 SYELMQPQSVISPGQARTC 328 WYQKPGQAPLVNY 211 GPERFSGSSSTGTVLTISGVAQDEADY 42 FGGGTLTVL

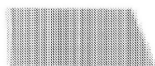
COR Diversity, Incl:

CDR-H1: 968
CDR-H2: 229
CDR-H3: 267
CDR-L1: 329
CDR-L2: 211
CDR-L3: 42

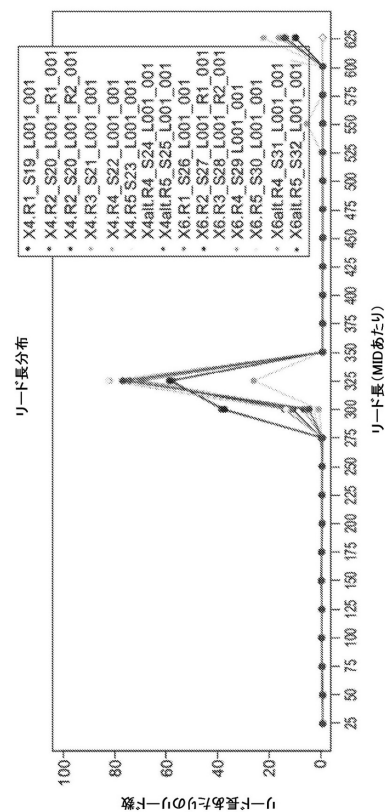
ライブラリ多様性:
重鎖: 5.9e+07
軽鎖: 2.9e+06
ライブラリ: 1.7e+14

2 オリゴプール & 銑型DNAを順序付け

③ 標的に対してライブラリを合成し、スクリーニングする



【図 4 A】

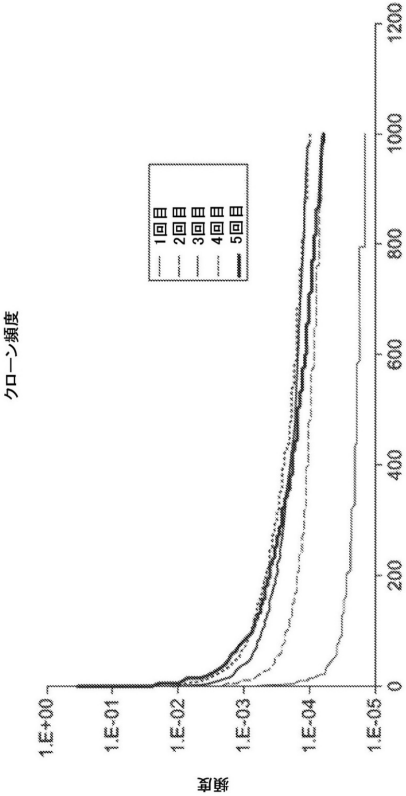


30

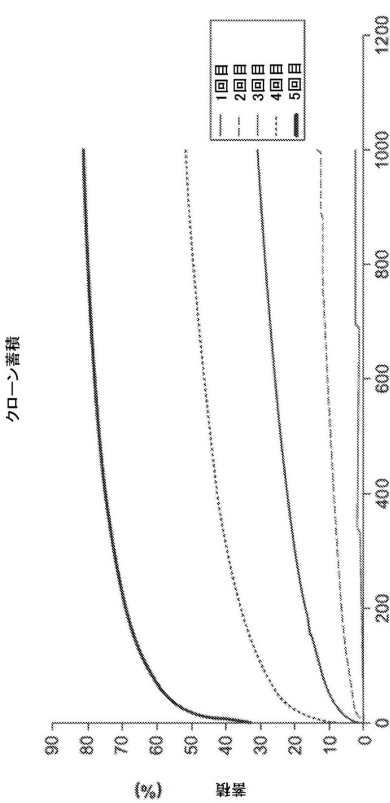
40

50

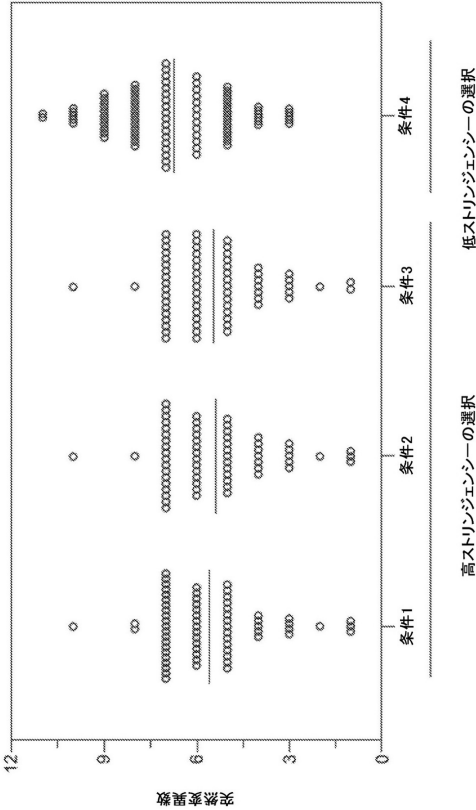
【図 4 B】



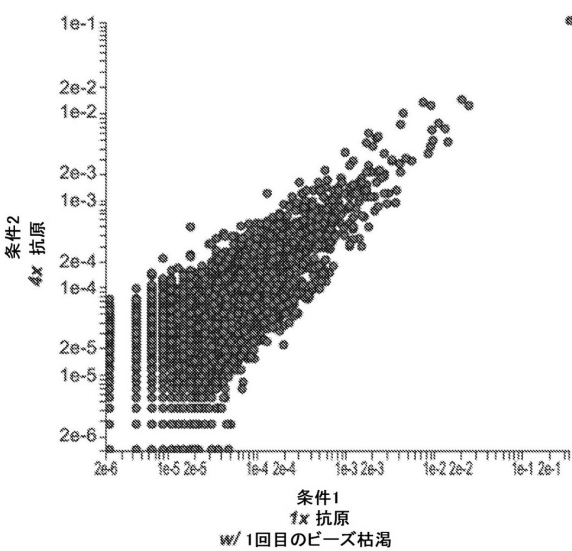
【図 4 C】



【図 4 D】



【図 4 E】



10

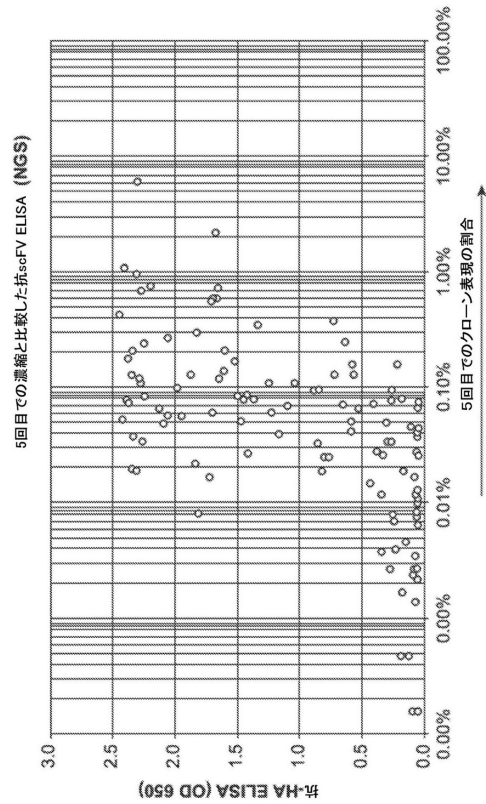
20

30

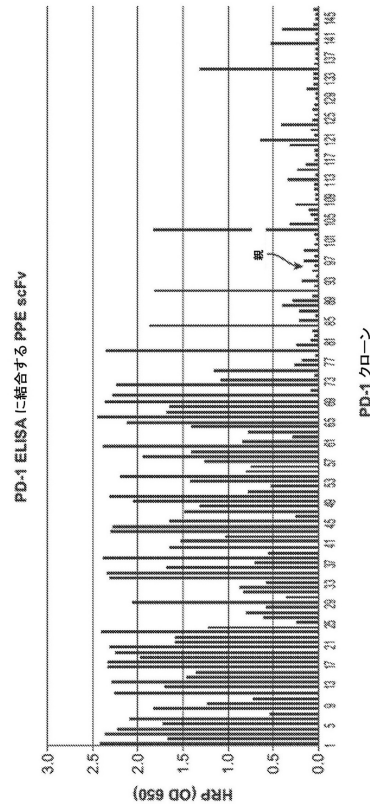
40

50

【図 5 A】



【図 5 B】



【図 6 A - 1】

クローン	SPR (Cartera)				FACS				収量 (μg/ml)	Y	R	F	T	S	I	Y	G
	KD (M)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)	KD (nM)	Y	R	F									
PD1 TAO1	4.52	6.E+05	2.94E-03	3.37	19.7	Y	R	F	19.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO15	7.29	2.E+05	1.76E-03	11.52	8.8	Y	R	F	8.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO91	9.17	6.E+05	5.12E-03	4.18	9.7	Y	R	F	9.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO2	9.76	7.E+05	7.29E-03	4.81	30.7	Y	R	F	30.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO7	10.4	7.E+04	7.37E-04	1.23	14.8	Y	R	F	14.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO75	11.1	5.E+05	5.60E-03	ND	8.5	Y	R	F	8.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
*ニホルマブ	14.5	2.E+06	2.80E-02	1.30	13.4	Y	R	F	13.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
ベンブロシズマブ	16.3	2.E+05	2.96E-03	18.60	21.3	Y	R	F	21.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO60	16.4	3.E+05	5.23E-03	3.46	53.5	Y	R	F	53.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO86	27.5	5.E+05	1.96E-02	4.08	8.1	Y	R	F	8.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO4	31.3	9.E+05	2.67E-02	6.90	15.1	Y	R	F	15.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO86	42.6	3.E+04	1.39E-03	ND	10.5	Y	R	F	10.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO54	42.9	8.E+04	3.23E-03	9.18	7.3	Y	R	F	7.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO14	45.8	1.E+07	6.42E-01	ND	10.8	Y	R	F	10.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO82	46.9	6.E+05	2.76E-02	7.46	12.5	Y	R	F	12.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO10	47.3	4.E+06	1.66E-01	1.99	15.4	Y	R	F	15.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO11	48.1	8.E+05	3.97E-02	4.26	10.5	Y	R	F	10.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO76	52.6	7.E+05	3.85E-02	5.27	13.4	Y	R	F	13.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO12	53.5	8.E+08	4.05E+01	3.01	119.7	Y	R	F	119.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO42	53.6	1.E+07	7.55E-01	2.09	9.1	Y	R	F	9.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO43	54.4	5.E+05	2.86E-02	4.12	8.4	Y	R	F	8.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO17	60.0	8.E+05	5.07E-02	2.65	9.2	Y	R	F	9.2	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO89	63.8	9.E+05	5.66E-02	3.37	11.5	Y	R	F	11.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO87	63.9	3.E+06	1.65E-01	2.72	7.7	Y	R	F	7.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO48	64.3	1.E+09	6.43E+01	ND	59.4	Y	R	F	59.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO59	65.9	7.E+05	4.87E-02	8.37	8.3	Y	R	F	8.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO18	66.4	8.E+05	5.15E-02	2.55	12.6	Y	R	F	12.6	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO30	66.7	4.E+05	2.61E-02	3.62	8.0	Y	R	F	8.0	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO23	69.2	2.E+06	1.41E-01	10.76	8.0	Y	R	F	8.0	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO25	76.0	3.E+05	2.18E-02	5.28	7.3	Y	R	F	7.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO8	78.0	8.E+05	6.39E-02	1.44	9.4	Y	R	F	9.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO36	84.8	1.E+09	6.49E+01	ND	7.1	Y	R	F	7.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO50	87.4	7.E+08	6.21E+01	12.67	15.8	Y	R	F	15.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO27	88.6	1.E+06	1.07E-01	4.33	11.8	Y	R	F	11.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
親	325.5	9.E+04	2.85E-02	ND	10.4	Y	R	F	10.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G

【図 6 A - 2】

クローン	SPR (Cartera)				FACS				収量 (μg/ml)	Y	R	F	T	S	I	Y	G
	KD (M)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)	KD (nM)	Y	R	F									
PD1 TAO1	4.52	6.E+05	2.94E-03	3.37	19.7	Y	R	F	19.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO15	7.29	2.E+05	1.76E-03	11.52	8.8	Y	R	F	8.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO91	9.17	6.E+05	5.12E-03	4.18	9.7	Y	R	F	9.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO2	9.76	7.E+05	7.29E-03	4.81	30.7	Y	R	F	30.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO7	10.4	7.E+04	7.37E-04	1.23	14.8	Y	R	F	14.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO75	11.1	5.E+05	5.60E-03	ND	8.5	Y	R	F	8.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
*ニホルマブ	14.5	2.E+06	2.80E-02	1.30	13.4	Y	R	F	13.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
ベンブロシズマブ	16.3	2.E+05	2.96E-03	18.60	21.3	Y	R	F	21.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO60	16.4	3.E+05	5.23E-03	3.46	53.5	Y	R	F	53.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO86	27.5	5.E+05	1.96E-02	4.08	8.1	Y	R	F	8.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO4	31.3	9.E+05	2.67E-02	6.90	15.1	Y	R	F	15.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO86	42.6	3.E+04	1.39E-03	ND	10.5	Y	R	F	10.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO54	42.9	8.E+04	3.23E-03	9.18	7.3	Y	R	F	7.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO14	45.8	1.E+07	6.42E-01	ND	10.8	Y	R	F	10.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO82	46.9	6.E+05	2.76E-02	7.46	12.5	Y	R	F	12.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO10	47.3	4.E+06	1.66E-01	1.99	15.4	Y	R	F	15.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO11	48.1	8.E+05	3.97E-02	4.26	10.5	Y	R	F	10.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO76	52.6	7.E+05	3.85E-02	5.27	13.4	Y	R	F	13.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO12	53.5	8.E+08	4.05E+01	3.01	119.7	Y	R	F	119.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO42	53.6	1.E+07	7.55E-01	2.09	9.1	Y	R	F	9.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO43	54.4	5.E+05	2.86E-02	4.12	8.4	Y	R	F	8.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO17	60.0	8.E+05	5.07E-02	2.65	9.2	Y	R	F	9.2	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO89	63.8	9.E+05	5.66E-02	3.37	11.5	Y	R	F	11.5	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO87	63.9	3.E+06	1.65E-01	2.72	7.7	Y	R	F	7.7	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO48	64.3	1.E+09	6.43E+01	ND	59.4	Y	R	F	59.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO59	65.9	7.E+05	4.87E-02	8.37	8.3	Y	R	F	8.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO18	66.4	8.E+05	5.15E-02	2.55	12.6	Y	R	F	12.6	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO30	66.7	4.E+05	2.61E-02	3.62	8.0	Y	R	F	8.0	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO23	69.2	2.E+06	1.41E-01	10.76	8.0	Y	R	F	8.0	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO25	76.0	3.E+05	2.18E-02	5.28	7.3	Y	R	F	7.3	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO8	78.0	8.E+05	6.39E-02	1.44	9.4	Y	R	F	9.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO36	84.8	1.E+09	6.49E+01	ND	7.1	Y	R	F	7.1	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO50	87.4	7.E+08	6.21E+01	12.67	15.8	Y	R	F	15.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
PD1 TAO27	88.6	1.E+06	1.07E-01	4.33	11.8	Y	R	F	11.8	Y	R	F	T	S	I	Y	G
親	325.5	9.E+04	2.85E-02	ND	10.4	Y	R	F	10.4	Y	R	F	T	S	I	Y	G

10

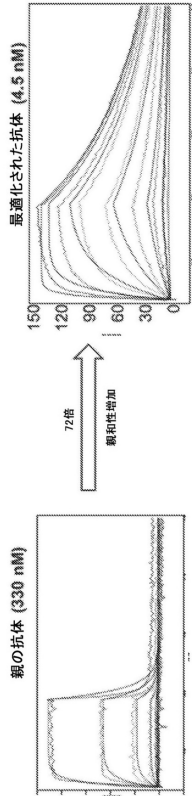
20

30

40

50

【図 6 B】



【図 6 C】

PD1_38	YTFTRHGISGWISAYSSENTKYACARDADYWSGSGYW
PD1_36	YTFSSYGVSGWISAYSSENTNYACARDAYSSGSGYW
PD1_7	YTFTHYGITGWISAYSSENTNYACARDADYISGSGYW
PD1_11	YTFSNYGVSGWISAYSSENTKYACARDADYISGSGYW
PD1_43	YTFSNYGVSGWISAYSSENTKYACARDADYASGSGYW
PD1_8	YTFSHYGVSGWISAYSSENTNYACARDNDYSSGSGYW
PD1_20	YTFSHYGVSGWISAYSSENTNYACARDNDYSSGSGYW
PD1_30	YTFNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYASGSGYW
PD1_24	YTFSHYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_1	YTFSHYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_15	YTFDYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYISGSGYW
PD1_17	YTFKYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_41	YFSSYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_29	YFSSYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYASGSGYW
PD1_32	YFSSYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_39	YFPANYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_2	YFSSYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYASGSGYW
PD1_18	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_9	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_5	YFPARYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_42	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_27	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_25	YFPTRYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_26	YFPDRYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_14	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_3	YFPTRYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_28	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_19	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_12	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_21	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_31	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_4	YFPTRYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_33	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_23	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_10	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_16	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_WT	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_35	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_13	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_37	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW
PD1_22	YFPNNYGVSGWISAYSSENTNYACARDADYSSGSGYW

* * * * *

10

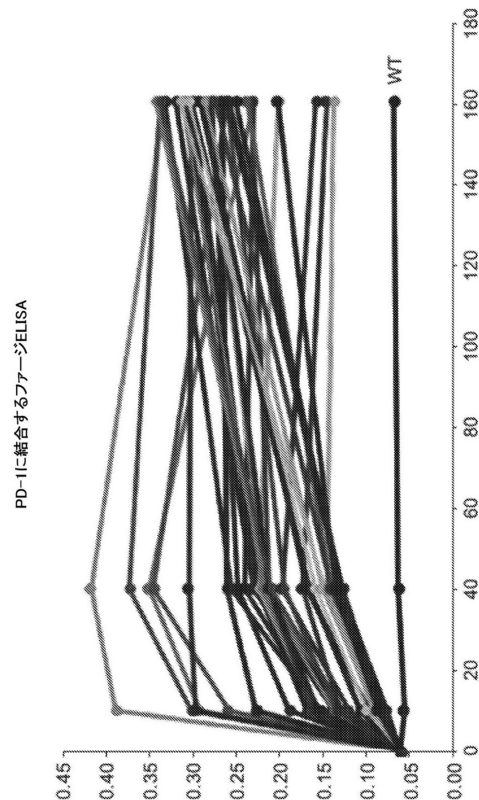
20

【図 6 D】

PD1_38	SGDALPKQYTSKDNALCQSDRSSTYRVF
PD1_36	SGDALPNQYAHKDTQRPSQSDNSITYRVF
PD1_7	SGDALPNQYAFKDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_11	SGDALPRQYAHKDNVRPSCQSDNSTIYRVF
PD1_43	SGDALPRQYAHKDNERPSCQSDNSTIYRVF
PD1_8	SGDALPKQYAYKDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_20	SGDALPNQYAFEDTERPSCQSDNSITYRVF
PD1_30	SGDALSNQYVYKDKRPSQSDNSITYRVF
PD1_24	SGDALANQYVYKDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_1	SGDALPTQYAYQDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_15	SGDALPKQYAFKDTQRPSQSDNSITYRVF
PD1_17	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_41	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_29	SGDALPKQYAHKDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_32	SGDALPHQYAYKDTGRPSQSDNSITYRVF
PD1_39	SGDALPKQYVYKDTETPSCQSDNSITYRVF
PD1_2	SGDALPNQYAYKDTQRPSQSDNSITYRVF
PD1_18	SGDALSNQYGYKDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_9	SGDALPKQYAYQDTQRPSQSDNSITYRVF
PD1_5	SGNTLPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_42	SGDALSNQYAYKDTETPSCQSDNSITYRVF
PD1_27	SGDILPKQYAYKDNERPSCQSDNSITYRVF
PD1_25	SGDALPDQYAYKDYERPSCQSDNSITYRVF
PD1_26	SGDALSKQYAYKDAERPSCQSDNSITYRVF
PD1_14	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_3	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_28	SGDALPTQYAYKDKERPSCQSDNSITYRVF
PD1_19	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_12	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_21	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_31	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_4	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_33	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_23	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_10	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_16	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_WT	SGDALPKQYAYKDTQRPSQSDNSITYRVF
PD1_35	SGDALPKQYAYKDTQRPSQSDNSITYRVF
PD1_13	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_37	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF
PD1_22	SGDALPKQYAYKDTERRPSCQSDNSITYRVF

* * * * *

【図 6 E】

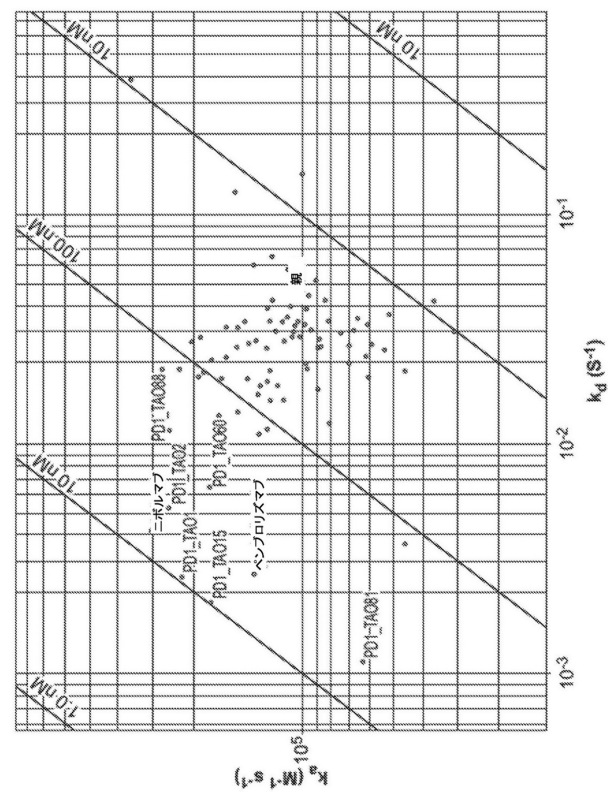


30

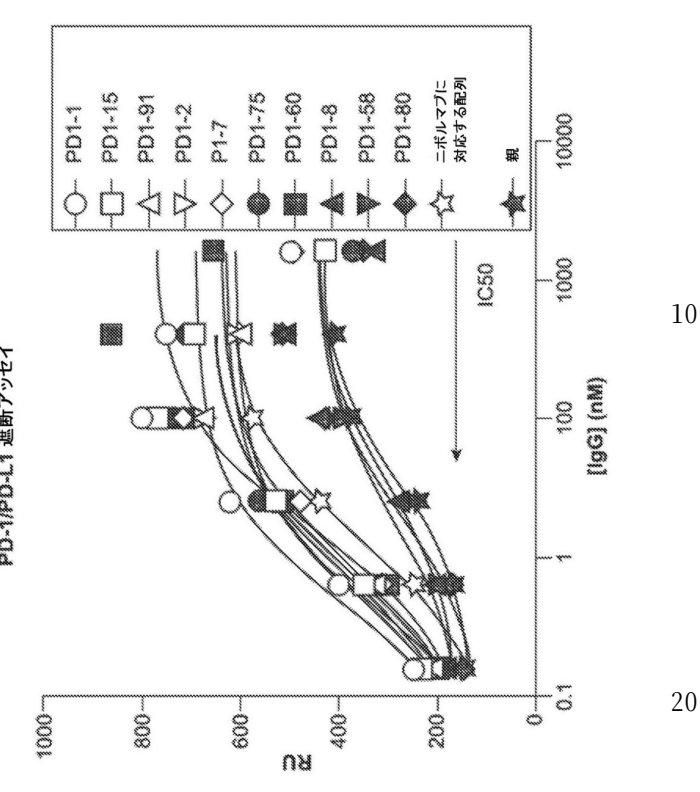
40

50

【図 6 F】



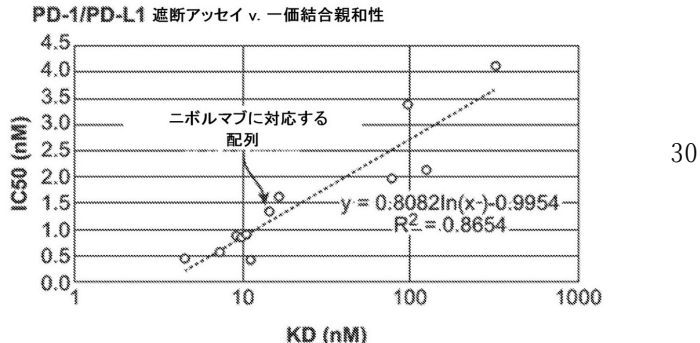
【図 7 A】



【図 7 B】

クローン	SPR K_D (nM)	IC50 (nM)	Bmax (RU)
PD1-1	4.5	0.434	693
PD1-15	7.3	0.562	634
PD1-91	9.2	0.868	664
PD1-2	9.8	0.848	661
PD1-7	10.5	0.896	642
PD1-75	11.2	0.418	614
ニボルマブに対応する配列	14.5	1.345	628
PD1-60	16.5	1.614	776
PD1-8	78.1	1.968	436
PD1-58	96.7	3.384	446
PD1-80	125	2.129	450
親	325	4.122	449

【図 7 C】



結合親和性 (lgG)

10

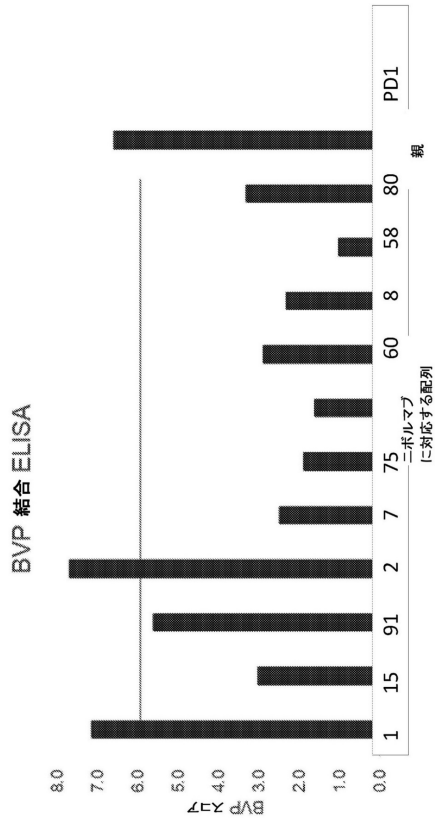
20

30

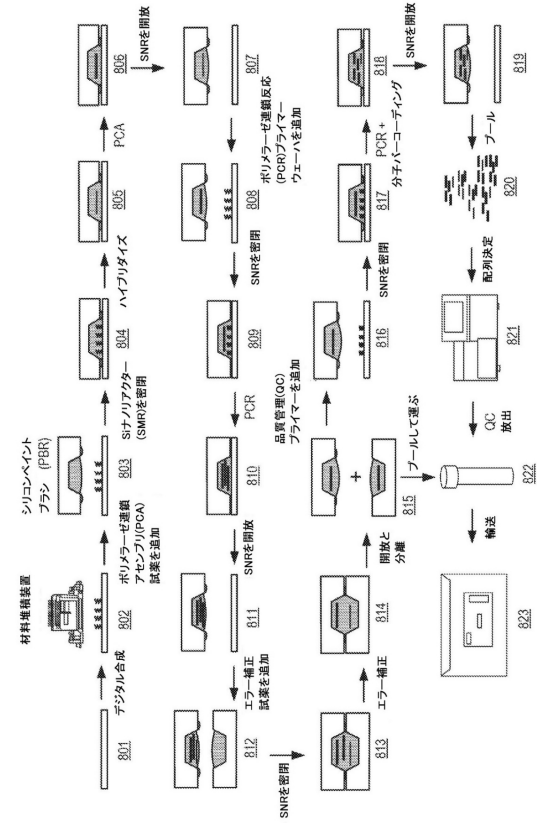
40

50

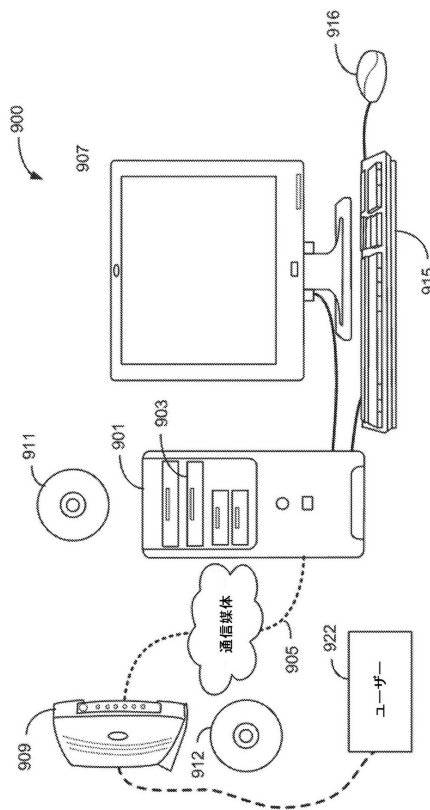
【図 7 D】



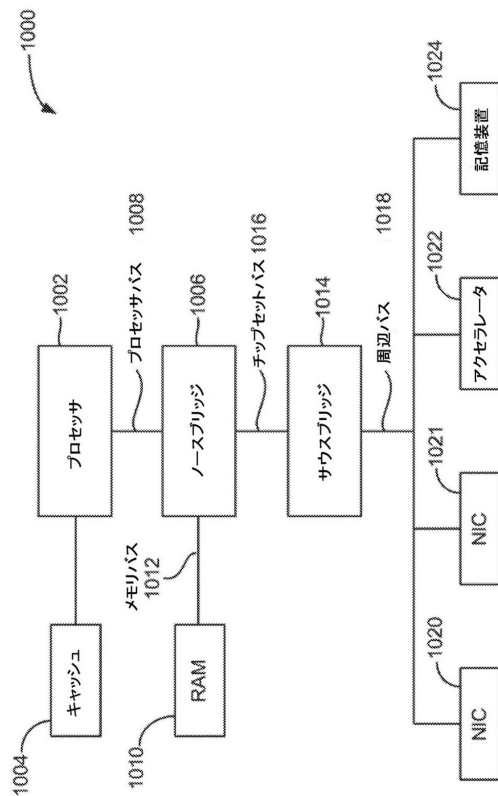
【圖 8】



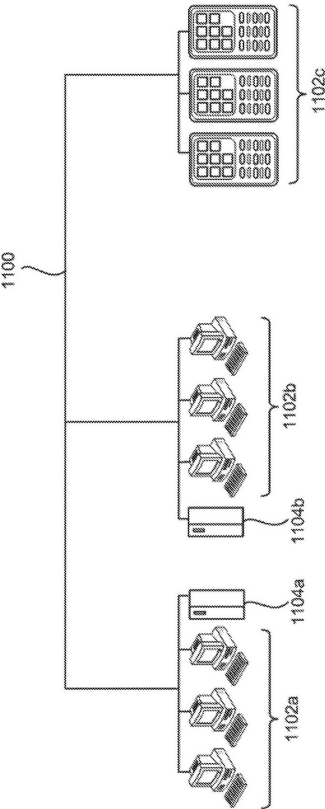
【圖 9】



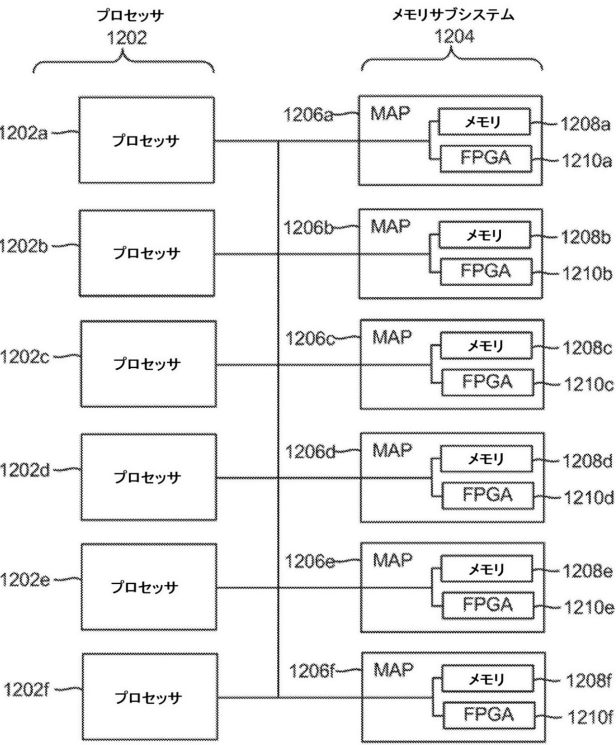
【 図 1 0 】



【図 1 1】



【図 1 2】



【配列表】

202252266800001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/19988

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - C12N 15/10; C07K 16/46; C12N 15/10; C07K 16/28, 16/30; C12P 21/02; C07H 21/04 (2020.01)		
CPC - C12N 15/1034, 15/1089; C07K 16/005, 16/464; C12N 15/102; C07K 16/28, 16/30; C12P 21/02; C07H 21/04; C07K 2317/565		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y - A	US 2017/0247473 A1 (BIOATLA, LLC) 31 August 2017; abstract; paragraphs [0013], [0014], [0015], [0019], [0022], [0024], [0067], [0110], [0162], [0189], [0190], [0191], [0192], [0193], [0194], [0195], [0244], [0245]; claim 1	1-12, 13/1-12, 15-19, 25 22-24 20-21, 26-27, 28/26-27, 29/26-27, 30/29/26-27, 31/29/26-27
X	US 2003/0022240 A1 (LUO, P et al.) 30 January 2003; abstract; paragraphs [0032], [0033], [0034], [0037], [0039], [0043], [0057], [0086], [0087], [0088], [0107], [0108], [0114], [0115], [0195], [0221], [0222], [0223], [0225], [0229], [0247], [0248], [0249], [0250], [0267], [0282], [0303], [0308], [0645], [0762], [0821], [0840]; Fig. 28B	32-42, 43/32-42, 45-59
Y	WO 2015/095404 A2 (GENENTECH, INC.) 25 June 2015; abstract; page 2, line 18; page 26, lines 35-36; page 37, lines 1-2; page 40, lines 17-18	22-24
A	US 2004/0213795 A1 (COLLINS, M et al.) 28 October 2004; paragraphs [0044], [0049]; Tables 1, 2	20-21, 26-27, 28/26-27, 29/26-27, 30/29/26-27, 31/29/26-27
A	(GOODWIN, E et al.) immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Homo sapiens]. Genbank entry (online). National Institute of Biotechnology Information. 11 July 2018 (Retrieved on 29 June 2020). Retrieved from the Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AXA12486.1>; page 1	20-21, 26-27, 28/26-27, 29/26-27, 30/29/26-27, 31/29/26-27
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 2020 (29.06.2020)		Date of mailing of the international search report 29 JUL 2020
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/19988

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.	☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3.	Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/19988

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017/0073664 A1 (IONTAS LIMITED) 16 March 2017; entire document	1-12, 13/1-12, 15-27, 28/26-27, 29/26-27, 30/29/26-27, 31/29/26-27, 32-42, 43/32-42, 45-59
A	US 2014/0221250 A1 (ADIMAB, LLC) 7 August 2014; entire document	1-12, 13/1-12, 15-27, 28/26-27, 29/26-27, 30/29/26-27, 31/29/26-27, 32-42, 43/32-42, 45-59

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US20/19988

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 14, 44
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

---Please see supplemental page---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-13, 15-43, 45-59 and SEQ ID NO: 1 (CDR sequence)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/19988

Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-13, 15-43, 45-59 and SEQ ID NO: 1 (CDR sequence) are directed toward nucleic acid libraries, antibodies associated therewith, methods related to said antibodies, and computerized systems for antibody optimization.

The libraries, antibodies, methods, and computerized systems will be searched to the extent they encompass SEQ ID NO: 1 (first exemplary CDR sequence). Applicant is invited to elect additional CDR(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional CDR sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-13, 15-19, 20-21 (each in-part), 22-25, 26-31 (each in-part), 32-43 and 45-59 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (CDR sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (CDR sequence).

No technical features are shared between the CDR sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a nucleic acid library comprising: a plurality of sequences comprising nucleic acids that when translated encode for antibodies or antibody fragments, wherein each of the sequences comprises a predetermined number of mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody; wherein the library comprises at least 50,000 variant sequences, each represented in an amount within 1.5X of a mean frequency; and wherein at least one sequence when translated encodes for an antibody or antibody fragment having at least 2.5X higher binding affinity than a binding infinity of the input sequence; an antibody, wherein the antibody comprises a sequence, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a polyclonal antibody, a bi-specific antibody, a multispecific antibody, a grafted antibody, a human antibody, a humanized antibody, a synthetic antibody, a chimeric antibody, a camelized antibody, a single-chain Fvs (scFv), a single chain antibody, a Fab fragment, a F(ab')₂ fragment, a Fd fragment, a Fv fragment, a single-domain antibody, an isolated complementarity determining region (CDR), a diobody, a fragment comprised of only a single monomeric variable domain, disulfide-linked Fvs (sdFv), an intrabody, an anti-idiotypic (anti-Id) antibody, or an antigen-binding fragments thereof; a method of inhibiting PD-1 activity, comprising administering the antibody; a method for treatment of a proliferative disorder, comprising administering to a subject in need thereof the antibody; and a computerized system for antibody optimization comprising: (a) a general purpose computer; and (b) a computer readable medium comprising functional modules including instructions for the general purpose computer, wherein said computerized system is configured for operating in a method of: (i) receiving operating instructions, wherein the operating instructions comprise a plurality of sequences encoding for an antibody or antibody fragment; (ii) generating a nucleic acid library comprising the plurality of sequences comprising nucleic acids that when translated encode for antibodies or antibody fragments, wherein each of the sequences comprises a predetermined number of mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody; wherein the library comprises at least 50,000 variant sequences, each represented in an amount within 1.5X of a mean frequency; and wherein at least one sequence when translated encodes for an antibody or antibody fragment having at least 2.5X higher binding affinity than a binding infinity of the input sequence; and (iii) synthesizing the at least 50,000 variant sequences.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2017/0073664 A1 to Iontas Limited (hereinafter 'Iontas'), in view of US 2003/0022240 A1 to Luo et al. (hereinafter 'Luo'), further in view of WO 2015/095404 A2 to Genentech, Inc. (hereinafter 'Genentech').

Iontas discloses a nucleic acid library (encoding nucleic acids isolated from a cell library (a nucleic acid library); paragraphs [0038], [0192]) comprising: a plurality of sequences comprising nucleic acids that when translated encode for antibodies or antibody fragments (comprising: a plurality of sequences comprising nucleic acids that when translated encode for binders, including antibodies or antibody fragments; paragraphs [0033], [0038], [0122]), wherein each of the sequences comprises mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody (wherein each of the sequences comprises mutations within a binding loop (wherein each of the sequences comprises mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody); paragraphs [0122], [0123], [0190]) wherein the library comprises variant sequences (wherein the library comprises variant sequences; paragraph [0194]), each represented in an amount within 1.5X of a mean frequency (wherein the library comprises cells with a single potential integration site, and the library of clones contains donor DNA integrated at the single fixed locus, thus each cell displays a single member of the repertoire of binders (each represented in an amount within 1.5X of a mean frequency); paragraphs [0198], [0200]); and wherein at least one sequence when translated encodes for an antibody or antibody fragment having higher binding affinity than a binding infinity of the input sequence (wherein at least one sequence when translated encodes for an antibody or antibody fragment having higher binding affinity than a binding infinity of the input sequence; paragraphs [0155], [0195]); an antibody, wherein the antibody comprises a sequence, wherein the antibody is a bi-specific antibody (an antibody, wherein the antibody comprises a sequence, wherein the antibody is a bi-specific antibody; paragraphs [0033], [0034], [0134]).

Iontas does not disclose wherein each of the sequences comprises a predetermined number of mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody; wherein the library comprises at least 50,000 variant sequences; an antibody or antibody fragment having at least 2.5X higher binding affinity; a method of inhibiting PD-1 activity, comprising administering the antibody; a method for treatment of a proliferative disorder, comprising administering to a subject in need thereof the antibody; and a computerized system for antibody optimization comprising: (a) a general purpose computer; and (b) a computer readable medium comprising functional modules including instructions for the general purpose computer, wherein said computerized system is configured for operating in a method of: (i) receiving operating instructions, wherein the operating instructions comprise a plurality of sequences encoding for an antibody or antibody fragment; (ii) generating a nucleic acid library comprising the plurality of sequences comprising nucleic acids that when translated encode for antibodies or antibody fragments, wherein each of the sequences comprises a predetermined number of mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody; wherein the library comprises at least 50,000 variant sequences, each represented in an amount within 1.5X of a mean frequency; and wherein at least one sequence when translated encodes for an antibody or antibody fragment having at least 2.5X higher binding affinity than a binding infinity of the input sequence; and (iii) synthesizing the at least 50,000 variant sequences.

Continued Within the Next Supplemental Box

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US20/19988

-Continued from Previous Supplemental Box-

Luo discloses wherein each of the sequences comprises a predetermined number of mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody (wherein each of the sequences comprises a predetermined number of mutations within a CDR relative to an input sequence of an antibody; paragraphs [0200]-[0206], [0270]); wherein the library comprises at least 50,000 variant sequences (wherein the library comprises at least $10^6 - 10^7$ (50,000) variant sequences; paragraph [0820]); an antibody or antibody fragment having at least 2.5X higher binding affinity (an antibody or antibody fragment having at least 135X (2.5X) higher binding affinity; paragraph [0762]); and a computerized system for antibody optimization comprising: (a) a general purpose computer (a computerized system for antibody optimization comprising: (a) a general purpose computer; paragraph [0840]); and (b) a computer readable medium comprising functional modules including instructions for the general purpose computer (a computer readable medium comprising programs (functional modules including instructions for the general purpose computer); paragraphs [0317], [0689], [0840]), wherein said computerized system is configured for operating in a method of: (i) receiving operating instructions (wherein said computerized system is configured for operating in a method of: (i) receiving programming (operating instructions); paragraphs [0317], [0689], [0840]), and synthesizing the at least 50,000 variant sequences (synthesizing the at least 10^6 (50,000) variant sequences; paragraphs [0268], [0820]).

Genentech discloses a method of inhibiting PD-1 activity (a method comprising administering a PD-1 antagonist antibody (a method of inhibiting PD-1 activity; page 2, lines 6-7, line 18), comprising administering an anti-PD-1 antibody (comprising administering an anti-PD-1 antibody; page 2, lines 6-7, line 18); and a method for treatment of a proliferative disorder (a method for treatment of cancer (a proliferative disorder); page 2, lines 6-7, line 18), comprising administering to a subject in need thereof the antibody (comprising administering to a subject in need thereof the antibody; page 2, lines 6-7, line 18), wherein the antibody is an affinity matured antibody with improved binding affinity (wherein the antibody is an affinity matured antibody with improved binding affinity; page 50, lines 11-19).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Iontas to have used the cells and methods of Luo to have obtained a library with single copies of a sufficient number of variants to ensure the capacity to obtain variants with significantly improved affinity, as disclosed by Luo. It further would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Iontas to have used a computer system to perform the methods of mutant generation, as disclosed by Luo, in order to better enable the selection of mutants of desired residues in the antibody, and a useful range of mutations with respect to amino acid identity, to obtain variants with improved affinity, as disclosed by Luo. It also would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time the invention was made to have modified the disclosure of Iontas to have applied the mutational variant generation to a useful antibody, such as an anti-PD-1 antibody for the treatment of a proliferative disorder, such as cancer, as disclosed by Genentech, in order to ensure the ability to identify variants with optimized affinity and effectiveness of treatment.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Iontas, Luo, and Genentech references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)**A 6 1 P 43/00 1 1 1****C 1 2 P 21/08 (2006.01)****A 6 1 P 35/00****C 0 7 K 16/46 (2006.01)****C 1 2 P 21/08****C 0 7 K 16/30 (2006.01)****C 0 7 K 16/46****C 0 7 K 16/28 (2006.01)****C 0 7 K 16/30****C 0 7 K 16/28**

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
 MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
 RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

F ターム (参考) 4H045 AA11 DA76 EA20 FA74