

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-504384

(P2024-504384A)

(43)公表日 令和6年1月31日(2024.1.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/42 (2006.01)	C 0 7 K 16/42	
A 6 1 K 39/395(2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全177頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2023-544418(P2023-544418)	(71)出願人 516040017 ツイスト バイオサイエンス コーポレーション アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ ゲートウェイ・ブルバード 6 8 1
(86)(22)出願日 令和4年1月20日(2022.1.20)	
(85)翻訳文提出日 令和5年9月21日(2023.9.21)	
(86)国際出願番号 PCT/US2022/013184	
(87)国際公開番号 WO2022/159620	
(87)国際公開日 令和4年7月28日(2022.7.28)	
(31)優先権主張番号 63/140,201	(74)代理人 110003797 弁理士法人清原国際特許事務所
(32)優先日 令和3年1月21日(2021.1.21)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(72)発明者 サトー, アーロン アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ ゲートウェイ・ブルバード 6 8 1
(31)優先権主張番号 63/209,892	(72)発明者 リウ, チアン アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ ゲートウェイ・ブルバード 6 8 1
(32)優先日 令和3年6月11日(2021.6.11)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(31)優先権主張番号 63/244,976	
最終頁に続く	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノシン受容体に関する方法および組成物

(57)【要約】

アデノシン A 2 A 結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を有するアデノシン A 2 A 受容体ライブラリーに関する方法および組成物が、本明細書に提供される。本明細書に記載されるアデノシン A 2 A 受容体ライブラリーは、抗体などの免疫グロブリンをコードする。

【選択図】 図 1 3

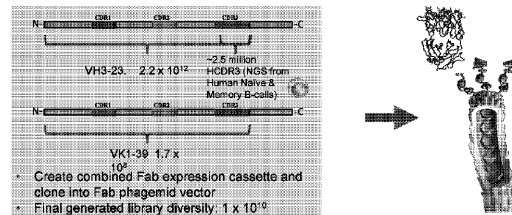


FIG. 13

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 6 ~ 7 1 7 に記載の配列に対して少なくとも約 9 0 % 同一の配列を含む抗体または抗体フラグメントを投与する工程を含む、T 細胞を活性化する方法。

**【請求項 2】**

前記抗体または抗体フラグメントは、配列番号 3 5 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記抗体または抗体フラグメントは、配列番号 3 5 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載されるようなアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。 10

**【請求項 4】**

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、多特異性抗体、グラフト化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、単鎖 F v s ( s c F v )、単鎖抗体、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、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 ( s d F v )、イントラボディ、抗イデオタイプ ( 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、請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の方法。 20

**【請求項 5】**

前記抗体または抗体フラグメントは、約 7 5 n M 未満の K<sub>D</sub> でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記抗体または抗体フラグメントは、約 5 0 n M 未満の K<sub>D</sub> でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記抗体または抗体フラグメントは、約 2 5 n M 未満の K<sub>D</sub> でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記抗体または抗体フラグメントは、約 1 0 n M 未満の K<sub>D</sub> でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。 30

**【請求項 9】**

前記抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 2 0 n M 未満の I C<sub>50</sub> を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 0】**

前記抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 1 0 n M 未満の I C<sub>50</sub> を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 1】**

前記抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 7 . 5 n M 未満の I C<sub>50</sub> を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。 40

**【請求項 1 2】**

前記抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 5 n M 未満の I C<sub>50</sub> を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 1 3】**

配列番号 6 ~ 7 1 7 に記載の配列に対して少なくとも約 9 0 % 同一の配列を含む抗体または抗体フラグメント。

**【請求項 1 4】**

配列番号 3 5 ~ 4 4 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 に記載の抗体または抗体フラグメント。 50

## 【請求項 15】

配列番号 35 ~ 44 のいずれか 1 つに記載されるようなアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 16】

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、多特異性抗体、グラフト化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、単鎖 Fv s ( s c F v )、単鎖抗体、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、単一ドメイン抗体、単離された相補性決定領域 ( C D R )、ダイアボディ、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 ( 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である、請求項 13 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

10

## 【請求項 17】

約 75 n M 未満の  $K_D$  でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 18】

約 50 n M 未満の  $K_D$  でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 19】

約 25 n M 未満の  $K_D$  でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

20

## 【請求項 20】

約 10 n M 未満の  $K_D$  でアデノシン 2 A 受容体に結合する、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 21】

T 細胞活性化アッセイにおいて約 20 n M 未満の  $I C_{50}$  を含む、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 22】

T 細胞活性化アッセイにおいて約 10 n M 未満の  $I C_{50}$  を含む、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

30

## 【請求項 23】

T 細胞活性化アッセイにおいて約 7.5 n M 未満の  $I C_{50}$  を含む、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 24】

T 細胞活性化アッセイにおいて約 5 n M 未満の  $I C_{50}$  を含む、請求項 13 ~ 20 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 相互参照

本出願は、2021年1月21日出願の米国特許出願第63/140,201号、2021年6月11日出願の米国特許出願第63/209,892号、および2021年9月16日出願の米国特許出願第63/244,976号の利益を主張し、これら各々の内容は参照によって本明細書に援用される。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

アデノシン受容体などの G タンパク質共役受容体 ( G P C R ) は、多種多様な疾患に関与している。G P C R は細胞において低レベルで発現されることが多く、精製時は非常に不安定であるため、適切な抗原を得る際における問題から、G P C R に対する抗体を産生させることは困難である。したがって、アデノシン受容体を標的とする、治療的介入のた

50

めの改良された薬剤が必要とされている。

【0003】

参照による援用

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、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援用されるよう本明細書に具体的かつ個別に示されるかのように、同じ程度まで参照により本明細書に援用される。

【発明の概要】

【0004】

T細胞を活性化するための組成物および方法が本明細書に提供される。

【0005】

配列番号6～717に記載の配列に対して少なくとも約90%同一である配列を含む抗体または抗体フラグメントを投与する工程を含む、T細胞を活性化する方法が本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、配列番号35～44のいずれか1つに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約95%同一のアミノ酸配列を含む、T細胞を活性化する方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、配列番号35～44のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む、T細胞を活性化する方法がさらに本明細書に提供される。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、多特異性抗体、グラフト化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、単鎖Fv(scfv)、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>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T細胞、ジスルフィド結合Fv(sdfv)、イントラボディ、抗イデオタイプ(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、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、約75nM未満のK<sub>D</sub>でアデノシン2A受容体に結合する、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、約50nM未満のK<sub>D</sub>でアデノシン2A受容体に結合する、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、約25nM未満のK<sub>D</sub>でアデノシン2A受容体に結合する、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、約10nM未満のK<sub>D</sub>でアデノシン2A受容体に結合する、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、T細胞活性化アッセイにおいて約20nM未満のIC<sub>50</sub>を含む、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、T細胞活性化アッセイにおいて約10nM未満のIC<sub>50</sub>を含む、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、T細胞活性化アッセイにおいて約7.5nM未満のIC<sub>50</sub>を含む、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントは、T細胞活性化アッセイにおいて約5nM未満のIC<sub>50</sub>を含む、T細胞を活性化するための方法がさらに本明細書に提供される。

【0006】

配列番号6～717に記載の配列に対して少なくとも約90%同一である配列を含む抗体または抗体フラグメントが本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、配列番号35～44のいずれか1つに記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約95%同一のアミノ酸配列を含む。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、配列番号35～44のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。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、多特異性抗体、グラフト化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、単鎖Fv(scfv)、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>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T細胞、ジスルフィド結合Fv(sdfv)、イ

10

20

30

40

50

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である、抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供される。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、約 75 nM 未満の K D で アデノシン 2 A 受容体に結合する。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、約 50 nM 未満の K D で アデノシン 2 A 受容体に結合する。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、約 25 nM 未満の K D で アデノシン 2 A 受容体に結合する。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、約 10 nM 未満の K D で アデノシン 2 A 受容体に結合する。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 20 nM 未満の I C 50 を含む。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 10 nM 未満の I C 50 を含む。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 7.5 nM 未満の I C 50 を含む。抗体または抗体フラグメントがさらに本明細書に提供され、抗体または抗体フラグメントは、T 細胞活性化アッセイにおいて約 5 nM 未満の I C 50 を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図 1 A】免疫グロブリンスキャフォールドの第 1 の略図を表す。

【図 1 B】免疫グロブリンスキャフォールドの第 2 の略図を表す。

20

【図 2】スキャフォールドに配置するためのモチーフの略図を表す。

【図 3】本明細書で開示されるような遺伝子合成のための典型的なプロセスワークフローを実証する工程の図を提示する。

【図 4】コンピュータシステムの一例を例証する。

【図 5】コンピュータシステムの構造を例証するブロック図である。

【図 6】複数のコンピュータシステム、複数の携帯電話および個人用携帯情報端末、ならびに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たネットワークを実証する図である。

【図 7】共有仮想アドレスメモリ空間を使用した、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

【図 8 A】リンカーを使用して V L ドメインに付着した V H ドメインを含む免疫グロブリンスキャフォールドの略図を表す。

【図 8 B】リンカー、リーダー配列、および p I I I 配列を使用して、V L ドメインに付着した V H ドメインを含む免疫グロブリンスキャフォールドの完全なドメインの構造の略図を表す。

【図 8 C】4つのフレームワーク要素（F W 1、F W 2、F W 3、F W 4）および V L ドメインまたは V H のドメインのための可変 3 C D R（L 1、L 2、L 3）要素の略図を表す。

【図 9 A】G L P - 1 受容体（G L P - 1 R）と複合体を形成するグルカゴン様ペプチド 1（G L P - 1、四角で囲まれた）、すなわち P D B エントリー 5 V A I の構造を表す。

40

【図 9 B】環状ペプチドアンタゴニスト C V X 1 5（四角で囲まれた）と複合体を形成する C X C R 4 ケモカインレセプター、すなわち P D B エントリー 3 O R 0 の結晶構造を表す。

【図 9 C】膜貫通ドメインおよび細胞外ドメイン（E C D）（四角で囲まれた）を有するヒト s m o o t h e n e d、すなわち P D B エントリー 5 L 7 D の結晶構造を表す。E C D は、細胞外ループ 3（E C L 3）を介して T M D と接触する。

【図 9 D】F a b（四角で囲まれた）と複合体を形成する G L P - 1 R、すなわち P D B エントリー 6 L N 2 の構造を表す。

【図 9 E】ウイルスケモカインアンタゴニストのウイルスマクロファージ炎症性タンパク質 2（v M I P - I I、四角で囲まれた）と複合体を形成する C X C R 4、すなわち P D

50

B エントリー 4 R W S の結晶構造を表す。

【図 1 0】G P C R に焦点を置いたライブラリー設計の略図を表す。2 つの生殖系列重鎖 V H 1 - 6 9 および V H 3 - 3 0、4 つの生殖系列軽鎖 I G K V 1 - 3 9 および I G K V 3 - 1 5、ならびに I G L V 1 - 5 1 および I G L V 2 - 1 4。

【図 1 1】3 人の健康な成人ドナーからの B 細胞集団における H C D R 3 の長さの分布と比較した、G P C R に焦点を置いたライブラリーの H C D R 3 の長さの分布のグラフを表す。合計で、G P C R ライブラリーからの 2, 4 4 4, 7 1 8 の固有の V H 配列およびヒト B 細胞レパートリーからの 2, 4 8 1, 5 1 1 の固有の V H 配列を分析して、長さの分布のプロットを生成した。Y 軸は 0.0200 の単位間隔で 0.000 ~ 0.1400 の頻度と記され、X 軸は長さであり、3 アミノ酸間隔で 0 ~ 57 と記される。

【図 1 2】V H H - F c についてのクローン、E L I S A 値、ライブラリー、P r o A 値と K<sub>D</sub> 値を表す。

【図 1 3】本明細書中の生成された、ファージディスプレイされた高度免疫ライブラリーの設計の略図を表す。

【図 1 4 A】A 2 A R - 9 0 - 0 0 7 の用量曲線のグラフを表す。

【図 1 4 B】A 2 A R - 9 0 - 0 0 7 の F A C S 分析のグラフを表す。

【図 1 5 A】重鎖 I G H V 3 - 2 3 設計の略図を表す。

【図 1 5 B】重鎖 I G H V 1 - 6 9 設計の略図を表す。

【図 1 5 C】軽鎖 I G K V 2 - 2 8 および I G L V 1 - 5 1 設計の略図を表す。

【図 1 5 D】G P C R ライブラリーの理論的多様性および最終多様性の略図を表す。

【図 1 6 A】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 0 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 B】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 1 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 C】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 2 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 D】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 3 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 E】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 4 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 F】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 1 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 G】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 5 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 H】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 2 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 I】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 3 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 J】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 4 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 K】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 5 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 L】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 6 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 M】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 9 6 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 N】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 7 を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 6 O】対照を使用した、フローサイトメトリーのデータを表す。

【図 1 7 A】バリエーション A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A - 9 4 を使用した、結合曲線

10

20

30

40

50

- のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 7 B】バリエント A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 1 を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 7 C】バリエント A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 3 を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 7 D】バリエント A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 4 を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 7 E】バリエント A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 5 を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 7 F】バリエント A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 6 を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。 10
- 【図 1 7 G】バリエント A 2 A 受容体免疫グロブリン A 2 A 7 を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 7 H】対照 (図 1 7 H) を使用した、結合曲線のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 8 A】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 9 7 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 B】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 9 8 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 C】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 9 9 を使用した、結合曲線のグラフを表す。 20
- 【図 1 8 D】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 0 0 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 E】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 0 1 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 F】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 0 2 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 G】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 0 3 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 H】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 0 4 を使用した、結合曲線のグラフを表す。 30
- 【図 1 8 I】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 9 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 J】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 0 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 K】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 1 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 L】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 2 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 M】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 3 を使用した、結合曲線のグラフを表す。 40
- 【図 1 8 N】マウスの免疫ライブラリーからのバリエント A 2 A 1 4 を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 8 O】対照を使用した、結合曲線のグラフを表す。
- 【図 1 9 A】アデノシン A 2 a R モノクローナル (M A B 9 4 9 7) および選択されたバリエント A 2 A - 9 との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。
- 【図 1 9 B】アデノシン A 2 a R モノクローナル (M A B 9 4 9 7) および選択されたバリエント A 2 A 1 0 との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、I g G 濃度対 M F I (平均蛍光強度) でプロットされる。 50

- 【図19C】アデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)および選択されたバリエーションA2A11との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。
- 【図19D】アデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)および選択されたバリエーションA2A12との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。
- 【図19E】アデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)および選択されたバリエーションA2A13との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。
- 【図19F】アデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)および選択されたバリエーションA2A15との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。 10
- 【図19G】アデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)および対照との細胞結合のグラフを表す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。
- 【図20A】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質への合成ライブラリーの細胞結合を表す。
- 【図20B】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質+ZM241385への合成ライブラリーの細胞結合を表す。
- 【図20C】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質へのヒト化合成ライブラリーの細胞結合を表す。 20
- 【図20D】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質+ZM241385へのヒト化合成ライブラリーの細胞結合を表す。
- 【図20E】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質への免疫ライブラリーの細胞結合を表す。
- 【図20F】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質+ZM241385への免疫ライブラリーの細胞結合を表す。
- 【図20G】100nMからの滴定アッセイにおける細胞結合のグラフを表す。グラフは、A2aタンパク質へのマウスの免疫ライブラリーの細胞結合を表す。
- 【図21】cAMPアッセイを使用して測定されたアゴニスト用量反応アッセイのデータを表す。 30
- 【図22】cAMPアッセイを使用して測定されたアンタゴニスト用量反応アッセイのデータを表す。
- 【図23】cAMPアンタゴニスト滴定アッセイの結果を表す。
- 【図24】cAMPアッセイからのバリエーションA2A-1およびA2A-9のデータを表す。
- 【図25】cAMPアッセイを使用した、バリエーションA2A9のデータを表す。
- 【図26】cAMPアンタゴニスト滴定アッセイを使用した、バリエーションA2A9のデータを表す。
- 【図27A】アンタゴニストのcAMPアッセイにおけるバリエーションA2A受容体免疫グロブリンのデータを表す。 40
- 【図27B】アンタゴニストのcAMPアッセイにおけるさらなるバリエーションA2A受容体免疫グロブリンのデータを表す。
- 【図27C】アンタゴニストのcAMPアッセイにおけるさらなるバリエーションA2A受容体免疫グロブリンのデータを表す。
- 【図28A】アロステリックなcAMPアッセイにおけるバリエーションA2A受容体免疫グロブリンのデータを表す。
- 【図28B】アロステリックなcAMPアッセイにおけるさらなるバリエーションA2A受容体免疫グロブリンのデータを表す。
- 【図28C】アロステリックなcAMPアッセイにおけるさらなるバリエーションA2A受容 50

体免疫グロブリンのデータを表す。

【図 29 A】アンタゴニストの cAMP アッセイにおけるバリエント A2A 受容体免疫グロブリンのデータを表す。

【図 29 B】アンタゴニストの cAMP アッセイにおけるさらなるバリエント A2A 受容体免疫グロブリンのデータを表す。

【図 29 C】アンタゴニストの cAMP アッセイにおけるさらなるバリエント A2A 受容体免疫グロブリンのデータを表す。

【図 30 A】アンタゴニストの cAMP アッセイにおけるバリエント A2A 受容体免疫グロブリンのデータを表す。

【図 30 B】アンタゴニストの cAMP アッセイにおけるさらなるバリエント A2A 受容体免疫グロブリンのデータを表す。 10

【図 30 C】アンタゴニストの cAMP アッセイにおけるさらなるバリエント A2A 受容体免疫グロブリンのデータを表す。

【図 31 A】バリエント A2A - 77 の親和性データを表す。

【図 31 B】バリエント A2A - 77 のさらなる親和性データを表す。

【図 31 C】バリエント A2A - 77 の特異性データを表す。

【図 31 D】カニクイザル PBMC に結合する A2A - 77 を表す。

【図 32 A】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 53、A2A - 77、A2A - 31、A2A - 24、A2A - 78、A2A - 74、A2A - 75、A2A - 52、および A2A - 36 についての T 細胞活性化を表す。 20

【図 32 B】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 53、A2A - 77、A2A - 31、および A2A - 78 の T 細胞活性化を表す。

【図 32 C】バリエント A2A - 77 の T 細胞活性化データを表す。

【図 32 D】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 77、および A2A - 28 の T 細胞活性化データを表す。

【図 32 E】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 77、および A2A - 28 の T 細胞活性化データを表す。

【図 32 F】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 77、および A2A - 28 の T 細胞活性化データを表す。

【図 32 G】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 77、および A2A - 28 の T 細胞活性化データを表す。 30

【図 32 H】バリエント A2A - 81、A2A - 51、A2A - 77、および A2A - 28 の T 細胞活性化データを表す。

【図 33 A】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 についての細胞結合アッセイの結果を表す。

【図 33 B】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 についての A2A アンタゴニスト cAMP アッセイの結果を表す。

【図 33 C】対照 A2a に加えてバリエント A2A - 77 および A2A - 81 の特異性データを表す。

【図 33 D】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 の T 細胞活性化データを表す。 40

【図 34 A】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 を用いて処置したマウスの経時的な平均腫瘍体積 (図 34 A および 図 34 C) および経時的な相対腫瘍体積 (図 34 B および 34 D) を表す。

【図 34 B】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 を用いて処置したマウスの経時的な平均腫瘍体積 (図 34 A および 図 34 C) および経時的な相対腫瘍体積 (図 34 B および 34 D) を表す。

【図 34 C】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 を用いて処置したマウスの経時的な平均腫瘍体積 (図 34 A および 図 34 C) および経時的な相対腫瘍体積 (図 34 B および 34 D) を表す。

【図 34 D】バリエント A2A - 77 および A2A - 81 を用いて処置したマウスの経時 50

的な平均腫瘍体積（図 3 4 A および図 3 4 C）および経時的な相対腫瘍体積（図 3 4 B および 3 4 D）を表す。

- 【図 3 4 E】併用療法の実験の概要を表す。
- 【図 3 4 F】結腸癌モデルからのデータを表す。
- 【図 3 4 G】結腸癌モデルからのデータを表す。
- 【図 3 4 H】結腸癌モデルからのデータを表す。
- 【図 3 4 I】結腸癌モデルからのデータを表す。
- 【図 3 4 J】結腸癌モデルからのデータを表す。
- 【図 3 4 K】結腸癌モデルからのデータを表す。
- 【図 3 5 A】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての T I L C D 4 5 + 細胞の数を表す。 10
- 【図 3 5 B】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 5 C】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 4 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 5 D】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 8 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 5 E】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。制御性T細胞（T r e g）の合計の数を表す。
- 【図 3 5 F】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 腫瘍関連マクロファージ（T A M）の合計の数を表す。 20
- 【図 3 5 G】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 T A Mの合計の数を表す。
- 【図 3 5 H】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての T I L C D 4 5 + 細胞の数を表す。
- 【図 3 5 I】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 5 J】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 4 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 5 K】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 8 + 細胞の合計の数を表す。 30
- 【図 3 5 L】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。制御性T細胞（T r e g）の合計の数を表す。
- 【図 3 5 M】4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 腫瘍関連マクロファージ（T A M）の合計の数を表す。
- 【図 3 6 A】溶解された全血の中間試料対最終試料における細胞プロファイルを表す。C D 4 5 + 細胞のパーセントは生細胞のパーセントとして表される。
- 【図 3 6 B】溶解された全血の中間試料対最終試料における細胞プロファイルを表す。C D 3 +（図 3 6 B）細胞および C D 3 -（図 3 6 C）細胞の量は、C D 4 5 + 細胞のパーセントとして表される。 40
- 【図 3 6 C】溶解された全血の中間試料対最終試料における細胞プロファイルを表す。C D 3 +（図 3 6 B）細胞および C D 3 -（図 3 6 C）細胞の量は、C D 4 5 + 細胞のパーセントとして表される。
- 【図 3 7 A】中間溶解全血試料中の4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとして T I L C D 4 5 + 細胞の数を表す。
- 【図 3 7 B】中間溶解全血試料中の4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 7 C】中間溶解全血試料中の4つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 4 + 細胞の合計の数を表す。 50

- 【図 3 7 D】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 8 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 7 E】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。制御性 T 細胞 ( T r e g ) の合計の数を表す。
- 【図 3 7 F】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 腫瘍関連マクロファージ ( T A M ) の合計の数を表す。
- 【図 3 7 G】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 T A M の合計の数を表す。
- 【図 3 8 A】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとして T I L C D 4 5 + 細胞の数を表す。 10
- 【図 3 8 B】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 8 C】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 4 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 8 D】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 8 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 3 8 E】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。制御性 T 細胞 ( T r e g ) の合計の数を表す。
- 【図 3 8 F】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 腫瘍関連マクロファージ ( T A M ) の合計の数を表す。 20
- 【図 3 8 G】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 T A M の合計の数を表す。
- 【図 3 9】T 細胞活性化後の末梢血中のサイトカインレベルを表す。
- 【図 4 0 A】最終血液試料中で検出されたインターフェロン のレベルを表す。
- 【図 4 0 B】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 2 のレベルを表す。
- 【図 4 0 C】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 4 のレベルを表す。
- 【図 4 0 D】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 6 のレベルを表す。
- 【図 4 0 E】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 8 のレベルを表す。
- 【図 4 0 F】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 10 のレベルを表す。 30
- 【図 4 0 G】最終血液試料中で検出された T N F のレベルを表す。
- 【図 4 1 A】溶解された全血の中間試料対最終試料における細胞プロファイルを表す。CD 4 5 + 細胞のパーセントは生細胞のパーセントとして表される。
- 【図 4 1 B】溶解された全血の中間試料対最終試料における細胞プロファイルを表す。CD 3 + ( 図 4 1 B ) 細胞および CD 3 - ( 図 4 1 C ) 細胞の量は、CD 4 5 + 細胞のパーセントとして表される。
- 【図 4 1 C】溶解された全血の中間試料対最終試料における細胞プロファイルを表す。CD 3 + ( 図 4 1 B ) 細胞および CD 3 - ( 図 4 1 C ) 細胞の量は、CD 4 5 + 細胞のパーセントとして表される。
- 【図 4 2 A】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての T I L C D 4 5 + 細胞の数を表す。 40
- 【図 4 2 B】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T 細胞の合計の数を表す。
- 【図 4 2 C】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 4 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 4 2 D】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 8 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 4 2 E】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。制御性 T 細胞 ( T r e g ) の合計の数を表す。 50

- 【図 4 2 F】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 腫瘍関連マクロファージ ( T A M ) の合計の数を表す。
- 【図 4 2 G】中間溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 T A M の合計の数を表す。
- 【図 4 3 A】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての T I L C D 4 5 + 細胞の数を表す。
- 【図 4 3 B】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T 細胞の合計の数を表す。
- 【図 4 3 C】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 4 + 細胞の合計の数を表す。 10
- 【図 4 3 D】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 8 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 4 3 E】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。制御性 T 細胞 ( T r e g ) の合計の数を表す。
- 【図 4 3 F】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 腫瘍関連マクロファージ ( T A M ) の合計の数を表す。
- 【図 4 3 G】最終溶解全血試料中の 4 つの処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 T A M の合計の数を表す。
- 【図 4 4 A】最終血液試料中で検出されたインターフェロン のレベルを表す。 20
- 【図 4 4 B】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 2 のレベルを表す。
- 【図 4 4 C】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 4 のレベルを表す。
- 【図 4 4 D】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 6 のレベルを表す。
- 【図 4 4 E】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 8 のレベルを表す。
- 【図 4 4 F】最終血液試料中で検出されたインターロイキン 10 のレベルを表す。
- 【図 4 4 G】最終血液試料中で検出された T N F のレベルを表す。
- 【図 4 5】H E K 2 9 3 T 細胞における h A 2 b 交差結合剤活性を表す。
- 【図 4 6】A 2 b 抗体の活性を試験するために使用される機能的 c A M P アッセイを表す。
- 【図 4 7 A】A 2 b 機能的 c A M P アッセイの結果を表す。 30
- 【図 4 7 B】A 2 b 機能的 c A M P アッセイの結果を表す。
- 【図 4 7 C】A 2 b 機能的 c A M P アッセイの結果を表す。
- 【図 4 7 D】A 2 b 機能的 c A M P アッセイの結果を表す。
- 【図 4 8 A】再フォーマット抗体 ( I g G 1 または I g G 4 ) に応答した初代 T 細胞活性化アッセイ ( サイトカイン放出 ) を実証する。
- 【図 4 8 B】再フォーマット抗体 ( I g G 1 または I g G 4 ) に応答した初代 T 細胞活性化アッセイ ( サイトカイン放出 ) を実証する。
- 【図 4 8 C】再フォーマット抗体 ( I g G 1 または I g G 4 ) に応答した初代 T 細胞活性化アッセイ ( サイトカイン放出 ) を実証する。
- 【図 4 8 D】再フォーマット抗体 ( I g G 1 または I g G 4 ) に応答した初代 T 細胞活性化アッセイ ( サイトカイン放出 ) を実証する。 40
- 【図 4 8 E】再フォーマット抗体 ( I g G 1 または I g G 4 ) に応答した初代 T 細胞活性化アッセイ ( サイトカイン放出 ) を実証する。
- 【図 4 9 A】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての L W B C D 4 5 + 細胞の数を表す。
- 【図 4 9 B】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 3 + 細胞の合計の数を表す。
- 【図 4 9 C】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。C D 8 + 細胞の合計の数を表す。 50

【図 4 9 D】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 4 + 細胞の合計の数を表す。

【図 4 9 E】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 3 - 非 T 細胞の合計の数を表す。

【図 4 9 F】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T r e g 細胞の合計の数を表す。

【図 4 9 G】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。増殖性 T 細胞の合計の数を表す。

【図 4 9 H】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。増殖性 T r e g 細胞の合計の数を表す。

10

【図 4 9 I】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 1 1 b + 細胞の合計の数を表す。

【図 4 9 J】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 1 1 c + 細胞の合計の数を表す。

【図 4 9 K】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 マクロファージの合計の数を表す。

【図 4 9 L】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 マクロファージの合計の数を表す。

【図 5 0 A】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての L W B CD 4 5 + 細胞の数を表す。

20

【図 5 0 B】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 3 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 C】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 4 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 D】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 8 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 E】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 3 - 非 T 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 F】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T r e g 細胞の合計の数を表す。

30

【図 5 0 G】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。増殖性 T 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 H】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。増殖性 T r e g 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 I】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 1 1 b + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 J】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 1 1 c + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 0 K】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 マクロファージの合計の数を表す。

40

【図 5 0 L】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 マクロファージの合計の数を表す。

【図 5 1 A】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。検出されたすべての生細胞のパーセントとしての T I L CD 4 5 + 細胞の数を表す。

【図 5 1 B】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 3 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 C】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 4 + 細胞の合計の数を表す。

50

【図 5 1 D】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 8 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 E】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 3 - 非 T 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 F】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。T r e g 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 G】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。増殖性 T 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 H】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。増殖性 T r e g 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 I】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 1 1 b + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 J】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。CD 1 1 c + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 1 K】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 1 マクロファージの合計の数を表す。

【図 5 1 L】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された細胞の割合を表す。M 2 マクロファージの合計の数を表す。

【図 5 1 M】マウス中の最終溶解全血試料中の T I L M 1 / M 2 マクロファージの比率を表す。

【図 5 2 A】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 3 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 4 5 + 細胞のパーセントとしての L W B C D 3 + 細胞の数を表す。

【図 5 2 B】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 3 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 3 + 細胞のパーセントとして、C D 3 + T N F a + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 2 C】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 3 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 3 + 細胞のパーセントとして、C D 3 + I F N g + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 2 D】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 3 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 3 + 細胞のパーセントとして、C D 3 + I L 6 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 2 E】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 3 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 3 + 細胞のパーセントとして、C D 3 + I L 8 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 3 A】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 4 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 3 + 細胞のパーセントとして L W B C D 4 + 細胞の数を表す。

【図 5 3 B】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 4 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 4 + 細胞のパーセントとして C D 4 + T N F a + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 3 C】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 4 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 4 + 細胞のパーセントとして C D 4 + I F N g + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 3 D】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 4 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 4 + 細胞のパーセントとして C D 4 + I L 6 + 細胞の合計の数を表す。

【図 5 3 E】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 4 + 細胞の割合を表す。検出されたすべての C D 4 + 細胞のパーセントとして C D 4 + I L 8 + 細胞の合計の数を表す。

10

20

30

40

50



+ 細胞の合計の数を表す。

【図 5 8 A】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 8 + 細胞の割合を表す。C D 4 5 + 細胞の割合として C D 8 + 細胞の数を表す。

【図 5 8 B】中間溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 8 + 細胞の割合を表す。C D 4 5 + 細胞の割合として T r e g 細胞の数を表す。

【図 5 8 C】マウス中の中間溶解全血試料中の L W B C D 8 + / T r e g 細胞の比率を表す。

【図 5 9 A】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 8 + 細胞の割合を表す。C D 4 5 + 細胞の割合として C D 8 + 細胞の数を表す。

【図 5 9 B】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された L W B C D 8 + 細胞の割合を表す。C D 4 5 + 細胞の割合として T r e g 細胞の数を表す。

【図 5 9 C】マウス中の最終溶解全血試料中の L W B C D 8 + / T r e g 細胞の比率を表す。

【図 6 0 A】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された T I L C D 8 + 細胞の割合を表す。C D 4 5 + 細胞の割合として C D 8 + 細胞の数を表す。

【図 6 0 B】最終溶解全血試料中の処置群のそれぞれにおけるマウス中で検出された T I L C D 8 + 細胞の割合を表す。C D 4 5 + 細胞の割合として T r e g 細胞の数を表す。

【図 6 0 C】マウス中の最終溶解全血試料中の T I L C D 8 + / T r e g 細胞の比率を表す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本開示は、別段の定めのない限り、当該技術の範囲内である従来分子生物学的技術を採用する。別段の定めのない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、当業者により共通して理解されるものと同じ意味を有する。

【0009】

定義

【0010】

本開示の全体にわたって、様々な実施形態が範囲の形式で提示される。範囲形式での記載は単に利便性と簡潔さのためのものに過ぎず、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されてはならないということを理解されたい。これに応じて、範囲の記載は、文脈で別段の定めのない限り、すべての可能性のある下位範囲と、下限の単位の小数第 2 位までのその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると考えられなければならない。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、例えば、1 . 1、2、2 . 3、5、および 5 . 9 のその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると考えられなければならない。これは、範囲の広さにかかわらず適用される。これらの介在する範囲の上限および下限は、より小さな範囲内に独立して含まれてもよく、かつ、定められた範囲内のあらゆる具体的に除外された限界に従って本開示内に包含される。定められた範囲が上限および下限の 1 つまたはその両方を含む場合、これらの含まれた上限および下限のいずれかまたは両方を除く範囲も、文脈から明確に指示されない限り、本開示内に包含される。

【0011】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを記載するためのものであり、いずれの実施形態も制限するようには意図されていない。本明細書で使用されるとき、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が他に明白に示していない限り、同様に複数形を含むように意図される。「含む」および「含むこと」という用語は、本明細書での使用時に、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 つ以上の他の特徴、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または追加を除外するものではないことが、さらに理解される。本明細書で使用されるとき、「および/または」という用語は、関連する列挙された項目の 1 つ以上のあらゆる組合せを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

別段の定めのない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書で使用されるとき、数または数の範囲に関連して「約」という用語は、明示された数とその数 + / - 10 %、あるいはある範囲の列挙された値について列挙された下限の 10 % 以下と列挙された 10 % 以上を意味するものと理解されたい。

## 【 0 0 1 3 】

特に明記しない限り、本明細書で使用されるとき、「核酸」という用語は、一本鎖分子と同様に、二本鎖または三本鎖の核酸を包含する。二本鎖または三本鎖の核酸において、核酸鎖は同一の広がりをもつ必要はない（すなわち、二本鎖の核酸は、両鎖の全長に沿って二本鎖である必要はない）。核酸配列は、提供される場合、別段の記載がない限り、5' から 3' 方向に記載されている。本明細書に記載される方法は、単離された核酸の生成を提供する。本明細書に記載される方法はさらに、単離および精製された核酸の生成を提供する。本明細書に引用されるとき「核酸」は、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長を含むことができる。さらに、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) モジュールおよび合成バリエーションをコードする配列、抗体などの他のモジュールタンパク質のポリペプチドセグメント、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からのポリペプチドセグメント、例えば、プロモーター、転写因子、エンハンサー、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、マイクロRNA に由来する核小体低分子 RNA、あるいは対象の任意の機能的または構造的な DNA または RNA ユニットを含む、ヌクレオチド配列をコードするポリペプチド - セグメントの任意の数の合成のための方法が本明細書で提供される。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメントのコード化またはノンコーディング領域、遺伝子間 DNA、連鎖解析から定められた座（遺伝子座）、エキソン、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)、低分子ヘアピン型 RNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA) および核小体低分子 RNA、リボザイム、メッセンジャー RNA (mRNA) の逆転写または増幅によって通常得られる mRNA の DNA 提示である相補的 DNA (cDNA)；合成的にまたは増幅により生成された DNA 分子、ゲノム DNA、組み換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、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、同等のゲノム配列中に介在イントロン配列のないエクソン配列をコードする少なくとも 1 つの領域を含んでもよい。

## 【 0 0 1 4 】

アデノシン A 2 A および A 2 B 受容体ライブラリー

## 【 0 0 1 5 】

アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むアデノシン A 2 A 受容体 (ADORA2) のための G タンパク質共役受容体 (GPCR) 結合ライブラリーに関する方法および組成物が本明細書に提供される。本明細書に記載されるスキャフォールドは、安定してアデノシン A 2 A 受容体結合ドメインを支持することができる。アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインは、アデノシン A 2 A 受容体リガンドおよびアデノシン A 2 A 受容体の表面相互作用に基づいて設計されることがある。アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むアデノシン A 2 B 受容体 (ADORA2B) の G タンパク質共役受容体 (GPCR) 結合ライブラリーに関する方法および組成物が、さらに本明細書で提供される。本明細書に記載されるスキャフォールドは、安定してアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを支持することができ

10

20

30

40

50

る。アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインは、アデノシン A 2 B 受容体リガンドおよびアデノシン A 2 B 受容体の表面相互作用に基づいて設計されることがある。本明細書に記載されるライブラリーは、少なくとも1つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸を含むバリエーションライブラリーを提供するために、さらに多様化されてもよい。さらに、核酸ライブラリーが翻訳されるときに生成され得るタンパク質ライブラリーが本明細書に記載される。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ーは、細胞ライブラリーを生成するために細胞に導入される。さらに、本明細書に記載される方法を用いて合成されたライブラリーの下流アプリケーション (downstream applications) が本明細書で提供される。下流アプリケーションは、増強された生物学的関連機能、例えば、改善された安定性、親和性、結合、機能活性を有するバリエーション核酸またはタンパク質配列の同定、ならびにアデノシン A 2 A 受容体シグナル伝達、アデノシン A 2 B 受容体シグナル伝達、またはアデノシン A 2 A 受容体シグナル伝達およびアデノシン A 2 B 受容体シグナル伝達の両方に関連する疾患状態の処置または予防を含む。

10

#### 【0016】

アデノシン A 2 A 受容体免疫グロブリンまたは抗体、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンまたは抗体、あるいはその両方の最適化のための本明細書に記載される方法、組成物、およびシステムは、抗体配列の天然の多様性を映す比率 - バリエーションアプローチを含む。いくつかの例では、最適化されたアデノシン A 2 A 受容体免疫グロブリンまたは抗体のライブラリーは、バリエーションアデノシン A 2 A 受容体免疫グロブリンまたは抗体の配列を含む。いくつかの例では、バリエーションアデノシン A 2 A 受容体免疫グロブリンまたは抗体の配列は、バリエーション C D R 領域を含んで設計される。いくつかの例では、バリエーション C D R 領域を含むバリエーションアデノシン A 2 A 受容体免疫グロブリンまたは抗体の配列は、ラムフレームワーク、ヒト化フレームワーク、またはキメラフレームワークにおいて天然 C D R 配列をシャッフルすることによって生成される。いくつかの例では、最適化されたアデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンまたは抗体のライブラリーは、バリエーションアデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンまたは抗体の配列を含む。いくつかの例では、バリエーションアデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンまたは抗体の配列は、バリエーション C D R 領域を含んで設計される。いくつかの例では、バリエーション C D R 領域を含むバリエーションアデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンまたは抗体の配列は、ラムフレームワーク、ヒト化フレームワーク、またはキメラフレームワークにおいて天然 C D R 配列をシャッフルすることによって生成される。いくつかの例では、そのようなライブラリーは、合成され、発現ベクターにクローニングされ、翻訳産物 (抗体) が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が合成され、その後組み立てられる。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および濃縮するために使用される。いくつかの例では、ファージベクターは、F a b ファージミドベクターである。いくつかの例での濃縮中に使用される選択圧は、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、特定の特性を有する抗体を選択すること (「パニング」) が可能となり、その後のそのような配列の伝播または増幅は、これらの配列でライブラリーを濃縮する。パニングラウンドは、1、2、3、4、5、6、7、または7を超えるラウンドなどの任意の回数繰り返されてもよい。いくつかの例では、パニングの各ラウンドは、多数の洗浄を含む。いくつかの例では、パニングの各ラウンドは、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または16を超える洗浄を含む。

20

30

40

#### 【0017】

インシリコのライブラリー設計の方法およびシステムが本明細書に記載される。本明細書に記載されるようなライブラリーは、いくつかの例では、様々な抗体配列を含むデータベースに基づいて設計される。いくつかの例では、データベースは、様々な標的に対する複数のバリエーション抗体配列を含む。いくつかの例では、データベースは、少なくとも100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000

50

、4500、5000、または5000を超える抗体配列を含む。例示的なデータベースは、iCANデータベースである。いくつかの例では、データベースは、ナীবB細胞受容体配列および記憶B細胞受容体配列を含む。いくつかの例では、ナীবB細胞受容体配列および記憶B細胞受容体配列は、ヒト、マウス、または霊長類の配列である。いくつかの例では、ナীবB細胞受容体配列および記憶B細胞受容体配列は、ヒト配列である。いくつかの例では、データベースは、位置特異的変動について分析される。いくつかの例では、本明細書に記載される抗体は、CDR領域における位置特異的変動を含む。いくつかの例では、CDR領域は、変動について複数の部位を含む。

#### 【0018】

スキャフォールドライブラリー

10

#### 【0019】

スキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、ここで、アデノシンA2A受容体結合ドメインの配列はスキャフォールド中に配置される。本明細書に記載されるスキャフォールドは、未修飾のスキャフォールドと比較して、スキャフォールドへと挿入された時、一連のアデノシンA2A受容体結合ドメインをコードする配列の安定性の改善を可能にする。例示的なスキャフォールドには、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、その誘導体、またはそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、スキャフォールドは免疫グロブリンである。本明細書に記載されるようなスキャフォールドは、機能活性、構造的安定性、発現、特異性、またはそれらの組合せの改善を含む。いくつかの例では、スキャフォールドは、アデノシンA2A受容体結合ドメインを支持するための長い領域を含む。

20

#### 【0020】

スキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、ここで、アデノシンA2B受容体結合ドメインの配列はスキャフォールド中に配置される。本明細書に記載されるスキャフォールドは、未修飾のスキャフォールドと比較して、スキャフォールドへと挿入された時、一連のアデノシンA2B受容体結合ドメインをコードする配列の安定性の改善を可能にする。例示的なスキャフォールドには、タンパク質、ペプチド、免疫グロブリン、その誘導体、またはそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、スキャフォールドは免疫グロブリンである。本明細書に記載されるようなスキャフォールドは、機能活性、構造的安定性、発現、特異性、またはそれらの組合せの改善を含む。いくつかの例では、スキャフォールドは、アデノシンA2B受容体結合ドメインを支持するための長い領域を含む。

30

#### 【0021】

スキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、ここで、スキャフォールドは免疫グロブリンである。いくつかの例では、免疫グロブリンは抗体である。本明細書で使用されるとき、抗体という用語は、典型的な抗体分子の特徴的な2つのアームのY字形状を有するタンパク質と、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上のフラグメントとを含むと理解される。例示的な抗体としては、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、多特異性抗体、グラフト化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、単鎖Fv(s c F v)(V L領域とV H領域が対合して単鎖F a bおよびs c F a bを含む一価分子を形成する単一タンパク質鎖として作製することを可能にする合成または天然リンカーによる組換え法を用いてV LおよびV Hが連結されるフラグメントを含む)、単鎖抗体、F a bフラグメント(V L、V H、C L、およびC H 1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(ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された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(抗体の単一アームの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(互いに結合し、2つの異なる抗原を認識する2つのV LおよびV H

40

50

ドメインなどの二価ダイマーを含むフラグメントを含む)、単一のモノマー可変ドメインのみから構成されるフラグメント、ジスルフィド連結されたFv(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ーは、スキヤフォールドをコードする核酸を含み、スキヤフォールドは、完全な抗原認識および抗原結合部位を含有する最小の抗体フラグメントで構成されたFv抗体を含むFv抗体である。いくつかの実施形態では、Fv抗体は、緊密に非共有結合した1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインのダイマーからなり、各可変ドメインの3つの超可変領域は、VH-VLダイマーの表面上の抗原結合部位を画定するために相互作用している。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付与する。いくつかの実施形態では、単一の可変ドメイン(または、VHH抗体またはナノボディなどの1つの重鎖可変ドメインまたは重鎖の可変領域を含むラクダ科動物から単離された単ドメイン抗体を含む、抗原に特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分)は、抗原を認識して結合する能力を有している。いくつかの例では、本明細書に開示されるライブラリーは、スキヤフォールドをコードする核酸を含み、スキヤフォールドは、VH、VL、もしくはVHおよびVLのドメインの両方を含む抗体フラグメントを含む単鎖Fvまたはs c F vであり、両方のドメインは単一ポリペプチド鎖中に存在する。いくつかの実施形態では、Fvポリペプチドは、s c F vが抗原結合のために所望の構造を形成することを可能にする、VHおよびVLのドメイン間のポリペプチドリンカーをさらに含む。いくつかの例では、s c F vはFcフラグメントに連結されるか、またはVHHはFcフラグメント(ミニボディを含む)に連結される。いくつかの例では、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、Ig G、Ig E、Ig M、Ig D、Ig A、およびIg Y)、クラス(例えば、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1、およびIg A 2)またはサブクラスのものである。

10

20

【0022】

いくつかの実施形態では、ライブラリーは、意図された治療標的の種に適合した免疫グロブリンを含む。一般に、これらの方法は「哺乳動物化」を含み、有用な治療処置を生成するために、ドナーの抗原結合情報を、免疫原性の低い哺乳動物抗体受容体へ移すための方法を含む。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、抗体のネコ化(felini z a t i o n)およびイヌ化(c a n i n i z a t i o n)のためのライブラリーおよび方法が本明細書で提供される。

30

【0023】

非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体由来の最小限の配列を含むキメラ抗体であり得る。ヒト化抗体は一般に、1つ以上のCDRからの残基が非ヒト抗体(ドナー抗体)の1つ以上のCDRからの残基と取り替えられているヒト抗体(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を有するマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、または非ヒト霊長類抗体などの、任意の適切な非ヒト抗体であり得る。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、ドナー抗体からの対応するフレームワーク領域残基と取り替えられる。ヒト化抗体はさらに、レシピエント抗体またはドナー抗体のいずれでも見られない残基を含んでいてもよい。いくつかの例では、これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させるために行われる。

40

【0024】

「イヌ化」は、イヌにおける治療薬として有用な処置法を生成するために、非イヌ抗原結合情報を、ドナー抗体から免疫原性の低いイヌ抗体受容体へ移すための方法を含むことができる。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限の配列を含有するキメラ抗体である。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

50

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、または所望の特性を有する人工配列などの非イヌ種（「ドナー」抗体）からの超可変領域残基と取り替えられたイヌ抗体配列（「受容体」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残基と取り替えられる。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では見られない残基を含む。いくつかの例では、これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させるために行われる。イヌ化抗体はさらに、イヌ抗体の免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含んでもよい。

#### 【0025】

「ネコ化」は、ネコにおける治療薬として有用な処置法を生成するために、非ネコ抗原結合情報を、ドナー抗体から免疫原性の低いネコ抗体受容体へ移すための方法を含むことができる。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限の配列を含有するキメラ抗体である。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、または所望の特性を有する人工配列などの非ネコ種（「ドナー」抗体）からの超可変領域残基と取り替えられたネコ抗体配列（「受容体」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残基と取り替えられる。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では見られない残基を含む。いくつかの例では、これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練させるために行われる。ネコ化抗体はさらに、ネコ化抗体の免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部を含んでもよい。

#### 【0026】

スキヤフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、スキヤフォールドは非免疫グロブリンである。いくつかの例では、スキヤフォールドは非免疫グロブリン結合ドメインである。例えば、スキヤフォールドは抗体模倣物である。例示的な抗体模倣物としては、アンチカリン、アフィリン、アフィボディ分子、アフィマー、アフィチン、アルファボディ、アピマー、アトリマー、DARPin s、フィノマー、クニツドメインベースタンパク質、モノボディ、アンチカリン、ノッチン、アルマジロ反復タンパク質ベースタンパク質、および二環式ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0027】

スキヤフォールドが免疫グロブリンである、スキヤフォールドをコードする核酸を含む本明細書に記載されるライブラリーは、免疫グロブリンの少なくとも1つの領域においてバリエーションを含む。バリエーションに関する抗体の例示的な領域としては、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、限定されないが、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3を含む重鎖ドメインである。いくつかの例では、CDRは、限定されないが、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む軽鎖ドメインである。いくつかの例では、可変ドメインは、可変ドメイン、軽鎖（VL）または可変ドメイン、重鎖（VH）である。いくつかの例では、VLドメインは、鎖または鎖を含む。いくつかの例では、定常ドメインは、定常ドメイン、軽鎖（CL）または定常ドメイン、重鎖（CH）である。

#### 【0028】

本明細書に記載される方法は、スキヤフォールドをコードする核酸を含むライブラリーの合成を提供し、各核酸は少なくとも1つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをコードする。場合によっては、予め定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、バリエーションライブラリーは、合成された核酸によってコードされたその後のタンパク質中の単一の残基の複数の異なるバリエーションが標準的な翻訳プロセスによって生成されるように、少なくとも1つのコドンのバリエーションをコードする配

10

20

30

40

50

列を含む。いくつかの例では、スキファールドライブラリーは、複数の位置のバリエーションをまとめてコードする多様な核酸を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、またはVHのドメインの少なくとも1つのコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、またはVHのドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、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)の複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。バリエーションのためのコドンの例示的な数としては、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を超えるコドンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0029】

いくつかの例では、バリエーションのための免疫グロブリンの少なくとも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、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。例示的な遺伝子としては、IGHV1-18、IGHV1-69、IGHV1-8、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30/33rn、IGHV3-28、IGHV1-69、IGHV3-74、IGHV4-39、IGHV4-59/61、IGKV1-39、IGKV1-9、IGKV2-28、IGKV3-11、IGKV3-15、IGKV3-20、IGKV4-1、IGLV1-51、IGLV2-14、IGLV1-40、およびIGLV3-1が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、遺伝子は、IGHV1-69、IGHV3-30、IGHV3-23、IGHV3、IGHV1-46、IGHV3-7、IGHV1、またはIGHV1-8である。いくつかの例では、遺伝子は、IGHV1-69およびIGHV3-30である。いくつかの例では、遺伝子は、IGHJ3、IGHJ6、IGHJ、IGHJ4、IGHJ5、IGHJ2、またはIGH1である。いくつかの例では、遺伝子は、IGHJ3、IGHJ6、IGHJ、またはIGHJ4である。

20

30

#### 【0030】

免疫グロブリンスキファールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書で提供され、ライブラリー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、フラグメントは、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、またはVHのドメインを含む。いくつかの例では、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、スキファールドライブラリーは、少なくともまたは約2個のフラグメント、3個のフラグメント、4個のフラグメント、5個のフラグメント、または5個を超えるフラグメントで合成される。核酸フラグメントのそれぞれの長さまたは合成された核酸の平均の長さは、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を超える塩基対であってもよい。いくつかの例では、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。

40

#### 【0031】

本明細書に記載されるような免疫グロブリンスキファールドをコードする核酸を含むライブラリーは、翻訳時、様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、アミノ酸フ

50

ラグメントのそれぞれの長さまたは合成されたアミノ酸の平均の長さは、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を超えるアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、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、アミノ酸の長さは、約22アミノ酸~約75アミノ酸である。いくつかの例では、免疫グロブリンスキファールド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を超えるアミノ酸を含む。

#### 【0032】

バリエーションのための免疫グロブリンの少なくとも1つの領域のための多数のバリエーション配列は、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、多数のバリエーション配列は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、VH、またはそれらの組合せについてデノボ合成される。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、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)についてデノボ合成される。バリエーション配列の数は、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を超える配列であってもよい。いくつかの例では、バリエーション配列の数は、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個を超える配列である。いくつかの例では、バリエーション配列の数は、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。

#### 【0033】

免疫グロブリンの少なくとも1つの領域のためのバリエーション配列は、いくつかの例では、長さまたは配列が異なる。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、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、VH、またはこれらの組合せに対するものである。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)に対するものである。いくつかの例では、バリエーション配列は、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、50、または50を超えるバリエーションヌクレオチドまたはアミノ酸を含む。いくつかの例では、バリエーション配列は、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個の追加のヌクレオチドまたはアミノ酸を含む。いくつかの例では、バリエーション配列は、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個以下のヌクレオチドまたはアミノ酸を含む。いくつかの例では、ライブラリーは少なくともまたは約 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、または $10^{10}$ を超えるバリエーションを含む。

#### 【0034】

スキファールドライブラリーの合成後、スキファールドライブラリーはスクリーニングおよび分析に使用されてもよい。例えば、スキファールドライブラリーは、ライブ

ラリー表示可能性およびパニングについてアッセイされる。いくつかの例では、表示可能性は、選択可能なタグを使用してアッセイされる。例示的なタグとしては、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、比色タグ、親和性タグ、あるいは当技術分野で知られている他の標識またはタグが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、タグは、ヒスチジン、ポリヒスチジン、myc、ヘマグルチニン(HA)、またはFLAGである。いくつかの例では、スキャフォールドライブラリーは、単一分子リアルタイム(SMRT)配列決定、ポロニー配列決定、ライゲーションによる配列決定、可逆的ターミネーター配列決定、プロトン検出配列決定、イオン半導体配列決定、ナノポア配列決定、電子配列決定、パイロシーケンシング、マクサム・ギルバート配列決定、鎖終結(例えば、サンガー)配列決定、+S配列決定、または合成による配列決定などを含むがこれらに限定されない様々な方法を用いる配列決定によってアッセイされる。

10

## 【0035】

いくつかの例では、スキャフォールドライブラリーは、機能活性、構造安定性(例えば、熱安定性またはpH安定性)、発現、特異性、またはそれらの組合せについてアッセイされる。いくつかの例では、スキャフォールドライブラリーは、フォールディングが可能なスキャフォールドについてアッセイされる。いくつかの例では、抗体の領域は、機能活性、構造安定性、発現、特異性、フォールディング、またはそれらの組合せについてアッセイされる。例えば、VH領域またはVL領域は、機能活性、構造的安定性、発現、特異性、フォールディング、またはそれらの組合せについてアッセイされる。

20

## 【0036】

アデノシンA2A受容体ライブラリー

## 【0037】

アデノシンA2A受容体結合ドメインのための配列を含むスキャフォールドをコードする核酸を含むアデノシンA2A受容体結合ライブラリーが、本明細書に提供される。いくつかの例では、スキャフォールドは免疫グロブリンである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ドメインのための配列を含むスキャフォールドは、アデノシンA2A受容体結合ドメインとアデノシンA2A受容体との間の相互作用によって決定される。

## 【0038】

アデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、アデノシンA2A受容体上の表面相互作用に基づいて設計される。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、配列番号1によって定義されるような配列を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、アデノシンA2A受容体のアミノ末端またはカルボキシ末端と相互に作用する。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、膜貫通ドメイン1(TM1)、膜貫通ドメイン2(TM2)、膜貫通ドメイン3(TM3)、膜貫通ドメイン4(TM4)、膜貫通ドメイン5(TM5)、膜貫通ドメイン6(TM6)、および膜貫通ドメイン7(TM7)を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの膜貫通ドメインと相互に作用する。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、アデノシンA2A受容体の細胞内表面と相互に作用する。例えば、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、細胞内ループ1(ICL1)、細胞内ループ2(ICL2)、および細胞内ループ3(ICL3)を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの細胞内ループと相互に作用する。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、アデノシンA2A受容体の細胞外表面と相互に作用する。例えば、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、アデノシンA2A受容体の少なくとも1つの細胞外ドメイン(ECD)または細胞外ループ(ECL)と相互に作用する。細胞外ループとしては、細胞外ループ1(ECL1)、細胞外ループ2(ECL2)、および細胞外ループ3(ECL3)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

## 【0039】

アデノシンA2A受容体結合ドメインが本明細書に記載され、アデノシンA2A受容体結合ドメインは、アデノシンA2A受容体リガンドとアデノシンA2A受容体との間の相

50

相互作用に基づいて設計される。いくつかの例では、リガンドはペプチドである。いくつかの例では、リガンドはアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体アゴニストである。いくつかの例では、リガンドはアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体アンタゴニストである。いくつかの例では、リガンドはアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体アロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは正のアロステリックモジュレーターである。アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体の例示的なリガンドとしては、DU172、PSB36、ZM241385、XAC、カフェイン、T4G、T4E、6DY、6DZ、6DX、6DV、8D1b、テオフィリン、UK-432097、アデノシン、NECA、および CGS21680 が挙げられるが、これらに限定されない。

10

**【0040】**

アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体リガンドとアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体との間の表面相互作用に基づいたアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインの配列は、様々な方法を使用して分析される。例えば、多種類のコンピュータ分析が行われる。いくつかの例では、構造分析が行われる。いくつかの例では、配列分析が行われる。配列分析は、当該技術分野で知られているデータベースを使用して実施可能である。データベースの非限定的な例としては、NCBI BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))、UCSC Genome Browser ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/))、UniProt ([www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/))、および IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY ([guidetopharmacology.org/](http://guidetopharmacology.org/)) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

**【0041】**

様々な生物中の配列分析に基づいて設計された A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインが本明細書に記載される。例えば、配列分析は、異なる生物における相同配列を同定するために行われる。例示的な生物としては、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、魚、ハエ、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。

**【0042】**

アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインの同定後に、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインをコードする核酸を含むライブラリーが生成され得る。いくつかの例では、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーは、立体配座リガンド相互作用、ペプチドリガンド相互作用、小分子リガンド相互作用、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体の細胞外ドメイン、またはアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体を標的とする抗体に基づいて設計されたアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインの配列を含む。いくつかの例では、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーは、ペプチドリガンド相互作用に基づいて設計されたアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインの配列を含む。いくつかの例では、リガンドは抗体リガンドではない。アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーは、タンパク質ライブラリーを生成するために翻訳され得る。いくつかの例では、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーは、ペプチドライブラリー、免疫グロブリンライブラリー、それらの誘導体、またはそれらの組合せを生成するために翻訳される。いくつかの例では、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーは、ペプチド模倣ライブラリーを生成するためにさらに修飾されるタンパク質ライブラリーを生成するために翻訳される。いくつかの例では、アデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーは、小分子を生成するために使用されるタンパク質ライブラリーを生成するために翻訳される。

30

40

**【0043】**

本明細書に記載される方法は、少なくとも 1 つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸を含むアデノシン A<sub>2</sub>A 受容体結合ドメインのライブラリーの合成を提供する。場合によっては、予め定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、バリエーションライブラリーは、合成された核酸によってコードされたその後のタンパク質中の単一の残基の複数の異なるバリエーションが標準的な翻

50

訳プロセスによって生成されるように、少なくとも1つのコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインのライブラリーは、複数の位置のバリエーションをまとめてコードする多様な核酸を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの少なくとも1つのコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。バリエーションのためのコドンの例示的な数としては、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を超えるコドンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

**【0044】**

本明細書に記載される方法は、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインをコードする核酸を含むライブラリーの合成を提供し、ライブラリーは、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定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、300、または300を超えるコドンが少ない長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定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、300、または300を超えるコドンが多い長さのバリエーションをコードする配列を含む。

20

**【0045】**

アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの同定後に、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインは本明細書に記載されているようなスキファールドに配置され得る。いくつかの例では、スキファールドは免疫グロブリンである。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインはCDRH3領域に配置される。スキファールドに配置され得るアデノシン A 2 A 受容体結合ドメインも、モチーフと称することができる。アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインを含むスキファールドは、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、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインを含むスキファールドは、アデノシン A 2 A 受容体との接触を可能にする。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインを含むスキファールドは、アデノシン A 2 A 受容体との高親和性結合を可能にする。アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの例示的なアミノ酸配列は、表1に記載される。

30

**【0046】**

40

50

【表 1】

表 1. アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインのアミノ酸配列

配列番号	GPCR	アミノ酸配列
1	アデノシン A 2 A 受容体	MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLVCWAVWLNSNLQNVITNYFVVS LAAADIAVGVLAIPFAITISTGFCACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLA AIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCG QPKEGKNHSQGC GEGQVACLFEDVVP MNYMVYFNFFACVLVPLLL MLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVHAAKSLAIIV GLFALCWLP LHIINCFTFFCPDCSHAPLWLMYLAIVLSHTNSVVPFIY AYRIREFRQTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLA AHGSDGEQVSL RLNGHPPGVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSAQESQGNTGLPD VELLSHELKGVCPPEPGLDDPLAQDGAGVS

10

【 0 0 4 7 】

アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインを含むスキフォールドまたは免疫グロブリンが本明細書に提供され、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列はアデノシン A 2 A 受容体との相互作用を支持する。配列は、アデノシン A 2 A 受容体リガンドの配列に対して相同または同一であり得る。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列は、配列番号 1 に対して少なくともまたは約 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列は、配列番号 1 に対して少なくともまたは約 95% の相同性を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列は、配列番号 1 に対して少なくともまたは約 97% の相同性を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列は、配列番号 1 に対して少なくともまたは約 99% の相同性を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列は、配列番号 1 に対して少なくともまたは約 100% の相同性を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 A 受容体結合ドメインの配列は、配列番号 1 の少なくともまたは約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、または 400 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む。

20

30

【 0 0 4 8 】

抗体または免疫グロブリンが本明細書に提供され、抗体または免疫グロブリンは、配列番号 540 ~ 717 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性の配列を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 540 ~ 717 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 95% の配列同一性を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 540 ~ 717 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 97% の配列同一性を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 540 ~ 717 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 99% の配列同一性を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 540 ~ 717 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 100% の配列同一性を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 540 ~ 717 のいずれか 1 つの少なくともまたは約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、または 110 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む。

40

【 0 0 4 9 】

50

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、表 15 ~ 16 に記載の配列を含む相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 539 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を含む相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 539 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 95% の相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 539 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 97% の相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 539 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 99% の相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 539 のいずれか 1 つの少なくともまたは約 100% の相補性決定領域 (CDR) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 539 のいずれか 1 つの少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む相補性決定領域 (CDR) を含む。

10

**【0050】**

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 94 もしくは 273 ~ 361 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を含む CDR 1 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 94 および 273 ~ 361 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 95% の相補性決定領域 (CDR 1) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 94 もしくは 273 ~ 361 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 97% の相補性決定領域 (CDR 1) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 94 もしくは 273 ~ 361 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 99% の相補性決定領域 (CDR 1) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 270 もしくは 273 ~ 537 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 100% の相補性決定領域 (CDR 1) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 94 もしくは 273 ~ 361 のいずれか 1 つの少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む CDR 1 を含む。

20

30

**【0051】**

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 95 ~ 183 および 362 ~ 450 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を含む CDR 2 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 95 ~ 183 および 362 ~ 450 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 95% の相補性決定領域 (CDR 2) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 795 ~ 183 および 362 ~ 450 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 97% の相補性決定領域 (CDR 2) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 95 ~ 183 および 362 ~ 450 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 99% の相補性決定領域 (CDR 2) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 95 ~ 183 および 362 ~ 450 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 100% の相補性決定領域 (CDR 2) を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 95 ~ 183 および 362 ~ 450 のいずれか 1 つの少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含

40

50

む C D R 2 を含む。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 および 4 5 1 ~ 5 3 9 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む C D R 3 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 および 4 5 1 ~ 5 3 9 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 9 5 % の相同性を含む C D R 3 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 および 4 5 1 ~ 5 3 9 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 9 7 % の相同性を含む C D R 3 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 および 4 5 1 ~ 5 3 9 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 9 9 % の相同性を含む C D R 3 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 および 4 5 1 ~ 5 3 9 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 1 0 0 % の相同性を含む C D R 3 を含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 および 4 5 1 ~ 5 3 9 のいずれか 1 つの少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む C D R 3 を含む。

10

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 9 4 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % の配列同一性を含む C D R H 1 と、配列番号 9 5 ~ 1 8 3 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む C D R H 2 と、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む C D R H 3 とを含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 9 4 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 9 5 %、9 7 %、9 9 %、または 1 0 0 % の相同性を含む C D R H 1 と、配列番号 9 5 ~ 1 8 3 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 9 5 %、9 7 %、9 9 %、または 1 0 0 % の相同性を含む C D R H 2 と、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 のいずれか 1 つに対して少なくともまたは約 9 5 %、9 7 %、9 9 %、または 1 0 0 % の相同性を含む C D R H 3 とを含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 6 ~ 9 4 の少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む C D R H 1 と、配列番号 9 5 ~ 1 8 3 の少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む C D R H 2 と、配列番号 1 8 4 ~ 2 7 2 の少なくともまたは約 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または 16 を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む C D R H 3 とを含む。

20

30

40

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号 2 7 3 ~ 3 6 1 に対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む C D R L 1 と、配列番号 3 6 2 ~ 4 5 0 に対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む C D R L 2 と、配列番号 4 5 1 ~ 5 3 9 に対して少なくともまたは約 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を含む C D R L 3 とを含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号

50

273～361に対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRL1と、配列番号362～450に対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRL2と、配列番号451～539に対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRL3とを含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号273～361の少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRL1と、配列番号362～450の少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRL2と、配列番号451～539の少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRL3とを含む。

10

#### 【0055】

いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号6～94のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列同一性を含むCDRH1と、配列番号95～183のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含むCDRH2と、配列番号184～272のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含むCDRH3と、配列番号273～362のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含むCDRL1と、配列番号362～450のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含むCDRL2と、配列番号451～539のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含むCDRL3とを含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号6～94のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRH1と、配列番号95～183のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRH2と、配列番号184～272のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRH3と、配列番号273～362のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRL1と、配列番号362～450のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRL2と、配列番号451～539のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%、97%、99%、または100%の相同性を含むCDRL3とを含む。いくつかの例では、抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号6～94のいずれか1つの少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRH1と、配列番号95～183のいずれか1つの少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRH2と、配列番号184～272のいずれか1つの少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRH3と、配列番号273～362のいずれか1つの少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRL1と、配列番号362～450のいずれか1つの少なくともまたは約3、4

20

30

40

50

、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRL2と、配列番号451～539のいずれか1つの少なくともまたは約3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、または16を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含むCDRL3とを含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、アデノシンA2A受容体に結合する抗体または免疫グロブリンが本明細書に記載される。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号540～628のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号540～628のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%の配列同一性を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号540～628のいずれか1つに対して少なくともまたは約97%の配列同一性を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号540～628のいずれか1つに対して少なくともまたは約99%の配列同一性を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号540～628のいずれか1つに対して少なくともまたは約100%の配列同一性を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号540～628の少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、または110を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0057】

いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号629～717のいずれか1つに対して少なくともまたは約70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号629～717のいずれか1つに対して少なくともまたは約95%の配列同一性を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号629～717のいずれか1つに対して少なくともまたは約97%の配列同一性を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号629～717のいずれか1つに対して少なくともまたは約99%の配列同一性を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号629～717のいずれか1つに対して少なくともまたは約100%の配列同一性を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体または免疫グロブリンの配列は、配列番号629～717の少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、または400を超えるアミノ酸を有する少なくとも一部分を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号540に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号629に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号541に記載のア

10

20

30

40

50











鎖は、配列番号 710 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 622 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブ

リン軽鎖は、配列番号 711 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 623 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号 712 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 624 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号 713 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 625 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号 714 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 626 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号 715 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 627 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号 716 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、配列番号 628 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、免疫グロブリン軽鎖は、配列番号 717 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。

#### 【0059】

ドメイン型のバリエーション、ドメイン長、もしくは残基バリエーションを含むアデノシン A2A 受容体結合ドメインを含む、スキファールドまたは免疫グロブリンをコードする核酸を含むアデノシン A2A 受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。いくつかの例では、ドメインは、アデノシン A2A 受容体結合ドメインを含むスキファールド中の領域である。例えば、領域は、VH、CDRH3、または VL ドメインである。いくつかの例では、ドメインはアデノシン A2A 受容体結合ドメインである。

#### 【0060】

本明細書に記載される方法は、少なくとも 1 つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸のアデノシン A2A 受容体結合ライブラリーの合成を提供する。場合によっては、予め定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、バリエーションライブラリーは、合成された核酸によってコードされたその後のタンパク質中の単一の残基の複数の異なるバリエーションが標準的な翻訳プロセスによって生成されるように、少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、アデノシン A2A 受容体結合ライブラリーは、複数の位置のバリエーションをまとめてコードする多様な核酸を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、VH、CDRH3、または VL ドメインの少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A2A 受容体結合ドメインの少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。例えば、表 1 に列挙されるようなアデノシン A2A 受容体結合ドメインの少なくとも 1 つの単一コドンが変化する。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、VH、CDRH3、または VL ドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A2A 受容体結合ドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。バリエーションのためのコドンの例示的な数としては、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を超えるコドンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0061】

本明細書に記載される方法は、少なくとも1つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸のアデノシンA2A受容体結合ライブラリーの合成を提供し、アデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、ドメインの長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ドメインは、VH、CDRH3、またはVLドメインである。いくつかの例では、ドメインはアデノシンA2A受容体結合ドメインである。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定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、300、または300を超えるコドンが少ない長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定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、200225、250、275、300、または300を超えるコドンが多い長さのバリエーションをコードする配列を含む。

10

【0062】

アデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードする核酸を含むアデノシンA2A受容体結合ライブラリーが本明細書に提供され、アデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、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、フラグメントは、VH、CDRH3、またはVLドメインを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、少なくともまたは約2個のフラグメント、3個のフラグメント、4個のフラグメント、5個のフラグメント、または5個を超えるフラグメントで合成される。核酸フラグメントのそれぞれの長さまたは合成された核酸の平均の長さは、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を超える塩基対であってもよい。いくつかの例では、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。

20

30

【0063】

本明細書に記載されるようなアデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードする核酸を含むアデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、翻訳時、様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、アミノ酸フラグメントのそれぞれの長さまたは合成されたアミノ酸の平均の長さは、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を超えるアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、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、アミノ酸の長さは、約22~約75アミノ酸である。

40

【0064】

アデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードするデノボ合成されたバリエーション配列を含むアデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、多数のバリエーション配列を含む。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、VH、またはそれらの組合せについてデノボ合成される。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、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(FW

50

3)、またはフレームワーク要素4(FW4)についてデノボ合成される。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、アデノシンA2A受容体結合ドメインについてデノボ合成される。例えば、バリエーション配列の数は、VHドメインについては約1~約10の配列、アデノシンA2A受容体結合ドメインについては約 $10^8$ の配列、およびVKドメインについては約1~約44の配列のである。バリエーション配列の数は、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を超える配列であってもよい。いくつかの例では、バリエーション配列の数は、約10~300、25~275、50~250、75~225、100~200、または125~150の配列である。

10

#### 【0065】

アデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードするデノボ合成されたバリエーション配列を含む、アデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、改善された多様性を含む。例えば、バリエーションは、アデノシンA2A受容体結合ドメインバリエーションを、N末端CDRH3バリエーションおよびC末端CDRH3バリエーションを含む免疫グロブリンスキフォールドのバリエーションに配置することにより生成される。いくつかの例では、バリエーションは、親和性成熟バリエーションを含む。代替的にまたは組み合わせて、バリエーションは、CDRH1、CDRH2、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含むがこれらに限定されない免疫グロブリンの他の領域におけるバリエーションを含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ライブラリーのバリエーションの数は、少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える同一でない配列である。例えば、VH領域については約10のバリエーション配列、CDRH3領域については約237のバリエーション配列、ならびにVLおよびCDRL3の領域については約43のバリエーション配列を含むライブラリーは、 $10^5$ の同一でない配列( $10 \times 237 \times 43$ )を含む。

20

#### 【0066】

抗体の少なくとも1つの領域にバリエーションを含むアデノシンA2A受容体抗体をコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、領域はCDR領域である。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体抗体は、1つの重鎖可変ドメインを含む単ドメイン抗体、例えばVHH抗体である。いくつかの例では、VHH抗体は、1つ以上のCDR領域にバリエーションを含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、CDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、または3000を超える配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、CDR1、CDR2、あるいはCDR3の少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列を含む。例えば、ライブラリーは、CDR1の少なくとも2000の配列、CDR2については少なくとも1200の配列、およびCDR3については少なくとも1600の配列を含む。いくつかの例では、各配列は同一でない。

30

40

#### 【0067】

いくつかの例では、CDR1、CDR2、またはCDR3は、軽鎖可変ドメイン(VL)のものである。軽鎖可変ドメイン(VL)のCDR1、CDR2、またはCDR3は、それぞれCDRL1、CDRL2、またはCDRL3と称することができる。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VLのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、4

50

0、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、または3000を超える配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VLのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列を含む。例えば、ライブラリーは、VLのCDR1の少なくとも20の配列、VLのCDR2の少なくとも4つの配列、およびVLのCDR3の少なくとも140の配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、VLのCDR1の少なくとも2つの配列、VLのCDR2の少なくとも1つの配列、およびVLのCDR3の少なくとも3000の配列を含む。いくつかの例では、VLは、IGKV1-39、IGKV1-9、IGKV2-28、IGKV3-11、IGKV3-15、IGKV3-20、IGKV4-1、IGLV1-51、IGLV2-14、IGLV1-40、またはIGLV3-1である。いくつかの例では、VLはIGKV2-28である。いくつかの例では、VLはIGLV1-51である。

10

#### 【0068】

いくつかの例では、CDR1、CDR2、またはCDR3は、可変ドメイン、重鎖(VH)のものである。可変ドメイン、重鎖(VH)のCDR1、CDR2、またはCDR3は、それぞれCDRH1、CDRH2、またはCDRH3と称することができる。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VHのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、または3000を超える配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VHのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列を含む。例えば、ライブラリーは、VHのCDR1の少なくとも30の配列、VHのCDR2の少なくとも570の配列、およびVHのCDR3の少なくとも $10^8$ の配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、VHのCDR1の少なくとも30の配列、VHのCDR2の少なくとも860の配列、およびVHのCDR3の少なくとも $10^7$ の配列を含む。いくつかの例では、VHは、IGHV1-18、IGHV1-69、IGHV1-8、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30/33rn、IGHV3-28、IGHV3-74、IGHV4-39、またはIGHV4-59/61である。いくつかの例では、VHは、IGHV1-69、IGHV3-30、IGHV3-23、IGHV3、IGHV1-46、IGHV3-7、IGHV1、またはIGHV1-8である。いくつかの例では、VHは、IGHV1-69およびIGHV3-30である。いくつかの例では、VHはIGHV3-23である。

20

30

#### 【0069】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるようなライブラリーは、様々な長さのCDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3を含む。いくつかの例では、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3の長さは、少なくともまたは約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、40、50、60、70、80、90、または90を超えるアミノ酸長を含む。例えば、CDRH3は、少なくともまたは約12、15、16、17、20、21、または23アミノ酸長を含む。いくつかの例では、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3は、約1~約10、約5~約15、約10~約20、または約15~約30のアミノ酸長の範囲を含む。

40

50

## 【0070】

本明細書に記載されるようなバリエーションCDR配列を有する抗体をコードする核酸を含むライブラリーは、翻訳時、様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、アミノ酸フラグメントのそれぞれの長さまたは合成されたアミノ酸の平均の長さは、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を超えるアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、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、アミノ酸の長さは、約22アミノ酸~約75アミノ酸である。いくつかの例では、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を超えるアミノ酸を含む。

10

## 【0071】

CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3の長さの比率は、本明細書に記載されるライブラリーにおいて変動し得る。いくつかの例では、少なくともまたは約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、40、50、60、70、80、90、または90を超えるアミノ酸長を含むCDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3は、ライブラリーの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または90%以上を含む。例えば、約23アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に40%存在し、約21アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に30%存在し、約17アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に20%存在し、約12アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に10%存在する。いくつかの例では、約20アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に40%存在し、約16アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に30%存在し、約15アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に20%存在し、約12アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に10%存在する。

20

30

## 【0072】

VHH抗体をコードする本明細書に記載されるようなライブラリーは、少なくともまたは約 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列の理論的多様性を有するライブラリーを生成するためにシャッフルされたバリエーションCDR配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、少なくともまたは約 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列の最終的なライブラリー多様性を有している。

## 【0073】

免疫グロブリンをコードするアデノシンA2A受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは抗体である。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンはVHH抗体である。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、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未満のアデノシンA2A受容体への結合親和性(例えば、 $K_D$ )を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、1nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、1.2nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、2nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体

40

50

免疫グロブリンは、5 nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、10 nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、13.5 nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、15 nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、20 nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、25 nM未満の $K_D$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、30 nM未満の $K_D$ を含む。

【0074】

いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、アデノシンA2A受容体アゴニストである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、アデノシンA2A受容体アンタゴニストである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、アデノシンA2A受容体アロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは正のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約1 nM、2 nM、4 nM、6 nM、8 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、120 nM、140 nM、160 nM、180 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1000 nM、または1000 nMを超える濃度で、アゴニスト効果、アンタゴニスト効果、またはアロステリック効果をもたらす。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 nM、2 nM、4 nM、6 nM、8 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、または100 nMを超える濃度の負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、約0.001~約100、0.01~約90、約0.1~約80、1~約50、約10~約40 nM、または約1~約10 nMの範囲の濃度の負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.06、0.07、0.08、0.9、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、または6 nMを超える $EC_{50}$ または $IC_{50}$ を含む。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約1 nM、2 nM、4 nM、6 nM、8 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、または100 nMを超える $EC_{50}$ または $IC_{50}$ を含む。

【0075】

本明細書に記載されるようなアデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、改善された特性を含み得る。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンはモノマーである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは凝集しにくい。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンの少なくともまたは約70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%はモノマーである。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは熱安定性である。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体免疫グロブリンは、非特異的結合の減少をもたらす。

【0076】

アデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むアデノシンA2A受容体結合ライブラリーの合成後、ライブラリーはスクリーニングおよび分析に使用され得る。例えば、ライブラリーは、ライブラリー表示可能性およびパニングについてアッセイされる。いくつかの例では、表示可能性は、選択可能なタグを使用してアッセイされる。例示的なタグとしては、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ

10

20

30

40

50

、比色タグ、親和性タグ、あるいは当技術分野で知られている他の標識またはタグが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、タグは、ヒスチジン、ポリヒスチジン、myc、ヘマグルチニン（HA）、またはFLAGである。アデノシンA2A受容体結合ライブラリーは、GFP、FLAG、Lucy、ならびにDNAバーコードなどの複数のタグを有するアデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキファールドをコードする核酸を含み得る。いくつかの例では、ライブラリーは、単一分子リアルタイム（SMRT）配列決定、ポロニー配列決定、ライゲーションによる配列決定、可逆的ターミネーター配列決定、プロトン検出配列決定、イオン半導体配列決定、ナノポア配列決定、電子配列決定、パイロシーケンシング、マクサム・ギルバート配列決定、鎖終結（例えば、サンガー）配列決定、+S配列決定、または合成による配列決定などを含むがこれらに

10

## 【0077】

アデノシンA2B受容体ライブラリー

## 【0078】

アデノシンA2B受容体結合ドメインのための配列を含むスキファールドをコードする核酸を含むアデノシンA2B受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。いくつかの例では、スキファールドは免疫グロブリンである。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体結合ドメインのための配列を含むスキファールドは、アデノシンA2B受容体結合ドメインとアデノシンA2B受容体との間の相互作用によって決定される。

## 【0079】

アデノシンA2B受容体結合ドメインを含むスキファールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、アデノシンA2B受容体上の表面相互作用に基づいて設計される。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、アデノシンA2B受容体のアミノ末端またはカルボキシ末端と相互に作用する。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、膜貫通ドメイン1（TM1）、膜貫通ドメイン2（TM2）、膜貫通ドメイン3（TM3）、膜貫通ドメイン4（TM4）、膜貫通ドメイン5（TM5）、膜貫通ドメイン6（TM6）、および膜貫通ドメイン7（TM7）を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの膜貫通ドメインと相互に作用する。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、アデノシンA2B受容体の細胞内表面と相互に作用する。例えば、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、細胞内ループ1（ICL1）、細胞内ループ2（ICL2）、および細胞内ループ3（ICL3）を含むがこれらに限定されない少なくとも1つの細胞内ループと相互に作用する。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、アデノシンA2B受容体の細胞外表面と相互に作用する。例えば、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、アデノシンA2B受容体の少なくとも1つの細胞外ドメイン（ECD）または細胞外ループ（ECL）と相互に作用する。細胞外ループとしては、細胞外ループ1（ECL1）、細胞外ループ2（ECL2）、および細胞外ループ3（ECL3）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

## 【0080】

アデノシンA2B受容体結合ドメインが本明細書に記載され、アデノシンA2B受容体結合ドメインは、アデノシンA2B受容体リガンドとアデノシンA2B受容体との間の相互作用に基づいて設計される。いくつかの例では、リガンドはペプチドである。いくつかの例では、リガンドはアデノシンA2B受容体アゴニストである。いくつかの例では、リガンドはアデノシンA2B受容体アンタゴニストである。いくつかの例では、リガンドはアデノシンA2B受容体アロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは正のアロステリックモジュレーターである。アデノシンA2B受容体の例示的なリガンドとしては、DU172、PSB36、ZM241385、XAC、カフェイン、T4G、T4E、6DY、6DZ、6DX、6DV、8D1b、テオフィリン、UK-432097、アデノシン、NECA、およびCGS2168

40

50

0 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0081】

アデノシン A 2 B 受容体リガンドとアデノシン A 2 B 受容体との間の表面相互作用に基づいたアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの配列は、様々な方法を使用して分析される。例えば、多種類のコンピュータ分析が行われる。いくつかの例では、構造分析が行われる。いくつかの例では、配列分析が行われる。配列分析は、当該技術分野で知られているデータベースを使用して実施可能である。データベースの非限定的な例としては、NCBI BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))、UCSC Genome Browser ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/))、UniProt ([www.uniprot.org/](http://www.uniprot.org/))、および IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY ([guidetopharmacology.org/](http://guidetopharmacology.org/)) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0082】

様々な生物中の配列分析に基づいて設計された A 2 B 受容体結合ドメインが本明細書に記載される。例えば、配列分析は、異なる生物における相同配列を同定するために行われる。例示的な生物としては、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、魚、ハエ、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの同定後に、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインをコードする核酸を含むライブラリーが生成され得る。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、立体配座リガンド相互作用、ペプチドリガンド相互作用、小分子リガンド相互作用、アデノシン A 2 B 受容体の細胞外ドメイン、またはアデノシン A 2 B 受容体を標的とする抗体に基づいて設計されたアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの配列を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、ペプチドリガンド相互作用に基づいて設計されたアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの配列を含む。いくつかの例では、リガンドは抗体リガンドではない。アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、タンパク質ライブラリーを生成するために翻訳され得る。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、ペプチドライブラリー、免疫グロブリンライブラリー、それらの誘導体、またはそれらの組合せを生成するために翻訳される。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、ペプチド模倣ライブラリーを生成するためにさらに修飾されるタンパク質ライブラリーを生成するために翻訳される。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、小分子を生成するために使用されるタンパク質ライブラリーを生成するために翻訳される。

20

30

【0084】

本明細書に記載される方法は、少なくとも 1 つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸を含むアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーの合成を提供する。場合によっては、予め定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、バリエーションライブラリーは、合成された核酸によってコードされたその後のタンパク質中の単一の残基の複数の異なるバリエーションが標準的な翻訳プロセスによって生成されるように、少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインのライブラリーは、複数の位置のバリエーションをまとめてコードする多様な核酸を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。バリエーションのためのコドンの例示的な数としては、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

40

50

、 2 2 5、 2 5 0、 2 7 5、 3 0 0、 または 3 0 0 を超えるコドンが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載される方法は、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインをコードする核酸を含むライブラリーの合成を提供し、ライブラリーは、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定められた参照配列と比較して、少なくともまたは約 1、 5、 1 0、 1 5、 2 0、 2 5、 3 0、 3 5、 4 0、 4 5、 5 0、 5 5、 6 0、 6 5、 7 0、 7 5、 8 0、 8 5、 9 0、 9 5、 1 0 0、 1 2 5、 1 5 0、 1 7 5、 2 2 5、 2 5 0、 2 7 5、 3 0 0、 または 3 0 0 を超えるコドンが少ない長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定められた参照配列と比較して、少なくともまたは約 1、 5、 1 0、 1 5、 2 0、 2 5、 3 0、 3 5、 4 0、 4 5、 5 0、 5 5、 6 0、 6 5、 7 0、 7 5、 8 0、 8 5、 9 0、 9 5、 1 0 0、 1 2 5、 1 5 0、 1 7 5、 2 0 0 2 2 5、 2 5 0、 2 7 5、 3 0 0、 または 3 0 0 を超えるコドンが多い長さのバリエーションをコードする配列を含む。

10

【 0 0 8 6 】

アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの同定後に、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインは本明細書に記載されているようなスキャフォールドに配置され得る。いくつかの例では、スキャフォールドは免疫グロブリンである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインは C D R H 3 領域に配置される。スキャフォールドに配置され得るアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインも、モチーフと称することができる。アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキャフォールドは、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、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキャフォールドは、アデノシン A 2 B 受容体との接触を可能にする。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキャフォールドは、アデノシン A 2 B 受容体との高親和性結合を可能にする。

20

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、アデノシン A 2 B 受容体に結合する抗体または免疫グロブリンが本明細書に記載される。

【 0 0 8 8 】

ドメイン型のバリエーション、ドメイン長、もしくは残基バリエーションを含むアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含む、スキャフォールドまたは免疫グロブリンをコードする核酸を含むアデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。いくつかの例では、ドメインは、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキャフォールド中の領域である。例えば、領域は、V H、C D R H 3、または V L ドメインである。いくつかの例では、ドメインはアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインである。

30

【 0 0 8 9 】

本明細書に記載される方法は、少なくとも 1 つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸のアデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーの合成を提供する。場合によっては、予め定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、バリエーションライブラリーは、合成された核酸によってコードされたその後のタンパク質中の単一の残基の複数の異なるバリエーションが標準的な翻訳プロセスによって生成されるように、少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、複数の位置のバリエーションをまとめてコードする多様な核酸を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、V H、C D R H 3、または V L ドメインの少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの少なくとも単一のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、バリエーションライブラリーは、V H、C D R H 3、または V L ドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例

40

50

では、バリエーションライブラリーは、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインの複数のコドンのバリエーションをコードする配列を含む。バリエーションのためのコドンの例示的な数としては、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 を超えるコドンが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0090】

本明細書に記載される方法は、少なくとも 1 つの予め定められた参照核酸配列の予め定められたバリエーションをそれぞれコードする核酸のアデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーの合成を提供し、アデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、ドメインの長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ドメインは、VH、CDRH3、または VL ドメインである。いくつかの例では、ドメインはアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインである。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定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、300、または 300 を超えるコドンが少ない長さのバリエーションをコードする配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、予め定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、300、または 300 を超えるコドンが多い長さのバリエーションをコードする配列を含む。

#### 【0091】

アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードする核酸を含むアデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーが本明細書に提供され、アデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、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、フラグメントは、VH、CDRH3、または VL ドメインを含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、少なくともまたは約 2 個のフラグメント、3 個のフラグメント、4 個のフラグメント、5 個のフラグメント、または 5 個を超えるフラグメントで合成される。核酸フラグメントのそれぞれの長さまたは合成された核酸の平均の長さは、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 を超える塩基対であってもよい。いくつかの例では、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。

#### 【0092】

本明細書に記載されるようなアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードする核酸を含むアデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、翻訳時、様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、アミノ酸フラグメントのそれぞれの長さまたは合成されたアミノ酸の平均の長さは、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 を超えるアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、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、アミノ酸の長さは、約 22 ~ 約 75 アミノ酸である。

#### 【0093】

アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードするデノボ合成されたバリエーション配列を含むアデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、多数のバリエ

ント配列を含む。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3、VL、VH、またはそれらの組合せについてデノボ合成される。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、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)についてデノボ合成される。いくつかの例では、多数のバリエーション配列は、アデノシンA2B受容体結合ドメインについてデノボ合成される。例えば、バリエーション配列の数は、VHドメインについては約1~約10の配列、アデノシンA2B受容体結合ドメインについては約108の配列、およびVKドメインについては約1~約44の配列のである。バリエーション配列の数は、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を超える配列であってもよい。いくつかの例では、バリエーション配列の数は、約10~300、25~275、50~250、75~225、100~200、または125~150の配列である。

10

#### 【0094】

アデノシンA2B受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードするデノボ合成されたバリエーション配列を含む、アデノシンA2B受容体結合ライブラリーは、改善された多様性を含む。例えば、バリエーションは、アデノシンA2B受容体結合ドメインバリエーションを、N末端CDRH3バリエーションおよびC末端CDRH3バリエーションを含む免疫グロブリンスキフォールドのバリエーションに配置することにより生成される。いくつかの例では、バリエーションは、親和性成熟バリエーションを含む。代替的にまたは組み合わせて、バリエーションは、CDRH1、CDRH2、CDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含むがこれらに限定されない免疫グロブリンの他の領域におけるバリエーションを含む。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体結合ライブラリーのバリエーションの数は、少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える同一でない配列である。例えば、VH領域については約10のバリエーション配列、CDRH3領域については約237のバリエーション配列、ならびにVLおよびCDRL3の領域については約43のバリエーション配列を含むライブラリーは、 $10^5$ の同一でない配列( $10 \times 237 \times 43$ )を含む。

20

30

#### 【0095】

抗体の少なくとも1つの領域にバリエーションを含むアデノシンA2B受容体抗体をコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、領域はCDR領域である。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体抗体は、1つの重鎖可変ドメインを含む単ドメイン抗体、例えばVHH抗体である。いくつかの例では、VHH抗体は、1つ以上のCDR領域にバリエーションを含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、CDR1、CDR2、あるいはCDR3の少なくともまたは約1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、または3000を超える配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、CDR1、CDR2、あるいはCDR3の少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列を含む。例えば、ライブラリーは、CDR1の少なくとも2000の配列、CDR2については少なくとも1200の配列、およびCDR3については少なくとも1600の配列を含む。いくつかの例では、各配列は同一でない。

40

#### 【0096】

いくつかの例では、CDR1、CDR2、またはCDR3は、軽鎖可変ドメイン(VL

50

）のものである。軽鎖可変ドメイン（VL）のCDR1、CDR2、またはCDR3は、それぞれCDRL1、CDRL2、またはCDRL3と称することができる。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VLのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、または3000を超える配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VLのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列を含む。例えば、ライブラリーは、VLのCDR1の少なくとも20の配列、VLのCDR2の少なくとも4つの配列、およびVLのCDR3の少なくとも140の配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、VLのCDR1の少なくとも2つの配列、VLのCDR2の少なくとも1つの配列、およびVLのCDR3の少なくとも3000の配列を含む。いくつかの例では、VLは、IGKV1-39、IGKV1-9、IGKV2-28、IGKV3-11、IGKV3-15、IGKV3-20、IGKV4-1、IGLV1-51、IGLV2-14、IGLV1-40、またはIGLV3-1である。いくつかの例では、VLはIGKV2-28である。いくつかの例では、VLはIGLV1-51である。

10

#### 【0097】

20

いくつかの例では、CDR1、CDR2、またはCDR3は、可変ドメイン、重鎖（VH）のものである。可変ドメイン、重鎖（VH）のCDR1、CDR2、またはCDR3は、それぞれCDRH1、CDRH2、またはCDRH3と称することができる。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VHのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1200、1400、1600、1800、2000、2400、2600、2800、3000、または3000を超える配列を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーは、VHのCDR1、CDR2、またはCDR3の少なくともまたは約 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列を含む。例えば、ライブラリーは、VHのCDR1の少なくとも30の配列、VHのCDR2の少なくとも570の配列、およびVHのCDR3の少なくとも $10^8$ の配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、VHのCDR1の少なくとも30の配列、VHのCDR2の少なくとも860の配列、およびVHのCDR3の少なくとも $10^7$ の配列を含む。いくつかの例では、VHは、IGHV1-18、IGHV1-69、IGHV1-8、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30/33rn、IGHV3-28、IGHV3-74、IGHV4-39、またはIGHV4-59/61である。いくつかの例では、VHは、IGHV1-69、IGHV3-30、IGHV3-23、IGHV3、IGHV1-46、IGHV3-7、IGHV1、またはIGHV1-8である。いくつかの例では、VHは、IGHV1-69およびIGHV3-30である。いくつかの例では、VHはIGHV3-23である。

30

40

#### 【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるようなライブラリーは、様々な長さのCDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3を含む。いくつかの例では、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3の長さは、少なくともまたは約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、40、50、60、70、80、90、または90を

50

越えるアミノ酸長を含む。例えば、CDRH3は、少なくともまたは約12、15、16、17、20、21、または23アミノ酸長を含む。いくつかの例では、CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3は、約1～約10、約5～約15、約10～約20、または約15～約30のアミノ酸長の範囲を含む。

#### 【0099】

本明細書に記載されるようなバリエーションCDR配列を有する抗体をコードする核酸を含むライブラリーは、翻訳時、様々な長さのアミノ酸を含む。いくつかの例では、アミノ酸断片の各々の長さまたは合成されたアミノ酸の平均の長さは、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を超えるアミノ酸であってもよい。いくつかの例では、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、アミノ酸の長さは、約22アミノ酸～約75アミノ酸である。いくつかの例では、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を超えるアミノ酸を含む。

10

#### 【0100】

CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3の長さの比率は、本明細書に記載されるライブラリーにおいて変動し得る。いくつかの例では、少なくともまたは約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、40、50、60、70、80、90、または90を超えるアミノ酸長を含むCDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1、CDRH2、またはCDRH3は、ライブラリーの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または90%以上を含む。例えば、約23アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に40%存在し、約21アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に30%存在し、約17アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に20%存在し、約12アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に10%存在する。いくつかの例では、約20アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に40%存在し、約16アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に30%存在し、約15アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に20%存在し、約12アミノ酸長を含むCDRH3はライブラリー中に10%存在する。

20

30

#### 【0101】

VHH抗体をコードする本明細書に記載されるようなライブラリーは、少なくともまたは約 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列の理論的多様性を有するライブラリーを生成するためにシャッフルされたバリエーションCDR配列を含む。いくつかの例では、ライブラリーは、少なくともまたは約 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ 、 $10^{14}$ 、 $10^{15}$ 、 $10^{16}$ 、 $10^{17}$ 、 $10^{18}$ 、 $10^{19}$ 、 $10^{20}$ 、または $10^{20}$ を超える配列の最終的なライブラリー多様性を有している。

40

#### 【0102】

免疫グロブリンをコードするアデノシンA2B受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体免疫グロブリンは抗体である。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体免疫グロブリンはVHH抗体である。いくつかの例では、アデノシンA2B受容体免疫グロブリンは、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未満のアデノシンA2A受容体への結合

50

親和性（例えば、 $K_D$ ）を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、1 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、1.2 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、2 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、5 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、10 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、13.5 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、15 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、20 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、25 nM 未満の  $K_D$  を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、30 nM 未満の  $K_D$  を含む。

#### 【0103】

いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、アデノシン A 2 B 受容体アゴニストである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、アデノシン A 2 B 受容体アンタゴニストである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、アデノシン A 2 B 受容体アロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アロステリックモジュレーターは正のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約 1 nM、2 nM、4 nM、6 nM、8 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、120 nM、140 nM、160 nM、180 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1000 nM、または 1000 nM を超える濃度で、アゴニスト効果、アンタゴニスト効果、またはアロステリック効果をもたらす。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 nM、2 nM、4 nM、6 nM、8 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、または 100 nM を超える濃度の負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、約 0.001 ~ 約 100、0.01 ~ 約 90、約 0.1 ~ 約 80、1 ~ 約 50、約 10 ~ 約 40 nM、または約 1 ~ 約 10 nM の範囲の濃度の負のアロステリックモジュレーターである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約 0.001、0.0025、0.005、0.01、0.025、0.05、0.06、0.07、0.08、0.9、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、または 6 nM を超える EC50 または IC50 を含む。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、少なくともまたは約 1 nM、2 nM、4 nM、6 nM、8 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、または 100 nM を超える EC50 または IC50 を含む。

#### 【0104】

本明細書に記載されるようなアデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、改善された特性を含み得る。いくつかの例では、アデノシン A 2 B レセプター免疫グロブリンはモノマーである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B レセプター免疫グロブリンは凝集しにくい。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンの少なくともまたは約 70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 99% はモノマーである。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは熱安定性である。いくつかの例では、アデノシン A 2 B 受容体免疫グロブリンは、非特異的結合の減少をもたらす。

#### 【0105】

アデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキフォールドをコードする核酸を含む

アデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーの合成後、ライブラリーはスクリーニングおよび分析に使用され得る。例えば、ライブラリーは、ライブラリー表示可能性およびパニングについてアッセイされる。いくつかの例では、表示可能性は、選択可能なタグを使用してアッセイされる。例示的なタグとしては、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、比色タグ、親和性タグ、あるいは当技術分野で知られている他の標識またはタグが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、タグは、ヒスチジン、ポリヒスチジン、myc、ヘマグルチニン(HA)、またはFLAGである。アデノシン A 2 B 受容体結合ライブラリーは、GFP、FLAG、Lucy、ならびにDNAバーコードなどの複数のタグを有するアデノシン A 2 B 受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含み得る。いくつかの例では、ライブラリーは、単一分子リアルタイム(SMRT)配列決定、ポロニー配列決定、ライゲーションによる配列決定、可逆的ターミネーター配列決定、プロトン検出配列決定、イオン半導体配列決定、ナノポア配列決定、電子配列決定、パイロシーケンシング、マクサム・ギルバート配列決定、鎖終結(例えば、サンガー)配列決定、+S配列決定、または合成による配列決定などを含むがこれらに限定されない様々な方法を用いる配列決定によってアッセイされる。

10

**【0106】**

発現系

**【0107】**

アデノシン A 2 A 受容体結合ドメイン、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメイン、またはそれらの組合せを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、ライブラリーは改善された特異性、安定性、発現、フォールディング、または下流活性を有する。いくつかの例では、本明細書に記載されるライブラリーはスクリーニングおよび分析に使用される。

20

**【0108】**

アデノシン A 2 A 受容体結合ドメイン、アデノシン A 2 B 受容体結合ドメイン、またはそれらの組合せを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、核酸ライブラリーはスクリーニングおよび分析に使用される。いくつかの例では、スクリーニングおよび分析は、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。スクリーニングのための細胞は、生きている対象または細胞株から得られた主要な細胞を含む。細胞は、原核細胞(例えば、細菌および真菌)および真核細胞(例えば、植物および動物)からのものであってもよい。典型的な動物細胞は、マウス、ウサギ、霊長類、および昆虫からのものを含むが、これらに限定されない。いくつかの例では、スクリーニングのための細胞は、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、ヒト胚腎臓(HEK)細胞株、または赤ん坊のハムスター腎臓(BHK)細胞株を含むがこれらに限定されない細胞株を含んでいる。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ーはさらに多細胞生物に送達されることもある。典型的な多細胞生物は、植物、マウス、ウサギ、霊長類、および昆虫を含むが、これらに限定されない。

30

**【0109】**

本明細書に記載される核酸ライブラリーまたはそのコードされたタンパク質ライブラリーは、様々な薬理的または薬物動態学的特性についてスクリーニングされてもよい。いくつかの実施態様では、ライブラリーは、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理的または薬物動態学的特性としては、結合親和性、結合特異性、および結合アビディティが挙げられるが、これらに限定されない。スクリーニングされる本明細書に記載のライブラリーの例示的なインビトロの薬理的または薬物動態学的特性としては、治療効果、活性、前臨床毒性特性、臨床効果特性、臨床毒性特性、免疫原性、効力、および臨床安全性特性が挙げられるが、これらに限定されない。

40

**【0110】**

スクリーニングされ得る薬理的または薬物動態学的特性は、細胞結合親和性および細胞活性を含むがこれらに限定されない。例えば、細胞結合親和性アッセイまたは細胞活性

50

アッセイは、本明細書に記載されるライブラリーのアゴニスト効果、アンタゴニスト効果、またはアロステリック効果を決定するために実施される。いくつかの例では、細胞活性アッセイはcAMPアッセイである。いくつかの例では、本明細書に記載されるようなライブラリーは、アデノシンA2A受容体、アデノシンA2B受容体、またはアデノシンA2A受容体のリガンドおよびアデノシンA2B受容体の両方の細胞結合性もしくは細胞活性と比較される。

#### 【0111】

本明細書に記載されるようなライブラリーは、細胞ベースアッセイまたは非細胞ベースアッセイにおいてスクリーニングされ得る。非細胞ベースアッセイの例としては、ウイルス粒子の使用、インビトロの翻訳タンパク質の使用、ならびにアデノシンA2A受容体、アデノシンA2B受容体、またはアデノシンA2A受容体およびアデノシンA2B受容体の両方を有するプロテオリポソーム ( proteoaliposomes ) の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0112】

本明細書に記載されるような核酸ライブラリーは、配列決定によりスクリーニングされ得る。いくつかの例では、次世代シーケンスはアデノシンA2A受容体結合バリエーション、アデノシンA2B受容体結合バリエーション、またはそれらの組合せの配列濃縮を決定するために使用される。いくつかの例では、V遺伝子分布、J遺伝子分布、V遺伝子ファミリー、長さ当たりのCDR3カウント、またはそれらの組合せが決定される。いくつかの例では、クローン頻度、クローン蓄積、系統蓄積、またはそれらの組合せが決定される。いくつかの例では、配列の数、VHクローンを有する配列、クローン、1より大きいクローン、クロナタイプ、1より大きいクロナタイプ、系統、シンプソン、またはそれらの組合せが決定される。いくつかの例では、同一でないCDR3の割合が決定される。例えば、同一でないCDR3の割合は、試料中の同一でないCDR3の数を試料中のCDR3を有していた配列の総数で割ったものとして計算される。

20

#### 【0113】

核酸ライブラリーが本明細書で提供され、核酸ライブラリーはベクター中で発現され得る。本明細書に開示される核酸ライブラリー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んでもよい。典型的な発現ベクターは、限定されないが、哺乳動物の発現ベクター：pSF-CMV-NEO-NH<sub>2</sub>-PPT-3XFLAG、pSF-CMV-NEO-COOH-3XFLAG、pSF-CMV-PURO-NH<sub>2</sub>-GST-TEV、pSF-OXB20-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-NH<sub>2</sub>-CMYC；細菌性の発現ベクター：pSF-OXB20-BetaGal、pSF-OXB20-Fluc、pSF-OXB20、およびpSF-Tac；植物の発現ベクター：pRI 101-AN DNAおよびpCambia2301；および酵母発現ベクター：pTYB21およびpKLAC2、ならびに昆虫のベクター：pAc5.1/V5-His AおよびpDEST8を含む。いくつかの例では、ベクターはpcDNA3またはpcDNA3.1である。

30

40

#### 【0114】

アデノシンA2A受容体結合ドメイン、アデノシンA2B受容体結合ドメイン、またはそれらの組合せの配列を含むスキフォールド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ーが、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化する。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、1100、1300、1400、1500、1600、1700、1800、2000、2400、2600、2800、3000、3200、3400、3600、3800、4000、4200、4400、4600、480

50

0、5000、6000、7000、8000、9000、10000、または10000を超える塩基を含む。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

#### 【0115】

20

アデノシンA2A受容体結合ドメイン、アデノシンA2B受容体ドメイン、またはそれらの組合せを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むライブラリーが本明細書に提供され、核酸ライブラリーは細胞中で発現される。いくつかの例では、ライブラリーは、レポーター遺伝子を発現するように合成される。例示的なレポーター遺伝子としては、アセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHAS)、アルカリホスファターゼ(AP)、ベータガラクトシダーゼ(LacZ)、グルクロニダーゼ(beta glucuronidase)(GUS)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、セルリアン蛍光タンパク質、シトリン蛍光タンパク質、オレンジ蛍光タンパク質、チェリー蛍光タンパク質、ターコイズ蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ルシフェラーゼ(Luc)、ノパリンシンターゼ(NOS)、オクトピンシンターゼ(OCS)、ルシフェラーゼ、およびその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。レポーター遺伝子の調節を決定する方法は、当該技術分野で周知であり、蛍光測定方法(例えば、蛍光分光法、蛍光活性化細胞選別(Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS)、蛍光顕微鏡法)、および抗生物質耐性測定を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0116】

疾患および障害

#### 【0117】

40

治療効果を有し得るアデノシンA2A受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むA2A受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。また、治療効果を有し得るアデノシンA2B受容体結合ドメインを含むスキャフォールドをコードする核酸を含むA2B受容体結合ライブラリーが本明細書に提供される。いくつかの例では、アデノシンA2A受容体結合ライブラリーおよびアデノシンA2B受容体ライブラリーは、翻訳時に、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もたらす。いくつかの例では、タンパク質は免疫グロブリンである。いくつかの例では、タンパク質はペプチド模倣物である。例示的な疾患としては、癌、炎症性の疾患または障害、代謝性の疾患または障害、循環器の疾患または障害、呼吸器の疾患または障害、疼痛、消化器の疾患または障害、生殖疾患または生殖障害、内分泌性の疾患または障害、あるいは神経系の疾

50

患または障害が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例では、本明細書に記載されるようなアデノシン A 2 A 受容体、アデノシン A 2 B 受容体、またはその組合せの阻害剤は、中枢神経系、腎臓、腸、肺、毛、皮膚、骨、もしくは軟骨の疾患または障害の処置に使用される。いくつかの例では、本明細書に記載されるようなアデノシン A 2 A 受容体、アデノシン A 2 B 受容体、またはその組合せの阻害剤は、睡眠調節、血管新生、または免疫系の調節に使用される。

【0118】

いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、神経系の疾患または障害の処置に使用される。いくつかの例では、神経系の疾患または障害は神経変性の疾患または障害である。いくつかの例では、神経系の疾患または障害は、パーキンソン病、アルツハイマー病、または多発性硬化症である。

10

【0119】

いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、癌の処置に使用される。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、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、癌の処置の単剤療法として使用される。いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、癌の処置のために他の治療剤と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、癌は、肺癌、大腸癌、または前立腺癌である。いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、腫瘍ワクチン、チェックポイント遮断、および養子 T 細胞療法を増強する。いくつかの例では、A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、癌を処置するために免疫細胞を標的とし免疫抑制を遮断する。

20

【0120】

いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、少なくともまたは約 10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 95% を超えて腫瘍サイズを縮小させる。いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、コンパレーター抗体（例えば、ペムプロリズマブまたはニボルマブ）または対照と比較して、少なくともまたは約 10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 95% を超えて腫瘍サイズを縮小させる。いくつかの例では、対照は無処置またはプラセボである。

30

【0121】

いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、リンパ系または骨髄系のコンパートメントの細胞数を増加させる。いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) CD45+細胞、総 T 細胞、CD4+細胞、CD8+細胞、調節性 T 細胞 (Treg)、M1 腫瘍関連マクロファージ (TAM)、またはそれらの組合せを少なくともまたは約 10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または 95% を超えて増大させる。いくつかの例では、本明細書に記載される A 2 A R 免疫グロブリン、A 2 B R 免疫グロブリン、またはその組合せは、コンパレーター抗体（例えば、ペムプロリズマブまたはニボルマブ）もしくは対照と比較して、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) CD45+細胞、総 T 細胞、CD4+細胞、CD8+細胞、調節性 T 細胞 (Treg)、M1 腫瘍関連マクロファージ (TAM)、またはそれらの組合せを少なくともまたは約 10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%

40

50

、 90%、95%、または95%を超えて増加させる。いくつかの例では、対照は無処置またはプラセボである。

【0122】

いくつかの例では、本明細書に記載されるA2AR免疫グロブリン、A2BR免疫グロブリン、またはその組合せは、サイトカイン発現を増加させる。いくつかの実施形態では、サイトカインは、インターフェロン、インターロイキン2、インターロイキン4、インターロイキン6、インターロイキン8、インターロイキン10、またはTNFである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、インターロイキン1、インターロイキン1R、GM-CSF、インターロイキン2、インターロイキン7、インターロイキン15、インターロイキン6、インターロイキン6、インターロイキン10、インターフェロン、またはTNFである。いくつかの例では、本明細書に記載されるA2AR免疫グロブリン、A2BR免疫グロブリン、またはそれらの組合せは、少なくともまたは約10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または95%を超えてサイトカイン発現を増加させる。いくつかの例では、本明細書に記載されるA2AR免疫グロブリン、A2BR免疫グロブリン、またはそれらの組合せは、コンパレーター抗体（例えば、ペムプロリズマブまたはニボルマブ）または対照と比較して、少なくともまたは約10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または95%を超えてサイトカイン発現を増加させる。いくつかの例では、対照は無処置またはプラセボである。

10

20

【0123】

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、乳児、成体、または子どもであってもよい。本明細書に記載されるような抗体または抗体フラグメントを含む医薬組成物は、静脈内または皮下で投与されてもよい。

【0124】

バリエーションライブラリー

【0125】

コドンバリエーション

【0126】

本明細書に記載されるバリエーション核酸ライブラリーは複数の核酸を含んでもよく、それぞれの核酸は、参照核酸配列と比較して、バリエーションコドン配列をコードする。いくつかの例では、第1の核酸集団のそれぞれの核酸は、単一のバリエーション部位にバリエーションを含有する。いくつかの例では、第1の核酸集団は、同じバリエーション部位に1つを超えるバリエーションを含有するように、単一のバリエーション部位に複数のバリエーションを含有する。第1の核酸集団は、同じバリエーション部位に複数のコドンバリエーションをまとめてコードする核酸を含み得る。第1の核酸集団は、同じ位置に最大で19以上のコドンをまとめてコードする核酸を含み得る。第1の核酸集団は、同じ位置に最大で60のバリエーショントリプレットを集団的にコードする核酸を含み得、または、第1の核酸集団は、同じ位置に最大で61のコドンの異なるトリプレットをまとめてコードする核酸を含み得る。それぞれのバリエーションは、翻訳中に異なるアミノ酸をもたらすコドンをコードすることがある。表2は、異なる部位について可能性のあるそれぞれのコドン（と代表的なアミノ酸）のリストを提供する。

30

40

【0127】

50

## 【表 2 - 1】

表2. コドンとアミノ酸のリスト

アミノ酸	一文字 コード	三文字 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			
リシン	K	Lys	AAA	AAG				
ロイシン	L	Leu	TTA	TTG	CTA	CTC	CTG	CTT
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		

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

50

【表 2 - 2】

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

## 【0129】

核酸集団は、複数の位置に最大で20のコドンバリエーションをまとめてコードする多様な核酸を含み得る。このような場合、集団中のそれぞれの核酸は、同じ核酸中の1つを超える位置でコドンのバリエーションを含む。いくつかの例では、集団中のそれぞれの核酸は、単一核酸中の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上のコドンにおいてコドンのバリエーションを含む。いくつかの例では、それぞれのバリエーションの長い核酸は、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、またはそれ以上のコドンにおいてコドンのバリエーションを含む。いくつかの例では、バリエーション核酸集団は、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、またはそれ以上のコドンにおいてコドンのバリエーションを含む。いくつかの例では、バリエーション核酸集団は、単一の核酸中の少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはそれ以上のコドンにおいてコドンのバリエーションを含む。

20

## 【0130】

高並列核酸合成

## 【0131】

革新的な合成プラットフォームを作るために、シリコン上のナノウェル内で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のプロセスの小型化、並列化、および垂直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に提供される。本明細書に記載されるデバイスは、96ウェルのプレートと同じフットプリントとともに、従来の合成方法と比較して、最大で1,000倍以上スループットを増加させることができるシリコン合成プラットフォームを提供し、1回の高並列化されたラン(run)で、最大でおよそ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。

30

## 【0132】

次世代配列決定の出現で、高解像度のゲノムデータは、正常な生態および病因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対する重要な因子となった。この研究の中心となるのは、分子生物学のセントラルドグマと「配列情報の残基ごとの移動」の概念である。DNAにおいてコードされたゲノム情報は、メッセージへと転写され、これはその後、所定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。

40

## 【0133】

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。高多様性のDNA配列ライブラリーは、標的とされた治療薬のための開発パイプラインの中心にある。治療標的に対して高い親和性を有するタンパク質の高い発現のために理想的には最適化された遺伝子になる、設計、構造、および試験用のタンパク質工学サイクルにおいてタンパク質を発現するために、遺伝子バリア

50

ントが使用される。一例として、受容体の結合ポケットを考察されたい。結合ポケット内のすべての残基のすべての配列の並べ替えを同時に試験する能力によって、徹底的な診査が可能になり、成功の可能性が増大する。研究者が受容体内の特定部位であらゆる可能な突然変異を発生させる試みを行う飽和突然変異誘発は、この開発課題に対する1つの手段を表す。高価であり、時間も手間もかかるが、これによって、各バリエーションを各位置へと導入することができる。対照的に、少数の選択された位置またはDNAの短い伸長部が広範囲に修飾され得るコンビナトリアル突然変異誘発は、偏った提示 (biased representation) でバリエーションの不完全なレパートリーを発生させる。

#### 【0134】

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望ましいバリエーションを有するライブラリー、言い換えれば、高精度ライブラリー (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も可能にする。望ましい頻度で各々の意図したバリエーションの正確な導入をもたらす核酸合成バリエーションライブラリーを合成する方法が本明細書に提供される。エンドユーザーにとって、これは、配列空間を徹底的にサンプリングするだけでなく、効率的な方法でこれらの仮説を問うことができる能力に翻訳され、コストおよびスクリーニング時間を削減する。ゲノム全体の編集は、重要な経路、各バリエーションおよび配列の並べ替えが最適な機能性に関して試験され得るライブラリーを解明することができ、全経路を再構築するために何千もの遺伝子を使用することができ、創薬のための生物系を再設計するためにゲノムを使用することができる。

#### 【0135】

第1の実施例では、薬物自体は、本明細書に記載される方法を使用して最適化することができる。例えば、抗体の指定された機能を改善するために、抗体の一部をコードするバリエーションポリヌクレオチドライブラリーが設計および合成される。その後、抗体に対するバリエーション核酸ライブラリーは、本明細書に記載されるプロセス (例えば、PCR突然変異誘発と、その後のベクターへの挿入) によって生成することができる。その後、抗体は、産生細胞株 (production cell line) において発現され、活性の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) の調節を検査することを含む。抗体を最適化する典型的な領域としては、Fc領域、Fab領域、Fab領域の可変領域、Fab領域の定常領域、重鎖または軽鎖の可変ドメイン (V<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>)、およびV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>の特異的な相補性決定領域 (CDR) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0136】

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ーは、疾患状態に関連付けられる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は、対象からの細胞株、組織試料、初代細胞、対象から増殖された培養細胞、またはモデル系における細胞を含む。典型的なモデル系としては、疾患状態の植物および動物のモデルを含むが、これらに限定されない。

#### 【0137】

疾患状態の予防、低減または処置に関連付けられたバリエーション分子を特定するために、本明細書に記載されるバリエーション核酸ライブラリーが、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、細胞において疾患状態を誘発するために薬剤が使用される。疾患状態の誘発のための典型的なツールは、Cre/Lox組換え系、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を含むが、これらに限定されない。疾患状態に関連付けられる細胞は、モデル系からの細胞または培養細胞、および特定の病状を有する対象からの細胞であり得る。典型的な病状は、細菌性、真菌性、ウイルス性、自己免疫性、または増殖性の障害 (例えば、癌) を含む。いくつかの例では、バリエーション核酸ライブラリーは、モデル系、細胞株、または対象由来の初代細胞において発現され、少なくとも1つの細胞活性における変化について

10

20

30

40

50

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、接着、遊走、繁殖、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、遊離ラジカル損傷に対する反応、またはそれらのあらゆる組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

基質

【0139】

ポリヌクレオチド合成のための表面として使用されるデバイスは、限定されないが、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、ピース、ゲル等を含む基質の形態であってもよい。複数のクラスターを含む基質が本明細書で提供され、ここで、各クラスターは、ポリヌクレオチドの付着および合成を支持する複数の場所を含む。いくつかの例では、基質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ような「場所」という用語は、表面から伸長するために単一の予め定められた配列をコードするポリヌクレオチドに支持を与える構造上の離散領域を指す。いくつかの例では、場所は、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、場所は、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、場所の表面は、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ために活発に機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。場合によっては、基質の表面は、基質の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ー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、しばしばエラー訂正なしで、1000分の1未満、2000分の1未満、3000分の1未満である。

【0140】

共通の支持体上のアドレス可能な位置で異なる予め定められた配列を有する複数のポリヌクレオチドの平行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、基質は、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、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、5,000,000、10,000,000、20,000,000、50,000,000、100,000,000、200,000,000、300,000,000、400,000,000、500,000,000、600,000,000、700,000,000、800,000,000、900,000,000、1,000,000,000、1,200,000,000、1,400,000,000、1,600,000,000、1,800,000,000、2,000,000,000、2,500,000,000、3,000,000,000、3,500,000,000、4,000,000,000、4,500,000,000、5,000,000,000、10,000,000,000、またはそれ以上を超える同一でないポリヌクレオチドの合成のための支持を提供する。場合によっては、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、またはそれ以上を超えるポリヌクレオチドの合成のための支持を提供する。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、基質は、少なくとも80、90、100、120、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、またはそれ以上の塩基を有するポリヌクレオチドの成長のための表面環境を提供する。

【0141】

10

20

30

40

50

基質の別個の場所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、各場所はポリヌクレオチドの集団の合成を支持する。場合によっては、各場所は、別の場所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場所の同じクラスター内の異なる場所にわたって、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、基質の場所は複数のクラスター内に位置する。いくつかの例では、基質は、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、またはそれ以上のクラスターを含む。いくつかの例では、基質は、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、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、1,000,000,000、1,200,000,000、1,400,000,000、1,600,000,000、1,800,000,000、2,000,000,000、2,500,000,000、3,000,000,000、3,500,000,000、4,000,000,000、4,500,000,000、5,000,000,000、または10,000,000,000、あるいはそれ以上の別々の場所を含む。いくつかの例では、基質は約10,000の別々の場所を含む。単一のクラスター内の場所の量は、異なる例では変動する。場合によっては、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、またはそれ以上の場所を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約50~500の場所を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約100~200の場所を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約100~150の場所を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約109、121、130、または137の場所を含む。いくつかの例では、各クラスターは、約19、20、61、64、またはそれ以上の場所を含む。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なアレイ表面で生じる。

#### 【0142】

いくつかの例では、基質上で合成された別々のポリヌクレオチドの数は、基質中で利用可能な別々の場所の数に左右される。いくつかの例では、基質のクラスター内または表面の場所の密度は、 $1\text{ mm}^2$ 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、またはそれ以上の場所である。場合によっては、基質は10~500、25~400、50~500、100~500、150~500、10~250、50~250、10~200、または50~200  $\text{mm}^2$ を含む。いくつかの例では、クラスター内または表面の2つの隣接した場所の中心間の距離は、約100~500、約10~200、または約10~100  $\mu\text{m}$ である。いくつかの例では、隣接した場所の2つの中心間の距離は、約10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100  $\mu\text{m}$ よりも大きい。いくつかの例では、2つの隣接した場所の中心間の距離は、約200、150、100、80、70、60、50、40、30、20、または10  $\mu\text{m}$ 未満である。いくつかの例では、各場所は、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  $\mu\text{m}$ の幅を有する。場合によっては、各場所は、約0.5~100、0.5~50、10~75、または0.5~50  $\mu\text{m}$ の幅を有する。

#### 【0143】

いくつかの例では、基質内のクラスターの密度は、 $100\text{ mm}^2$ あたり少なくともまた

は約1クラスター、 $10\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約1クラスター、 $5\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約1クラスター、 $4\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約1クラスター、 $3\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約1クラスター、 $2\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約1クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約1クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約2クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約3クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約4クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約5クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり少なくともまたは約10クラスター、 $1\text{ mm}^2$ あたり50クラスター、あるいはそれ以上である。いくつかの例では、基質は、 $10\text{ mm}^2$ 当たり約1クラスター~ $1\text{ mm}^2$ 当たり約10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、または5000  $\mu\text{m}$ 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、および100~2000  $\mu\text{m}$ 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の断面を有する。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の断面を有する。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の内部断面を有する。

#### 【0144】

いくつかの例では、基質はおよそ標準的な96ウェルプレートのサイズであり、例えば、約100~約200 mm x 約50~約150 mmである。いくつかの例では、基質は、約1000、500、450、400、300、250、200、150、100、または50 mm以下の直径を有する。いくつかの例では、基質の直径は、約25~1000、25~800、25~600、25~500、25~400、25~300、または25~200 mmの間である。いくつかの例では、基質は、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  $\text{mm}^2$ 、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、基質の厚さは、約50~2000、50~1000、100~1000、200~1000、または250~1000 mmの間である。

#### 【0145】

表面材料

#### 【0146】

本明細書で提供される基質、デバイス、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任意の様々な材料から作り上げられる。特定の例では、基質材料は低レベルのヌクレオチド結合を示すように作り上げられる。いくつかの例では、基質材料は、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修飾される。いくつかの例では、基質材料は、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、基質材料は、十分に導電性であり、例えば、基質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、基質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、耐薬品性かつ耐熱性である。いくつかの例では、基質は可撓性材料を含む。可撓性材料には、限定されないが、修飾および非修飾のナイロン、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、基質は剛性材料を含む。剛性材料には、限定されないが、ガ

ラス、石英ガラス ( f u s e s i l i c a )、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、およびそれらの混合物など)、金属 (例えば、金、白金など) が挙げられ得る。基質、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 ( P D M S )、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。基質 / 固体支持体またはそのミクロ構造、リアクターは、本明細書中にリストされる材料の組合せ、または当該技術分野で既知の他の任意の適切な材料で製造され得る。

【 0 1 4 7 】

表面構造

10

【 0 1 4 8 】

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質が本明細書で提供され、基材は、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、基質は隆起したおよび / または陥没した特徴を含む。そのような特徴を有することの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 / または陥没した特徴を有する基質は、三次元基質と呼ばれる。場合によっては、三次元基質は1つ以上のチャンネルを含む。場合によっては、1つ以上の場所はチャンネルを含む。場合によっては、チャンネルは、材料堆積デバイスなどの堆積デバイスによる試薬の堆積に利用可能である。場合によっては、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してより大きなウェルに集まる。例えば、基質は、クラスターと複数の場所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ーは、クラスターの複数の場所において合成される。

20

【 0 1 4 9 】

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質が本明細書で提供され、基質は、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、その構造は、表面上のポリヌクレオチド合成に関する流れの制御および物質移動経路制御を可能にするように構成されている。いくつかの例では、基質の構成は、ポリヌクレオチド合成中の物質移動経路、化学曝露時間、および / または洗浄効果の制御ならびにその均一な分布を可能にする。いくつかの例では、基質の構成は、成長しているポリヌクレオチドによって排除された体積が、例えば、ポリヌクレオチドの成長に利用可能なまたは適切な当初利用可能な体積の 50、45、40、35、30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1% 以下を超えるほど占めることがないように、ポリヌクレオチドの成長に十分な体積を提供することによって、奏効率の増大を可能にする。いくつかの例では、三次元構造は、化学曝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。

30

【 0 1 5 0 】

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質が本明細書で提供され、基質は、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包含する。いくつかの例では、物理構造によって分離が達成される。いくつかの例では、ポリヌクレオチド合成に対する能動領域および受動領域を生成する表面の差次的な機能化によって、分離が達成される。いくつかの例では、差次的な機能化は、基質表面にわたって疎水性を変化させ、それによって、堆積した試薬を玉のように繋げたり ( b e a d i n g ) 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 ( s p l a s h i n g )、および隣接するスポットの試薬による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。場合によっては、材料堆積デバイスなどのデバイスが、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質は、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

40

50

超える)の合成を可能にする方法で構成される。いくつかの例では、基質は、 $1\text{ mm}^2$  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、あるいはそれらを超える特徴の密度で特徴を含む。

【0151】

基質のウェルは、基質の別のウェルと同じまたは異なる幅、高さ、および/または体積を有してもよい。基質のチャンネルは、基質の別のチャンネルと同じまたは異なる幅、高さ、および/または体積を有してもよい。いくつかの例では、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あるいはその両方は、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0.5~2mmの間である。いくつかの例では、クラスターまたはウェルあるい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0.05mmまたはそれら未満である。いくつかの例では、クラスターまたはウェルあるいはその両方の直径は、約1.0~1.3mmの間である。いくつかの例では、クラスターまたはウェルあるいはその両方の直径は、約1.150mmである。いくつかの例では、クラスターまたはウェルあるいはその両方の直径は、約0.08mmである。クラスターの直径は、二次元または三次元の基質内のクラスターを指す。

10

【0152】

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500~1000um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600um未満である。

20

【0153】

いくつかの例では、基質は、クラスター内の複数の場所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10~50um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20um未満である。

【0154】

いくつかの例では、チャンネル、場所(例えば、実質的に平面の基質における)、またはチャンネルと場所の両方(例えば、場所がチャンネルに対応する三次元基質における)の直径は、約1~1000、1~500、1~200、1~100、5~100、または10~100um、例えば、約90、80、70、60、50、40、30、20、または10umである。いくつかの例では、チャンネル、場所、またはチャンネルと場所の両方の直径は、約100、90、80、70、60、50、40、30、20、または10um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、場所、またはチャンネルと場所の中心間の距離は、約1~500、1~200、1~100、5~200、5~100、5~50、または5~30、例えば、約20umである。

30

【0155】

表面修飾

【0156】

表面上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、上記表面は様々な表面修飾を含む。いくつかの例では、基質表面、または基質表面の選択部位もしくは領域の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または減算プロセスによる、表面の化学的および/または物理的な変更のために、表面修飾が利用される。例えば、表面修飾は、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

40

50

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を含む。

【0157】

場合によっては、表面の上部の化学層(接着促進剤と呼ばれる)の添加は、基質の表面の場所の構造化したパターン化を促進する。接着促進剤に適用される典型的な表面は、限定されないが、ガラス、シリコン、二酸化ケイ素、および窒化ケイ素を含む。場合によっては、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、基質の表面上に第2の化学層が堆積される。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配置によって、場所の近接および/または場所での流体接触の面積は変更可能である。

10

【0158】

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する基質表面または分解された場所は、滑らかであるか、実質的に平面であり(例えば、二次元)、あるいは隆起したまたは陥没した特徴(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、基質表面は、化合物の1つ以上の異なる層で修飾される。対象のそのような修飾層は、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を含む。

【0159】

いくつかの例では、基質の分解された場所は、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、基質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質を提供する工程、および、(b)本明細書に記載されるか、そうで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援用される。

20

30

【0160】

いくつかの例では、基質表面は、典型的には基質表面上に存在する反応性の親水性部分を介して、基質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む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、様々なシロキサンを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。

【0161】

ポリヌクレオチド合成

40

【0162】

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結合させることを含む。ポリヌクレオチド合成は、結合条件下でホスホラミダイトの堆積によって塩基を結合させることを含んでもよく、同じ塩基が任意選択で、1回を超えて、すなわち、二重の結合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、キャッピングは任意選択である。ポリヌクレオチド合成は、酸化、または、1回の酸化工程、または複数回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

50

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つの工程または各工程の間に、デバイスは、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。

#### 【0163】

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）のその後の添加を含んでもよい。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回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添加を可能にする。いくつかの例では、各合成サイクルは結合工程を含む。ホスホラミダイト結合は、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質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、起動されたデバイスに提供される。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトは、アクチベーター（activator）とともにデバイスに提供される。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトは、基質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、デバイスに提供される。いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトの添加は、無水環境において、例えば、無水アセトニトリル中で実行される。ヌクレオシドホスホラミダイトの添加後に、デバイスは任意選択で洗浄される。いくつかの例では、結合工程は任意選択で基質へのヌクレオシドホスホラミダイトの添加の間の洗浄工程とともに、1回以上添加して繰り返される。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、またはそれ以上の連続する結合工程を含む。結合前に、多くの場合において、デバイス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。

#### 【0164】

結合の後、ホスホラミダイトポリヌクレオチド合成方法は任意選択で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結合後に未反応の基質に結合した5'-OH基を遮断するのに有用であり、これによって、内部塩基の欠失を伴うポリヌクレオチドの形成を防ぐ。さらに、1H-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、I<sub>2</sub>/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、脱プリン化を受けられることもある。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、I<sub>2</sub>/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、基質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、デバイスは任意選択で洗浄される。

#### 【0165】

いくつかの例では、ヌクレオシドホスホラミダイトの添加後に、および任意選択でキャッピングと1以上の洗浄工程後に、デバイス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、任意選択で弱塩基（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、酸化後に実行される。持続する可能性のある酸化からの残留水がその後の結合を阻害することができるため、第2のキャッピング工程はデバイスの乾燥を可能にする。酸化後に、デバイスと成長しているポリヌクレオチドは任意選択で洗浄される。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。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)を含むが、これらに限定されない多くの試薬が、効率的な硫黄移動を行うことができる。

#### 【0166】

ヌクレオチド取り込みのその後のサイクルが結合を介して生じるようにするために、デバイス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、その結果、一次ヒドロキシル基が次のヌクレオチ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、脱ブロック化は、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できる。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、デバイス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。

#### 【0167】

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モノマーと結合するために、活発に官能化された表面(例えば、遺伝子座)への保護されたモノマーの適用；後に適用される保護されたモノマーと反応するような、適用されたモノマーの脱保護；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続く。

#### 【0168】

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デバイスへの適用を含む。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、チャンネルなどの三次元の特徴を含む基質のために、試薬は任意選択でウェルおよび/またはチャンネルを介してデバイスの1つ以上の領域を通過する。

#### 【0169】

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デバイスに関する。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、13~55

0、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、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。デバイス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それぞれのモル質量は、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。デバイス内のポリヌクレオチドのそれぞれ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。デバイス内のポリヌクレオチドのそれぞれ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。デバイス内のポリヌクレオチドのそれぞれ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の間に含まれ得る。当業者は、デバイス内のポリヌクレオチドのそれぞれ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。デバイス内のポリヌクレオチドのそれぞれ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。

#### 【0170】

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。いくつかの例では、ポリヌクレオチドのライブラリーは基質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の分解された場所を含むデバイスは、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場所で合成される。いくつかの例では、ポリヌクレオチドのライブラリーは、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デバイス上で合成される。いくつかの例では、本明細書に記載される基質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ブラリーから組み立てられる大きな核酸は、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時間未満で調製される。

#### 【0171】

いくつかの例では、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バリエーション核酸を含む核酸のライブラリーの生成を提供する。いくつかの例では、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バリエーション部位を有し得る。

#### 【0172】

いくつかの例では、バリエーション部位の1以上の部位は隣接することがある。いくつかの例では、バリエーション部位の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離れていることもある。

#### 【0173】

いくつかの例では、核酸はバリエーション部位の複数の部位を含むことがあり、ここで、バリエーション部位はすべて互いに隣接しており、一続きのバリエーション部位を形成する。いくつかの例では、核酸はバリエーション部位の複数の部位を含んでもよく、ここで、バリエーション部位は互いに隣接していない。いくつかの例では、核酸はバリエーション部位の複数の部位を含んでもよく、ここで、いくつかのバリエーション部位は互いに隣接しており、一続きのバリエーション部位を形成し、バリエーション部位の一部は互いに隣接していない。

#### 【0174】

図面を参照すると、図3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ーのデノボ合成、(2)より大きなフラグメント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、予め選択される。例えば、遺伝子の群が生成のために予め選択される。

#### 【0175】

いったん、生成のためにより大きな核酸が選択されると、核酸の予め定められたライブラリー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、デバイスの表面が提供される。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ために生成され、一方で高表面エネルギーの領域は液体を引き付けるために生成される。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援用される国際特許出願第2015/021080号で開示されるように、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。

#### 【0176】

ポリヌクレオチドアレイのインサイチュ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。材料堆積デバイスなどの堆積デバイスは、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、それにより予め定められた核酸配列を有するオリゴマーを生成するような段階的な手法で試薬を放出するように設計される(302)。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。

#### 【0177】

生成されたポリヌクレオチドライブラリーは反応チャンバに配置される。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」とも称される)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ー上に下げられる(303)。ポリヌクレオチドの密閉(304)の前または後に、試薬を加えて、基質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(305)。いったん放出されると、一本

10

20

30

40

50

鎖ポリヌクレオチドのフラグメントは、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(305)が可能である。

#### 【0178】

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フラグメント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ランダムに依存して、様々なフラグメントの長さを増加させる。フラグメント間の相補性は、完全な大きなスパンの二本鎖DNAの形成を可能にする(306)。

10

#### 【0179】

PCAが完了した後、ナノリアクターはデバイスから分離され(307)、PCRのためのプライマーを備えるデバイスとの相互作用のために位置付けられる(308)。密閉後、ナノリアクターはPCRにかけられ(309)、より大きな核酸が増幅される。PCR(310)の後、ナノチャンバが開放され(311)、エラー補正試薬が加えられ(312)、チャンバは密閉され(313)、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(314)。ナノリアクターが開放されて、分離される(315)。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かけられ、その後、輸送(323)のために包装される(322)。

20

#### 【0180】

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(316)、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(317)、および、増幅の追加ラウンドを行うこと(318)を含む。ナノリアクターは開放され(319)、産物がプールされ(320)、配列決定される(321)。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(322)は輸送を承認される(323)。

#### 【0181】

いくつかの例では、図3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ーは、固体支持体上でのインサイチュ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。材料堆積デバイスなどの堆積デバイスは、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、それにより予め定められた核酸配列を有するオリゴマーを生成するような段階的な手法で試薬を放出するように設計される(302)。

30

#### 【0182】

コンピュータシステム

#### 【0183】

本明細書に記載の任意のシステムは、コンピュータに操作可能に連結され得、コンピュータを介して局所的にまたは遠隔で自動操作され得る。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み得る。したがって、材料堆積デバイスの動作、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、基質の指定された領域に正しい試薬を送達するために、ユーザに指定された塩基配列と材料堆積デバイスの位置との間に干渉するようにプログラムされる。

40

#### 【0184】

図4に示されるコンピュータシステム(400)は、媒体(411)および/またはネットワークポート(405)(固定された媒体(412)を有するサーバ(409)に任

50

意選択で接続され得る)から命令を読み出すことができるロジックデバイスとして理解され得る。図4に示されるものなどのシステムは、CPU(401)、ディスクドライブ(403)、キーボード(415)および/またはマウス(416)などの任意選択の入力デバイス、ならびに任意選択のモニタ(407)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り得る。そのような接続は、ワールド・ワイド・ウェブ(World Wide Web)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4に例示されるように当事者(422)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。

10

#### 【0185】

図5に示されるように、高速キャッシュ(504)は、プロセッサ(502)に接続するか、または組み込まれることで、プロセッサ(502)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(502)は、プロセッサバス(508)によりノースブリッジ(506)に接続される。ノースブリッジ(506)は、メモリバス(512)によりランダムアクセスメモリ(RAM)(510)に接続され、プロセッサ(502)によりRAM(510)へのアクセスを管理する。ノースブリッジ(506)は、チップセットバス(516)によりサウスブリッジ(514)にも接続される。サウスブリッジ(514)は次に、ペリフェラルバス(518)に接続される。ペリフェラルバスは、例えば、PCI、PCI-X、PCI Express、または他のペリフェラル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、ペリフェラルバス(518)上でプロセッサと、RAM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得る。いくつかの例では、システム(500)は、ペリフェラルバス(518)に取り付けられたアクセラレータカード(522)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(FPGA)、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むことができる。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。

20

30

#### 【0186】

ソフトウェアとデータは、外部ストレージ(524)に記憶され、プロセッサにより使用されるRAM(510)および/またはキャッシュ(504)へとロードすることができる。システム(500)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、Linux、Windows(商標)、MACOS(商標)、BlackBerry OS(商標)、iOS(商標)、および他の機能的に同等なOS、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(500)はさらに、ネットワーク接続ストレージ(NAS)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る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、ペリフェラル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(NIC)(520)および(521)を含む。

40

#### 【0187】

図6は、複数のコンピュータシステム(602a)および(602b)、複数の携帯電話および個人用携帯情報端末(602c)、ならびにネットワーク接続ストレージ(NAS)(604a)および(604b)を備えたネットワーク(600)を示す略図である。例において、システム(602a)、(602b)、および(602c)は、データ記憶を管理し、ネットワーク接続ストレージ(NAS)(604a)および(604b)に

50

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(602a)および(602b)、ならびに携帯電話および個人用携帯情報端末システム(602c)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(602a)および(602b)、ならびに携帯電話および個人用携帯情報端末システム(602c)は、ネットワーク接続ストレージ(NAS)(604a)および(604b)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6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(NAS)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介し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。

10

**【0188】**

図7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(700)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(704)にアクセス可能な複数のプロセッサ(702a~702f)を含む。上記システムは、メモリサブシステム(704)に複数のプログラム可能なハードウェアメモリアルゴリズムプロセッサ(MAP)(706a~706f)を組み込む。各MAP(706a~706f)は、メモリ(708a~708f)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)(710a~710f)を含むことができる。MAPは構成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、それぞれのプロセッサと密接に協働して処理するためのFPGA(710a~710f)に提供され得る。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な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(708a~708f)にアクセスするためにダイレクトメモリアccess(DMA)を使用することができ、それにより、それぞれのマイクロプロセッサ(702a~702f)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。

20

30

**【0189】**

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合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、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。

40

**【0190】**

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装することができる。他の例では、システムの機能は、ファームウェア、図5で言及されるようなフィ

50

ードプログラマブルゲートアレイ ( F P G A ) 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 ( S O C ) 、特定用途向け集積回路 ( A S I C ) 、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プティマイザは、図 5 に例証されるアクセラレータカード ( 5 2 2 ) などのハードウェアアクセラレータカードの使用を介してハードウェアアクセレーションで実装することができる。

#### 【 0 1 9 1 】

以下の実施例は、当業者に対して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、すべての部分およびパーセンテージは重量基準である。

10

#### 【 実施例 】

#### 【 0 1 9 2 】

以下の実施例は、本開示の様々な実施形態を例示する目的で与えられ、いかなる様式においても本開示を制限することを意図していない。本実施例は、本明細書に記載された方法とともに、現在、好ましい実施形態の代表であり、例示的であり、本開示の範囲を制限することを意図していない。特許請求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そこでの変更および他の使用は、当業者にも思い浮かべることであろう。

#### 【 0 1 9 3 】

実施例 1 : デバイス表面の機能化

20

#### 【 0 1 9 4 】

ポリヌクレオチドのライブラリーの付着および合成を支援するために、デバイスを機能化した。90% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> および 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むピラニア溶液を用いて、デバイス表面を最初に 20 分間、湿式洗浄した。その後、デバイスを DI 水で複数のビーカー中ですすぎ、DI 水のグースネック水栓の下で 5 分間保持した後、N<sub>2</sub> で乾燥させた。その後、デバイスを NH<sub>4</sub>OH ( 1 : 100 ; 3 mL : 300 mL ) に 5 分間浸し、ハンドガンを用いて DI 水ですすぎ、DI 水で 3 つの連続したビーカーにそれぞれ 1 分間浸し、再度ハンドガンを用いて DI 水ですすいだ。その後、デバイス表面を O<sub>2</sub> に晒してデバイスのプラズマ洗浄を行った。SAMCO PC - 300 装置を使用して、ダウストリームモードで 250 ワットで 1 分間、O<sub>2</sub> をプラズマエッチングした。

30

#### 【 0 1 9 5 】

以下のパラメータ : 0 . 5 ~ 1 トル、60 分、70 、 135 の気化器で YES - 1224 P 蒸着オープンシステムを使用して、清潔になった装置表面を 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活発に官能化した。Brewer Science 200 X スピンコータを使用して、デバイス表面をレジストコーティングした。SPR ( 商標 ) 3612 フォトレジストを 2500 rpm で 40 秒間、デバイス上でスピンコーティングした。Brewer のホットプレート上で 90 で 30 分間、デバイスをプリベークした。Karl Suss MA6 マスクアライナー装置を用いて、デバイスをフォトリソグラフィーにさらした。デバイスを 2 . 2 秒間露光して、MSF 26A の中で 1 分間現像した ( developed ) 。残った現像液 ( developer ) をハンドガンですすぎ、デバイスを 5 分間水に浸した。デバイスを 100 のオープンで 30 分間ベークし、その後、Nikon L200 を用いてリソグラフィの欠損を目視で確認した。デスクトッププロセスを使用して、SAMCO PC - 300 装置を用いて、残留レジストを除去し、250 ワットで 1 分間 O<sub>2</sub> プラズマエッチングを行った。

40

#### 【 0 1 9 6 】

10 μL の軽鉱物油と混合した 100 μL のパーフルオロオクチルトリクロロシラン溶液で、デバイス表面を受動的に機能化した。デバイスをチャンバに配し、10 分間ポンプで送り、その後、バルブをポンプに対して閉じて、10 分間放置した。チャンバを通気した。デバイスを、最大出力 ( Crest システム上で 9 ) で超音波処理しながら、70

50

で500 mLのNMP中に5分間浸漬することを2回行うことによってレジスト剥離した。次に、デバイスを最大出力で超音波処理しながら、室温で500 mLのイソプロパノールに5分間浸漬した。このデバイスを300 mLの200プルーフのエタノールに浸し、N<sub>2</sub>で送風乾燥させた。ポリヌクレオチド合成のための支持体として機能するように、機能化した表面を活性化した。

【0197】

実施例2：オリゴヌクレオチド合成デバイス上での50量体配列の合成

【0198】

2次元オリゴヌクレオチド合成デバイスをフローセルに組み込み、これをフローセル (Applied Biosystems (ABI394 DNA Synthesizer) に接続した。2次元オリゴヌクレオチド合成デバイスを、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 (Gel est) で均一に機能化し、これを使用して、本明細書に記載のポリヌクレオチド合成方法を用いて、50 bpの例示的ポリヌクレオチド (「50量体ポリヌクレオチド」) を合成した。

10

【0199】

50量体の配列は、配列番号2に記載されている通りであった。5' AGACCAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTTCGGCAAT##TTTTTTTTTT3' (配列番号2)、ここで、#は、チミン-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。

20

【0200】

表3のプロトコルおよびABIシンセサイザーに従って標準的なDNA合成化学 (結合、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。

【0201】

30

40

50

## 【表 3 - 1】

表 3. 合成プロトコル

一般的なDNA合成プロセス名	表 3	
	プロセス工程	時間(秒)
洗浄(アセトニトリル洗浄フロー)	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	23
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4
	アセトニトリルシステム洗浄	4
DNA塩基添加 (ホスホラミダイト+アクチベーターフロー)	アクチベーターマニホールド洗浄	2
	アクチベーターからフローセル	6
	アクチベーター+ホスホラミダイトからフローセル	6
	アクチベーターからフローセル	0.5
	アクチベーター+ホスホラミダイトからフローセル	5
	アクチベーターからフローセル	0.5
	アクチベーター+ホスホラミダイトからフローセル	5
	アクチベーターからフローセル	0.5
	アクチベーター+ホスホラミダイトからフローセル	5
	25秒間インキュベート	25
	洗浄(アセトニトリル洗浄フロー)	アセトニトリルシステム洗浄
アセトニトリルからフローセル		15
N <sub>2</sub> システム洗浄		4
アセトニトリルシステム洗浄		4
DNA塩基添加 (ホスホラミダイト+アクチベーターフロー)	アクチベーターマニホールド洗浄	2
	アクチベーターからフローセル	5
	アクチベーター+ホスホラミダイトからフローセル	18
	25秒間インキュベート	25
洗浄(アセトニトリル洗浄フロー)	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	15
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4
	アセトニトリルシステム洗浄	4
キャッピング (CapA+B, 1:1, フロー)	CapA+Bからフローセル	15

10

20

30

40

## 【0202】

50

【表 3 - 2】

表 3		
一般的なDNA合成プロセス名	プロセス工程	時間(秒)
洗浄(アセトニトリル洗浄フロー)	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	15
	アセトニトリルシステム洗浄	4
酸化(酸化剤フロー)	酸化剤からフローセル	18
洗浄(アセトニトリル洗浄フロー)	アセトニトリルシステム洗浄	4
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4
	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	15
	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	15
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4
	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	23
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4
	アセトニトリルシステム洗浄	4
	非ブロック化(Deblockフロー)	Deblockからフローセル
洗浄(アセトニトリル洗浄フロー)	アセトニトリルシステム洗浄	4
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4
	アセトニトリルシステム洗浄	4
	アセトニトリルからフローセル	18
	N <sub>2</sub> システム洗浄	4.13
	アセトニトリルシステム洗浄	4.13
	アセトニトリルからフローセル	15

10

20

30

40

50

## 【0203】

ホスホラアミダイト/アクチベーターの組合せを、フローセルを介したバルク試薬の送達と同様に送達した。環境が試薬によってずっと「湿った」ままであるため、いかなる乾燥工程も行わなかった。

## 【0204】

ABI394シンセサイザーからフローリストラクターを取り除き、より速い流れを可能にした。フローリストラクターなしでは、アミダイト(ACN中0.1M)、アクチベーター、(ACN中0.25M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%ピリジン、10%水、および70%THF中の0.02MのI2)の流量は、およそ約100uL/秒であり、アセトニトリル(「ACN」)とキャッピング試薬(CapAとCapBの1:1混合物、ここで、CapAはTHF/ピリジン中の無水酢酸であり、CapBはTHF中の16%1-メチルイミジゾールである)の場合、およそ約200uL/秒であり、Deblock(トルエン中の3%ジクロロ酢酸)の場合、およそ約300uL/秒(フローリストラクターを備えたすべての試薬の約50uL/秒と比較して)であった。酸化剤(Oxi

d i z e r ) を完全に押し出すまでの時間を観察し、それに合わせて化学薬品のフロー時間を調整し、異なる化学薬品間に余分な A C N 洗浄を導入した。ポリヌクレオチド合成後、75 p s i で一晚、チップを気体状のアンモニア中で脱保護した。表面に5滴の水を適用して、ポリヌクレオチドを回収した。次いで、回収したポリヌクレオチドを B i o A n a l y z e r s m a l l R N A チップで分析した。

【0205】

実施例3：オリゴヌクレオチド合成デバイス上での100量体配列の合成

【0206】

50量体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、100量体のポリヌクレオチド(「100量体ポリヌクレオチド」；5' C G G G A T C C T T A T C G T C A T C G T C G T A C A G A T C C C G A C C C A T T T G C T G T C C A C C A G T C A T G C T A G C C A T A C C A T G A T G A T G A T G A T G A T G A G A A C C C C G C A T # # T T T T T T T T T T 3'、ここで、#はチミジン-スクシニルヘキサミド C E D ホスホラミダイト(ChemGenesのCLP-2244)を表す；配列番号3)の、2つの異なるシリコンチップ上での合成に使用し、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機能化され、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の混合物で機能化され、表面から抽出されたポリヌクレオチドを、B i o A n a l y z e r 機器で分析した。

【0207】

以下の熱サイクルプログラム：

98、30秒

98、10秒；63、10秒；72、10秒；12サイクルを繰り返す

72、2分

を使用して、50 u L の P C R 混合物(25 u L の N E B Q 5 m a s t e r m i x、2.5 u L の 10 u M フォワードプライマー、2.5 u L の 10 u M リバースプライマー、表面から抽出した1 u L のポリヌクレオチド、および最大50 u L の水)の中で、フォワードプライマー(5' A T G C G G G G T T C T C A T C A T C 3'；配列番号4)およびリバースプライマー(5' C G G G A T C C T T A T C G T C A T C G 3'；配列番号5)を使用して、2つのチップからの10の試料全てをさらに増幅した。

【0208】

P C R 産物を B i o A n a l y z e r でも実行して、100量体の位置で鋭いピークを実証した。次に、P C R 増幅された試料をクローニングし、サンガー配列決定した。表4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配列決定から生じる結果を要約する。

【0209】

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表 4. 配列決定の結果

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%

10

20

## 【0 2 1 0】

このように、合成されたポリヌクレオチドの高い品質と均一性は、異なる界面化学特性の2つのチップ上で繰り返された。全体として、配列決定された100量体の89%はエラーのない完全な配列であり、262のうち233に相当した。

## 【0 2 1 1】

表 5 は、スポット 1 ~ 10 のポリヌクレオチド試料から得られた配列についてのエラー特徴を要約する。

## 【0 2 1 2】

30

40

50

【表 5】

表 5. エラー特徴

試料 ID/ スポット番 号	OSA_00 46/1	OSA_00 47/2	OSA_00 48/3	OSA_00 49/4	OSA_00 50/5	OSA_00 51/6	OSA_00 52/7	OSA_00 53/8	OSA_00 54/9	OSA_00 55/10
全配列	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
配列決定の 質	28 のう ちの 25	27 のう ちの 27	30 のう ちの 26	23 のう ちの 21	26 のう ちの 25	30 のう ちの 29	31 のう ちの 27	31 のう ちの 29	29 のう ちの 28	28 のう ちの 25
オリゴ質	25 のう ちの 23	27 のう ちの 25	26 のう ちの 22	21 のう ちの 18	25 のう ちの 24	29 のう ちの 25	27 のう ちの 22	29 のう ちの 28	28 のう ちの 26	25 のう ちの 20
ROI 一致数	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI 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 小挿 入	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 単一 塩基欠失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大欠失数	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
変異： G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
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 のうち 約 1	Err:135 のうち 約 1	Err:128 のうち 約 1	Err:708 のうち 約 1	Err:250 のうち 約 1	Err:266 のうち 約 1	Err:876 のうち 約 1	Err:290 のうち 約 1	Err:140 のうち 約 1	Err:234 のうち 約 1
ROI マイ ナスブライ マーエラー 率	MP Err:763 のうち 約 1	MP Err:824 のうち 約 1	MP Err:780 のうち 約 1	MP Err:429 のうち 約 1	MP Err:152 のうち 約 1	MP Err:161 のうち 約 1	MP Err:531 のうち 約 1	MP Err:176 のうち 約 1	MP Err:854 のうち 約 1	MP Err:145 のうち 約 1

10

20

30

40

50

## 【0213】

実施例 4：抗体スキファールドの設計

## 【0214】

スキファールドを生成するために、構造分析、重鎖のレパートリー配列決定分析 (repertoire sequencing analysis)、およびヘテロダイマーハイスループット配列決定のデータセットの特定の分析を実施した。各重鎖を、各軽鎖スキファールドと会合させた。各重鎖スキファールドに、5つの異なる長いCDRH3ループオプションを割り当てた。各軽鎖スキファールドに、5つの異なるL3スキファールドを割り当てた。個体およびV遺伝子セグメントの両方にわたって見出された、頻繁に観察された長いH3ループステム (N末端およびC末端上の10のアミノ酸) から重鎖CDRH3ステムを選択した。軽鎖スキファールドL3は、長いH3を含むヘテロダイマーから選択した。プロテインデータバンク (PDB) の情報に基づいた直接ヘテロダイマーと、CDRH1、H2、L1、L2、L3、およびCDRH3ステムが固定されたディープシーケンシングデータセットとを使用した。その後、様々なスキファールドをファージ上でのディスプレイのためにフォーマットして発現を評価した。

## 【0215】

50

## 構造分析

## 【0216】

約2,017の抗体構造を分析して、少なくとも25アミノ酸長の長いCDRH3を有する22の構造を観察した。重鎖には、IGHV1-69、IGHV3-30、IGHV4-49、およびIGHV3-21が含まれていた。同定された軽鎖には、IGLV3-21、IGKV3-11、IGKV2-28、IGKV1-5、IGLV1-51、IGLV1-44、およびIGKV1-13が含まれていた。分析では、IGHV4-59/61-IGLV3-21、IGHV3-21-IGKV2-28、IGHV1-69-IGKV3-11、およびIGHV1-69-IGKV1-5を含む4つのヘテロダイマーの組合せを複数回観察した。配列と構造の分析によって、ステム中のチロシンなどのかさばった側鎖のパッキングを伴ういくつかの構造でCDRH3内ジスルフィド結合を同定し、長いH3の安定性の支持を提供する。ターン-シートおよび「ハンマーヘッド」サブドメインを含む二次構造も観察した。

## 【0217】

## レポトリ分析

## 【0218】

レポトリ分析を、バイアスのない5'RACEによって12人の健康な対照から得られた、1,083,875のIgM+/CD27ナープB細胞受容体(BCR)配列および1,433,011のCD27+配列に対して実施した。12人の健康な対照は同数の男性と女性を含み、4人の白人、4人のアジア人、および4人のヒスパニックの個体で構成されていた。レポトリ分析によって、ヒトレポトリの1%未満が21アミノ酸より長いCDRH3を有するBCRを含むことが実証された。長いCDR3サブレポトリにおいてV遺伝子バイアスが観察され、IGHV1-69、IGHV4-34、IGHV1-18とIGHV1-8は長いH3ループを有するBCRにおける優先的な濃縮を示した。IGHV3-23、IGHV4-59/61、IGHV5-51、IGHV3-48、IGHV3-53/66、IGHV3-15、IGHV3-74、IGHV3-73、IGHV3-72、およびIGHV2-70については、長いループに対するバイアスを観察した。IGHV4-34スキファールドは自己反応性であり、短い半減期を有することが実証された。

## 【0219】

長いループのための実行可能なN末端およびC末端のCDRH3スキファールドのバリエーションもまた5'RACE参照レポトリに基づいて設計された。22アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸長の約81,065のCDRH3を観察した。V遺伝子スキファールド間で比較することによって、スキファールド特異的H3ステムバリエーションが回避され、スキファールド多様性を複数のスキファールド参照にクローニングできるようにした。

## 【0220】

## ヘテロダイマー分析

## 【0221】

ヘテロダイマー分析を、スキファールド上で実施した。スキファールドのバリエーション配列および長さをアッセイした。

## 【0222】

## 構造分析

## 【0223】

バリエーション配列のGPCRスキファールドを使用して、構造分析を実施し、長さをアッセイした。

## 【0224】

## 実施例5: GPCR抗体ライブラリーの生成

## 【0225】

GPCRリガンド相互作用表面およびスキファールド配置に基づいて、ライブラリー

を設計し、デノボ合成した。実施例 4 を参照されたい。可変ドメイン、重鎖に対して 10 のバリエーション配列を設計し、重鎖相補性決定領域 3 に対して 237 のバリエーション配列を設計し、可変ドメイン、軽鎖に対して 44 のバリエーション配列を設計した。フラグメントを、実施例 1 ~ 3 に記載されるものと同様の方法に従って、3 つのフラグメントとして合成した。

#### 【0226】

デノボ合成に続いて、可変ドメイン、重鎖に対して 10 のバリエーション配列を生成し、重鎖相補性決定領域 3 に対して 236 のバリエーション配列を生成し、可変ドメイン、軽鎖、および CDR L3 を含む領域に対して 43 のバリエーション配列を設計し、可変ドメイン、軽鎖に対して 9 個のバリエーション配列を設計した。これにより、約  $10^5$  の多様性 ( $10 \times 236 \times 43$ ) を有するライブラリーが得られた。これは、次世代配列決定 (NGS) を使用して 1600 万のリードと共に確認した。

10

#### 【0227】

その後、様々な軽鎖と重鎖を、発現およびタンパク質フォールディングについて試験した。可変ドメイン、重鎖の 10 個のバリエーション配列には、IGHV1-18、IGHV1-69、IGHV1-8、IGHV3-21、IGHV3-23、IGHV3-30/33rn、IGHV3-28、IGHV3-74、IGHV4-39、および IGHV4-59/61 が含まれていた。10 個のバリエーション配列のうち、IGHV1-18、IGHV1-69、および IGHV3-30/33rn は、熱安定性の改善などの改善された特徴を示した。可変ドメイン、軽鎖の 9 個のバリエーション配列には、IGKV1-39、IGKV1-9、IGKV2-28、IGKV3-11、IGKV3-15、IGKV3-20、IGKV4-1、IGLV1-51、および IGLV2-14 が含まれていた。9 個のバリエーション配列のうち、IGKV1-39、IGKV3-15、IGLV1-51、および IGLV2-14 は、熱安定性の改善などの改善された特徴を示した。

20

#### 【0228】

実施例 6 : GPCR ライブラリー

#### 【0229】

この実施例は、GPCR ライブラリーの生成について記載する。

#### 【0230】

材料および方法

30

#### 【0231】

安定した細胞株およびファージライブラリー生成

#### 【0232】

pCDNA3.1 (+) ベクター (ThermoFisher) にクローニングされた N 末端 FLAG タグおよび C 末端 GFP タグを有する完全長のヒト GLP-1R 遺伝子 (UniProt - P43220) を、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞懸濁液にトランスフェクトして、GLP-1R を発現する安定した細胞株を生成した。標的発現を、FACS によって確認した。その後、GFP によって 80% 超の GLP-1R を発現する細胞を、細胞ベースの選択に直接使用した。

#### 【0233】

40

生殖細胞系重鎖 IGHV1-69、IGHV3-30、および生殖細胞系軽鎖 IGKV1-39、IGKV3-15、IGLV1-51、IGLV2-14 のフレームワークの組合せを、GPCR に焦点を置いたファージディスプレイライブラリーで使用し、6 つの CDR 多様性はすべて上記の実施例 1 ~ 3 と同様に合成されたオリゴプールによってコードされた。また、CDR が、製造可能性の責任、潜在的なスプライス部位、または一般的に使用されるヌクレオチド制限部位を含有しないことを確実にするためにスクリーニングした。重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を、(G4S)3 リンカーによって連結した。得られた scFv (VH-リンカー-VL) 遺伝子ライブラリーを、NotI 制限酵素の消化によって pADL 22-2c (Antibody Design Labs) のファージディスプレイベクターにクローニングし、TG1 エレクトロ

50

コンピテント大腸菌細胞 (Lucigen) にエレクトロポレーションした。最終ライブラリーは、NGSによって検証された  $1.1 \times 10^{10}$  サイズの多様性を有している。

【0234】

アゴニスト GLP-1R scFv クローンを単離するために使用されるパニングおよびスクリーニング戦略

【0235】

GLP-1R 発現 CHO 細胞上でパニングする前に、ファージ粒子を 5% BSA / PBS でブロックし、CHO 親細胞上の非特異的結合剤について枯渇させた。CHO 親細胞枯渇のために、投入したファージアリコート、室温 (RT) で  $1 \times 10^8$  の CHO 親細胞と共に 14 rpm / 分で 1 時間回転させた。その後、細胞を、卓上エッペンドルフ遠心機 5920RS /  $4 \times 1000$  ロータ中で 1,200 rpm で 10 分間遠心分離することによってペレット化し、非特異的 CHO 細胞結合剤を枯渇させた。その後、CHO 細胞結合剤を枯渇させたファージ上清を、 $1 \times 10^8$  の GLP-1R 発現 CHO 細胞に移した。ファージ上清および GLP-1R 発現 CHO 細胞を、RT で 14 rpm / 分で 1 時間回転させ、GLP-1R 結合剤を選択した。インキュベーションの後、細胞を  $1 \times$  PBS / 0.5% Tween で数回洗浄し、非結合クローンを除去した。GLP-1R 細胞に結合したファージを溶出するために、細胞を 37 °C で PBS 緩衝液中のトリプシンと共に 30 分間インキュベートした。細胞を、1,200 rpm で 10 分間遠心分離することによってペレット化させた。GLP-1R 結合クローンが豊富な排出された上清を、TG1 大腸菌細胞中で増幅させ、次のラウンドの選択のための投入ファージとして使用した。この選択戦略を 5 ラウンド分繰り返した。すべてのラウンドを CHO 親のバックグラウンドに対して枯渇させた。あるラウンドからの増幅された排出ファージを次のラウンドの投入ファージとして使用し、洗浄のストリンジェンシーはより多くの洗浄を伴うその後の選択の各ラウンドで増加した。5 ラウンドの選択後、ラウンド 4 とラウンド 5 のそれぞれから 500 のクローンをサンガー配列決定して、固有のクローンを同定した。

【0236】

次世代配列決定分析

【0237】

ファージミド DNA を、すべてのパニングラウンドの排出細菌ストックからミニプレップした。フォワードプライマー ACAGAAATTCATTAAAGAGGGAGAAATTAACC と、リバースプライマー TGAACCGCCTCCACCGCTAG とを使用して、可変重鎖 (VH) をファージミド DNA から PCR 増幅した。KAPA Hyper Plus Library Preparation Kit (Kapa Biosystems、製品番号 KK8514) を使用して、PCR 産物をライブラリー調製に直接使用した。ライブラリーに多様性を加えるために、Illumina 社 (製品番号 FC-110-3001) から購入した 15% の PhiX Control を試料に添加した。その後、ライブラリーを、Illumina の 600 サイクル MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina、製品番号 MS-102-3003) にロードして、MiSeq 機器で実行した。

【0238】

再フォーマットおよびハイスルーブット (HT) IgG 精製

【0239】

Expi293 細胞を、Expifectamine (ThermoFisher、A14524) を使用して 2:1 比率の重鎖および軽鎖 DNA でトランスフェクトして、トランスフェクションの 4 日後に上清を収穫した後、細胞生存率が 80% 未満に低下した。プロテイン A 磁気ビーズを有する King Fisher (ThermoFisher) または Phynexus プロテイン A カラムチップ (Hamilton) のいずれかを使用して、精製を行った。インビボマウス試験で評価された IgG クローンの大規模生産のために、Akta HPLC 精製システム (GE) を使用した。

【0240】

10

20

30

40

50

I g G 特徴付けおよび品質管理。陽性 G L P - 1 R 結合剤 ( ヒット ) の精製された I g G を、 L a b C h i p G X I I T o u c h H T P r o t e i n E x p r e s s 高感度アッセイによってそれらの純度の特徴付けに供した。ジチオトレイトール ( D T T ) を使用して、I g G を V H および V L に還元した。L u n a t i c ( U n C h a i n ) を使用して I g G 濃度を測定した。インビボマウス研究用の I g G を、H P L C によってさらに特徴付けし、1 k g あたり 5 E U 未満の投与量でエンドトキシンレベルについて試験した ( E n d o s a f e ( 登録商標 ) n e x g e n - P T S ( 商標 ) E n d o t o x i n T e s t i n g , C h a r l e s R i v e r ) 。

【 0 2 4 1 】

結合アッセイおよびフローサイトメトリー

10

【 0 2 4 2 】

G L P - 1 R I g G クローンを、以下のようにフローサイトメトリー分析と組み合わせた結合アッセイで試験した： F L A G - G L P - 1 R - G F P 発現 C H O 細胞 ( C H O - G L P - 1 R ) および C H O 親細胞を、1 0 0 n M の I g G と共に氷の上で 1 時間インキュベートした後、3 回洗浄し、A l e x a 6 4 7 コンジュゲートヤギ抗ヒト抗体 ( 1 : 2 0 0 ) ( J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , 1 0 9 - 6 0 5 - 0 4 4 ) と共に氷の上で 3 0 分間インキュベートした後、3 回洗浄し、遠心分離して各洗浄工程の間に細胞をペレット化した。インキュベーションおよび洗浄はすべて、P B S + 1 % B S A を含む緩衝液で行った。滴定のために、I g G を 1 0 0 n M から開始して 0 . 0 4 6 n M まで 1 : 3 に段階的に希釈した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、A l e x a 6 4 7 シグナルに対する G F P シグナルを測定することによりヒット ( ヒットは C H O - G L P - 1 R に特異的に結合する I g G である ) を同定した。1 0 0 n M の I g G による結合アッセイのフローサイトメトリーデータは、ドットプロットとして提示される。I g G 滴定による結合アッセイの分析は、M F I ( 平均蛍光強度 ) に対して I g G 濃度をプロットする結合曲線として提示される。

20

【 0 2 4 3 】

リガンド競合アッセイ

【 0 2 4 4 】

リガンド競合アッセイは、一次 I g G を 1  $\mu$  M の G L P - 1 ( 7 - 3 6 ) と共インキュベートすることを含んでいた。各データポイントについては、I g G ( 6 0 0 n M ) を F l o w 緩衝液 ( P B S + 1 % B S A ) で調製して、8 滴定ポイントで 1 : 3 に希釈した。ペプチド G L P - 1 7 - 3 6 ( 2  $\mu$  M ) を、F l o w 緩衝液 ( P B S + 1 % B S A ) で同様に調製した。各ウェルは 1 0 0 , 0 0 0 の細胞を含有し、5 0  $\mu$  L の I g G および 5 0  $\mu$  L のペプチド ( = プラス ) またはペプチドを含まない緩衝液のみ ( = マイナス ) を添加した。細胞および I g G / ペプチド混合物を氷の上で 1 時間インキュベートし、洗浄後、P B S + 1 % B S A で 1 : 2 0 0 に希釈した二次抗体 ( ヤギ抗ヒト A P C , J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , 製品番号 1 0 9 - 6 0 5 - 0 4 4 ) を添加した。これを氷の上で 3 0 分間 ( ウェルあたり 5 0  $\mu$  L ) インキュベートした後、洗浄して 6 0  $\mu$  L の緩衝液に再懸濁した。最後に、アッセイの読み取り値をウェル当たり 4 秒の速度で I n t e l l i c y t ( 登録商標 ) I Q u e 3 S c r e e n e r 上で測定した。

30

40

【 0 2 4 5 】

結果

【 0 2 4 6 】

G P C R に焦点を置いた抗体ライブラリーの設計は、G P C R 結合モチーフおよび G P C R 抗体に基づく

【 0 2 4 7 】

G P C R と、リガンド、ペプチド、抗体、内因性細胞外ループ、および小分子との相互作用を含むすべての既知の G P C R 相互作用を分析して、G P C R 結合分子決定基をマッピングした。約 5 0 の G P C R ( <http://www.gpcrdb.org> ) の E C

50

Dに結合した約150のペプチド、リガンド、または抗体の結晶構造を使用して、GPCR結合モチーフを同定した。この分析から、1000を超えるGPCR結合モチーフを抽出した。さらに、GPCRのすべての解明された構造(zhanglab.ccm.b.med.umich.edu/GPCR-EXP/)の分析により、GPCRの内因性細胞外ループから2000を超える結合モチーフを同定した。最後に、GPCRに結合した1000を超える小分子リガンドの構造の分析により、これらのリガンドの構造的接触の多くを再現できる可能性のある5つのアミノ酸(Tyr、Phe、His、Pro、およびGly)の減少アミノ酸ライブラリーを同定した。この減少したアミノ酸多様性を有するサブライブラリーをCxxxxxCモチーフ内に配置した。合計で、5000を超えるGPCR結合モチーフを同定した(図9A~9E)。これらの結合モチーフは、5つの異なる

STEM領域: CARDLRELECEEWxxxxSRGPCVDPRGVAGSFDVW、CARDMYDFxxxxEVVPAADDAFDIW、CARDGRGSLPRPKGGPxxxxYDSSEDSGGAFDIW、CARANQHFXxxxxGYHYYGMDVW、CAKHMSMQxxxxRADLVGDAFDVWの1つに配置された。

10

## 【0248】

これらのSTEM領域は、超長HCDR3を有する構造抗体から選択した。抗体生殖細胞系列を、これらの超長HCDR3に耐えるように特異的に選択した。21アミノ酸より長いヒト抗体の構造および配列分析は、長いCDR3を有する抗体におけるV遺伝子パイアスを明らかにした。最後に、生殖細胞系列IGHV(IGHV1-69およびIGHV3-30)、IGKV(IGKV1-39およびIGKV3-15)、およびIGLV(IGLV1-51およびIGLV2-14)遺伝子をこの分析に基づいて選択した。

20

## 【0249】

HCDR3多様性に加えて、限定された多様性もまた、他の5つのCDRに導入された。IGHV1-69ドメインには416のHCDR1および258のHCDR2バリエーションが存在し、IGHV3-30ドメインには535のHCDR1および416のHCDR2バリエーションが存在し、IGKV1-39ドメインには490のLCDR1、420のLCDR2、および824のLCDR3バリエーションが存在し、IGKV3-15ドメインには490のLCDR1、265のLCDR2、および907のLCDR3バリエーションが存在し、IGLV1-51ドメインには184のLCDR1、151のLCDR2、および824のLCDR3バリエーションが存在し、IGLV2-14ドメインには967のLCDR1、535のLCDR2、および922のLCDR3バリエーションが存在した(図10)。これらのCDRバリエーションは、生殖細胞系列CDRを、12人のヒトドナーのうち少なくとも2人のV遺伝子レパートリー内のCDRにおいて観察された単一、二重、および三重の変異の近生殖細胞系列空間と比較することによって選択した。製造可能性の責任、潜在的なスプライス部位、またはヌクレオチド制限部位を除去するためにすべてのCDRを事前にスクリーニングした。CDRをオリゴプールとして合成して、選択された抗体スキュフォールドに組み込んだ。重鎖(VH)および軽鎖(VL)の遺伝子を、(G4S)<sub>3</sub>リンカーによって連結した。得られたscFv(VH-リンカー-VL)遺伝子プールを、M13遺伝子-3マイナーコートタンパク質のN末端のファージミッドディスプレイベクターにクローニングした。GPCRライブラリーの最終的なサイズはscFvフォーマットで $1 \times 10^{10}$ である。次世代配列決定(NGS)を最終ファージライブラリーで実施し、ライブラリー内のHCDR3長さ分布を分析して、3人の健康な成人ドナーからのB細胞集団におけるHCDR3長さ分布と比較した。使用された3人の健康なドナーからのHCDR3配列は、3700万を超えるB細胞受容体配列を含む公的に利用可能なデータベースから得られた<sup>31</sup>。GPCRライブラリーでのHCDR3の長さは、B細胞レパートリー配列で観察されるHCDR3の長さよりもはるかに長い。平均して、GPCRライブラリー(二相性の分布のパターンを示す)におけるHCDR3の長さの中央値は、天然のB細胞レパートリー配列(15アミノ酸~17アミノ酸)で観察される長さの中央値よりも2倍または3倍長い(33アミノ酸~44アミノ酸)(図11)。GPCRライブラ

30

40

50

リーにおけるHCDR3の二相性の長さの分布は、主に、HCDR3内のモチーフを提示するために使用されるステムの2つの群(8aa、9aa×××××10aa、12aa)および(14aa、16aa×××××18aa、14aa)によって引き起こされる。

#### 【0250】

実施例7：VHHライブラリー

#### 【0251】

合成VHHライブラリーを開発した。CDRの多様性を調整した「VHH Ratio」ライブラリーについて、Clustal Omegaを用いて、2391のVHH配列(iCANデータベース)をアラインメントすることで、各位置でのコンセンサスを決定し、各位置でのコンセンサスからフレームワークを導き出した。位置特異的な変異について2391の配列の全てのCDRを解析し、この多様性をライブラリー設計に導入した。CDRの多様性をシャッフルした「VHH Shuffle」ライブラリーでは、ナノボディ配列中の固有のCDRについて、iCANデータベースをスキャンした。1239の固有のCDR1、1600の固有のCDR2、および1608の固有のCDR3を同定し、iCANデータベース内の2391の配列のうち、各フレームワーク位置でのコンセンサスからフレームワークを導き出した。固有のCDRのそれぞれを個別に合成し、コンセンサスフレームワークでシャッフルすることで、理論上の多様性が $3.2 \times 10^9$ のライブラリーを生成した。その後、制限酵素消化を用いて、ライブラリーをファージミドベクターにクローニングした。「VHH hShuffle」ライブラリー(CDRの多様性をシャッフルした合成「ヒト」VHHライブラリー)について、ナノボディ配列中の固有のCDRを求めてiCANデータベースをスキャンした。1239の固有のCDR1、1600の固有のCDR2、および1608の固有のCDR3を同定し、フレームワーク1、3、および4を、ヒト生殖細胞系列DP-47フレームワークから導き出した。フレームワーク2は、iCANデータベースの2391の配列のうち、各フレームワークの位置でのコンセンサスから導き出された。固有のCDRそれぞれを個別に合成し、NUGETツールを用いて部分的にヒト化されたフレームワークでシャッフルすることで、理論上の多様性が $3.2 \times 10^9$ のライブラリーを生成した。このライブラリーを、NUGETツールを用いて、ファージミドベクターにクローニングした。

#### 【0252】

Carterra SPRシステムを用いて、VHH-Fcバリエーションの結合親和性および親和性分布を評価した。VHH-Fcは、TIGITに対する親和性の範囲を示し、下限は12nMの $K_D$ 、上限は1685nMの $K_D$ であった(データは示されていない)。図12は、ELISA、プロテインA(mg/ml)、および $K_D$ (nM)に対するVHH-Fcクローンの具体的な値を示している。

#### 【0253】

実施例8：A2A受容体用の高度免疫グロブリンライブラリー

#### 【0254】

高度免疫グロブリン(IgG)ライブラリーを、実施例7に記載されるものと同様の方法を使用して作成した。簡潔に言えば、3人の健康なドナーのそれぞれからの3700万を超える固有のIGH配列からなるヒトナীবおよび記憶B細胞受容体配列のデータベースの分析から、高度免疫IgGライブラリーを生成した。分析から200万を超えるCDRH3配列を収集して、実施例1~3と同様の方法を使用して個別に構築した。CDRH3配列を、実施例9に記載されるVHH hShuffleライブラリーに組み込んだ。最終的なライブラリー多様性は、 $1.3 \times 10^{10}$ であると決定された。設計の概略図を図13に示す。

#### 【0255】

88個の固有のクローンのうち73個は、親細胞の2倍の標的細胞MFI値を有していた。88個の固有のクローンのうち15個は、標的細胞のMFI値が親細胞の20倍であった。アデノシンA2A受容体バリエーションA2AR-90-007のデータを、図14A

~ 図 1 4 B に示す。

【 0 2 5 6 】

この実施例は、ナノモル以下の範囲の高い親和性および  $K_D$  値を有する A 2 A R についての V H H ライブラリーの生成を示す。

【 0 2 5 7 】

実施例 9 . 様々な C D R を有する G P C R ライブラリー

【 0 2 5 8 】

C D R ランダム化スキームを使用して、G P C R ライブラリーを作成した。

【 0 2 5 9 】

簡潔に言えば、G P C R 抗体配列に基づいて G P C R ライブラリーを設計した。6 0 以上の異なる G P C R 抗体を分析し、これらの G P C R からの配列を、C D R ランダム化スキームを用いて改変した。

【 0 2 6 0 】

重鎖 I G H V 3 - 2 3 の設計を、図 1 5 A に示す。図 1 5 A で示されるように、I G H V 3 - 2 3 C D R H 3 は、2 3 アミノ酸、2 1 アミノ酸、1 7 アミノ酸、および 1 2 アミノ酸の 4 つの特徴的な長さを有し、それぞれの長さはその残基多様性を有する。4 つの長さの比率は次のとおりであった：2 3 アミノ酸長の C D R H 3 で 4 0 %、2 1 アミノ酸長の C D R H 3 で 3 0 %、1 7 アミノ酸長の C D R H 3 で 2 0 %、および 1 2 アミノ酸長の C D R H 3 で 1 0 %。C D R H 3 の多様性は  $9 . 3 \times 1 0^8$  であると判定し、完全重鎖 I G H V 3 - 2 3 の多様性は  $1 . 9 \times 1 0^{13}$  であった。

【 0 2 6 1 】

重鎖 I G H V 1 - 6 9 の設計を、図 1 5 B に示す。図 1 5 B で示されるように、I G H V 1 - 6 9 C D R H 3 は、2 0 アミノ酸、1 6 アミノ酸、1 5 アミノ酸、および 1 2 アミノ酸の 4 つの特徴的な長さを有し、それぞれの長さはその残基多様性を有する。4 つの長さの比率は次のとおりであった：2 0 アミノ酸長の C D R H 3 で 4 0 %、1 6 アミノ酸長の C D R H 3 で 3 0 %、1 5 アミノ酸長の C D R H 3 で 2 0 %、および 1 2 アミノ酸長の C D R H 3 で 1 0 %。C D R H 3 の多様性は  $9 \times 1 0^7$  であると判定し、完全重鎖 I G H V - 6 9 の多様性は  $4 . 1 \times 1 0^{12}$  である。

【 0 2 6 2 】

軽鎖 I G K V 2 - 2 8 および軽鎖 I G L V 1 - 5 1 の設計を、図 1 5 C に示す。抗体軽鎖 C D R 配列を、位置特異的なパリエーションについて解析した。2 つの軽鎖フレームワークは固定された C D R 長で選択された。理論的な多様性は、カッパ鎖と軽鎖それぞれに関して 1 3 8 0 0 と 5 1 8 0 であると判定された。

【 0 2 6 3 】

最終的な理論的な多様性は  $4 . 7 \times 1 0^{17}$  であると判定し、最終的な生成された F a b ライブラリーの多様性は  $6 \times 1 0^9$  であった。図 1 5 D を参照されたい。

【 0 2 6 4 】

実施例 1 0 : 様々な C D R を有する アデノシン A 2 A 受容体 ライブラリー

【 0 2 6 5 】

アデノシン A 2 A 受容体 ライブラリーを、実施例 9 に同様に記載されている C D R ランダム化スキームを使用して作成する。

【 0 2 6 6 】

簡潔に言えば、G P C R 抗体配列に基づいてアデノシン A 2 A 受容体 ライブラリーを設計する。6 0 以上の異なる G P C R 抗体が分析され、これらの G P C R からの配列は、C D R ランダム化スキームを用いて改変される。C D R ランダム化スキームを使用して設計されたアデノシン A 2 A 受容体 パリアント I g G は精製され、細胞ベースの親和性測定を決定するため、および機能分析のためにアッセイされる。

【 0 2 6 7 】

実施例 1 1 . A 2 A パリアント免疫グロブリン

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

50

生成した A 2 A R バリエーション免疫グロブリンを、様々な機能的アッセイにおいて分析した。

【 0 2 6 9 】

初めに、A 2 A R 免疫グロブリン s c F v フェージライブラリーを細胞および固定された A 2 a タンパク質上でパニングして、スクリーニングした。選択の各ラウンドの排出フェージ数を表 7 ~ 表 8 に示す。

【 0 2 7 0 】

【表 6】

表 7.

標的	ライブラリー	ラウンド1	ラウンド2	ラウンド3	ラウンド4	ラウンド5
HEK293-A2a 細胞	マウス免疫	$2.7 \times 10^6$	$4.1 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$
A2a タンパク質	ヒト化合成	$4.1 \times 10^6$	$8.0 \times 10^7$	$2.3 \times 10^8$	$1.2 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$
A2a タンパク質 + ZM241385	ヒト化合成	$5.2 \times 10^6$	$4.5 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$	$3.0 \times 10^7$	$6.7 \times 10^7$
A2a タンパク質	マウス免疫	$4.3 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$4.8 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$
A2a タンパク質 + ZM241385	マウス免疫	$2.4 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$	$1.9 \times 10^8$	$6.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^6$

10

20

【 0 2 7 1 】

【表 7】

表 8.

標的	ライブラリー	ラウンド1	ラウンド2	ラウンド3	ラウンド4	ラウンド5
HEK293-A2a 細胞	免疫	$1.3 \times 10^6$	$3.1 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$
A2a タンパク質	合成	$5.2 \times 10^6$	$3.7 \times 10^7$	$1.5 \times 10^8$	$1.2 \times 10^7$	$4.9 \times 10^7$
A2a タンパク質 + ZM241385	合成	$6.7 \times 10^6$	$2.9 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$
A2a タンパク質	免疫	$8.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$	$9.0 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$
A2a タンパク質 + ZM241385	免疫	$6.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$1.3 \times 10^8$	$4.6 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$

30

40

【 0 2 7 2 】

実施例 1 2 . 抗体結合のスクリーニング

【 0 2 7 3 】

表 1 5 ~ 表 1 8 に列挙される群から選択される A 2 A R 免疫グロブリンを、表に列挙されるように標的への結合についてアッセイした。

【 0 2 7 4 】

50

HEK 293 - A2a 細胞

【0275】

バリエントライブラリーからの免疫グロブリンを使用したHEK 293 - A2a細胞への結合を示すフローサイトメトリーデータを、100 nMのIgGを使用して生成し、親細胞において検出された結合と比較した。免疫ライブラリーのバリエントを使用した結合を、図16A～16Nに示す。対照は図16Oに示し、これは、ヒトアデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)との細胞結合を示す。選択したバリエントを、100 nMから滴定した濃度での結合について評価した。得られた曲線を図17A～図17Hに示す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。マウス免疫ライブラリーのバリエントを使用した結合を図18A～18Nに示す。対照は図18Oに示し、これは、ヒトアデノシンA2aRモノクローナル(MAB9497)との細胞結合を示す。選択したバリエントを、100 nMから滴定した濃度での結合について評価した。得られた曲線を図19A～図19Gに示す。結合曲線は、IgG濃度対MFI(平均蛍光強度)でプロットされる。

10

【0276】

タンパク質結合

【0277】

表15～18からの精製されたA2a免疫グロブリンを、100 nMからの滴定での結合についてアッセイした。選択されたバリエントの結果を図20A～20Gに示す。

【0278】

実施例13 . LANCE(登録商標)cAMPアッセイ中のアゴニスト応答

【0279】

アゴニスト用量反応アッセイを、製造業者の指示に従って、2500細胞/ウェルを使用して384ウェルフォーマットでLANCE(登録商標)cAMPアッセイを使用して実施した。NECAおよびCGS 21680による細胞刺激を室温で30分間行った。読み取りは、レーザーモードのEnVisionプレートリーダーで行った。データを図21に示す。Z'因子を、少なくとも16のバックグラウンドと16の最大信号ポイント( $Z' = 0.80$ )とを有するNECAについて計算した。NECAについて計算された $EC_{50}(M) = 2.7 \times 10^{-7}$ 、およびCGS 21680について計算された $EC_{50}(M) = 4.3 \times 10^{-7}$ 。

20

30

【0280】

実施例14 . LANCE(登録商標)cAMPアッセイにおけるアンタゴニスト応答

【0281】

アンタゴニスト用量反応アッセイを、製造業者の指示に従って、2500細胞/ウェルおよび1 μMのNECA(参照アゴニスト)を使用して384ウェルフォーマットでLANCE(登録商標)cAMPアッセイを使用して実施した。ZM241385による細胞刺激を室温で30分間行った。読み取りは、レーザーモードのEnVisionプレートリーダーで行った。データを図22に示す。ZM241385について計算された $IC_{50}(M) = 1.25 \times 10^{-5}$ 。

【0282】

実施例15 . A2A cAMPアンタゴニスト滴定

【0283】

細胞を3000個/ウェルでプレATINGし、固定された100 nMのIgGと室温で1時間ブレインキュベートし、その後、製造業者の指示に従って、NECA滴定を用いて、室温にて30分間刺激した。緩衝液はPBS + 0.1%BSA + 0.5mM IBMXであった。結果を図23に示す。絶対IC50を表9に示し、これは、A2A-1が負のアロステリックモジュレーターであることを示す。

40

【0284】

50

## 【表 8】

## 表 9.

	+Ab なし	A2A-1	R&D 対照抗体
IC50	0.03040	0.2816	2.253

## 【0285】

実施例 16 . L A N C E (登録商標) アロステリック c A M P アッセイ

## 【0286】

A 2 A - 1 および A 2 A - 9 を、アロステリック調節についてアッセイした。細胞を、滴定した I g G と共に室温で 1 時間プレインキュベートした後、固定した N E C A 濃度で刺激した。結果を図 2 4 に示す。I C 5 0 値を表 1 0 に示し、これは、A 2 A - 1 が負のアロステリックモジュレーターであることを示す。

## 【0287】

## 【表 9】

## 表 10.

	A2A-1	A2A-9	R&D 対照抗体
絶対 IC50	1.833	4.106	9.432

## 【0288】

実施例 17 . c A M P アロステリック A 2 A パーキンエルマー

## 【0289】

実施例 15 に記載されるように A 2 A - 9 をアッセイした。得られた応答曲線を図 2 5 に示す。A 2 A - 9 について計算された I C 5 0 を表 1 1 に示す。

## 【0290】

## 【表 10】

## 表 11.

		A2A-9	R&D 対照抗体	抗体なし
絶対 IC50		~0.4513	~0.5126	~0.2556

## 【0291】

実施例 18 . A 2 A c A M P アンタゴニスト滴定

## 【0292】

実施例 16 に記載されるように A 2 A - 9 をアッセイした。得られた応答曲線を図 2 6 に示す。計算された I C 5 0 値を表 1 2 に示す。結果は、A 2 A - 9 がアンタゴニストであることを示す。

## 【0293】

## 【表 11】

## 表 12.

	A2A-9	R&D 対照抗体
絶対 IC50	4.106	9.432

## 【0294】

10

20

30

40

50

## 実施例 19 . A 2 A アンタゴニスト c A M P アッセイ

## 【 0 2 9 5 】

選択されたバリエーションを、標的への結合についてアッセイした。免疫グロブリンを3連で滴定し、細胞上で1時間インキュベートした後、0.5 μMのNECAと30分間インキュベートした。665 nm / 615 nmの相対蛍光単位 (RFU) 比対 nM IgG を対数スケールで示す結合曲線を図 27 A ~ 図 27 C に示す。最終的な結合研究では、表 13 および表 14 に列挙されるように、生成されたライブラリーの中に機能的な抗体を見出した。

## 【 0 2 9 6 】

## 【 表 1 2 】

10

表 1 3 .

標的	ライブラリー	再フォーマット	機能的
HEK293-A2a 細胞	マウス免疫	14	
A2a タンパク質	ヒト化合成	95	2
A2a タンパク質 +ZM241385	ヒト化合成	95	3
A2a タンパク質	マウス免疫	12	1
A2a タンパク質 +ZM241385	マウス免疫	22	0

20

## 【 0 2 9 7 】

## 【 表 1 3 】

表 1 4 .

標的	ライブラリー	再フォーマット	機能的
HEK293-A2a 細胞	免疫	14	
A2a タンパク質	合成	95	2
A2a タンパク質 +ZM241385	合成	95	5
A2a タンパク質	免疫	29	4
A2a タンパク質 +ZM241385	免疫	10	5

30

## 【 0 2 9 8 】

## 実施例 20 . A 2 A R 細胞の機能的 c A M P アッセイ

40

## 【 0 2 9 9 】

アロステリックおよびアンタゴニスト c A M P アッセイを、A 2 A 細胞株を使用して実施した。

## 【 0 3 0 0 】

簡潔に言えば、細胞を 100 nM の抗 A 2 A R 抗体とプレインキュベートし、その後 100 μM から NECA 刺激 3 × 滴定した。機能的アロステリック c A M P アッセイのデータを、図 28 A ~ 図 28 C に示す。ZM241385 はアンタゴニストとして機能した。「Abなし」はアゴニストとしてのみ機能した。

## 【 0 3 0 1 】

機能的アンタゴニスト c A M P アッセイのために、細胞を、100 nM からの抗 A 2 A

50

R抗体3×滴定を用いてプレインキュベートし、その後0.5 μMでのNECA刺激を行った。データを図29A～図29Cに示す。また、細胞を100 nMからの抗A2AR抗体3×滴定を用いてプレインキュベートし、その後10 μMでのNECA刺激を行った。データを図30A～図30Cに示す。

**【0302】**

データに基づくと、NECA滴定、IgG滴定（NECA 0.5 μM）、およびIgG滴定（NECA 10 μM）について、A2ARバリエーションA2A-17、A2A-19、A2A-24、A2A-26、およびA2A-27はcAMPアッセイにおいて改善された機能を示した。

**【0303】**

実施例21. T細胞活性化アッセイ

**【0304】**

先の実施例に従って開発されたバリエーションA2A-77は、hA2aに対する高親和性結合剤であることが見出された（図31A）。A2A-77はインビトロで機能的アンタゴニストであると決定され（図31B）、インビトロで高特異性を有していた（図31C）。A2A-77は、T細胞、NK細胞、樹状細胞、およびマクロファージを含むA2AR発現細胞を有するカニクイザルPBMCに結合すると見出された（図31D）。さらなる研究を実施して、T細胞活性化アッセイにおける効果を決定した。

**【0305】**

簡潔に言えば、ウェル当たり $2 \times 10^5$ のPBMCを、100 nMから滴定されたアンタゴニストZM-241385またはA2AR免疫グロブリンと37 で30分間インキュベートした後、A2ARアゴニストNECAを1 μMで用いて37 で30分間処理した。その後、細胞を、抗CD3 / CD28抗体でコーティングした磁気ビーズによって活性化した。インキュベーションの3日後、上清を採取してIFN- 放出の検出およびT細胞活性化の評価を行った。ZM-241385は強力であり、選択的な小分子A2Aアンタゴニスト対照として使用される。

**【0306】**

データを図32A～図32Hに示す。図32A～図32Bで見られるように、T細胞活性化をバリエーションA2A-81、A2A-51、A2A-53、A2A-77、A2A-31、およびA2A-78で観察した。A2A-77は、5.92 nMのIC50を有することをさらに観察した（図32C）。図32D～図32Gのデータは、T細胞活性化を抑制するためにより多くのNECAを使用しているとき、A2A-77およびA2A-81は、低NECAの場合ほどT細胞活性化を回復できないことを実証する。A2A-51は、高NECAでも依然として良好に機能する。

**【0307】**

この実施例は、A2A-77が免疫抑制を遮断するA2ARの機能的アンタゴニストであることを示す。

**【0308】**

実施例22. 例示的な配列

**【0309】**

10

20

30

40

50

## 【表 1 4 - 1】

表 1 5. 可変重鎖 CDR

A2AR バリエント	配列 番号	CDR1 配列	配列 番号	CDR2 配列	配列 番号	CDR3 配列
A2A - 1	6	GGSISSSN	95	YPSGN	184	DEGY
A2A - 2	7	GYTFTGY	96	NPNSGG	185	GGPFDY
A2A - 3	8	GYTFTGY	97	NPNSGG	186	VYSYGFDY
A2A - 4	9	GFTFSDY	98	SSSGST	187	DNWAFDL
A2A - 5	10	GFTFSSY	99	SSSSSY	188	TWYSSSPFDY
A2A - 6	11	GFTFSNY	100	SSSSSY	189	DSGSYDWFDP
A2A - 7	12	GFTFSSY	101	SGSGGS	190	YSNYFDY
A2A - 8	13	GYSITSGY	102	SYDGS	191	VHHYYGSSYFDY
A2A - 9	14	GYSITSGY	103	RYDGS	192	VHHYYGSSYFDY
A2A - 10	15	GYSITSGY	104	SYDGS	193	DPYYYGSSYFDY
A2A - 11	16	GFTFSDY	105	NYDGSS	194	EYYYGSSSFAY
A2A - 12	17	GFTFNDY	106	NYDGSS	195	EYYYGSSSFAY
A2A - 13	18	GFTFSDF	107	SSGSST	196	REFAY
A2A - 14	19	GFTFSDY	108	SSSGST	197	PNYHGSSPFAY
A2A - 15	20	GFTFSTY	109	SGSGGS	198	ARGKWRWRLGRRYDY
A2A - 16	21	GFTFNXY	110	SGSGGD	199	ARGYWRWRLRRYDY
A2A - 17	22	GFNIGNT	111	NPNYGT	200	DYGSSSFDY
A2A - 18	23	GFSFSGY	112	SGSGGS	201	ARGYPRWRLGRRYDY
A2A - 19	24	GFTFSGY	113	SGSGAS	202	ARGYKRWRLGRRYDY
A2A - 20	25	GFAFSNY	114	YPKSGS	203	LYGYDLHWYFDV
A2A - 21	26	GGSISSGGY	115	NPNSGN	204	DEVAAAGLFDY
A2A - 22	27	GYTFTEY	116	HPSSGS	205	HEVEYGPSSSWFAY
A2A - 23	28	GFTFSTY	117	SGSGGS	206	ARGKWRWRLGRRYDY
A2A - 24	29	GFNIGNT	118	NPNYGT	207	DYGSSSFDY
A2A - 25	30	GFTFGNY	119	DPANGD	208	EGDNSNYAMDY
A2A - 26	31	GFTFSTY	120	SGSAGS	209	ARGHWRWRLGRRYDY
A2A - 27	32	GFTFSSY	121	SGSGGS	210	ARGYWRWRLWRRYDY
A2A - 28	33	GFTFSSQ	122	SGSGVS	211	ARGRWRWRLGRRYDY
A2A - 29	34	GYSFTGY	123	YPSGN	212	EDDYGWYFGV
A2A - 30	35	GYRLTGY	124	DPASGD	213	HEDPIYYGNVVFAY
A2A - 31	36	GYLFTDY	125	YPGTG	214	LYYGSSWERYFDV
A2A - 32	37	GFTFIDY	126	NPNYGT	215	QGSNYGGYFDV
A2A - 33	38	GFPFSSY	127	SGSGGR	216	ARGYWRWRLGRRADY
A2A - 34	39	GFNFNTY	128	YPGNSD	217	VIYYGSSDYTLDY
A2A - 35	40	GFTFSTY	129	SGSGGS	218	ARGKWRWRLGRRYDY
A2A - 36	41	GFNIGNT	130	NPNYGT	219	DYGSSSFDY
A2A - 37	42	GYTFTSY	131	NHDGSN	220	SMITRFAY
A2A - 38	43	GFSLTSY	132	DPETDD	221	YYYGSSAFAY
A2A - 39	44	GFTFSNY	133	NPNNGG	222	AYYSNYGVMYF
A2A - 40	45	GFNFRSY	134	SGGGGS	223	ARGGWRWRLGRRYDY
A2A - 41	46	GFSLSIY	135	SPSGGS	224	PYYYGSSRYAMDY
A2A - 42	47	GYTFTSY	136	SSGDGS	225	DYYGSSWHFDV

10

20

30

40

【 0 3 1 0 】

50

【表 1 4 - 2】

A2A - 43	48	GFTFSSY	137	SDGGSY	226	YIWYYGSSWSWYFDA
A2A - 44	49	GFTFSAY	138	GTAGD	227	GYNWIFDL
A2A - 45	50	GYSFTGY	139	LPGSGG	228	GNYDAMDY
A2A - 46	51	GGYISSN	140	EQDGSE	229	GEYSRLWYFDL
A2A - 47	52	GIFTDY	141	LPGSGG	230	PYDYDFDY
A2A - 48	53	GYTFSS	142	YPRDGS	231	TVVADWYFDV
A2A - 49	54	GYTFNDD	143	NPNNGA	232	KGDGGSYAAMDY
A2A - 50	55	GYSFTGY	144	YPKDGS	233	TVVADWYFDV
A2A - 51	56	GYTFNDY	145	NPNNGA	234	NYGSSYYALDY
A2A - 52	57	GYTFNDY	146	NPNNGG	235	QGSNYGGYFDV
A2A - 53	58	GFNIIDD	147	TDTGEP	236	DYTYAMDY
A2A - 54	59	GYTFDY	148	DPANGD	237	GDYGSSYAMDY
A2A - 55	60	GYEFSSS	149	YPGTGN	238	YYYGSSAFAY
A2A - 56	61	GFTFSSY	150	DPGTGG	239	IYDYDYSAMDY
A2A - 57	62	GFIFSDF	151	DPEDG	240	DYYGSSYLDY
A2A - 58	63	GFNIKDY	152	NPNNGG	241	DYYGSFHRRWYFDV
A2A - 59	64	GYTFDY	153	NINNGG	242	DYHGSSFYWYFDV
A2A - 60	65	GYTFIEY	154	NFDGSS	243	YYDSSYYAMDY
A2A - 61	66	GFTFSTY	155	YPGDTD	244	GIAVAGTFDY
A2A - 62	67	GYTFNY	156	NPNNGG	245	HALLWYYYAMDY
A2A - 63	68	GFTFSDH	157	NPNSGI	246	VSYSGSLHY
A2A - 64	69	GFTFDDY	158	NTNTGN	247	SNWNYFDY
A2A - 65	70	GSAFSAS	159	DPDNGD	248	PRDSGPFAS
A2A - 66	71	GFTFSSY	160	YPKDGS	249	SRGYYYGSSYGYDV
A2A - 67	72	GHTITSY	161	LPGSGT	250	NWGFAY
A2A - 68	73	GYTFSGY	162	DPSDSF	251	DYGSSYEFTY
A2A - 69	74	GGYISSN	163	KTKTDGGT	252	GYSGSVDY
A2A - 70	75	GSEIKDY	164	SDGGS	253	DATGTIFAY
A2A - 71	76	GGSISSN	165	YHSGS	254	EVVSGMIGTVFDY
A2A - 72	77	GFTISTY	166	GTAGD	255	GYNWIFDY
A2A - 73	78	GFTVSTY	167	GTAGD	256	GYNWIFDF
A2A - 74	79	GFTFTTY	168	GTAGD	257	GYNWIFDF
A2A - 75	80	GGSISSN	169	YHSGN	258	EVVSGMIGTIFDY
A2A - 76	81	GFTFSSY	170	GTAGD	259	GYNWIFDF
A2A - 77	82	GGSISSN	171	YHSGN	260	EVVSGMIGTIFDY
A2A - 78	83	GFTFSAY	172	GTAGD	261	GYNWVFDL
A2A - 79	84	GFTFDDY	173	TWNGDR	262	DGLTGIFDY
A2A - 80	85	GFTISTY	174	GTAGD	263	GYNWIFDY
A2A - 81	86	GGSISSN	175	YHSGS	264	EVVSGLYGTIFDY
A2A - 82	87	GYSITSGY	176	SYGGS	265	DYDYFDY
A2A - 83	88	GYAFSSY	177	YPGDGD	266	GAY
A2A - 84	89	GYTFIEY	178	SGGGSY	267	PNYSGSSPFAY
A2A - 85	90	GFSLTAY	179	WTGGG	268	SRGYYYGSSYGYFDV
A2A - 86	91	GYSITSD	180	NYSGS	269	KLDWDGYFDV
A2A - 87	92	GFNIKNT	181	DPANGN	270	GSPYGYDGHYVMDY

10

20

30

40

【 0 3 1 1 】

【表 1 4 - 3】

A2A - 88	93	GFTFRTY	182	SAEGSN	271	DGRGSLPRPKGGFIGALSF HWPFGRWLGGSYGYDSS EDSGGAFDI
A2A - 89	94	GFTFNNTY	183	SYGGSD	272	DGRGSLPRPKGGFIGDLF HWPFGRWLGKSYGYDSS EDSGGAFDI

【 0 3 1 2 】

50

## 【表 15 - 1】

表 16. 可変軽鎖CDR

A2AR バリエーション	配列 番号	CDR1 配列	配列 番号	CDR2 配列	配列 番号	CDR3 配列
A2A - 1	273	RSSQSLVYSDGNTYLN	362	KVSNRDS	451	MQGTHWPRT
A2A - 2	274	KASQDIDDDMN	363	EATLVP	452	LQHDNFPMYT
A2A - 3	275	KSSQSVLYSSNNKNYLA	364	WASTRES	453	QQYYSTPYT
A2A - 4	276	RASQSVSSNLA	365	GASTRAT	454	QQYYSTPLT
A2A - 5	277	KASQDIDDDMN	366	EATLVP	455	LQHDNFPWT
A2A - 6	278	RASQGISSWLA	367	AASSLQS	456	QQTNSFPRT
A2A - 7	279	KASQDVDDDMN	368	EATLVP	457	LQHDNFPWT
A2A - 8	280	KASQNVGTNVA	369	SASYRYS	458	QRFNNYPLT
A2A - 9	281	KASQNVGSSVA	370	STSYRYS	459	QQYNSYPLT
A2A - 10	282	RASQISDYLH	371	YASQIS	460	QNGHSFPLT
A2A - 11	283	KASRNVGTNVA	372	SASYRYS	461	QQYNSYPLT
A2A - 12	284	RASQISDYLH	373	YASQIS	462	QNGHSFPHT
A2A - 13	285	KASQNVGTNVA	374	SASYRYS	463	QQYNIYPLT
A2A - 14	286	RASQISNYLH	375	YASQIS	464	QNGHSFPLT
A2A - 15	287	RASQSIGRYLN	376	AASSLHS	465	QQSYVTPWT
A2A - 16	288	RASQSIGTYLN	377	GASTLHS	466	QQSYSAPWT
A2A - 17	289	KASQSVRNDVV	378	RGNTLRP	467	QQYYGIPLT
A2A - 18	290	RASQSVTTYLN	379	SASSLQS	468	QQTYATPWT
A2A - 19	291	RASQISDYLN	380	TASTLQS	469	EQSYSTPWT
A2A - 20	292	KASHSVDYDGDNYMN	381	WASTRLT	470	LQHIEYPFT
A2A - 21	293	KSSQSVLYSSNNKNYFA	382	DAPNRAT	471	QQGYTTPYT
A2A - 22	294	RASQDIGRSL	383	DASRFIS	472	QWSNSWPYT
A2A - 23	295	RASQSIGRYLN	384	AASSLHS	473	QQSYVTPWT
A2A - 24	296	KASQSVRNDVV	385	RGNTLRP	474	QQYYGIPLT
A2A - 25	297	KASQSVDYDGDSYM	386	RANRLVD	475	QNGHSFPLT
A2A - 26	298	RASQTISRILN	387	SASTLQS	476	QQSYSTPHT
A2A - 27	299	RASQSIGSYLN	388	GASNLQS	477	QQGYSAPRT
A2A - 28	300	RASRSISSYLN	389	AASSLPS	478	QQSYSTPRT

10

20

30

40

## 【0313】

50

【表 1 5 - 2】

A2A - 29	301	KVSQDVRTAVA	390	DTSYLAS	479	QQSYSWSLT
A2A - 30	302	GGGNDIGSSMY	391	WMSNLAS	480	QQYSTYPFA
A2A - 31	303	RASQISDYLN	392	GASPRES	481	QQDNIWPYT
A2A - 32	304	GGGNDIGSSMY	393	DASRFIS	482	QQSNEDPPFT
A2A - 33	305	RASESVDSFGNFMN	394	HTSRLNS	483	QQNNEVPRT
A2A - 34	306	RASSSVTYIH	395	AVSRLDS	484	HQSNEDPYT
A2A - 35	307	RASQSIGRYLN	396	AASSLHS	485	QQSYVTPWT
A2A - 36	308	KASQSVRNDVV	397	RGNTLRP	486	QQYYGIPLT
A2A - 37	309	KASHSVDDYDGDNYMN	398	DASRFIS	487	LRYASYRT
A2A - 38	310	RASESVNSYGNFMH	399	DASRFIS	488	LQYGESPLT
A2A - 39	311	RSSKSLHSSGNAYVY	400	YTSKPNS	489	QHHYGIPLT
A2A - 40	312	RASQSIGTYLN	401	AASSLES	490	QQTYNTPWT
A2A - 41	313	RASSRVSSSYLY	402	ATYSLDY	491	LQHGERPLT
A2A - 42	314	GASQSIGTHH	403	DTSYLAS	492	QQGNTRPWT
A2A - 43	315	RASENIYVPLN	404	DASRFIS	493	QQYNSFPLYT
A2A - 44	316	RASQSVSSSYLA	405	GASSRAT	494	QQYGSSPIT
A2A - 45	317	KSSQSLLYSGEKTYPY	406	WASTRLT	495	QQSNEDSWT
A2A - 46	318	QSSQDIFNYLE	407	TASNLDT	496	QQGYSTPEIT
A2A - 47	319	RSTRNILSNMP	408	NANTLAE	497	LQHWNYPYM
A2A - 48	320	RASQDISNNLH	409	EISGWLS	498	QQSNSWSLLT
A2A - 49	321	SASQMSNNLH	410	LASNLYG	499	RQNGHSFPLT
A2A - 50	322	RASQDISNNLH	411	WASTRLT	500	QQWSDYPFT
A2A - 51	323	SASSSLSYM	412	GASPRES	501	RQMSSYPPT
A2A - 52	324	SASSSVSYM	413	EISGWLS	502	LRYASYRT
A2A - 53	325	KASQNMGSNVA	414	SASHRSS	503	QQWNYPRIT
A2A - 54	326	KASQNGGTNVD	415	EISGWLS	504	QHYYSWPPT
A2A - 55	327	RASENIYVPLN	416	LASYRFT	505	QQINGWPYT
A2A - 56	328	KASQNMGSNVA	417	AATRLAD	506	RQHYSSPPT
A2A - 57	329	KASQNGGTNVD	418	VASNQGT	507	QQYYTYPLT
A2A - 58	330	KASQGVDTNVA	419	SSSIS	508	AQNRELPT
A2A - 59	331	KASQDVGTAIT	420	SASKRNT	509	LHHYGTPYT
A2A - 60	332	KASQDVGTSA	421	PASYRSS	510	QQGSSNPLT
A2A - 61	333	RASQVIDDDIN	422	LGSNRAP	511	HQSYTIPHT
A2A - 62	334	RASQEISGYLT	423	SASHRSS	512	QQWDNNPYT
A2A - 63	335	RASQISRYLN	424	KASSLER	513	LQPNSYPWT
A2A - 64	336	RASQGISSWLD	425	TPFSLQS	514	QHYDDLPLT

10

20

30

40

【 0 3 1 4 】

50

【表 1 5 - 3】

A2A - 65	337	KASQNMGSNVA	426	EASTRFS	515	QQYSSYPLR
A2A - 66	338	RASQGILGYLN	427	STSNLLL	516	RQLSSNPLT
A2A - 67	339	RASEVDNYGISFMS	428	DASRFIS	517	QQINSWPLT
A2A - 68	340	KSSQSLLYSGEKTPY	429	EASNRYT	518	QQWSSYPPIA
A2A - 69	341	RASQGLRHDLG	430	WASNRES	519	QKYSSTPYT
A2A - 70	342	HASESVSVAGTSLH	431	AASNRES	520	QHWSSFPLT
A2A - 71	343	RVSQGISNYLN	432	AASSLQS	521	QQSYSTPLT
A2A - 72	344	RASQSVSSNLA	433	GASSRAT	522	QQYGSSPPT
A2A - 73	345	RASQSVSSNLA	434	GASSRAT	523	QQYGSSPLT
A2A - 74	346	RASQSVSSSYLA	435	GASSRAT	524	QQYYSTPLT
A2A - 75	347	RASQSISSYLN	436	AASSLQS	525	QQANSFPIT
A2A - 76	348	RASQSVSSNLA	437	DASNRAT	526	QQYGSSPLT
A2A - 77	349	RASQRISSYLN	438	AASSLQS	527	QQSYSTPLT
A2A - 78	350	RAIQSVSSSYLA	439	GASSRAT	528	QQYGSSPLT
A2A - 79	351	RASQSVSSYLA	440	GASSRAT	529	QQYGNSYT
A2A - 80	352	RASQSVSSNLA	441	GASTRAT	530	QQYGSSPPT
A2A - 81	353	RASQSISSYLN	442	AASSLQS	531	QQSYSTPIT
A2A - 82	354	KASQSVSNDVA	443	YASNRYT	532	QQDYRSPLT
A2A - 83	355	KASQNVGTNVA	444	SASYRYS	533	QQYNSYPLT
A2A - 84	356	SASSSVSYMY	445	DTSNLAS	534	QQWNSNPLT
A2A - 85	357	RASQISDYLH	446	YASQSIG	535	QNGHSFPLT
A2A - 86	358	HASQNINVWLN	447	KASNLHT	536	QQGQSYPLT
A2A - 87	359	KASQNVGSNVA	448	SASYRYS	537	QQYNSYPLT
A2A - 88	360	SGISSNIGNNYVS	449	DNNKRASG	538	GTWDTSLAGV
A2A - 89	361	SGSSSNIGNHYVS	450	DNTKRPSG	539	GTWDASLSTWV

【 0 3 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 1】

表 1 7. 可変重鎖配列

A2AR バリエーション	配列番号	配列
A2A - 1	540	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPG KGLEWIGEIYPSGNTYYNPSLKSRTISVDKSKNQFSLKLNST AADTAVYYCARDEGYWGQGLTVTVSS
A2A - 2	541	EVQLLESQAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHVWRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSSLRSEDTAVYYCARGGPFYWGQGMVTVSS
A2A - 3	542	EVQLLESQAEVKKPGASVKASCKASGYTFTGYYMHVWRQAP GQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCARVYSYGFYWGQGLTVTVSS
A2A - 4	543	AGQLQESGGGLVKPGGSLRPSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPG KGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDNWAFLD WGQGLTVTVSS
A2A - 5	544	GGALVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQATG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLHLQMNSL RDEDTAVYYCARTWYSSSPFYWGQGLTVTVSS
A2A - 6	545	EVQLLESQAEVKKPGASVKASCKASGYTFTGYYMHVWRQAPG KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVNGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVCYCARDSDGSYDWFDPWGQGLTVTVSS
A2A - 7	546	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPG KGLEWVSAISGSGGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAKYSNYFDYWGQGLTVTVSS
A2A - 8	547	EVQLQQPGLVKPSLSTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG KKLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLSSV TTDDTATYYCARVHHYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS
A2A - 9	548	EVQLQQSGPGLVKPSQSLSTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG KKLEWMGYIRYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSV TTDDTATYYCARVHHYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS
A2A - 10	549	EVQLQQSGPGLVKPSQSLSTLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSV TTEDTATYYCARDPYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS
A2A - 11	550	EVKLVESGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDYYMAWVRQVPE KGLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFTISRDNKNSLYLQMS LKSEDIATYYCAREYYGSSSFAYWGQGTTLTVSS
A2A - 12	551	EVNPVSEGGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFNDYYMAWVRQVPE KGLEWVANINYDGSSTYYLDSLKSRFTISRDNKNSLYLQMS KSEDTATYYCAREYYGSSSFAYWGQGLTVTVSA
A2A - 13	552	GGEVVEGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDFGMHVWRQAPE KGLEWVAIYSSGSGSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTSL RSEDTAMYYCARREFAYWGQGLTVTVSA
A2A - 14	553	EVKLEESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSDYGMHWVRQAPE KGLEWVAIYSSGSGSTIYYEDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMTS LRSEGTAIYYCARPNYHGSSPFAYWGQGLTVTVSA
A2A - 15	554	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPG KGLEWVSGISGSGSTNYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAAARGKWRWRLGRRYDYWGQGLTVTVSS
A2A - 16	555	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMWVRQAPG KGLEWVSSISGSGGDTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN LRAEDTAVYYCAAARGYWRWRLRRYDYWGQGLTVTVSS
A2A - 17	556	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIGNTYMHWFRQAPG

10

20

30

40

【 0 3 1 6 】

【表 1 6 - 2】

		KGLEWVGVINPNYGTTRYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYGSSSFDYWGQGLVTVSS
A2A - 18	557	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFSFGYAMSWVRQAPG KGLEWVSVISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGYPRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 19	558	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSGYAMNWVRQAPG KGLEWVSTISGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGYKRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 20	559	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFAFSNYWMNWVRQAP GKGLEWVGFYPKSGSIKYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCTGLYGDLHWYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 21	560	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGGSISSGGYYWNWVRQ ATGQGLEWGMWMPNSGNRGS AQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSED TAVYYCARDEVAAAGLFDYWGQGLVTVSS
A2A - 22	561	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGYTFTEYITHWVRQAPGK GLEWVGMHPSSGSISYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHEVEYYGPSSS WFA YWGQGLVTVSS
A2A - 23	562	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSTYGMSWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGSTNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGKWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 24	563	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFNIGNTYMHWFRQAPG KGLEWVGVINPNYGTTRYNDS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYGSSSFDYWGQGLVTVSS
A2A - 25	564	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFGNYWMNWVRQAP GKGLEWVGRIDPANGDTKYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAREGDN S NYAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 26	565	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYAMGWVRQAPG KGLEWVSGISGSGASTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGHW RWRRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 27	566	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMA WVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYFAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGYWRWRLW RRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 28	567	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSQAMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGVSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGRWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 29	568	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGYSFTGYDISWVRQAPGK GLEWVARIYPGSGNTYYDD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREDDY GWFYFGVWGQGLVTVSS
A2A - 30	569	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGYRLTGYWIEWVRQAPG KGLEWVGRIDPASGDTTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARHEDPIY YGNVFA YWGQGLVTVSS
A2A - 31	570	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGYLFTDYNMNVVRQAP GKGLEWVGWIYPGTGNTYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTALY YGSSWER YFDVWGQGLVTVSS
A2A - 32	571	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFIDYGMHWVRQAPG KGLEWVGVINPNYGTTRYNDS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQGSNYGGYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 33	572	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFPFSSYAMTWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGRTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGYWRWRLGRRADYWGQGLVTVSS
A2A - 34	573	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFNFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVGVTPGNSD TTYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTGVIIYYGSSDY TLDYWGQGLVTVSS
A2A - 35	574	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSTYGMSWVRQAPG KGLEWVSGISGSGGSTNYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS

10

20

30

40

【 0 3 1 7】

50

【表 1 6 - 3】

		LRAEDTAVYYCAAARGKWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 36	575	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIGNTYMHWFRQAPG KGLEWVGVINPNYGTTRYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYGSSSFYWGQGLVTVSS
A2A - 37	576	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYVHWVRQAPG KGLEWVANINHDSNTYYLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCASSMTRFAYWGQGLVTVSS
A2A - 38	577	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSLTSYNIDWVRQAPGK GLEWVGGVDPETDDTAYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCANYYYGSSAFAYWGQGLVTVSS
A2A - 39	578	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYMSWVRQAPG KGLEWVGDINPNNGGTYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTKAYYSNYGVMYFWGQGLVTVSS
A2A - 40	579	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNFRSYAMSWVRQAPG KGLEWVSVISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARGGWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS
A2A - 41	580	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSLSIYGISWVRQAPGK GLEWVGDISPGSGSTNYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAGPYYYGSSRYAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 42	581	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYNINWVRQAPG KGLEWVATISSGDSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCERDYYGSSWHFDVWGQGLVTVSS
A2A - 43	582	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYDMYWVRQAPG KGLEWVASISDGGSYTYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYIWWYGGSSWSWYFDAWGQGLVTVSS
A2A - 44	583	EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSAYDIYWVRQPTGK GLEWVSAIGTAGDTYYPGSVKGRFIISRESAKNSVYLQMN SLRAEDTAVYYCAVGNWIFDLWGQGLVTVSS
A2A - 45	584	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYSFTGYDISWVRQAPGK GLEWVGEILPGSGGTNYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTSGNYDAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 46	585	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGGYISSNWSWVRQA TGQGLEWMANIEQDGEKENVQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDVAVYYCARGEYSRLWYFDLWGQGLVTVSS
A2A - 47	586	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGTFDYYMKWVRQAPG KGLEWVGEILPGSGGTNYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARPYDYDFDYWGQGLVTVSS
A2A - 48	587	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSSWMHWARQAPG KGLEWVGWLYPRDGSSTEYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCITTVVADWYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 49	588	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFNDDYTNWVRQAPG KGLEWVGNINPNNGAMIYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARKGDGGSYAAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 50	589	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYSFTGYDISWVRQAPGK GLEWVGWIYPKDGSTKYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCITTVVADWYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 51	590	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFNDYYINWVRQAPG KGLEWVGDINPNNGANYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARNYGSSYYALDYWGQGLVTVSS
A2A - 52	591	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFNDDYYINWVRQAPG KGLEWVGDINPNNGGTYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARQGSNYGGYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 53	592	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIDDYMHWRQAPG KGLEWVGMITDTGEPTDADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCVYDYIAMDYWGQGLVTVSS

10

20

30

40

【 0 3 1 8】

50

【表 1 6 - 4】

A2A - 54	593	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDYDMYWVRQAP KGLEWVGRIDPANGDTKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGDYGSSYAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 55	594	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYEFSSSWMNWVRQAPG KGLEWVGWIYPGTGNTNYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCANYYYGSSAFAYWGQGLVTVSS
A2A - 56	595	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLPWVRQAPGK GLEWVGAIDPGTGGTASNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARIYYDYSDYAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 57	596	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSDFYMAWVRQAPG KGLEWVGRIDPEDGDEHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYYGSSYLDYWGQGLVTVSS
A2A - 58	597	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDYMHVVRQAPG KGLEWVGDIINPNNGGTTYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYYGSFHRRWYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 59	598	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDYNIDWVRQAPG KGLEWVGDIININNGGTTYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYHGSSFYWYFDVWGQGLVTVSS
A2A - 60	599	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTFYIHWVRQAPGK GLEWVANINFDGSSTYYLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYDSSYYAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 61	600	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSTYIMSWVRQATG QGLEWMGHIYPGDTDTRYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LRSSEDTAVYYCARGIAVAGTFDYWGQGLVTVSS
A2A - 62	601	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTNYLIEWVRQAPGK GLEWVGDIINPNNGGTTYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCVRHALLWYYYAMDYWGQGLVTVSS
A2A - 63	602	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSDHYMTWVRQAT QGLEWMGMWNPNSGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARVSYSGSLHYWGQGLVTVSS
A2A - 64	603	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFDDYAMHWVRQAT QGLEWMGVINTNTGNPTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARSNWNFYFDYWGQGLVTVSS
A2A - 65	604	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSAFASWMNLVRQAPG KGLEWVGWVDPDNGDTEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCSKPRDSGPFASWGQGLVTVSS
A2A - 66	605	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMYWVRQAPG KGLEWVGWIYPKDGSTKYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSRGYYYGSSYGYDVGQGLVTVSS
A2A - 67	606	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGHITTSYGINWVRQAPGK GLEWVGEILPGSGTSDYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCATNWGFAYWGQGLVTVSS
A2A - 68	607	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSGYTMHWVRQAPG KGLEWVGEIDPSDFANYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDYGSSYEFTYWGQGLVTVSS
A2A - 69	608	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGYISSNWWSWVRQA TGQGLEWMGRIKTKTDGGTIDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAKGYSGSVDYWGQGLVTVSS
A2A - 70	609	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSNIKDYIHWVRQAPG KGLEWVATISDGGSYIFDSDVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDATGTFAYWGQGLVTVSS
A2A - 71	610	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSNWWSWVRQPPG RGLEWIGEIYHSGSTNYNPSLKSRTISVDKPKNQFSLKSSVT AADTAVYYCAREVVSGMIGTVFDYWGQGLVTVSS
A2A - 72	611	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTISTYDIYWVRQATGK

10

20

30

40

【 0 3 1 9 】

【表 1 6 - 5】

		GLEWVSAIGTAGDTYYPDSVRGRFTISREDARNSLYLQMNSLR TGDTAVYYCATGYNWIFDYWGQGLVTVSS
A2A - 73	612	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTYDIYWVRQTTG KGLELVSAIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRENARNSLYLQMNSL RAGDTAVYYCAVGYNWIFDFWGQGLVTVSS
A2A - 74	613	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYDMYWVRQTTG KGLEWVSAIGTAGDTYYPDSVKGRFTISRESAKNSLYLQMNSL RAGDTAVYYCTVGYNWIFDFWGHGILVTVSS
A2A - 75	614	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPG KGLEWIGEYHSGNTNYPNPSLKSRVTMSVDKSKNQFSLNLHSV TAADTAVYYCAREVVSVMIGTIFDYWGQGLVTVSS
A2A - 76	615	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMYWVRQPTG KGLEWVSAIGTAGDTYYSGSVKGRFTISRESAKNSLYLQMNSL RAGDTAVYYCAVGYNWIFDFWGQGLVTVSS
A2A - 77	616	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPG KGLEWIGEYHSGNTNYPNPSLKSRVTMSVDKSKNQFSLNLHSV TAADTAVYYCAREVVSVMIGTIFDYWGQGLVTVSS
A2A - 78	617	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYDIYWVRQPTGK GLEWVSAIGTAGDTYYPGSVKGRFTISRESAKNSVYLQMNSLR AGDTAVYYCAVGYNWVFDLWGQGLVTVSS
A2A - 79	618	QVQLQESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWSWVRQVPG KGLEWVSGITWNGDRSGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCVRDGLTGIFDYWGQGLVTVSS
A2A - 80	619	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISTYDIYWVRQATGK GLEWVSAIGTAGDTYYPGSVKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLR AGDTAVYYCASGYNWIFDYWGQGLVTVSS
A2A - 81	620	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPG KGLEWIGEYHSGNTNYPNPSLKSRVTISVDKSKNQFSLKLGSVT AADTAVYYCAREVVSGLYGTIFDYWGQGLVTVSS
A2A - 82	621	EVQLQQSGPGLVKPSQSLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPG NKLEWMGYISYGGSDYNPSLKNRISITRDSSKNQFFLKLNSVT TEDTATYYCARDYDYFDYWGQGTTLTVSS
A2A - 83	622	EVQRVQSGAELVPGASVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRP GKGLEWIGQIYPGDGDTNYPNGKFEKATLTADKSSSTAYMQL TSLTSDDSAVYYCARGAYWGQGTTLTVSS
A2A - 84	623	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTEYITHWVRQAPGK GLEWVATISGGGSYTNFPDSVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSL RSEDTAMYYCARPNYSGSSPFAIYWGQGLVTVSA
A2A - 85	624	EVQLQQSGPGLVAPSQSLTCTVSGFSLTAYAISWVRQPPGK LEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSISKDNSKQVFLKMNSLQT DDTARYYCARSRYYYGSSYGYFDVWGTGTTVTVSS
A2A - 86	625	EVQLQESGPGGLAKPSQTLPLTCSVIGYSITSDYWNWIRKFPNGK LEYMGYINYSGSTYYNPSLKRISITRDTSKNQYQLNSVTTE DTATYYCTRKLDWDGYFDVWGTGTTVTVSS
A2A - 87	626	EVQLQQSEAEVLRPGAPVKLSCTASGFNIKNTYMHWVKQRPE QGLEWIGRIDPANGNTKYAPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSS LASEDSAVYFCARGSPYGYDGHYVMDYWGQGTSTVTVSS
A2A - 88	627	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISAEGSNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGRGSLPRPKGGFIGALSFWHPFGRWL GSYGTYSSEDSGGAFDIWGQGLVTVSS
A2A - 89	628	QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFNNGMHWVRQAP GKGLEWVAVISYGGSDKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARDGRGSLPRPKGGFIGDLSFWHPFGRWL GKSYGTYSSEDSGGAFDIWGQGLVTVSS

10

20

30

40

【 0 3 2 0 】

【表 17 - 1】

表 18. 可変軽鎖

A2AR バリエーション	配列番号	配列
A2A - 1	629	ELVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQ QRPQQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA EDVGVYYCMQGTHWPRTFGQGTKVDIK
A2A - 2	630	ELTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPG EAAIFIIQEATTLVPGIPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYY FCLQHDFNFPMTYTFGQGTKLEIK
A2A - 3	631	ELVLTQSPDSLAVSLGERATFNCKSSQSVLYSSNNKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKVDIK
A2A - 4	632	ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGGGKVEIK
A2A - 5	633	ELTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPG EAAIFIIQEATTLVPGIPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYY FCLQHDFNFPWTFGQGTKVDIK
A2A - 6	634	ELQMTQSPSSVSASVGDVITICRASQGISSWLAWYQQKPG KGPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFPTISSLQPEDFAT YYCQQTNSFPRTLFGQGTKLEIK
A2A - 7	635	ELTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDVDDDMNWYQQKP GEAAIFIIQEATTLVPGIPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAY YFCLQHDFNFPWTFGQGTRLEIK
A2A - 8	636	DIVMTQAQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTVTNVQSED LAEYFCQRFNNYPLTFGAGTKLEIK
A2A - 9	637	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSATCKASQNVGSSVAWFQQKP GQSPKALIYSTSYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDL AEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIK
A2A - 10	638	DIVMTQAPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHE SPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYY CQNGHSFPLTFGAGTKLEIK
A2A - 11	639	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASRNVGTNVAWYQQKL GQSPKTLIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDL AEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIK
A2A - 12	640	DIQMTQTPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHE SPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYY CQNGHSFPHLFGSGTKLEIK
A2A - 13	641	DIQMIQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFLTIGNVQSEDL VEYFCQQYNIYPLTFGAGTKLEIK
A2A - 14	642	DIVMTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSISNYLHWYQQKSHE SPRLLIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYY CQNGHSFPLTFGGGKLEIK
A2A - 15	643	DIQMTQSPSSLSASVGDVITICRASQSIGRYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYPWTFGGGKLEIK
A2A - 16	644	DIQMTQSPSSLSASVGDVITICRASQSIGTYLNWYQQKPGK APKLLIYGASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSAPWTFGGGKVEIK
A2A - 17	645	DIQMTQSPSSLSASVGDVITICRASQSVRNDVVWYQQKPG KAPKLLIYRGNTLRPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYYGIPLTFGQGTKLEIK

10

20

30

40

【 0 3 2 1 】

【表 1 7 - 2】

A2A - 18	646	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSVTTYLNWYQQKPGK APKLLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQTYYATPWTFGGGKLEIK
A2A - 19	647	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDYLNWYQQKPGK APKLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCEQSYSTPWTFGGGKLEIK
A2A - 20	648	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASHSDYDGDNYMNWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRLTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQ EDFATYYCLQHIEYPFTFGQGTLEIK
A2A - 21	649	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKSSQSVLYSSNNKNYFAWY QQKPGKAPKLLIYDAPNRATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQGYTTPYTFGGGKLEIK
A2A - 22	650	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDIGRSLSWYQQKPGK APKLLIYDASRFISGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQWSNSWPYTFGQGTLEIK
A2A - 23	651	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIGRYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYVTPWTFGGGKLEIK
A2A - 24	652	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVRNDVVWYQQKPG KAPKLLIYRGNTLRPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YQCQYYGIPLTFGQGTLEIK
A2A - 25	653	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSDYDGDSYMNYWYQ QKPGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ EDFATYYCQNGHSFPLTFGQGTLEIK
A2A - 26	654	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQTISRNYLNWYQQKPGK APKLLIYSASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPHTFGGGKLEIK
A2A - 27	655	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIGSYLNWYQQKPGK APKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGYAPRFTFGGGKLEIK
A2A - 28	656	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASRSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPRFTFGGGKLEIK
A2A - 29	657	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKVSDVRTAVAWYQQKPG KAPKLLIYDTSYLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YQCQSYSWSLTFGQGTLEIK
A2A - 30	658	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCGGNDIGSSMYWYQQKPG KAPKLLIYWMSNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQYSTYFPALGQGTLEIK
A2A - 31	659	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIDYLNWYQQKPGK APKLLIYGASPRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQDNIWPYTFGQGTLEIK
A2A - 32	660	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCGGNDIGSSMYWYQQKPG KAPKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YQCQSNEDPPFTFGQGTLEIK
A2A - 33	661	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASESVD SFGNNFMNYWYQ QKPGKAPKLLIYHTSRLNSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ DFATYYCQQNNEVPRTFGQGTLEIK
A2A - 34	662	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASSVYIHWYQQKPGKA PKLLIYAVSRLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CHQSNEDPYTFGQGTLEIK
A2A - 35	663	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIGRYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYVTPWTFGGGKLEIK
A2A - 36	664	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCKASQSVRNDVVWYQQKPG

10

20

30

40

【 0 3 2 2】

50

【表 17 - 3】

		KAPKLLIYRGNLTRPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQYYGIPLTFGQGTKLEIK
A2A - 37	665	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASHVDYDGDNYMNWYQ QKPGKAPKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCLRYASYRTFGQGTKLEIK
A2A - 38	666	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVNSYGNMFMHWYQ QKPGKAPKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCLQYGESPLTFGQGTKLEIK
A2A - 39	667	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKSLHSSGNAYVYWYQ QKPGKAPKLLIYYSKPNNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQHGYGIPLTFGQGTKLEIK
A2A - 40	668	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGTYLNWYQKPGK APKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQTYNTPWTFGGGTKVEIK
A2A - 41	669	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSRVSSSYLYWYQKPG KAPKLLIYATYSLDYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCLOHGERPLTFGQGTKLEIK
A2A - 42	670	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASQSIGTIHWHYQKPGKA PKLLIYDTSYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQGNTRPWTFGQGTKLEIK
A2A - 43	671	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYVPLNWYQKPGK APKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYNSFPLYTFGQGTKLEIK
A2A - 44	672	ELVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPG QAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPITFGQGTKVDIK
A2A - 45	673	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLYSGEKTYPYWYQ QKPGKAPKLLIYWASTRLTGVPFRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQSNEDSWTFGQGTKLEIK
A2A - 46	674	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQDIFNYLEWYQKPGK APKLLIYTASNLDTGVPFRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGYSTPPEITFGGGTKVEIK
A2A - 47	675	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTRNILSNMPWYQKPGK APKLLIYNANTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCLOHWNYPYMFQGTKLEIK
A2A - 48	676	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNNLHWYQKPGK APKLLIYEISGWLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSNSWSLLTFGQGTKLEIK
A2A - 49	677	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQSMSNNLHWYQKPG KAPKLLIYLASNLYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCRQNGHSFPLTFGQGTKLEIK
A2A - 50	678	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNNLHWYQKPGK APKLLIYWASTRLTGVPFRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQWSDYPFTFGQGTKLEIK
A2A - 51	679	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSLSYMHWYQKPGKA PKLLIYGASPRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CRQMSSYPPTFGQGTKLEIK
A2A - 52	680	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQKPGK APKLLIYEISGWLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLRYASYRTFGQGTKLEIK
A2A - 53	681	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNMGSNVAWYQKPG KAPKLLIYASHRSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQWNYPRITFGQGTKLEIK
A2A - 54	682	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNGGTNVDWYQKPG KAPKLLIYEISGWLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT

10

20

30

40

【 0 3 2 3 】

50

【表 1 7 - 4】

		YYCQHYYSWPPTFGQGTKLEIK
A2A - 55	683	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYVPLNWWYQQKPGK APKLLIYLASYRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQINGWPYTFGQGTKLEIK
A2A - 56	684	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNMGSNVAWYQQKPG KAPKLLIYAATRLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCRQHYSPPFTFGQGTKLEIK
A2A - 57	685	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNGGTINVDWYQQKPG KAPKLLIYVASNQGTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYYTYPLTFGQGTKLEIK
A2A - 58	686	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQGVDTNVAWYQQKPG KAPKLLIYSSISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CAQNRELPTFGQGTKLEIK
A2A - 59	687	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAITWYQQKPGK APKLLIYSASKRNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLHHYGTPTYTFGQGTKLEIK
A2A - 60	688	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSAWYQQKPG KAPKLLIYPASVRSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQGSSNPLTFGQGTKLEIK
A2A - 61	689	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIDDINWYQQKPGK APKLLIYLSNRAPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCHQSYTTPHTFGGGTKVEIK
A2A - 62	690	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLTWYQQKPGK APKLLIYSASHRSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQWDDNNPYTFGQGTKLEIK
A2A - 63	691	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISRVLNWWYQQKPGK APKLLIYKASSLERGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCLQPNSSYPWTFGGGKVEIK
A2A - 64	692	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLDWYQQKPGK APKLLIYTPFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQHYDDLPLTFGGGKVEIK
A2A - 65	693	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNMGSNVAWYQQKPG KAPKLLIYEASTRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQQYSSYPLRFGQGTKLEIK
A2A - 66	694	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQILGYLNWYQQKPGK APKLLIYSTSNLLGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCRQLSSNPLTFGQGTKLEIK
A2A - 67	695	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMSWYQQ KPGKAPKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQINSWPLTFGQGTKLEIK
A2A - 68	696	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQLL YSGEKTYPYWYQ QKPGKAPKLLIYEASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQWSSYPPLAFGQGTKLEIK
A2A - 69	697	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLRHDLGWYQQKPG KAPKLLIYWASNRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYCQKYSSPTYTFGGGKVEIK
A2A - 70	698	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASESVSVAGTSLHWWYQQ KPGKAPKLLIYAASNRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQHWSSPPLTFGQGTKLEIK
A2A - 71	699	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISNYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQYSYSTPLTFGGGKVEIK
A2A - 72	700	ELTLTQSPATLSVSPGERATLSRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYSSPPTFGQGTRLEIK

10

20

30

40

【 0 3 2 4】

【表 17 - 5】

A2A - 73	701	ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSSPLTFGGGKVDIK	
A2A - 74	702	ELVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEADVA VYYCQQYYSTPLTFGGGKVEIK	
A2A - 75	703	ELVMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQANSFPITFGQGTRLEIK	
A2A - 76	704	ELVMTQSPATLSVSLGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISRLLGPEDFA VYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIK	10
A2A - 77	705	ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRISYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSRVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPLTFGGGKLETK	
A2A - 78	706	ELTLTQSPATLSLSPGERATLSCRAIQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPLTFGGGTRLEIK	
A2A - 79	707	ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVY YCQQYGNSTYFGQGKVDIK	
A2A - 80	708	ELTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGTPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYGSSPITFGQGTRLEIK	20
A2A - 81	709	ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQSYSTPITFGGGKLEIK	20
A2A - 82	710	DIVITQAPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPG QSPKLLIYASNRYTGVDPDRFSGSGYGTDFITISTVQAEDLA VYFCQQDYRSPLTFGAGTKLELK	
A2A - 83	711	DIQMKQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKP GQSPKALIYSASYRYSVDPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSGDL AEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIK	
A2A - 84	712	DIVMTQAPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGS SPRFLIYDTSNLAGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAT YYCQQWNSNPLTFSAGTKLEIK	
A2A - 85	713	DIVMTQSPATLSVTPGDRVLSLSCRASQSIDYLNWYQQKSHE SPRLLIKYASQSIGPSRFSGSGSGTDFLTISNSVEPEDVGVY YCQNGHSFPLTFGAGTKLELK	30
A2A - 86	714	DIKITQSPSSLSASLGDITITITCHASQNNVWLNRYQQKPGNIP KLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDIATYYC QQGQSYPLTFGAGTKLEIK	
A2A - 87	715	DIQMNQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQQKP GQSPKALIYSASYRYSVDPDRFTGSGSGTDFPTISNVQSEDL AEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELK	
A2A - 88	716	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSISSNIGNNYVSWYQQLPGT APKLLIYDNNKRASGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEAD YYCGTWDTSLSAGVFGGGTKLTVL	
A2A - 89	717	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNHYVSWYQQLPG TAPKLLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEA DYCGTWDASLSTWVFGGGTKLTVL	40

## 【0325】

実施例 23 . A2A - 77 および A2A - 81 のインビボ細胞分析

## 【0326】

細胞結合アッセイ

## 【0327】

A2A - 77 および A2A - 81 を、100 nM から滴定した濃度での結合について評価した。得られた曲線は図 33A に示し、結果は表 19 に示す。結合曲線は、IgG 濃度対 MFI (平均蛍光強度) でプロットされる。A2A - 77 および A2A - 81 の両方は、hA2a 受容体に対する高親和性結合剤であった。

【 0 3 2 8 】

【 表 1 8 】

表 1 9 .

	A2A-77	A2A-81	対照 A2A
IC50	6.436	6.813	8.723

【 0 3 2 9 】

A 2 A アンタゴニスト c A M P アッセイ

【 0 3 3 0 】

免疫グロブリンを3連で滴定し、細胞上で1時間インキュベートした後、0.5 μMのNECAと30分間インキュベートした。665 nm / 615 nmの相対蛍光単位(RFU)比対nM IgGを対数スケールで示す結合曲線を図33Bに示す。絶対IC50を表20に示し、これはA2A-77およびA2A-81がインビトロで機能的アゴニストであったことを示す。

【 0 3 3 1 】

【 表 1 9 】

表 2 0 .

	A2A-77	A2A-81
IC50	3.53	8.67

【 0 3 3 2 】

交差反応性

【 0 3 3 3 】

A2A-77およびA2A-81を、HA1、hA2b、hA3、およびmA2受容体との交差反応性についてアッセイした。結果を図33Cに示す。A2A-77およびA2A-81の両方は、インビトロ特異性を示した。

【 0 3 3 4 】

初代T細胞活性化アッセイ

【 0 3 3 5 】

上に記載されるように、初代T細胞活性化アッセイを実施した。データを図33Dおよび表21に示す。T細胞活性化を、バリエーションA2A-77およびA2A-81で観察した。A2A-81はA2A-77よりも改善された活性を示した。

【 0 3 3 6 】

【 表 2 0 】

表 2 1 .

	A2A-77	A2A-81
EC50	5.92	1.71

【 0 3 3 7 】

実施例 2 4 . 結腸癌モデルにおけるインビボ研究

【 0 3 3 8 】

ヒト結腸癌(Colo205)を有するマウスを4つの群に分けた。群1はアイソタイプ対照であり、群2のマウスは抗PD1で処置し、群3のマウスはバリエーションA2A-77で処置し、群4のマウスはバリエーションA2A-81で処置した。腫瘍体積を30日間にわたって測定した。結果を図34A~図34Dに示す。バリエーションA2A-81の腫瘍サ

10

20

30

40

50

イズは、バリエント A 2 A - 7 7 または抗 P D - 1 抗体よりも良好に退縮した。

【 0 3 3 9 】

さらなる試験を、10 mg / kg のバリエント A 2 A - 5 1 ( 群 5 )、A 2 A - 2 8 ( 群 6 )、A b 7 / P D 1 T A O 1 5 ( 群 7 )、および A Z D 4 6 3 5 ( 群 8 ) で処置したマウスを用いて実施した。また、マウスは図 3 4 E のスケジュールに従って 2 0 mg / kg で処置した。データを図 3 4 F ~ 図 3 4 K に示す。

【 0 3 4 0 】

データは、A 2 A - 7 7 および A 2 A - 5 1 が腫瘍体積を縮小する能力を示し、P D 1 T A O 1 5 がコンパレータ-抗 P D 1 抗体に対して同様の結果を示したことを示す。単回処置または抗 P D 1 抗体処置と比較して、併用処置において差異は観察されなかった。図 3 5 K を参照されたい。

10

【 0 3 4 1 】

リンパ系および骨髄系の両方の区画における腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) をそれぞれの処置群で測定した。結果を図 3 5 A ~ 図 3 5 M に示す。T I L C D 8 + 細胞は、A 2 A - 8 1 バリエントよりも A 2 A - 7 7 バリエントで処置した群においてより多く増加した。T I L - M 1 腫瘍関連マクロファージは、A 2 A - 7 7 バリエントよりも A 2 A - 8 1 バリエントにおいてより多く増加した。

【 0 3 4 2 】

末梢血の溶解された全血 ( L W B ) の細胞プロファイルを、中間試料および最終試料において測定した。結果を、図 3 6 A ~ 図 3 6 C、図 3 7 A ~ 図 3 7 G、および図 3 8 A ~ 図 3 8 G に描く。T 細胞活性化後の末梢血中のサイトカインレベルは図 3 9 に描かれる。末端血清中のサイトカインレベルの結果は図 4 0 A ~ 図 4 0 G に描かれる。

20

【 0 3 4 3 】

末梢血の溶解された全血 ( L W B ) の細胞プロファイルを、中間試料および最終試料において測定した。結果を、図 4 1 A ~ 図 4 1 C、図 4 2 A ~ 図 4 2 G、および図 4 3 A ~ 図 4 3 G に描く。最終血清試料中のサイトカインレベルの結果は図 4 4 A ~ 図 4 4 G に描かれる。

【 0 3 4 4 】

実施例 2 5 . A 2 b R 細胞機能的 c A M P アッセイ

【 0 3 4 5 】

交差反応性

30

【 0 3 4 6 】

H E K 2 9 3 T 細胞における特異性について評価した A 2 b 交差結合剤を、交差反応性についてアッセイした。結果を図 4 5 および表 2 2 に表す。

【 0 3 4 7 】

40

50

## 【表 2 1】

## 表 2 2.

wA2a アンタゴニスト (一次スクリーニング)	A2a アンタゴニスト (絞込みリード(narrow down leads) )	
機能的 PE アンタゴニスト cAMP	機能的 DiscoverX cAMP	交差反応 hA1, A2b,A3
A2A-17, A2A-19	A2A-19	A2A-17, A2A-19
A2A-24, A2A-26, A2A-27,	A2A-24, A2A-26, A2A-27	A2A-26, A2A-27
A2A-35, A2A-36, A2A-37	A2A-37	A2A-35, A2A-37
A2A-51, A2A-52, A2A-53	A2A-51, A2A-53	
A2A-74, A2A-75	A2A-75	
A2A-77, A2A-78, A2A-81	A2A-78, A2A-81	
A2A-83, A2A-84	A2A-83, A2A-84	A2A-83

10

20

## 【 0 3 4 8 】

図 4 6 は、選択された A 2 b 抗体に対して実施した機能的 c A M P アッセイを表す。C H O - K 1 細胞を A 2 b 抗体とインキュベートした。次に、細胞を N E C A を使用して刺激した。A 2 b の活性化を、細胞株中の 3 ' - 5 ' - 環状アデノシンーリン酸 ( c A M P ) 産生に基づいてモニタリングした。

## 【 0 3 4 9 】

機能的アロステリック c A M P アッセイを実施した。細胞を、1 0 0 n M の抗 A 2 A - 1 7、A 2 A - 1 9、A 2 A - 2 6、A 2 A - 2 7、A 2 A - 3 5、A 2 A - 3 6、A 2 A - 8 3、および A 2 A - 8 4 とプレインキュベートした後、3 0 0 n M から 3 × 滴定で N E C A 刺激を行った。結果を図 4 7 A に表す。

30

## 【 0 3 5 0 】

機能的アンタゴニスト c A M P アッセイを実施した。最初に、細胞を、1 0 0 n M から開始した 3 × 滴定で A 2 A - 1 7、A 2 A - 1 9、A 2 A - 2 6、A 2 A - 2 7、A 2 A - 3 5、A 2 A - 3 6、および A 2 A - 8 3 とプレインキュベートした。次に、1 0 n M の濃度での N E C A 刺激を実施した。結果を図 4 7 B ~ 図 4 7 C に表す。

## 【 0 3 5 1 】

高レベルの I g C および低リガンドレベルでのアンタゴニスト c A M P アッセイを実施した。細胞を、1 0 0 0 n M から開始した 3 × 滴定で A 2 A - 1 7、A 2 A - 1 9、A 2 A - 2 6、A 2 A - 2 7、A 2 A - 3 5、A 2 A - 3 6、A 2 A - 8 3、および A 2 A - 7 2 とプレインキュベートした。次に、N E C A 刺激を 5 n M 濃度で実施した。結果を図 4 7 D に表す。A 2 A - 2 7 は、A 2 b と架橋する A 2 a アンタゴニストである一方で、A 2 b アンタゴニストでもある特性を示した。A 2 b の特性を表 2 3 に表す。

40

## 【 0 3 5 2 】

50

【表 2 2】

表 2 3.

交差反 応性 hA1, A2b, A3	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A2A-27 (合金)	GFTFSSY	SGSGGS	ARGYWRWR LWRRYDY	RASQSIG SYLN	GASNLQS	QQGYSAPRT

【 0 3 5 3 】

実施例 2 6 . I g G 1 および I g G 4 再フォーマットの A 2 A R 抗体

10

【 0 3 5 4 】

抗体を、I g G 1 または I g G 4 のいずれかへと再フォーマットした。その後、再フォーマットされた抗体を、初代 T 細胞活性化アッセイ中でアッセイし、サイトカイン放出を測定した。データを図 4 8 A ~ 図 4 8 E に示す。データに見られるように、リードを I g G 4 に再フォーマットした後、I g G 4 は I g G 1 よりも良好な T 細胞活性化活性を有している。

【 0 3 5 5 】

実施例 2 7 . 結腸癌モデルにおけるインビボ研究

【 0 3 5 6 】

ヒト結腸癌 ( H u C D 3 4 N C G - C o l o 2 0 5 ) を有するマウスを 2 つのセットに分け、セット 1 は 8 つの群に分けて、セット 2 は 6 つの群に分けた。セット 1 では、群 1 はアイソタイプ対照であり、群 2 のマウスは抗 P D 1 で処置し、群 3 のマウスはバリエーション A b 3 で処置し、群 4 のマウスはバリエーション A b 4 で処置し、群 5 のマウスはバリエーション A b 5 で処置し、群 6 のマウスはバリエーション A b 6 で処置し、群 7 のマウスはバリエーション A b 7 で処置し、群 8 のマウスは A Z D 4 6 3 5 で処置した。セット 1 中の各群には、群 8 を除いて Q 3 D x 6 スケジュールで 1 0 m g / k g の用量を投与し、1 日 2 回のスケジュールで 5 0 m g / k g を投与した。セット 2 では、群 1 はアイソタイプ対照であり、群 2 のマウスは抗 P D 1 で処置し、群 3 のマウスは A b 4 で処置し、群 4 のマウスは A b 4 + 抗 P D 1 で処置し、群 5 のマウスは A B 7 で処置し、群 6 マウスは A B 4 + A b 7 で処置した。セット 2 中の各群には、Q 3 D x 6 スケジュールで 2 0 m g / k g の全用量を投与した。腫瘍体積を 3 0 日間にわたって測定した。

20

30

【 0 3 5 7 】

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ことが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。

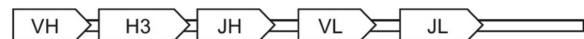
40

【 図面 】

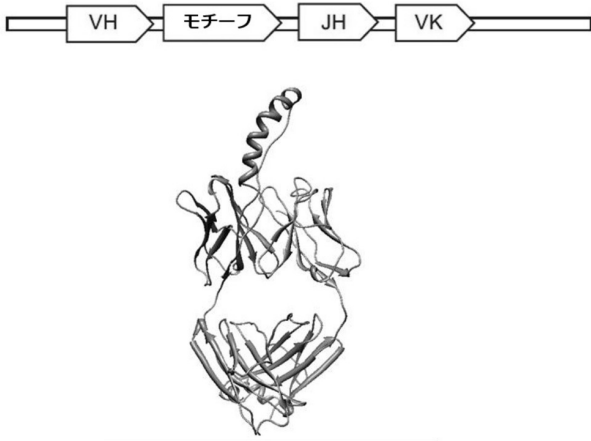
【 図 1 A 】



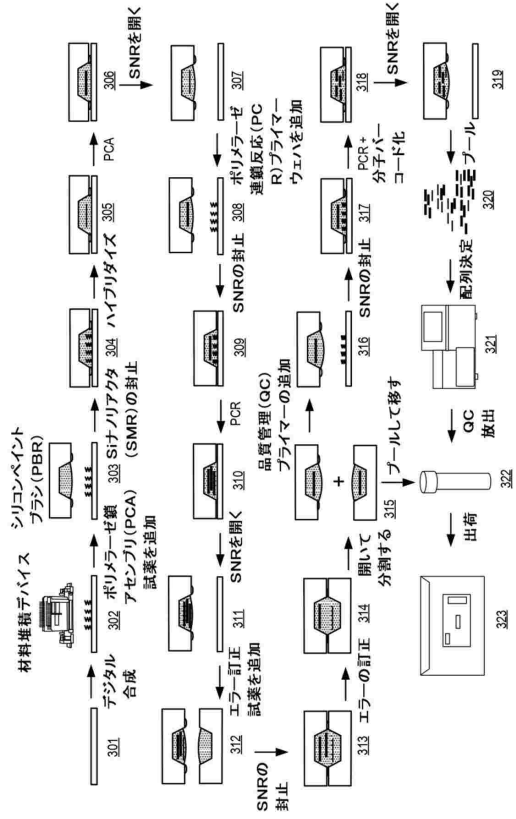
【 図 1 B 】



【 図 2 】



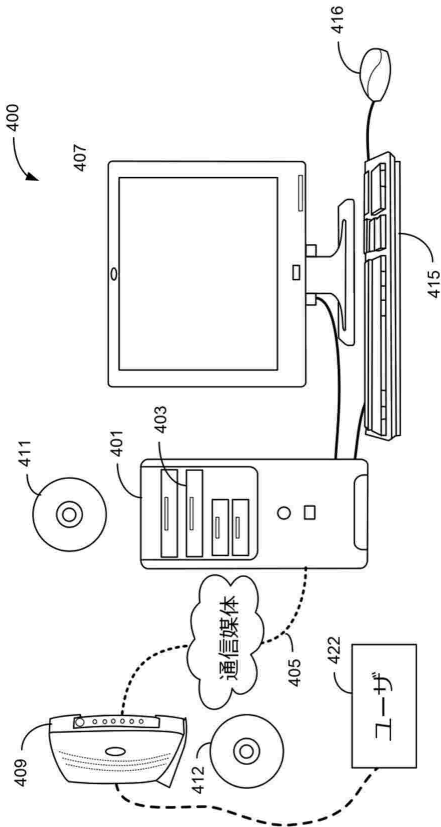
【 図 3 】



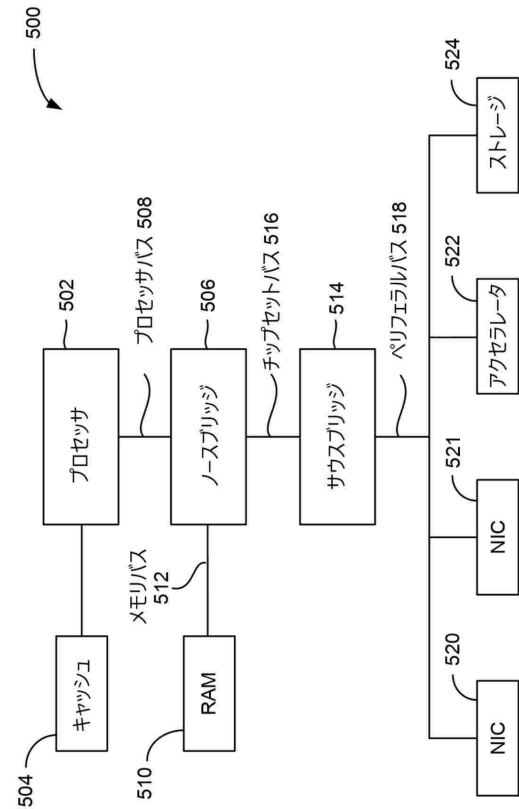
10

20

【 図 4 】



【 図 5 】

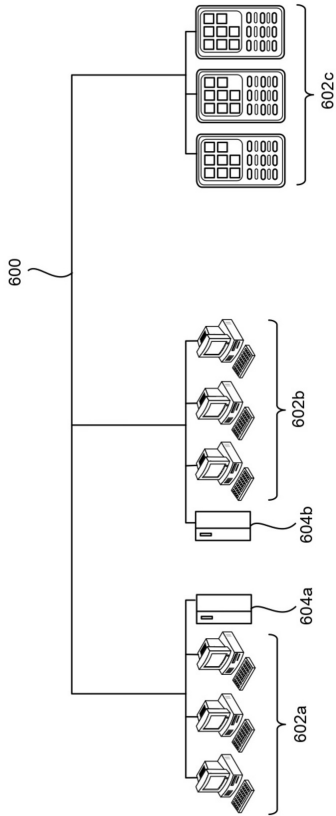


30

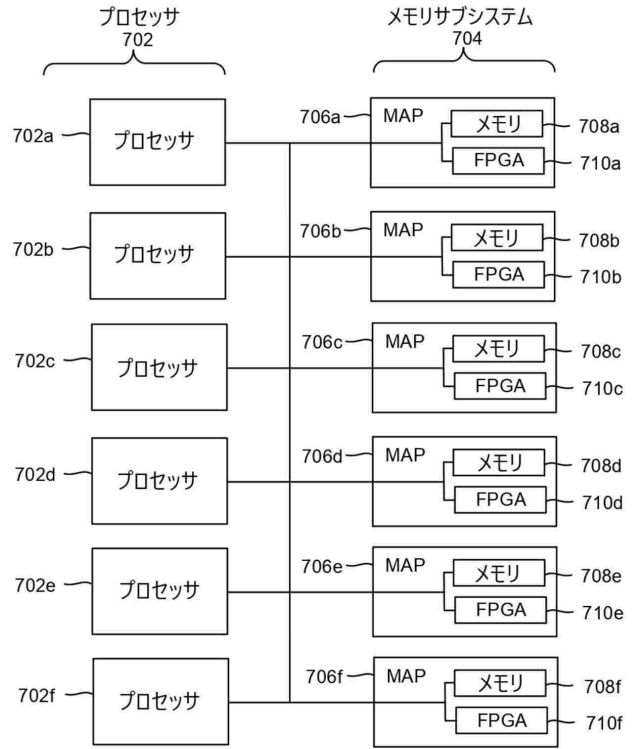
40

50

【 図 6 】



【 図 7 】



10

20

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

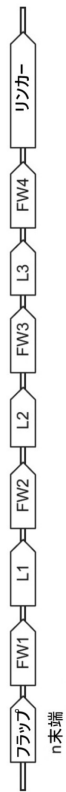


30

40

50

【 図 8 C 】



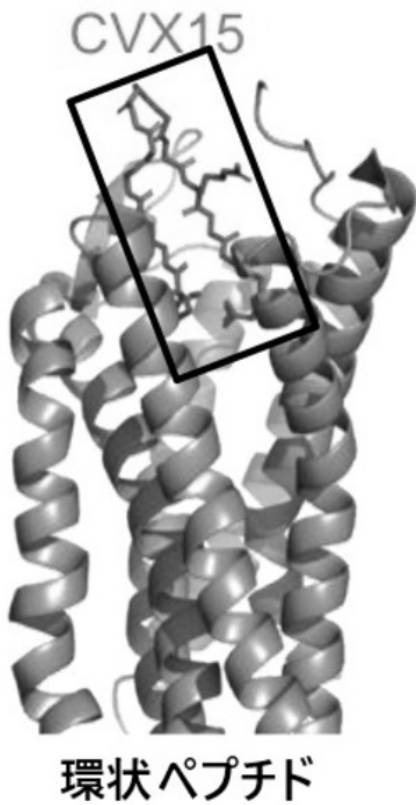
【 図 9 A 】



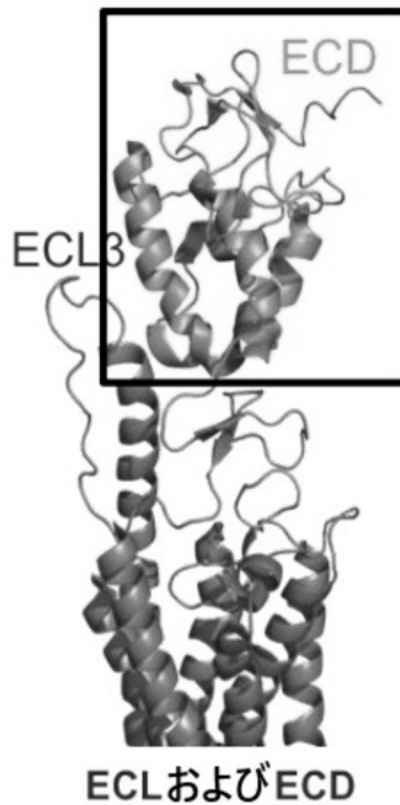
10

20

【 図 9 B 】



【 図 9 C 】

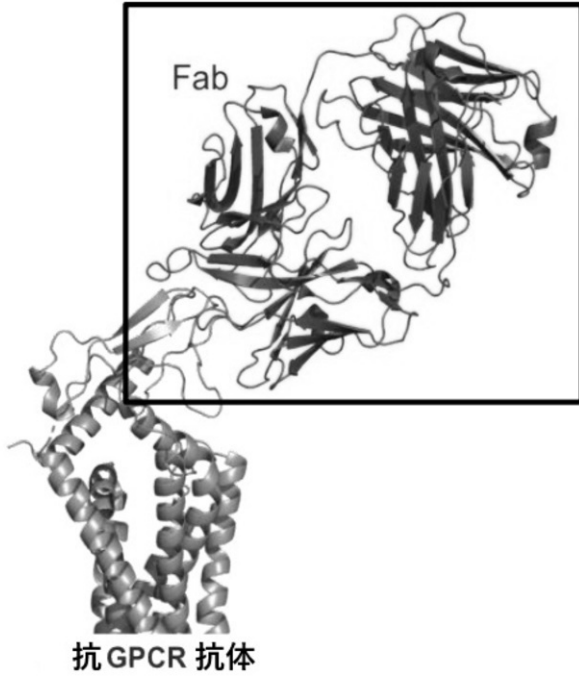


30

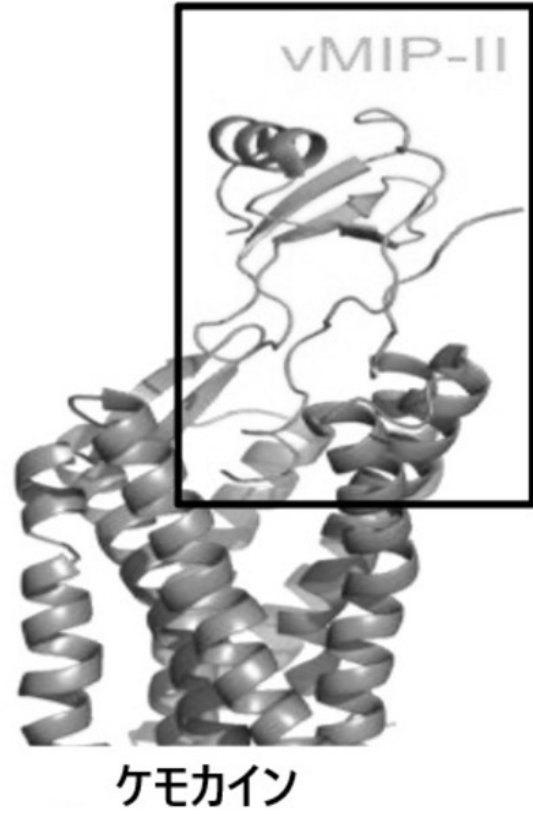
40

50

【 図 9 D 】



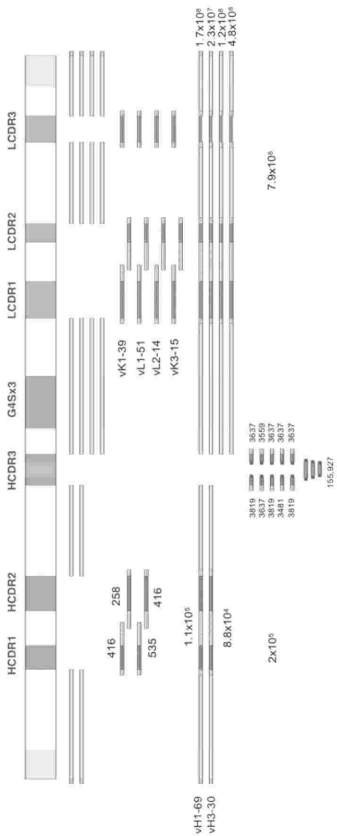
【 図 9 E 】



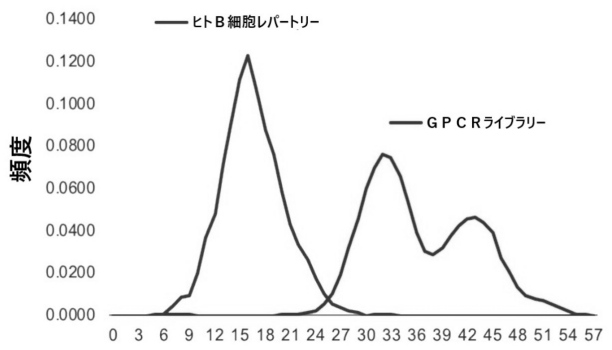
10

20

【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



30

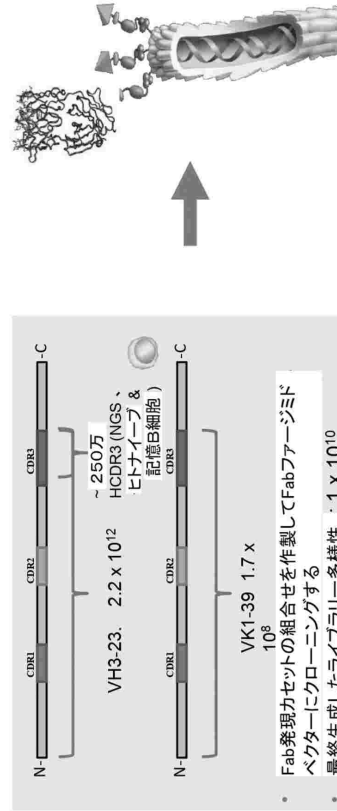
40

50

【 図 1 2 】

クローン	ELISA	ライブラリー	ProA (mg/ml)	K <sub>d</sub> (nM)
TB31-1	5.7	VHH hShuffle	0.29	12
TB31-6	9.6	VHH hShuffle	0.29	14
TB31-26	5.1	VHH hShuffle	0.31	19
TB30-30	8.0	VHH Shuffle	0.11	23
TB31-32	8.0	VHH hShuffle	0.25	27
TB29-10	5.0	VHH Ratio	0.19	32
TB29-7	7.3	VHH Ratio	0.28	41
TB30-43	13.5	VHH Shuffle	0.18	44
TB31-8	12.7	VHH hShuffle	0.29	45
TB31-56	11.7	VHH hShuffle	0.26	46
TB30-52	4.2	VHH Shuffle	0.22	49
TB31-47	8.8	VHH hShuffle	0.23	53
TB30-15	9.3	VHH Shuffle	0.26	55
TB30-54	5.5	VHH Shuffle	0.30	58
TB30-49	10.3	VHH Shuffle	0.26	62
TB29-22	3.4	VHH Ratio	0.27	65
TB29-30	9.2	VHH Ratio	0.28	65
TB31-35	5.7	VHH hShuffle	0.24	66
TB29-1	10.4	VHH Ratio	0.09	68
TB29-6	6.8	VHH Ratio	0.29	69
TB31-34	6.0	VHH hShuffle	0.32	70
TB29-12	6.2	VHH Ratio	0.23	70
TB30-1	5.4	VHH Shuffle	0.39	71
TB29-33	3.9	VHH Ratio	0.15	74
TB30-20	4.6	VHH Shuffle	0.19	74
TB31-20	6.6	VHH hShuffle	0.37	74
TB31-24	3.1	VHH hShuffle	0.15	75
TB30-14	9.9	VHH Shuffle	0.19	75
TB30-53	7.6	VHH Shuffle	0.24	78
TB31-39	9.9	VHH hShuffle	0.32	78
TB29-18	10.9	VHH Ratio	0.19	78
TB30-9	8.0	VHH Shuffle	0.40	79
TB29-34	8.6	VHH Ratio	0.21	80
TB29-27	8.6	VHH Ratio	0.18	82
TB29-20	5.9	VHH Ratio	0.26	83
TB30-55	6.0	VHH Shuffle	0.41	85
TB30-39	6.1	VHH Shuffle	0.07	88
TB31-15	6.2	VHH hShuffle	0.32	88
TB29-21	4.3	VHH Ratio	0.23	88
TB29-37	5.3	VHH Ratio	0.26	89
TB29-40	6.6	VHH Ratio	0.31	90
TB31-30	3.2	VHH hShuffle	0.33	93
TB31-10	12.2	VHH hShuffle	0.31	94
TB29-3	13.6	VHH Ratio	0.11	94
TB30-57	5.2	VHH Shuffle	0.24	95
TB29-31	4.4	VHH Ratio	0.18	96
TB31-27	8.1	VHH hShuffle	0.31	96
TB31-33	6.0	VHH hShuffle	0.32	96
TB30-40	7.1	VHH hShuffle	0.21	99
TB31-18	4.1	VHH hShuffle	0.36	99
TB30-5	9.3	VHH Shuffle	0.05	100

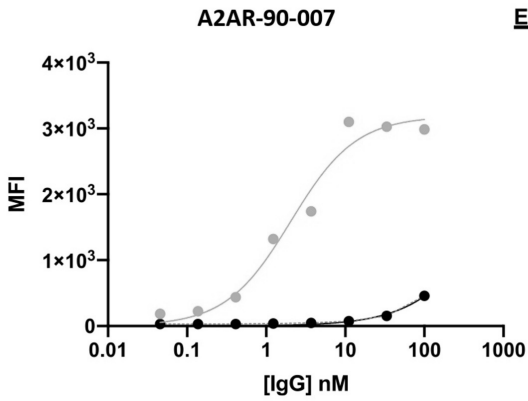
【 図 1 3 】



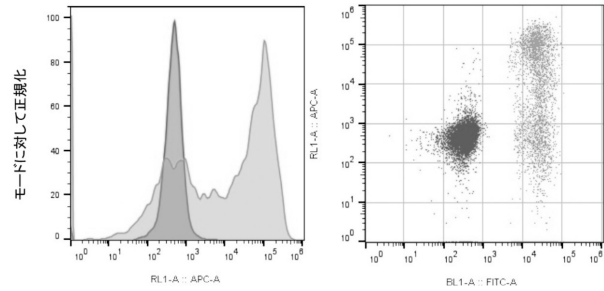
10

20

【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】

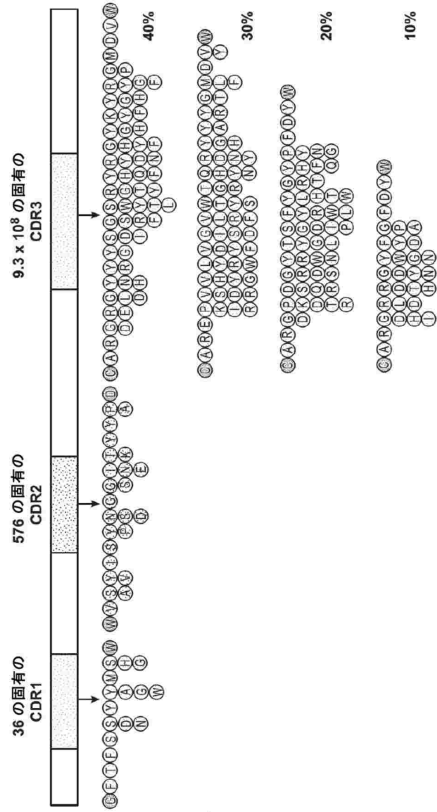


30

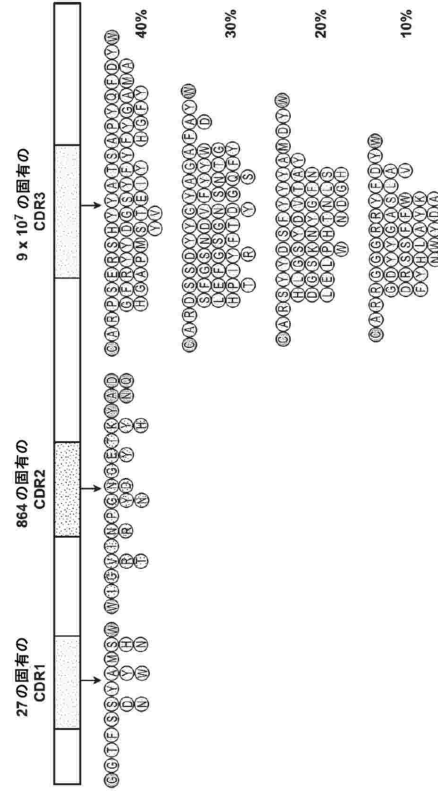
40

50

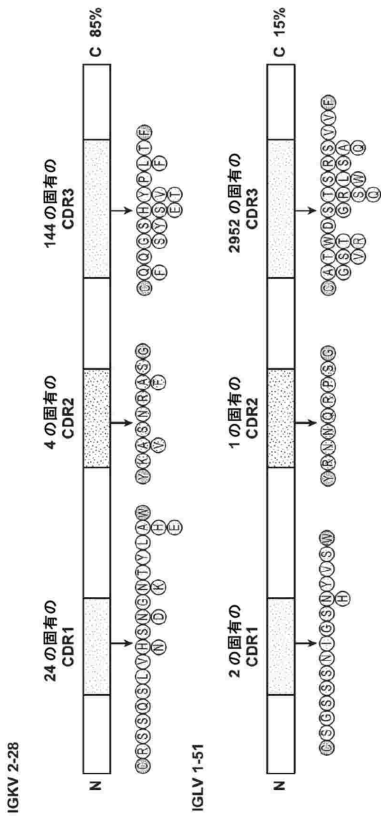
【 図 1 5 A 】



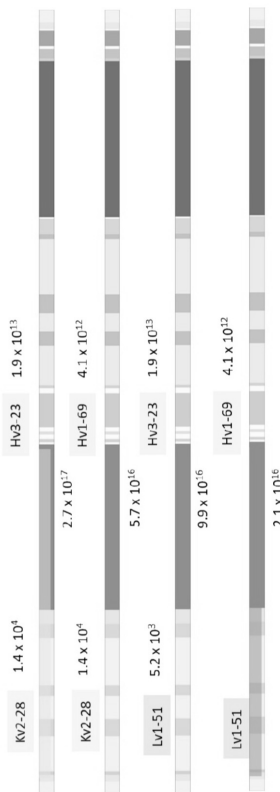
【 図 1 5 B 】



【 図 1 5 C 】



【 図 1 5 D 】



10

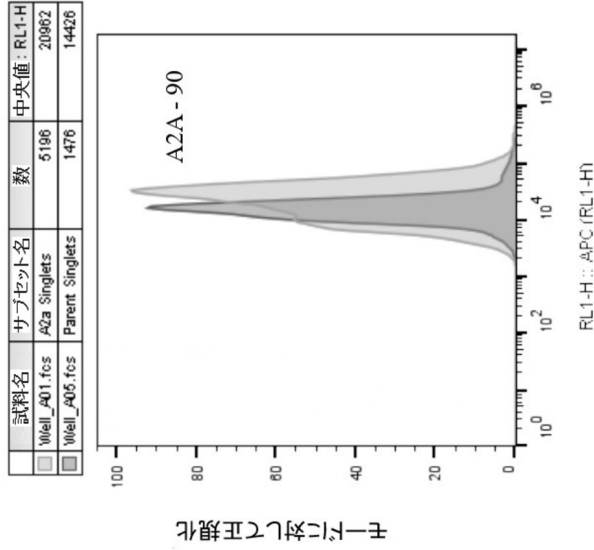
20

30

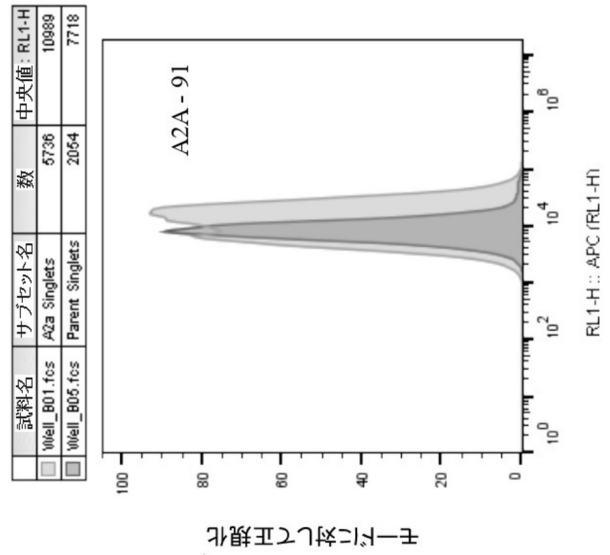
40

50

【 図 1 6 A 】

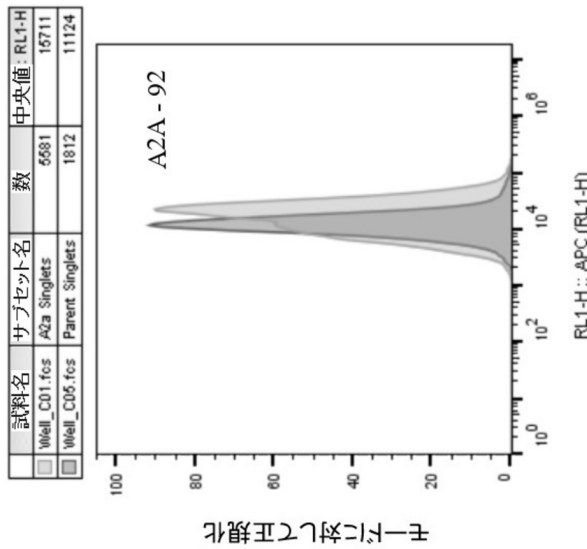


【 図 1 6 B 】

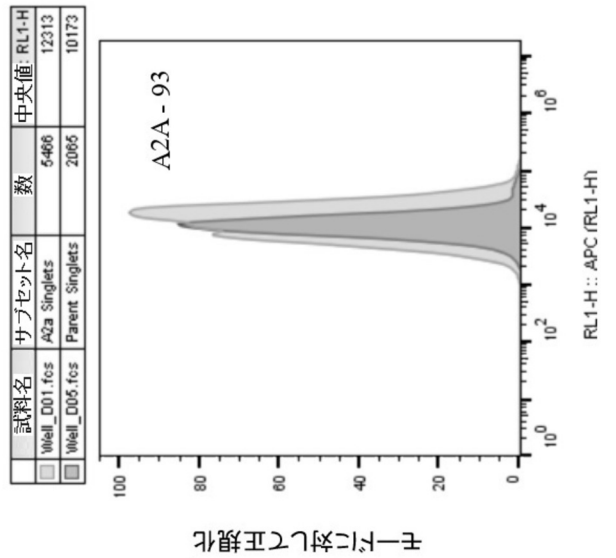


10

【 図 1 6 C 】



【 図 1 6 D 】



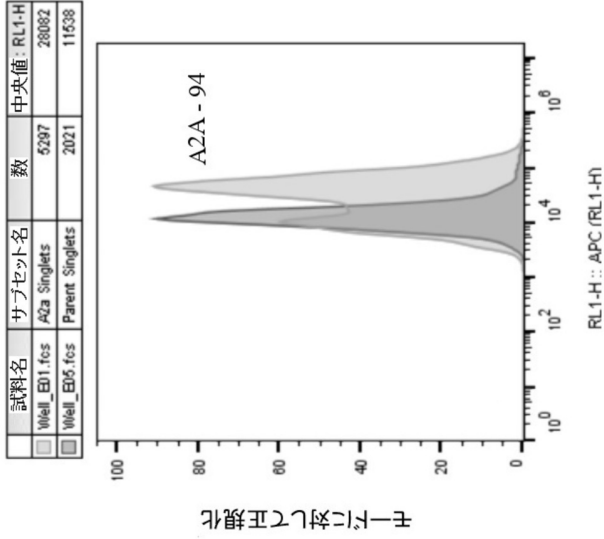
20

30

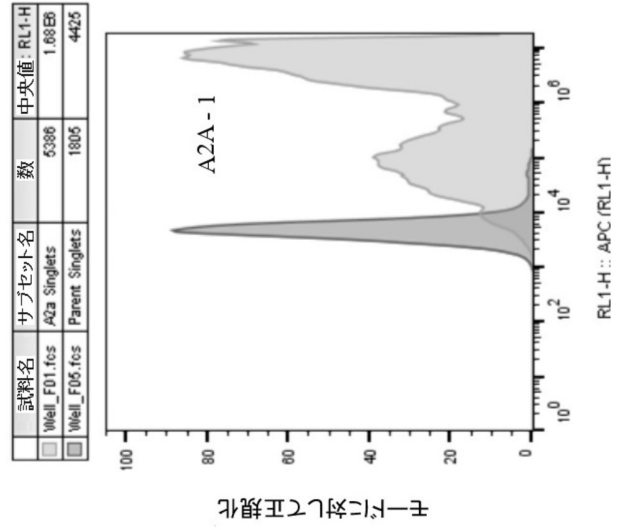
40

50

【 図 1 6 E 】

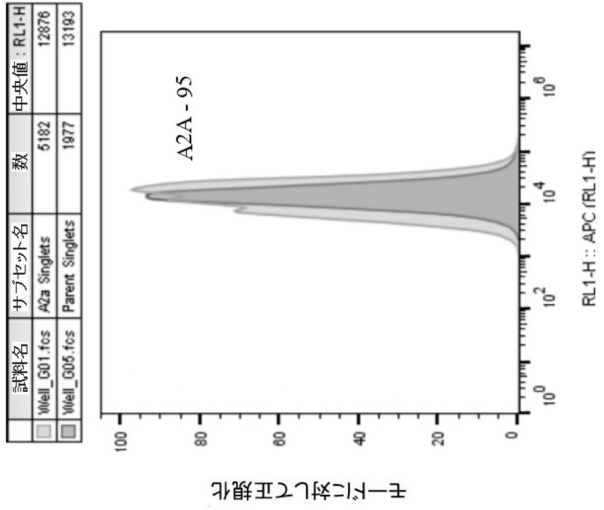


【 図 1 6 F 】

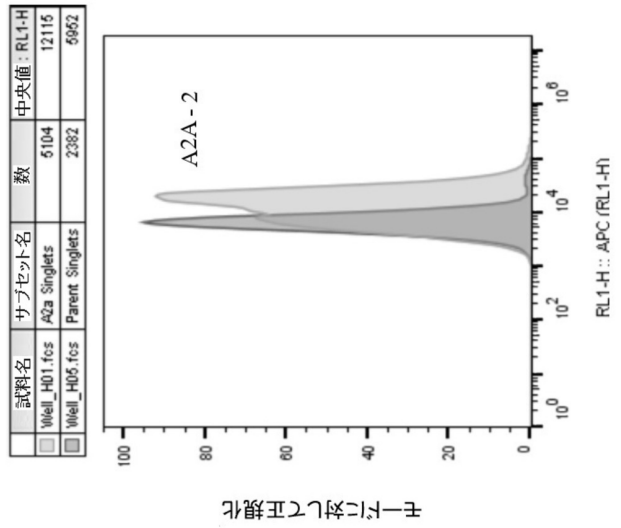


10

【 図 1 6 G 】



【 図 1 6 H 】



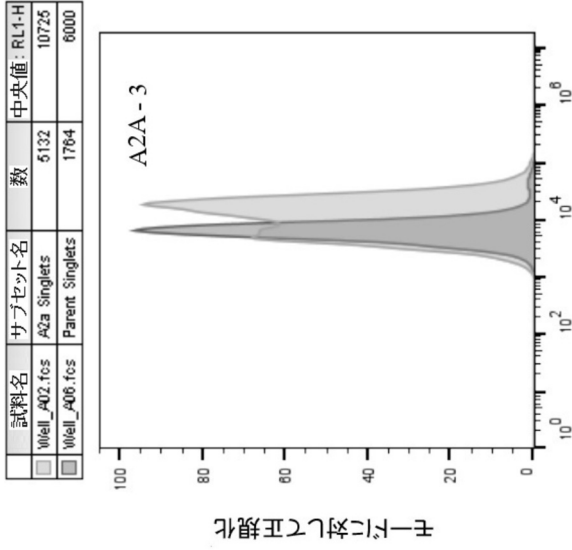
20

30

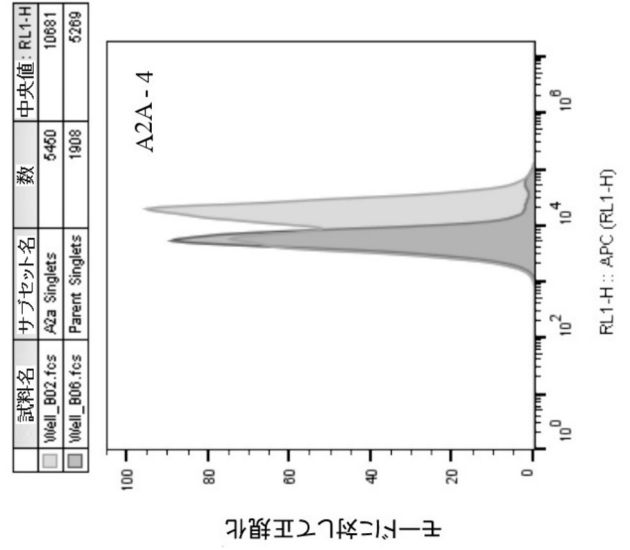
40

50

【 図 1 6 I 】

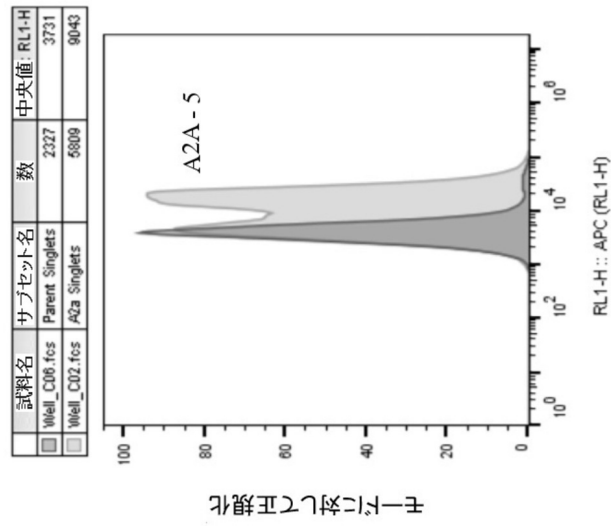


【 図 1 6 J 】

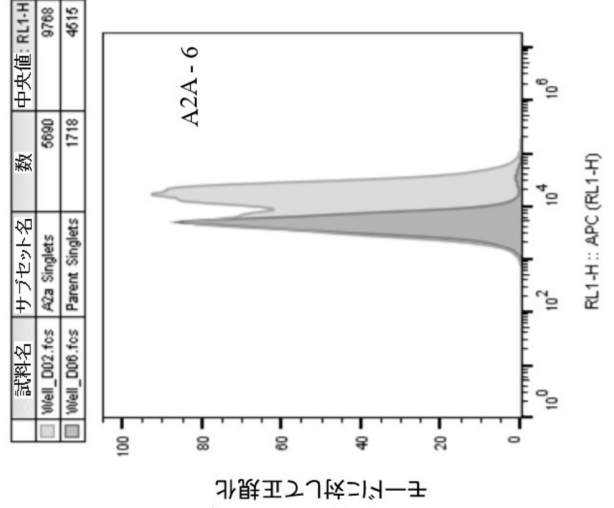


10

【 図 1 6 K 】



【 図 1 6 L 】



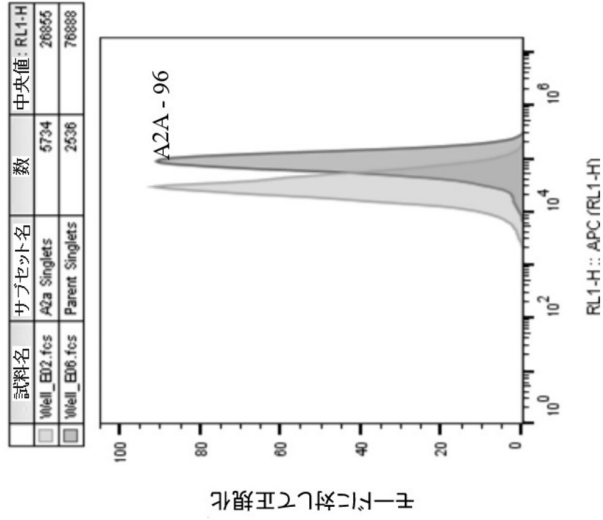
20

30

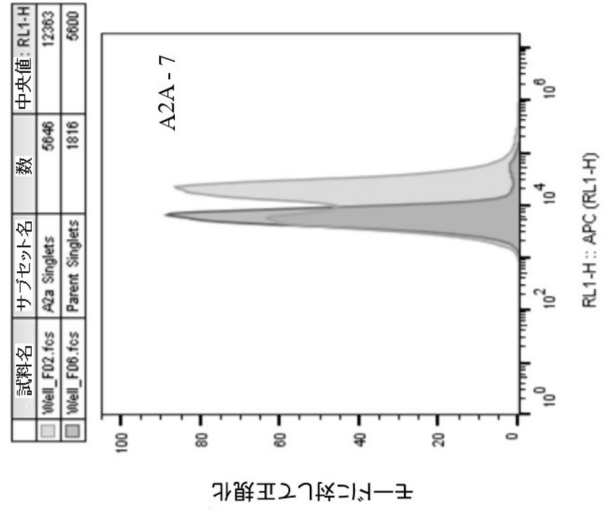
40

50

【 図 1 6 M 】

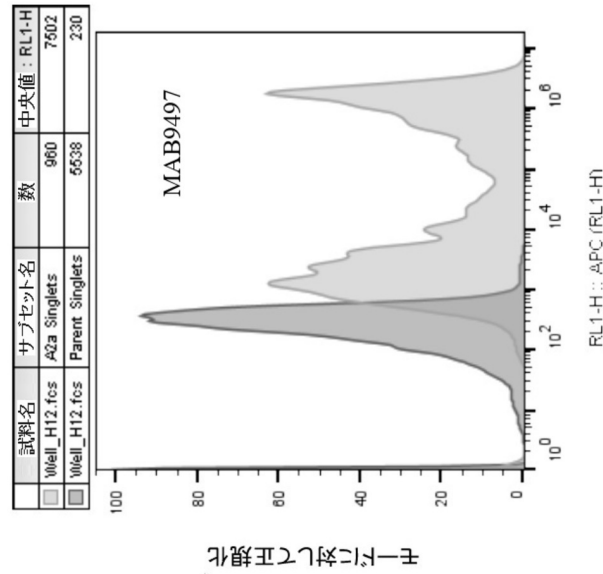


【 図 1 6 N 】

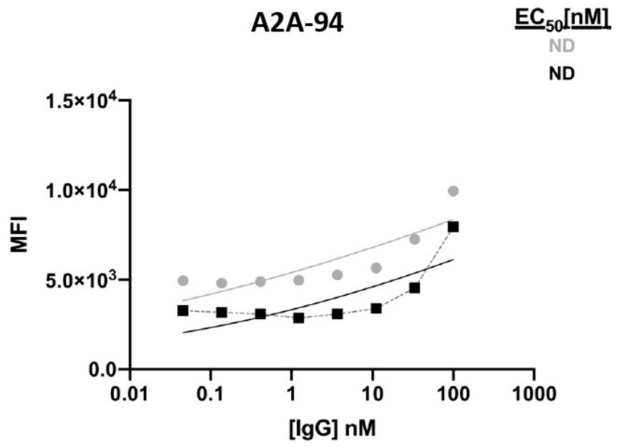


10

【 図 1 6 O 】



【 図 1 7 A 】



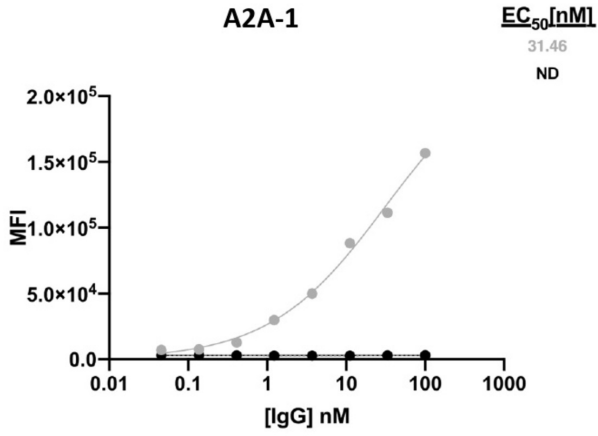
20

30

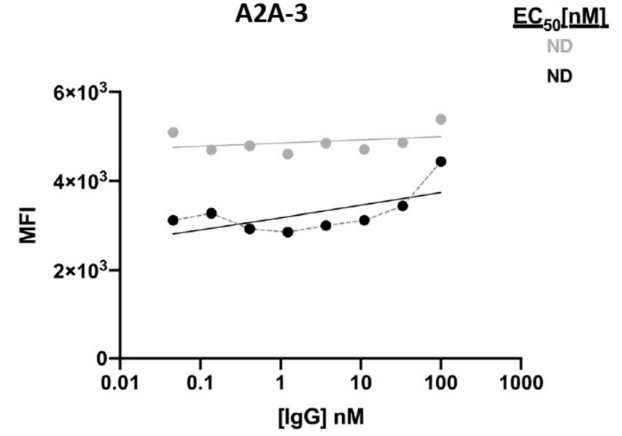
40

50

【 17 B 】

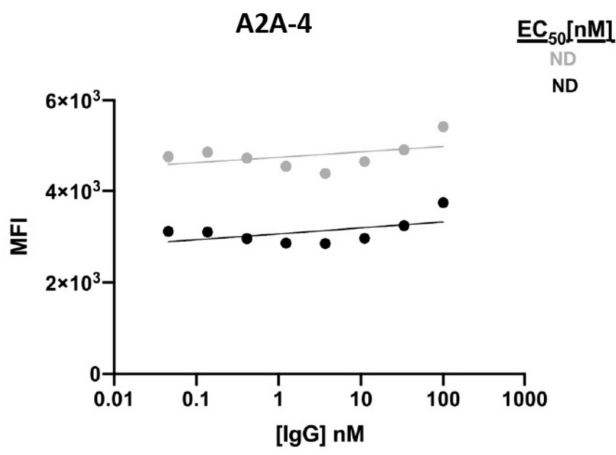


【 17 C 】

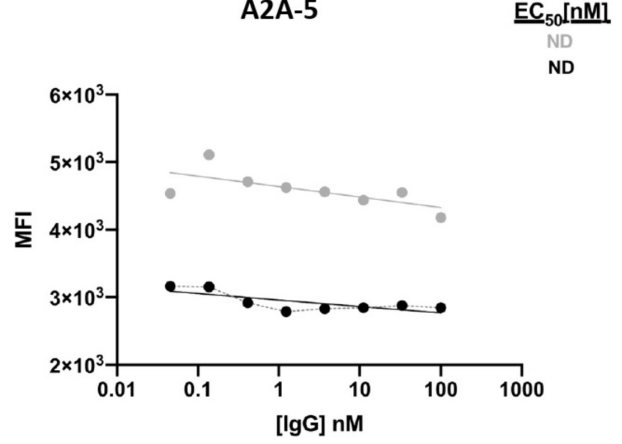


10

【 17 D 】



【 17 E 】



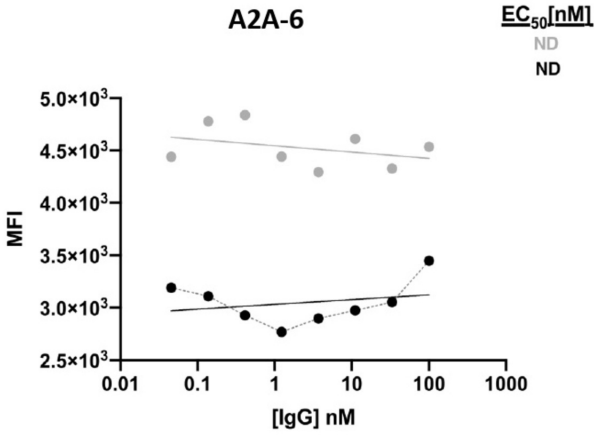
20

30

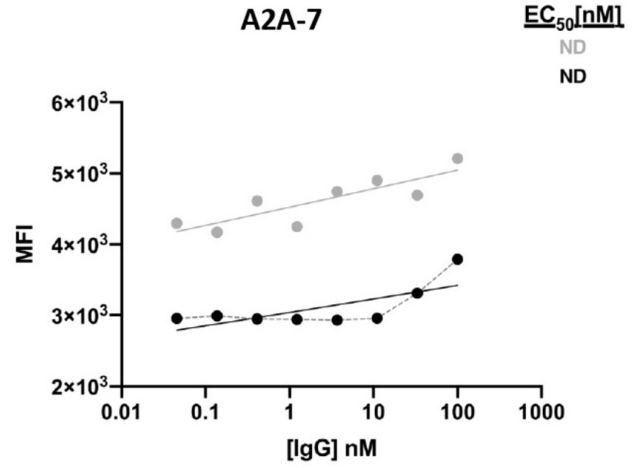
40

50

【 図 1 7 F 】

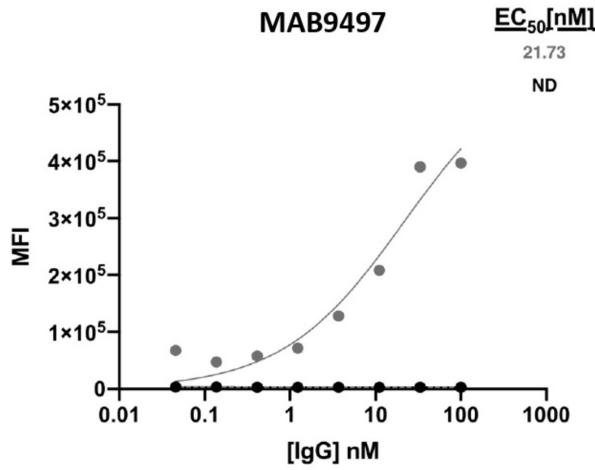


【 図 1 7 G 】



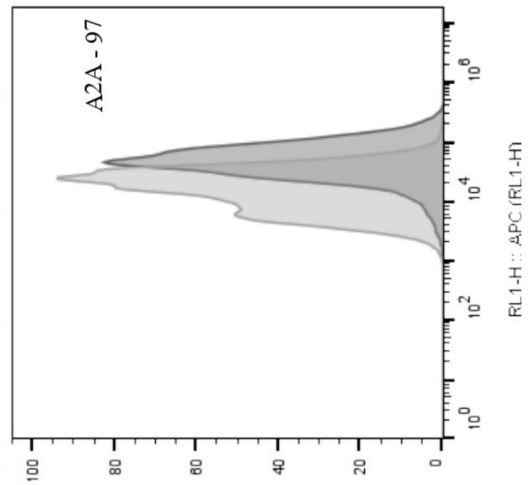
10

【 図 1 7 H 】



【 図 1 8 A 】

試料名	サブセット名	数	中央値: RL1-H
Well_A03.fcs	A2a Singlets	4888	16033
Well_A07.fcs	Parent Singlets	1904	43898



20

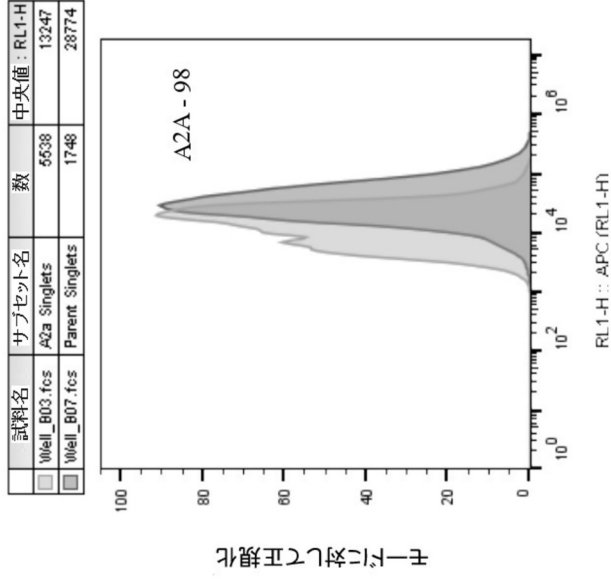
30

モーダに対して正規化

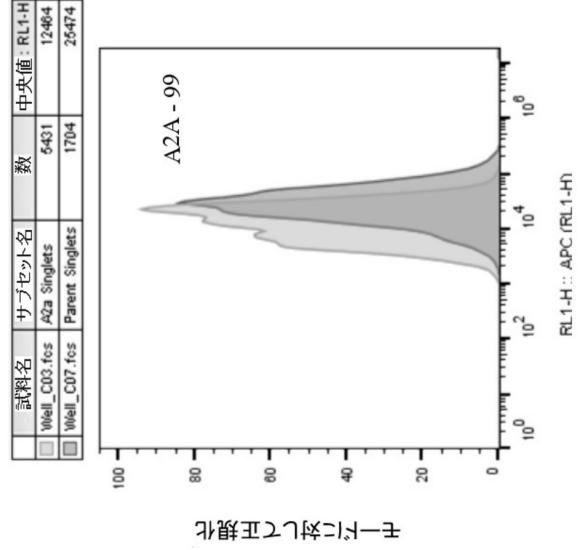
40

50

【 図 1 8 B 】

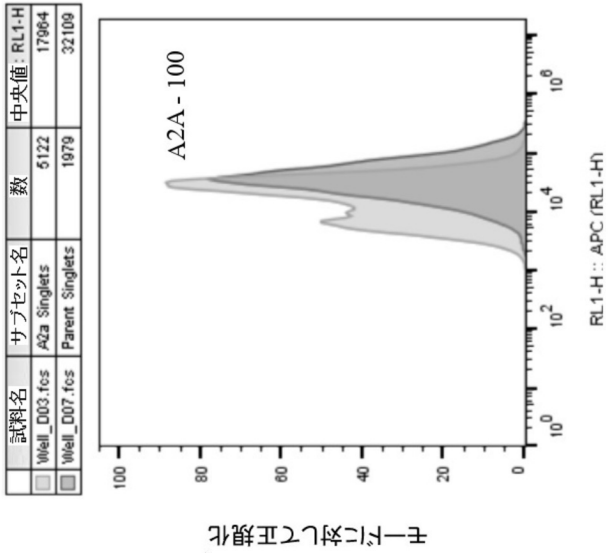


【 図 1 8 C 】

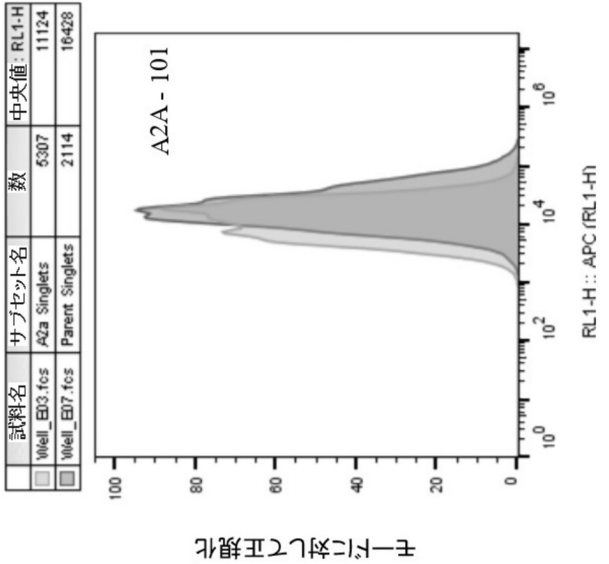


10

【 図 1 8 D 】



【 図 1 8 E 】



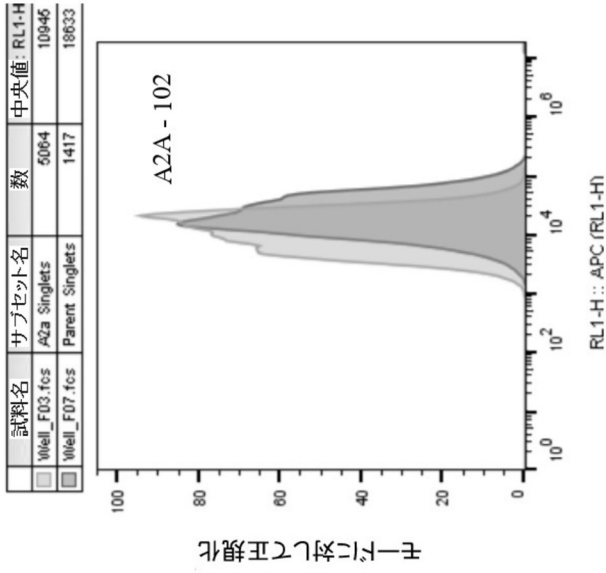
20

30

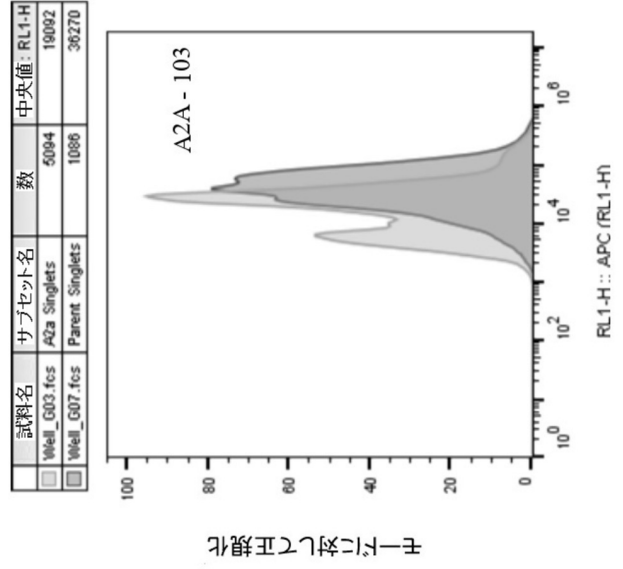
40

50

【 図 1 8 F 】

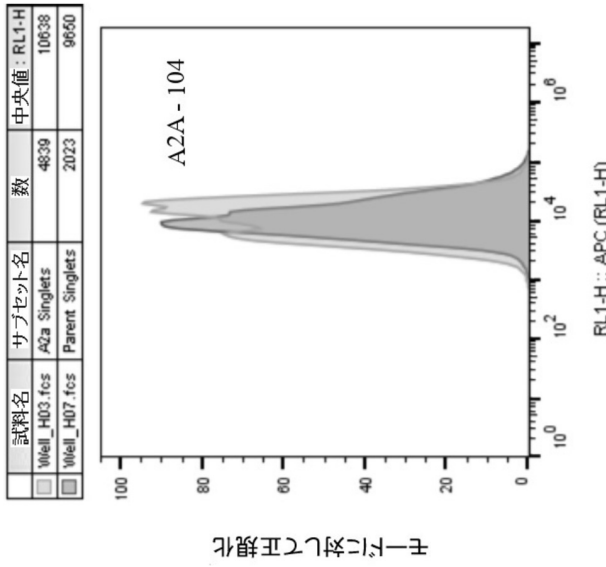


【 図 1 8 G 】

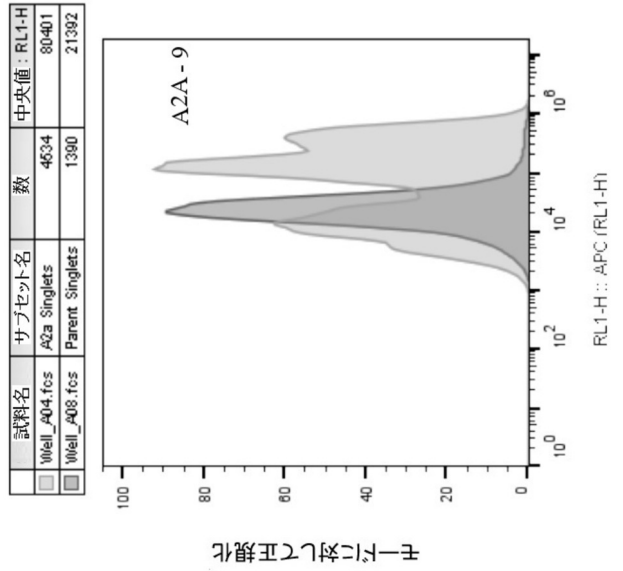


10

【 図 1 8 H 】



【 図 1 8 I 】



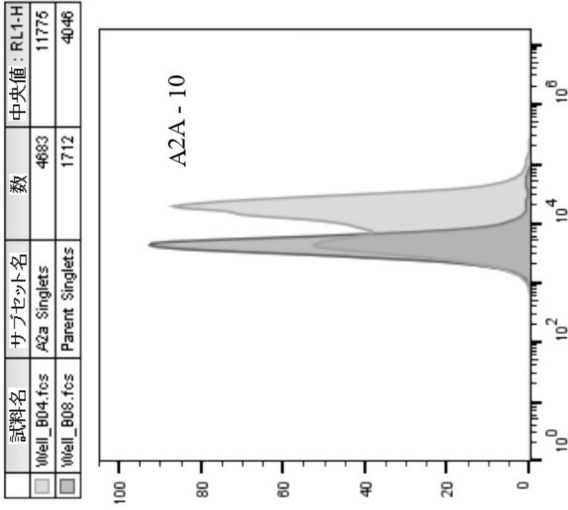
20

30

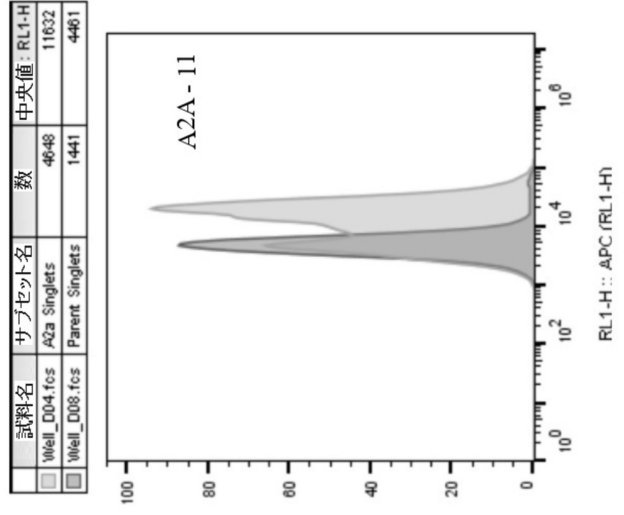
40

50

【 図 1 8 J 】

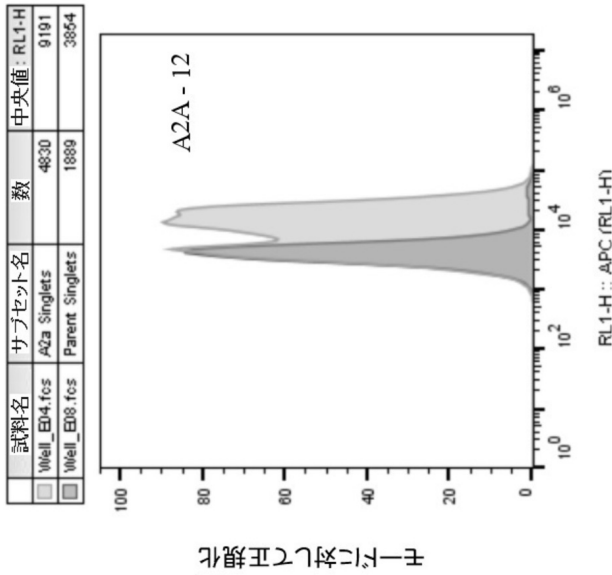


【 図 1 8 K 】

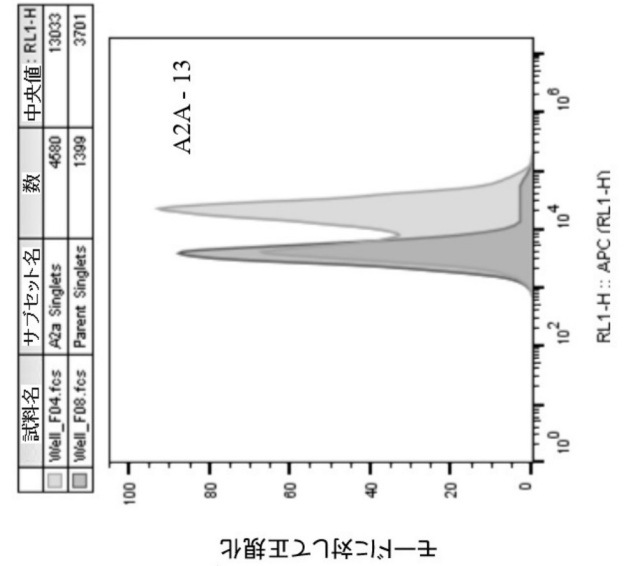


10

【 図 1 8 L 】



【 図 1 8 M 】



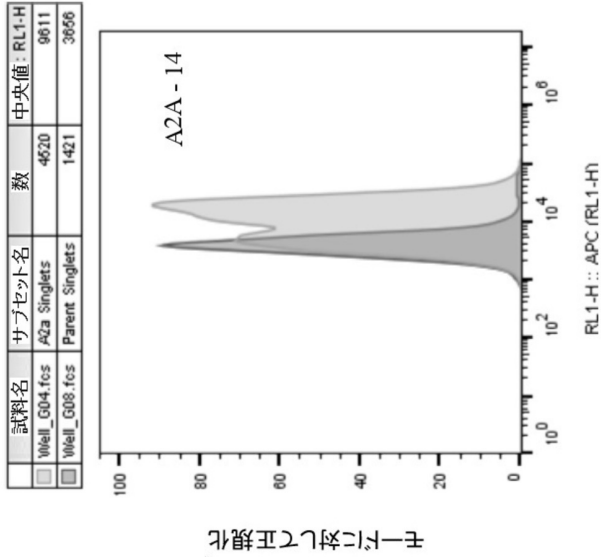
20

30

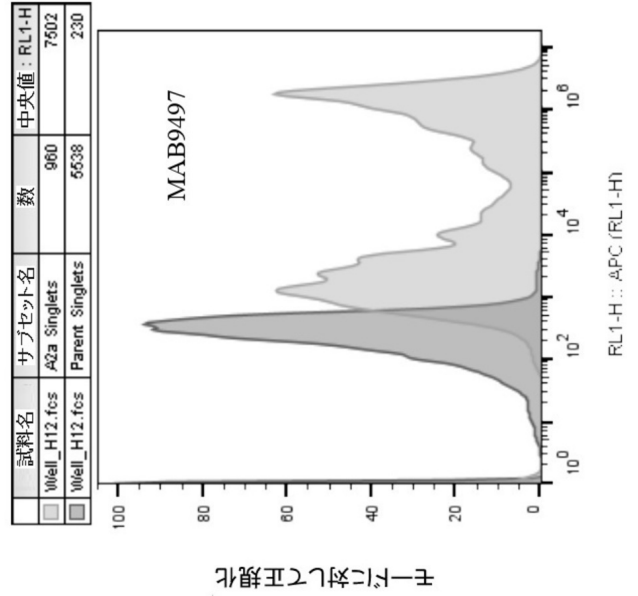
40

50

【 図 1 8 N 】



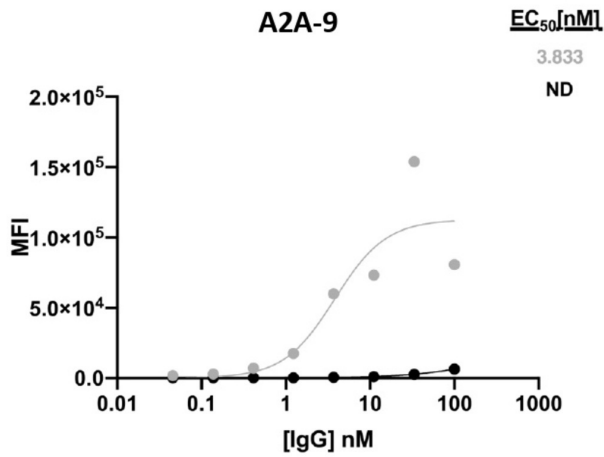
【 図 1 8 O 】



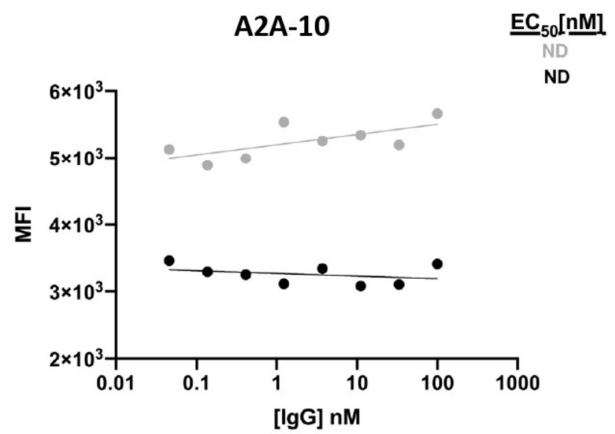
10

20

【 図 1 9 A 】



【 図 1 9 B 】

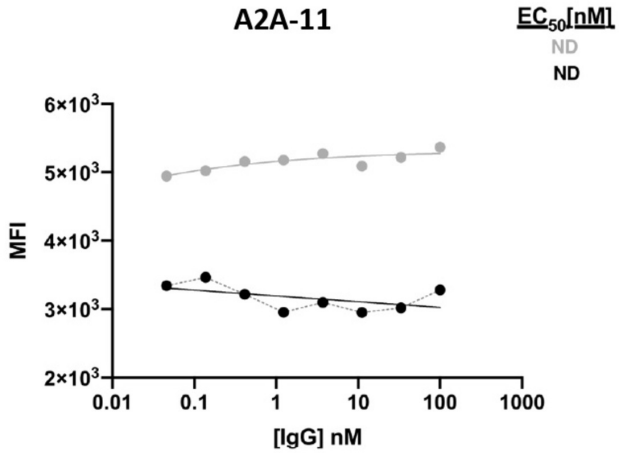


30

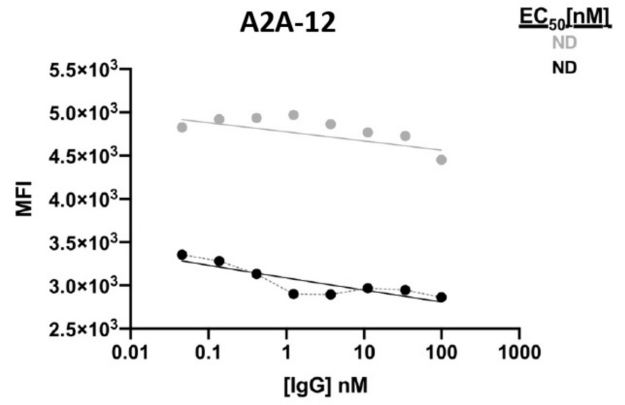
40

50

【 19 C 】

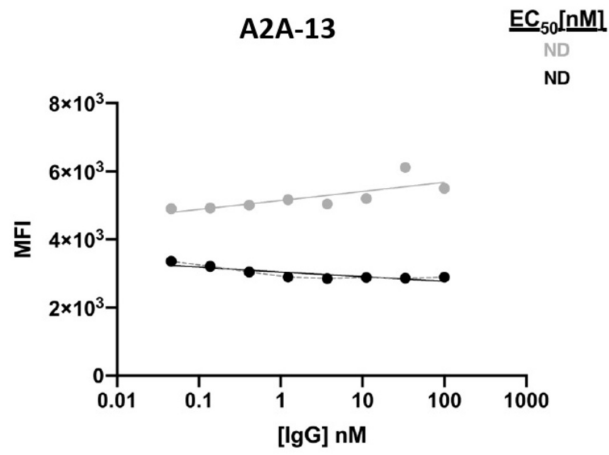


【 19 D 】

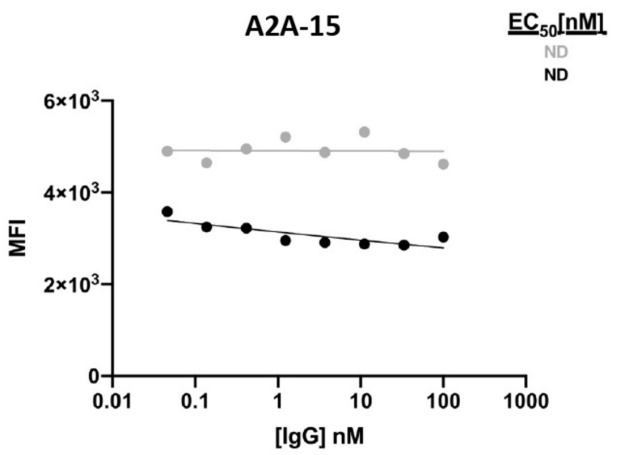


10

【 19 E 】



【 19 F 】



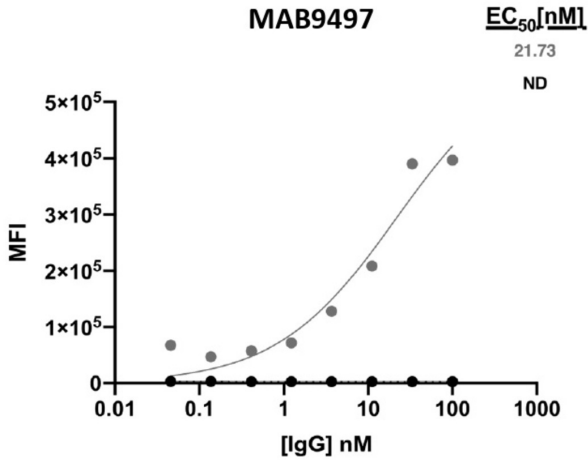
20

30

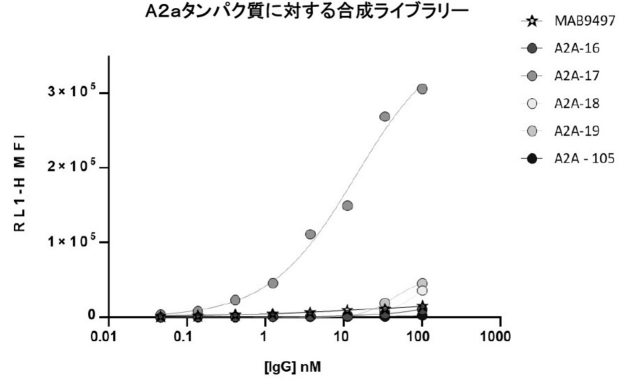
40

50

【 図 19 G 】

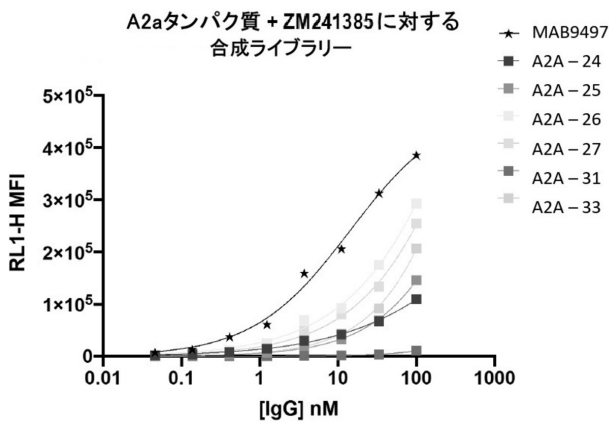


【 図 20 A 】

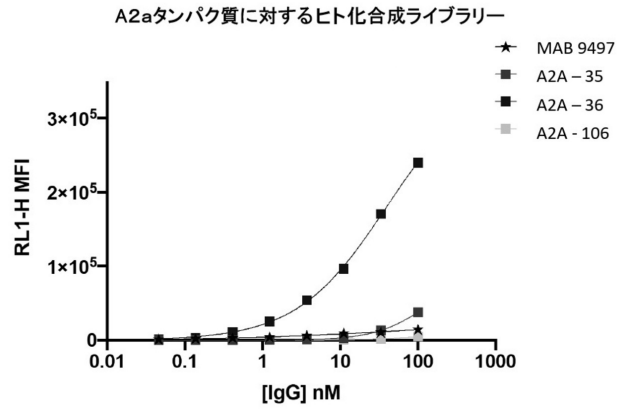


10

【 図 20 B 】



【 図 20 C 】



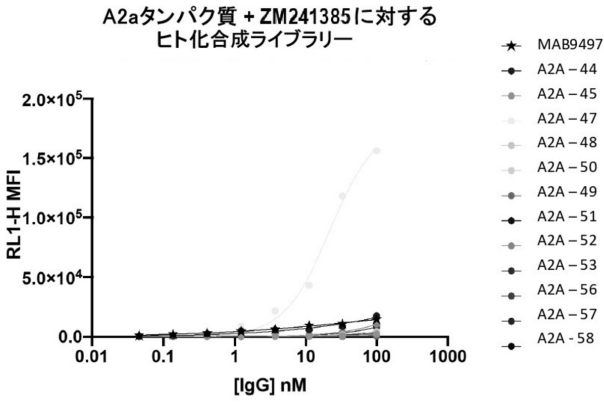
20

30

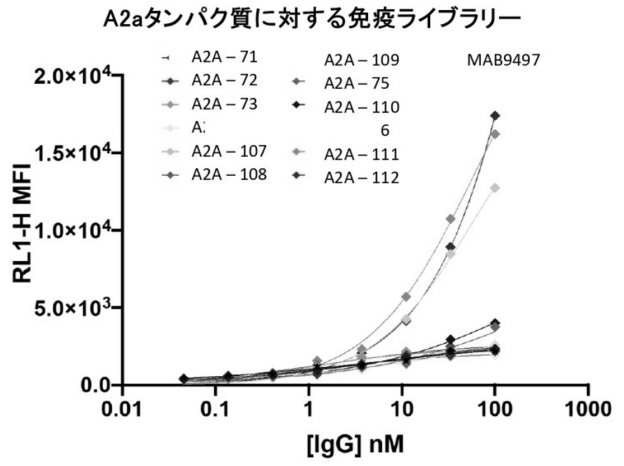
40

50

【 図 2 0 D 】

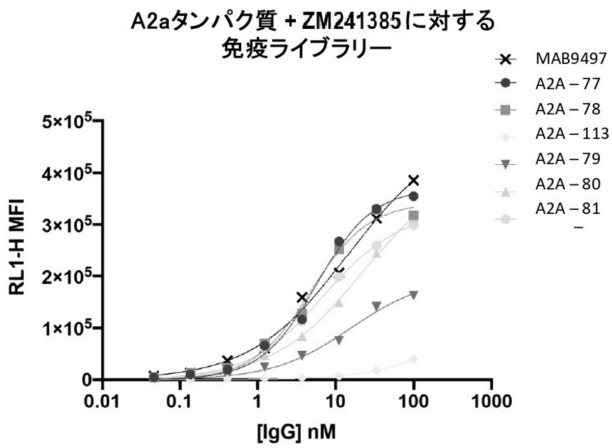


【 図 2 0 E 】

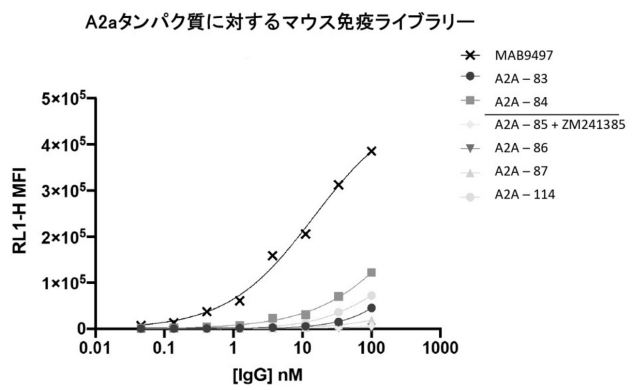


10

【 図 2 0 F 】



【 図 2 0 G 】



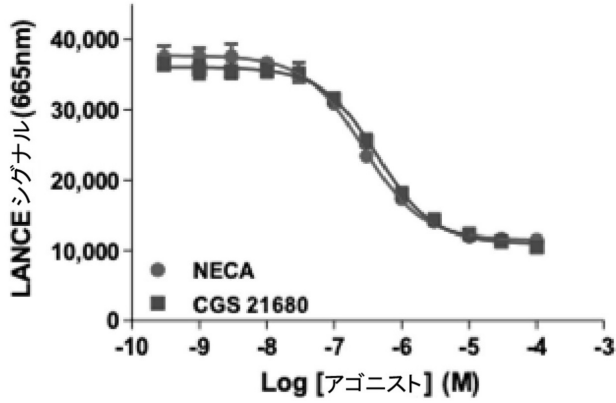
20

30

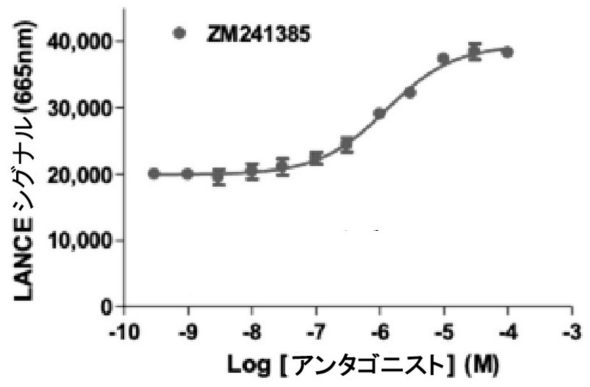
40

50

【 図 2 1 】

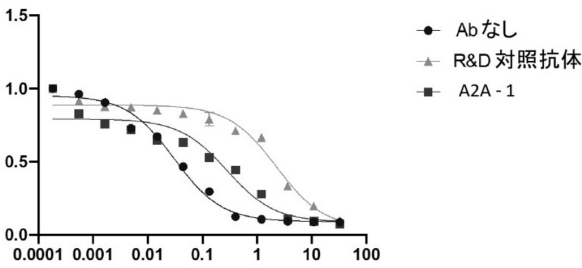


【 図 2 2 】

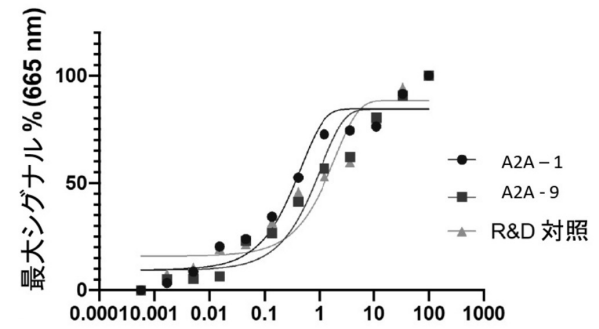


10

【 図 2 3 】

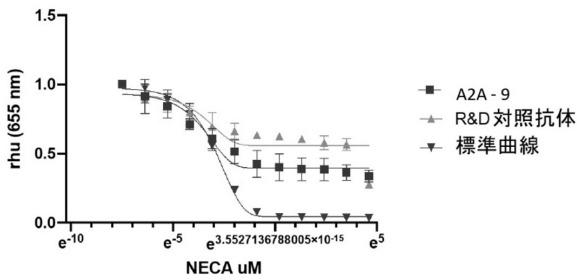


【 図 2 4 】

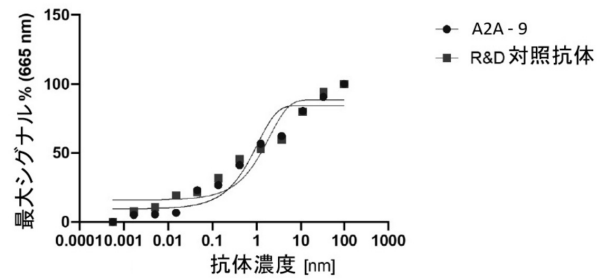


20

【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

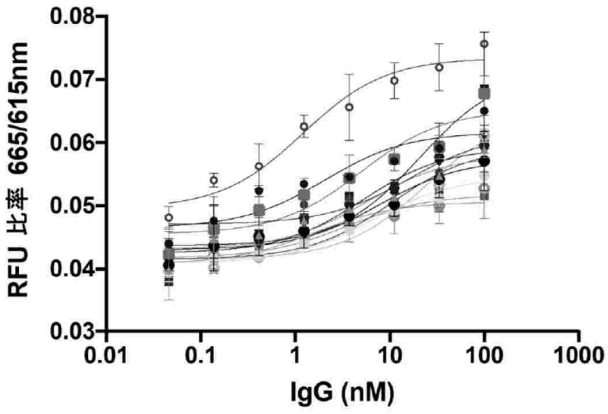


30

40

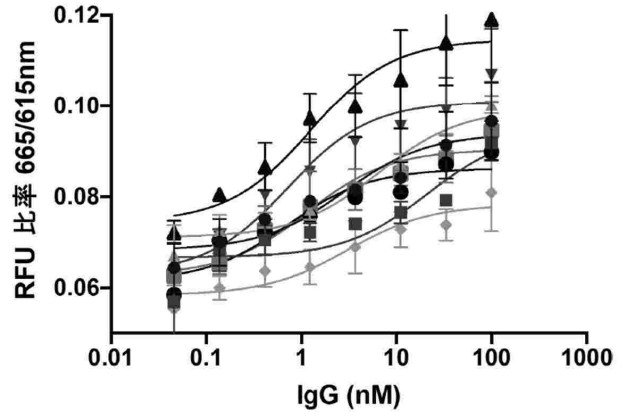
50

【 図 2 7 A 】



- A2A-17
- A2A-31
- ▲ A2A-35
- A2A-52
- A2A-72
- A2A-73
- A2A-74
- SC-29\_001
- ▼ SC-29\_002
- SC-29\_004
- ZM 241385
- MAB9497

【 図 2 7 B 】

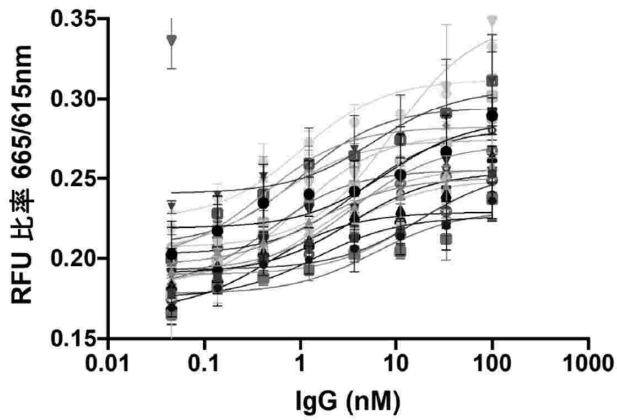


- A2A-24
- A2A-33
- ★ A2A-106
- ▼ A2A-51
- A2A-53
- A2A-75
- MAB9497
- ▲ ZM 241385

10

20

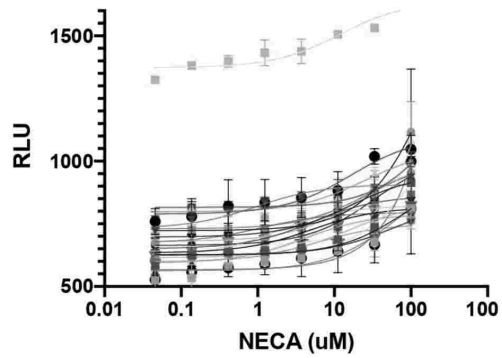
【 図 2 7 C 】



- SC-30-7
- SC-31-20
- ▲ A2A-80
- ▼ A2A-53
- ▲ A2A-26
- A2A-58
- A2A-59
- ▲ A2A-60
- A2A-19
- ▲ A2A-27
- ▲ A2A-56
- ▲ A2A-48
- ▼ MAB9497
- ▼ ZM 241385
- ▼ SC-29-3
- SC-29-7
- SC-30-12
- SC-31-14
- SC-31-19
- SC-31-21
- A2A-18

【 図 2 8 A 】

A2aアンタゴニストcAMPアッセイ



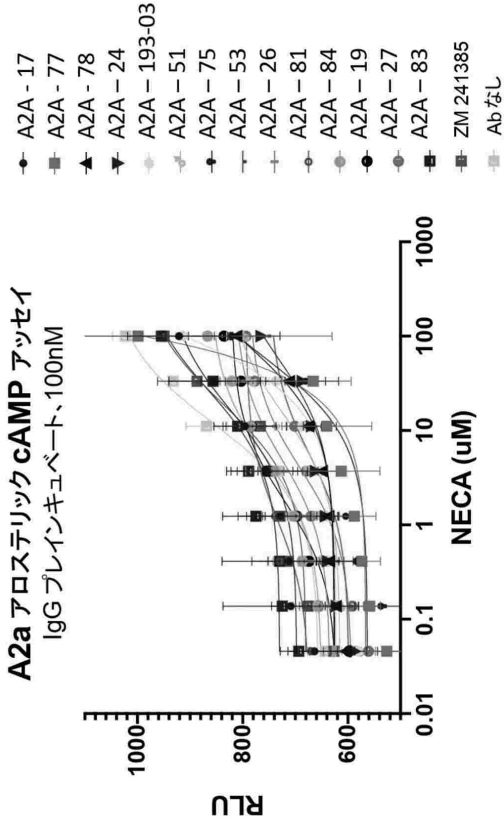
- A2A-17
- ▼ A2A-19
- A2A-24
- ▼ A2A-26
- ▲ A2A-27
- A2A-31
- ▲ A2A-72
- ▲ A2A-74
- A2A-75
- A2A-77
- A2A-78
- ▲ A2A-81
- A2A-35
- A2A-36
- A2A-37
- A2A-51
- A2A-52
- ▼ A2A-53
- ▲ A2A-83
- A2A-84
- A2A-254
- ZM 241385
- Abなし

30

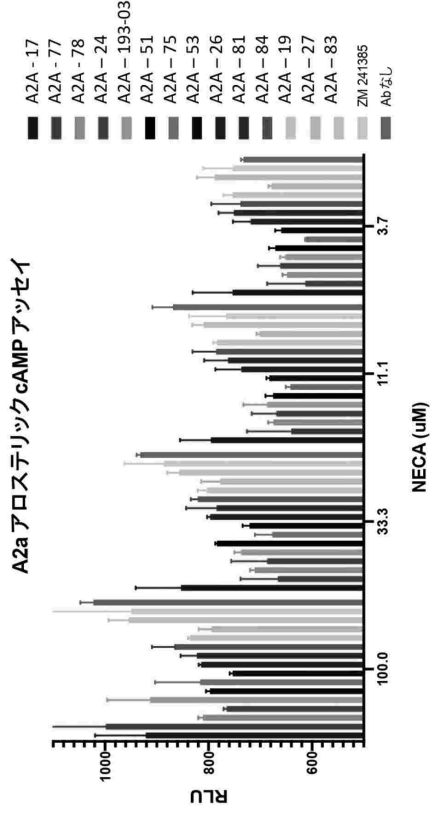
40

50

【 図 2 8 B 】



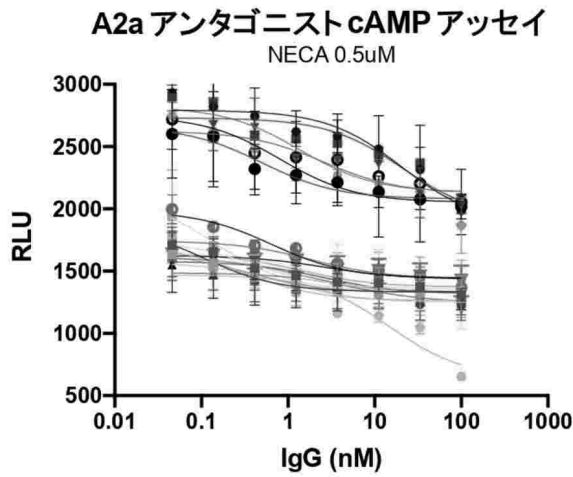
【 図 2 8 C 】



10

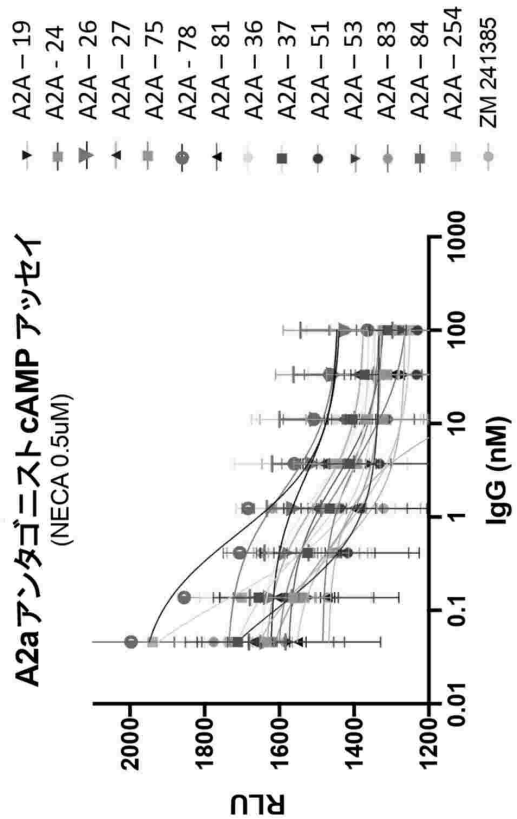
20

【 図 2 9 A 】



- A2A - 17
- A2A - 19
- A2A - 24
- A2A - 26
- A2A - 27
- A2A - 31
- A2A - 74
- A2A - 75
- A2A - 77
- A2A - 78
- A2A - 81
- A2A - 35
- A2A - 36
- A2A - 37
- A2A - 51
- A2A - 52
- A2A - 53
- A2A - 83
- A2A - 84
- A2A - 254
- ZM 241385

【 図 2 9 B 】

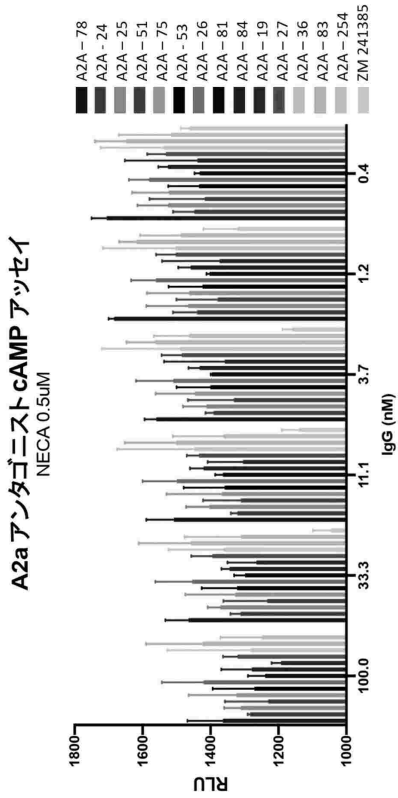


30

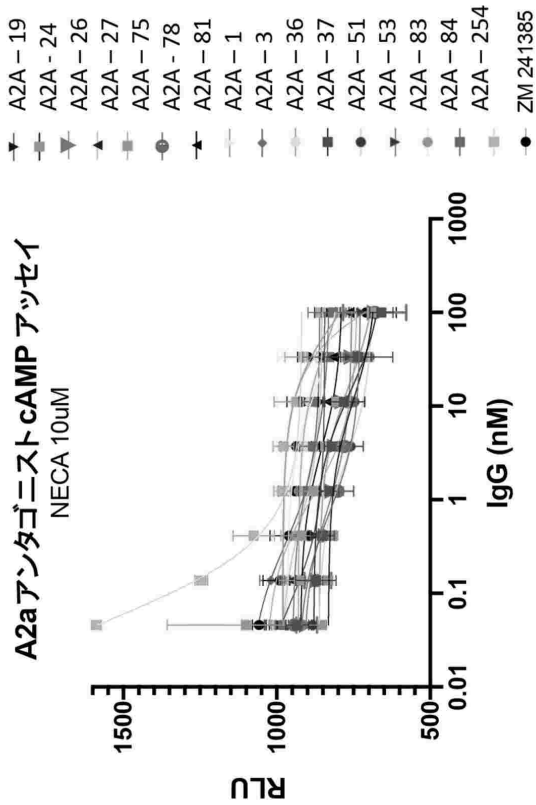
40

50

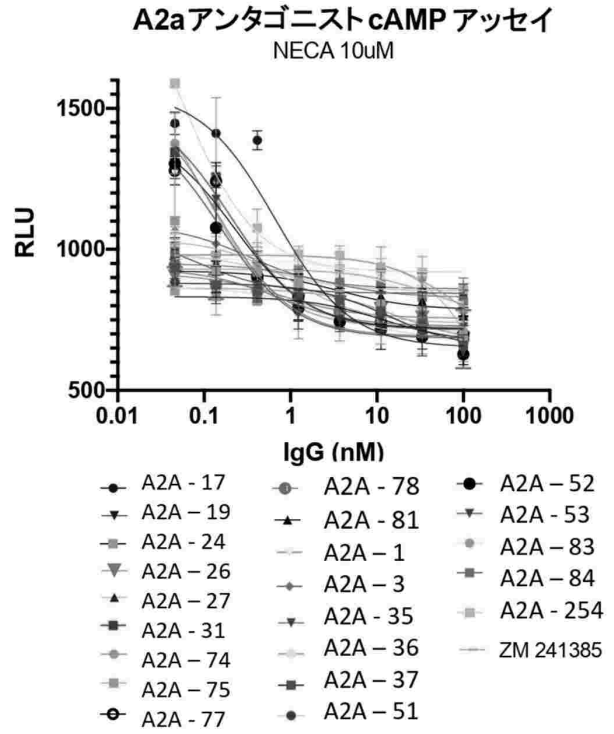
【 図 29C 】



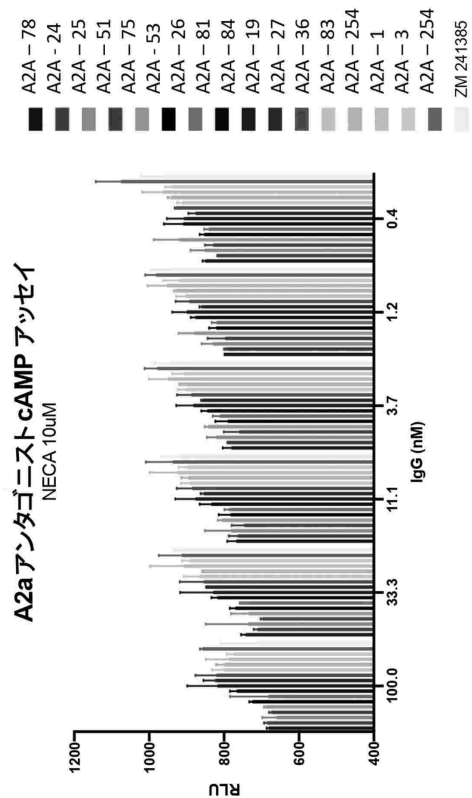
【 図 30B 】



【 図 30A 】



【 図 30C 】



10

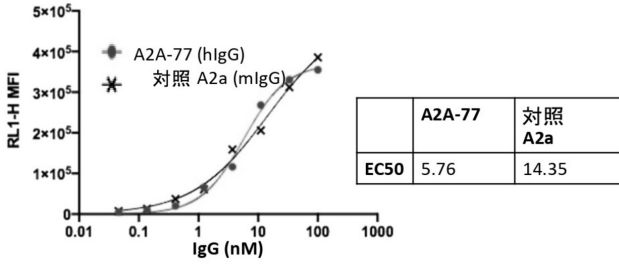
20

30

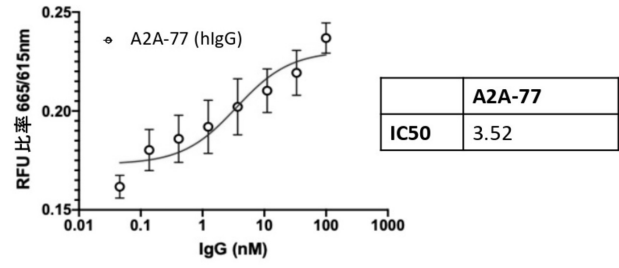
40

50

【 図 3 1 A 】

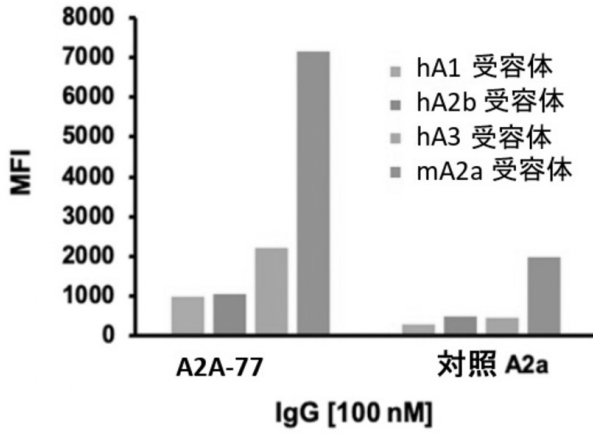


【 図 3 1 B 】

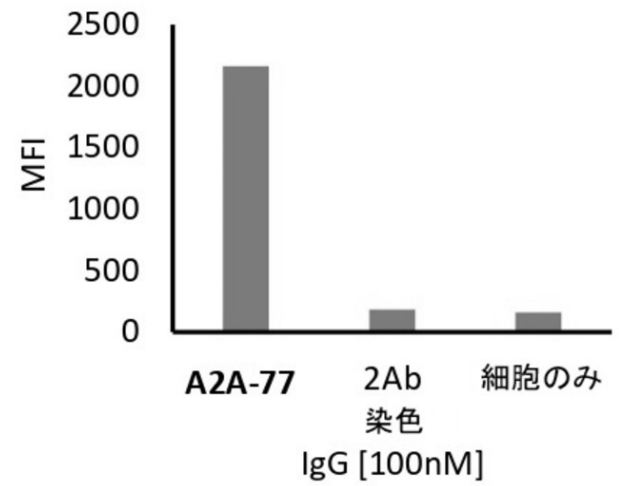


10

【 図 3 1 C 】

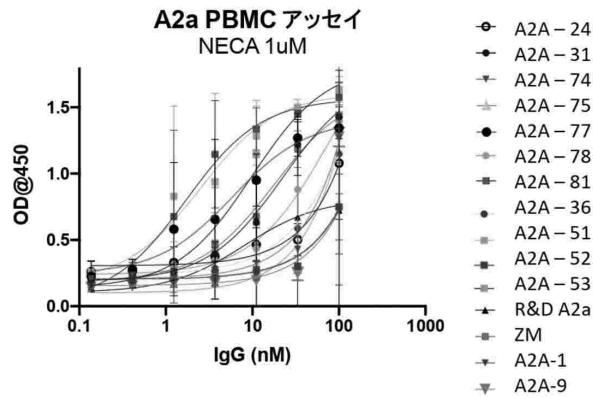


【 図 3 1 D 】

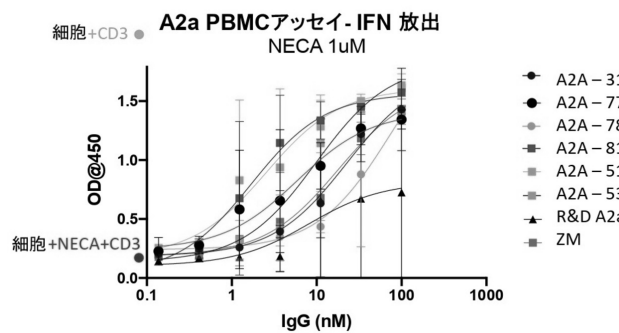


20

【 図 3 2 A 】



【 図 3 2 B 】

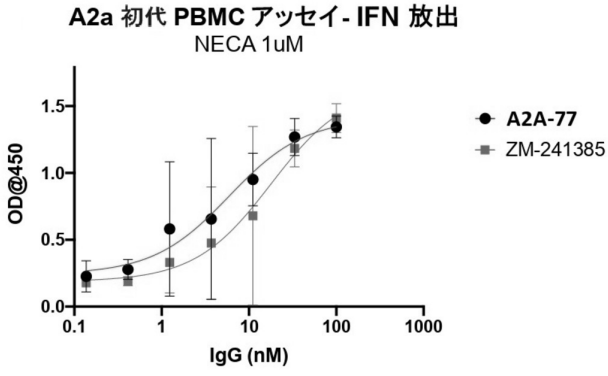


30

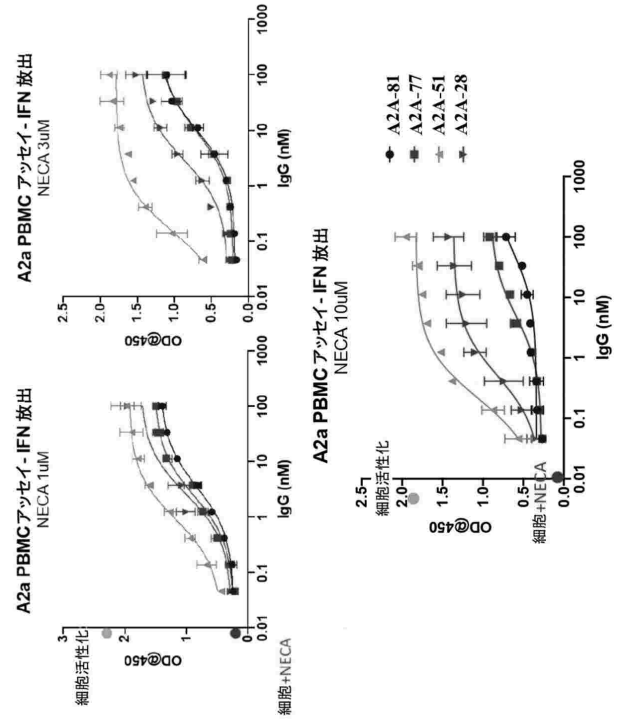
40

50

【 図 3 2 C 】



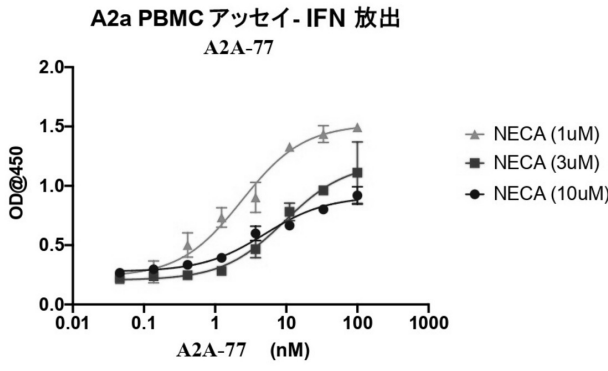
【 図 3 2 D 】



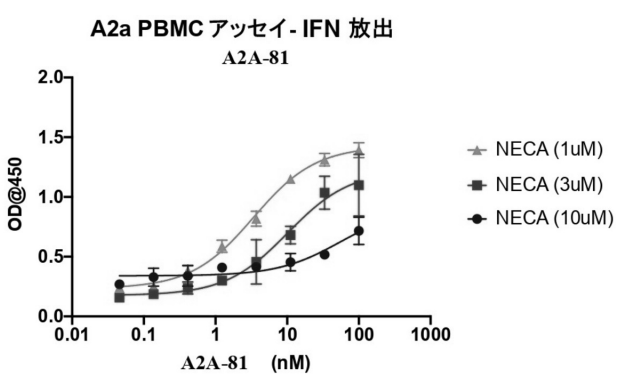
10

20

【 図 3 2 E 】



【 図 3 2 F 】



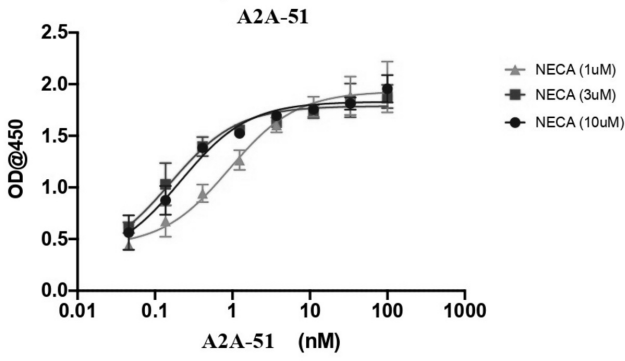
30

40

50

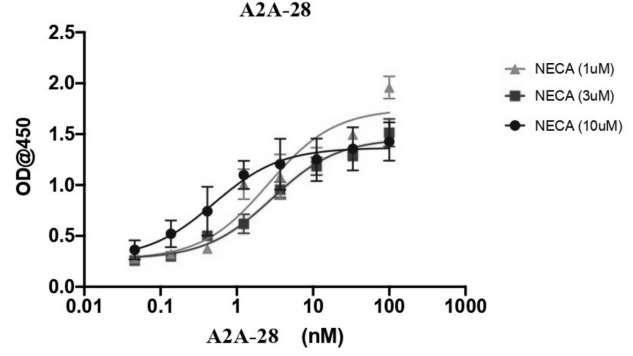
【 図 3 2 G 】

A2a PBMC アッセイ- IFN 放出



【 図 3 2 H 】

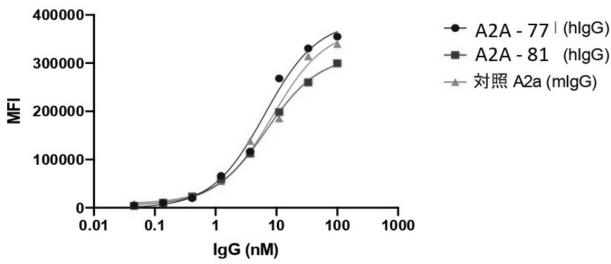
A2a PBMC アッセイ- IFN 放出



10

【 図 3 3 A 】

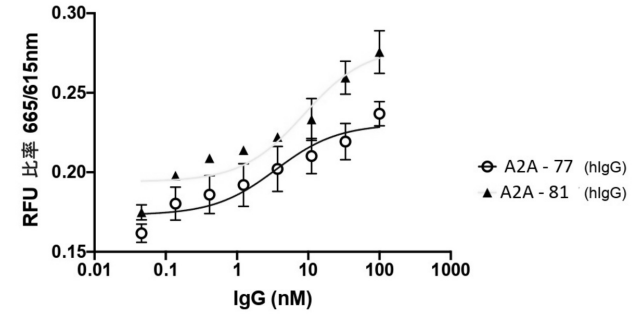
A2a 細胞結合滴定



【 図 3 3 B 】

A2a アンタゴニスト cAMP アッセイ

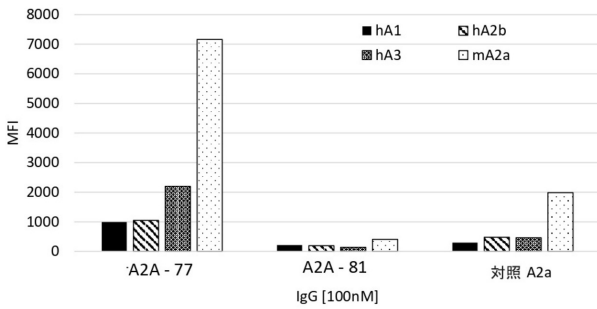
NECA 0.5uM



20

【 図 3 3 C 】

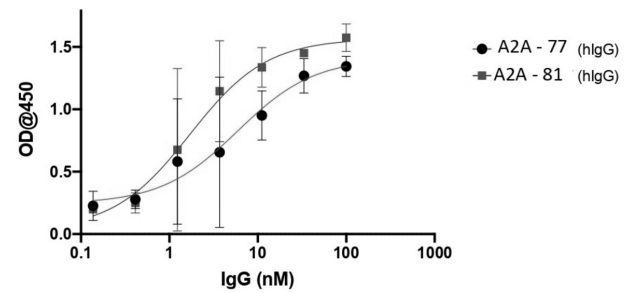
インビトロ特異性



【 図 3 3 D 】

A2a PBMC アッセイ- IFN 放出

NECA 1uM

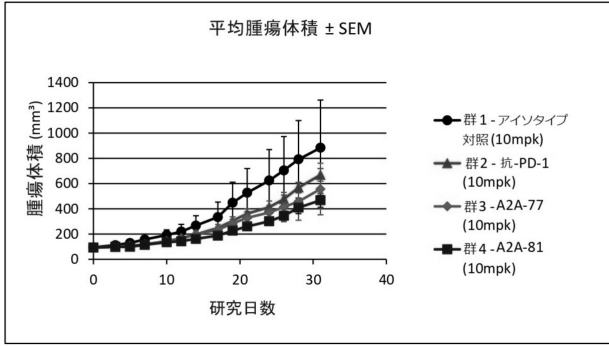


30

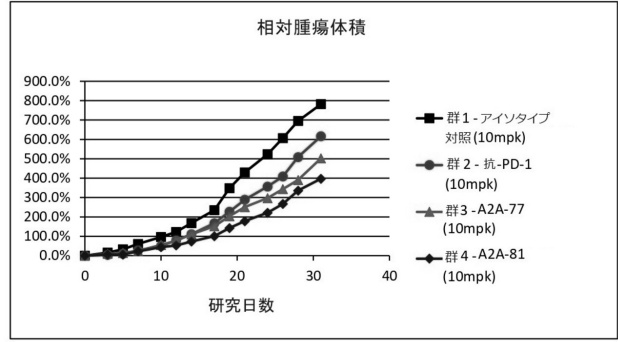
40

50

【 図 3 4 A 】

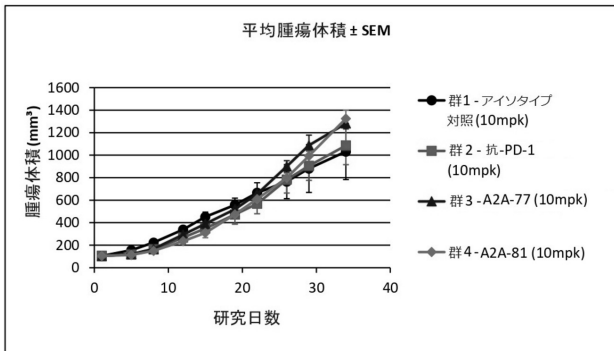


【 図 3 4 B 】

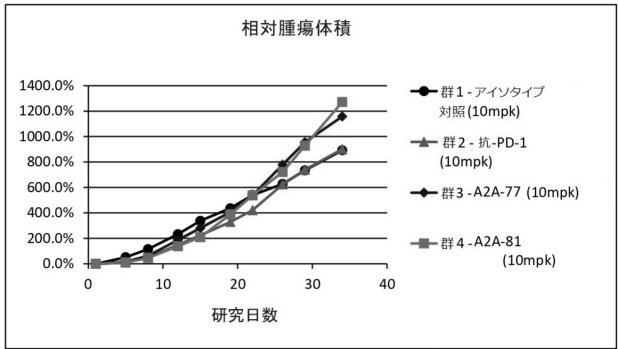


10

【 図 3 4 C 】



【 図 3 4 D 】

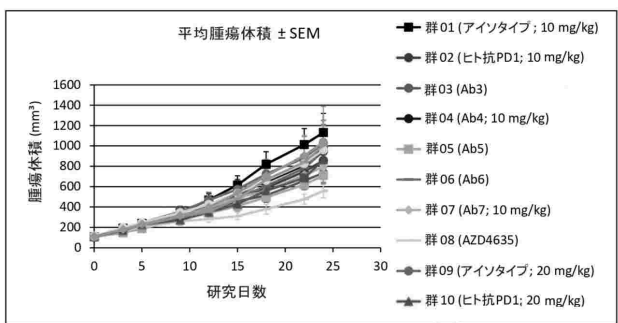


20

【 図 3 4 E 】

群	番号	薬剤	用量	スケジュール	量
9	6	アインタイプ対照	20 mg/kg, IP	Q3Dx6	24mg
10	6	抗-PD-1 (キイトルーダ)	20 mg/kg, IP	Q3Dx6	24mg
11	6	Ab4 (TB206-7)	20 mg/kg, IP	Q3Dx6	24mg
12	6	Ab4 + 抗-PD-1 (キイトルーダ)	10 mg/kg + 10 mg/kg, IP	Q3Dx6	12mg+12mg
13	6	Ab7 (PD1TAO15)	20 mg/kg, IP	Q3Dx6	24mg
14	6	Ab4 + Ab7	10 mg/kg + 10 mg/kg, IP	Q3Dx6	12mg+12mg

【 図 3 4 F 】

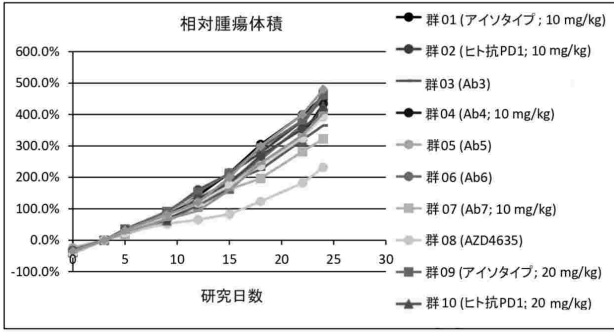


30

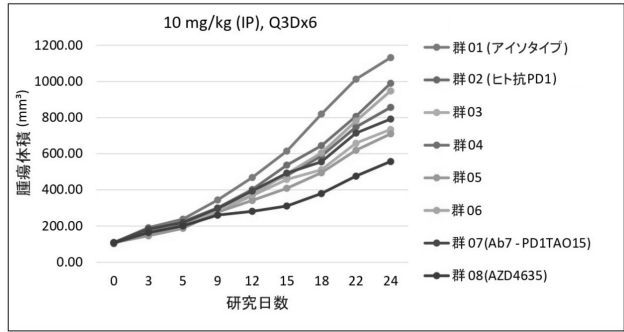
40

50

【 図 3 4 G 】

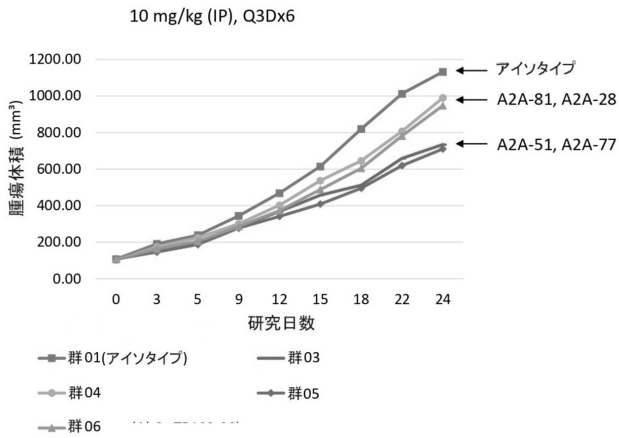


【 図 3 4 H 】

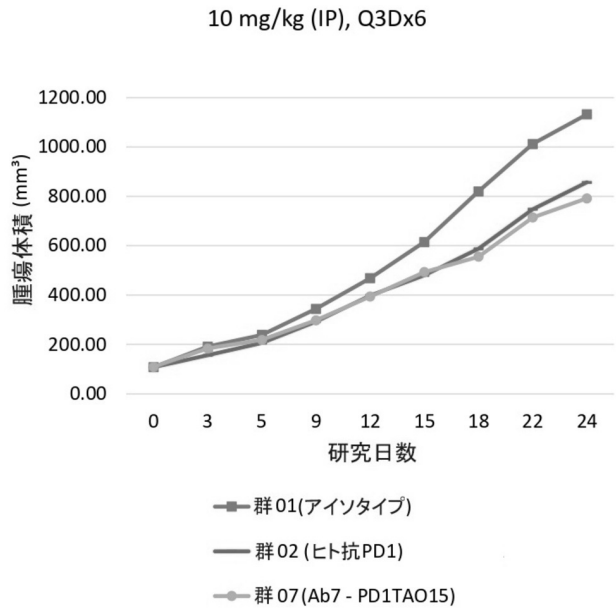


10

【 図 3 4 I 】



【 図 3 4 J 】



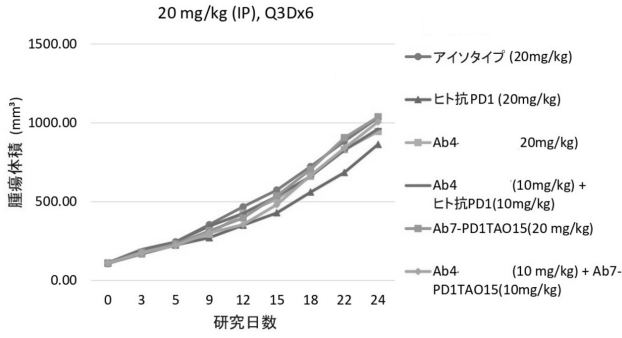
20

30

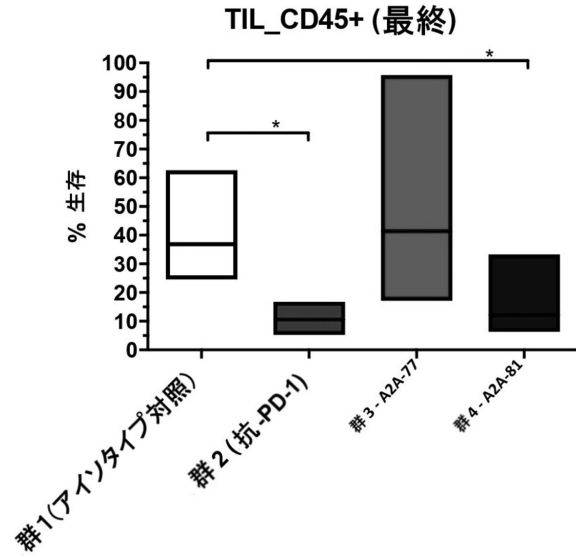
40

50

【 図 3 4 K 】

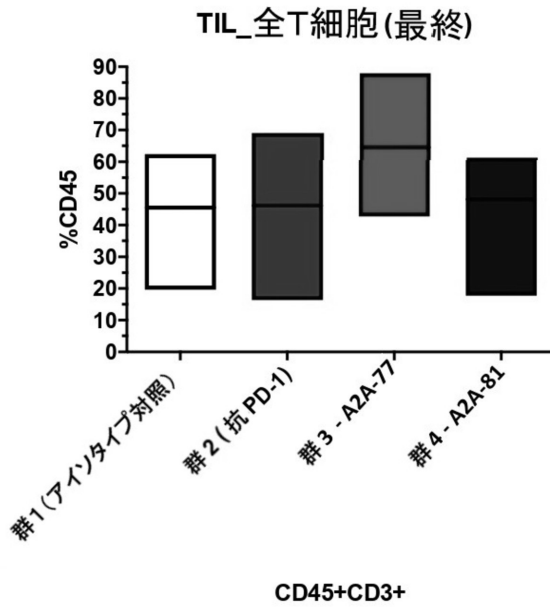


【 図 3 5 A 】

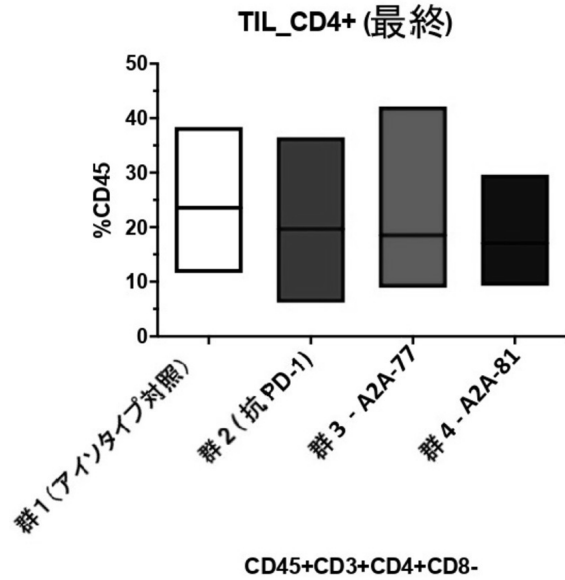


10

【 図 3 5 B 】



【 図 3 5 C 】



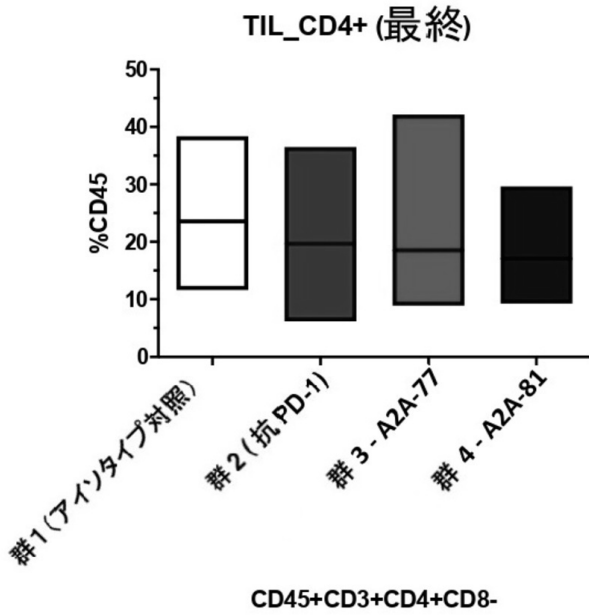
20

30

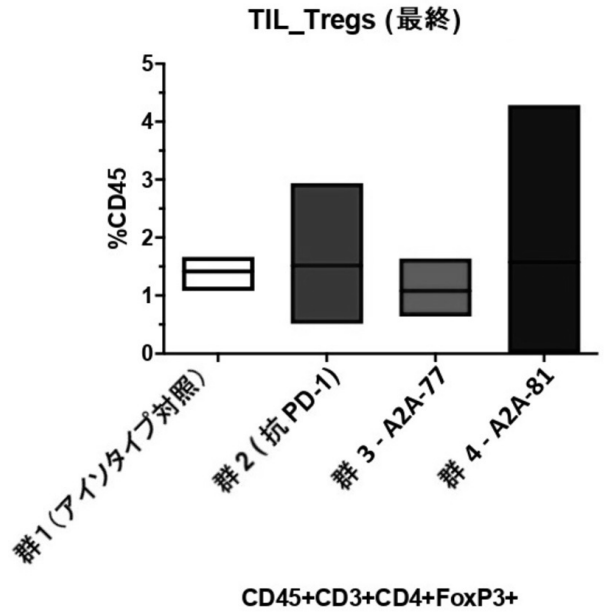
40

50

【 図 3 5 D 】

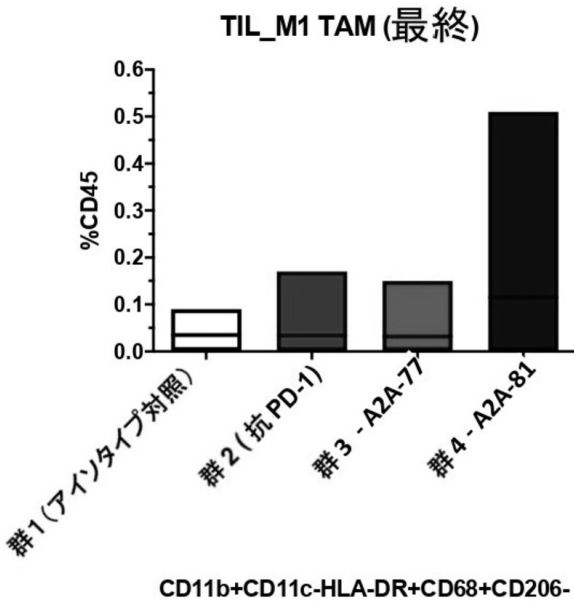


【 図 3 5 E 】

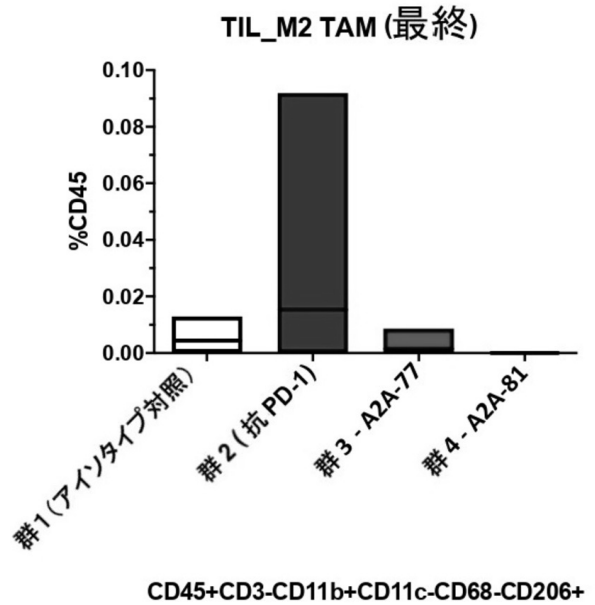


10

【 図 3 5 F 】



【 図 3 5 G 】



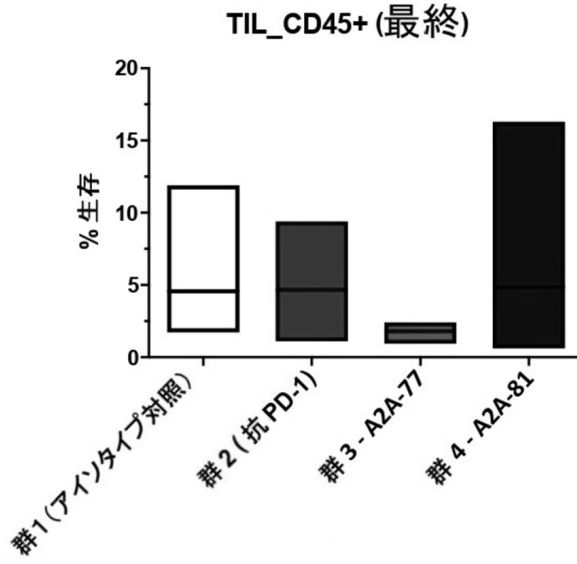
20

30

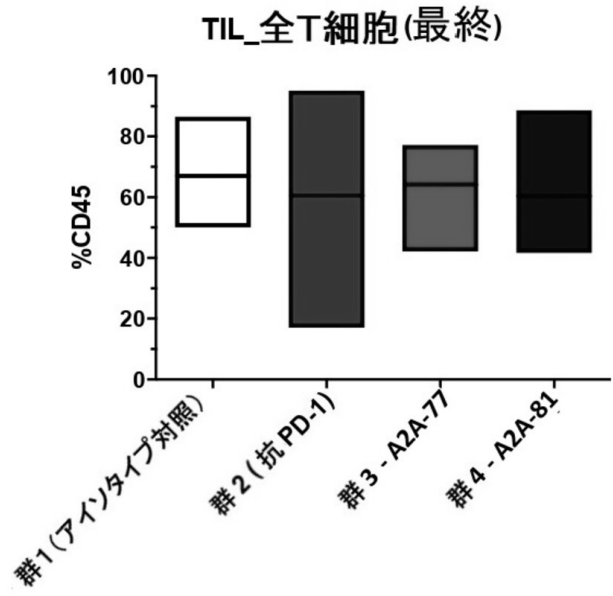
40

50

【 図 3 5 H 】



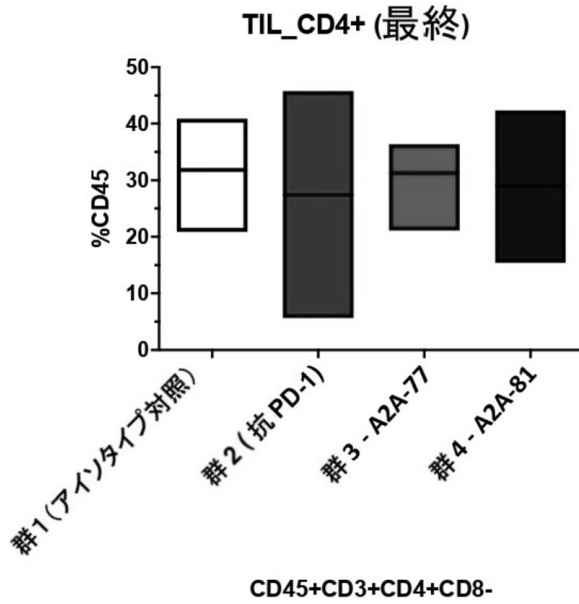
【 図 3 5 I 】



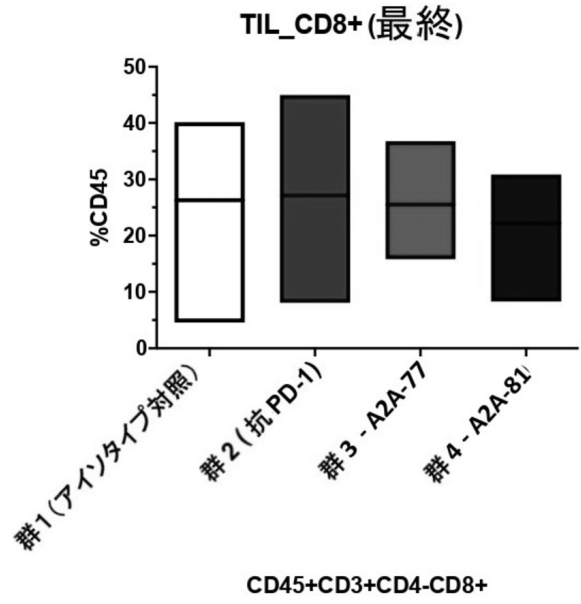
10

20

【 図 3 5 J 】



【 図 3 5 K 】

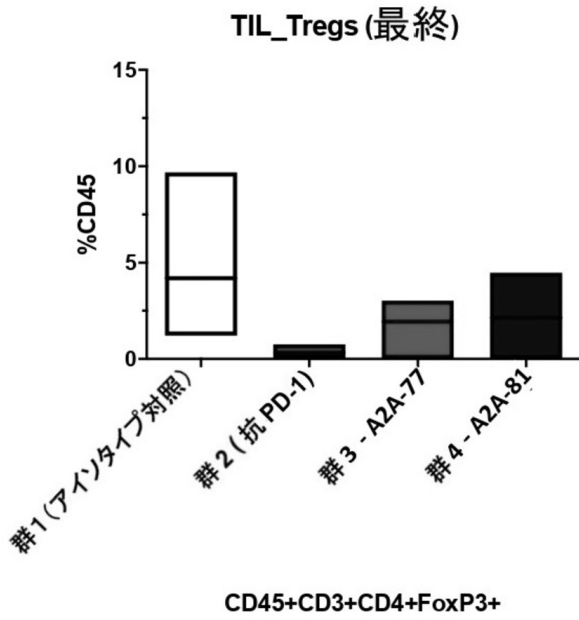


30

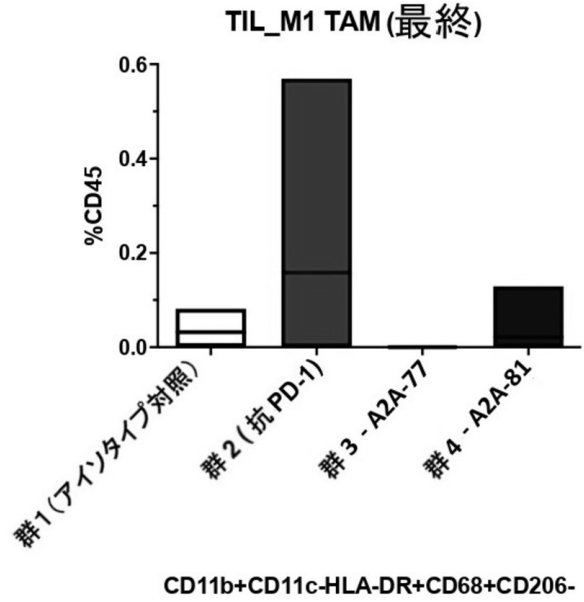
40

50

【 図 3 5 L 】

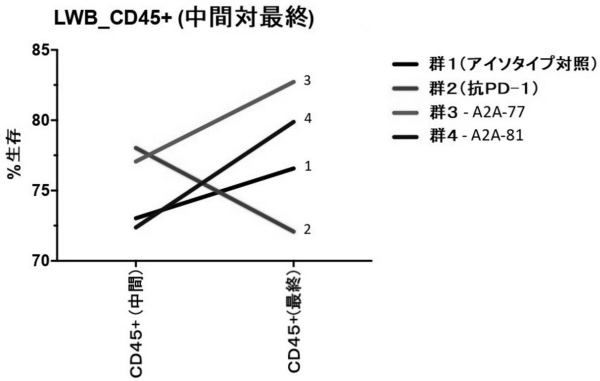


【 図 3 5 M 】

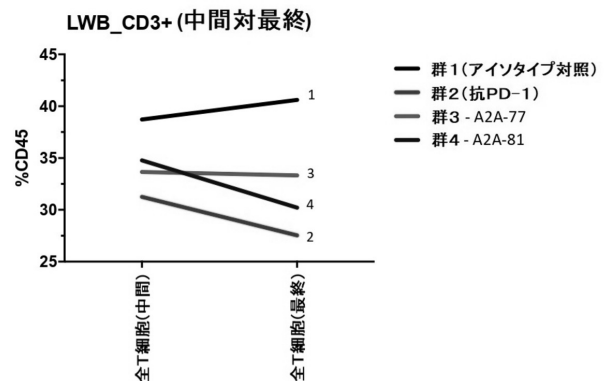


10

【 図 3 6 A 】



【 図 3 6 B 】



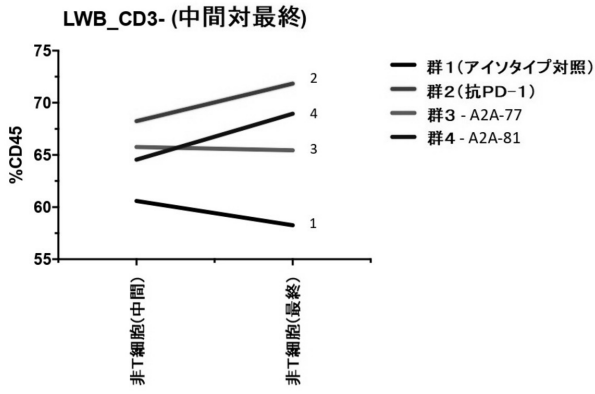
20

30

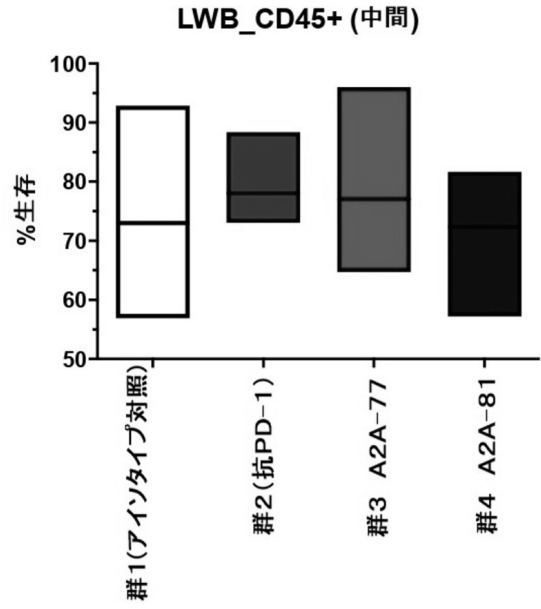
40

50

【 図 3 6 C 】



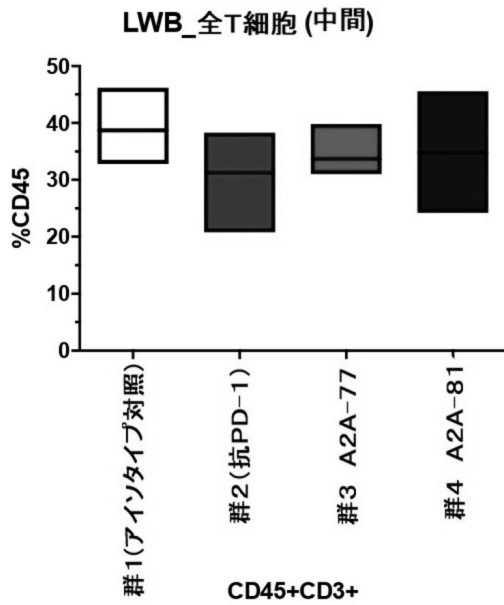
【 図 3 7 A 】



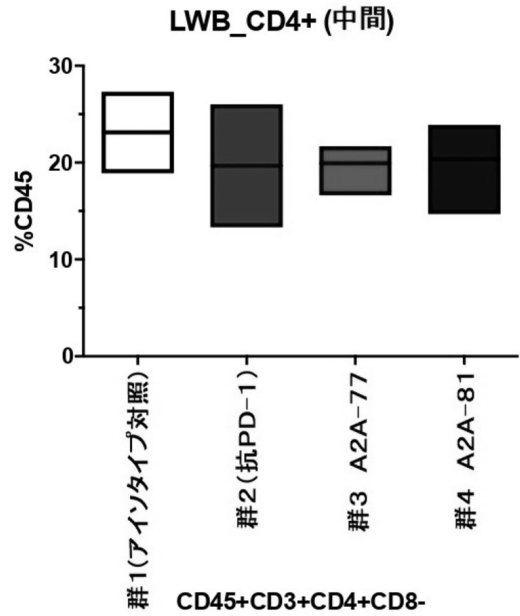
10

20

【 図 3 7 B 】



【 図 3 7 C 】

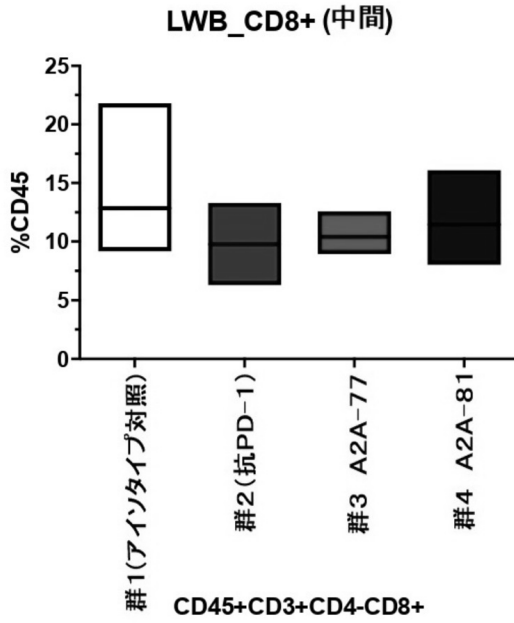


30

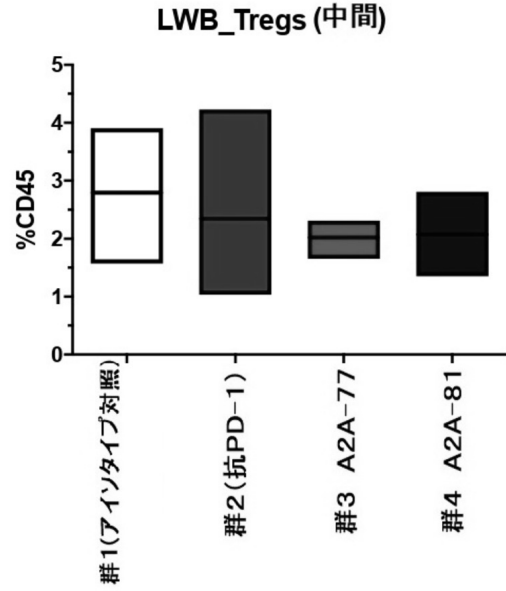
40

50

【 図 3 7 D 】



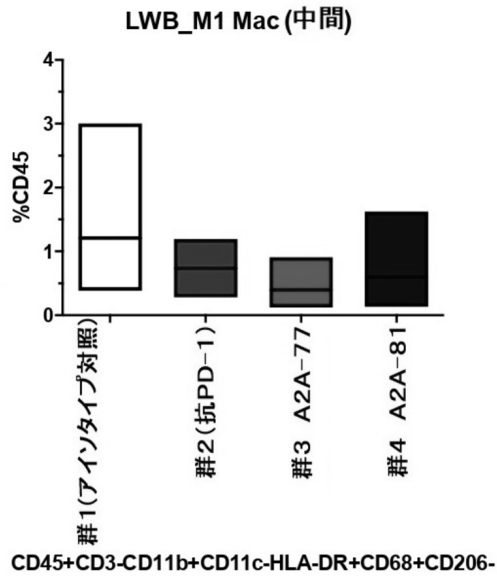
【 図 3 7 E 】



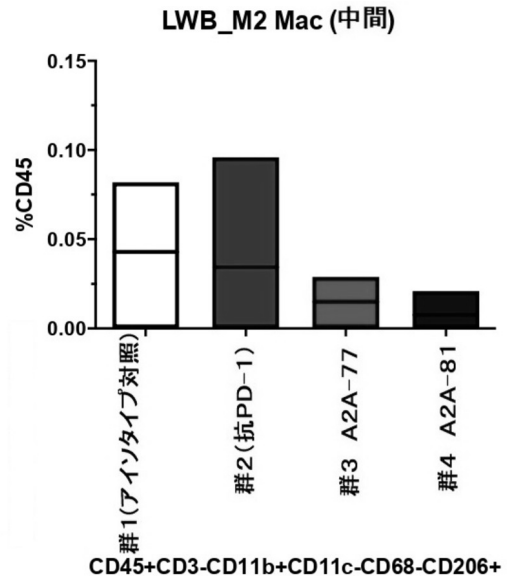
10

20

【 図 3 7 F 】



【 図 3 7 G 】

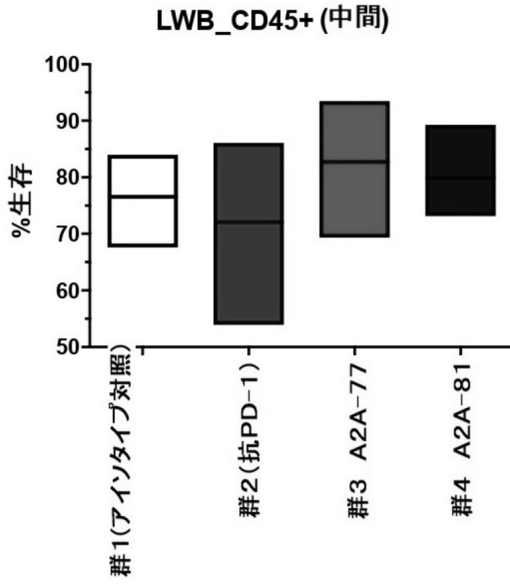


30

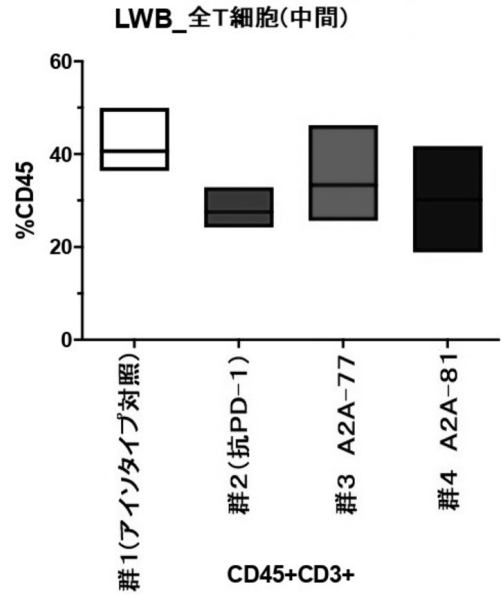
40

50

【 図 3 8 A 】



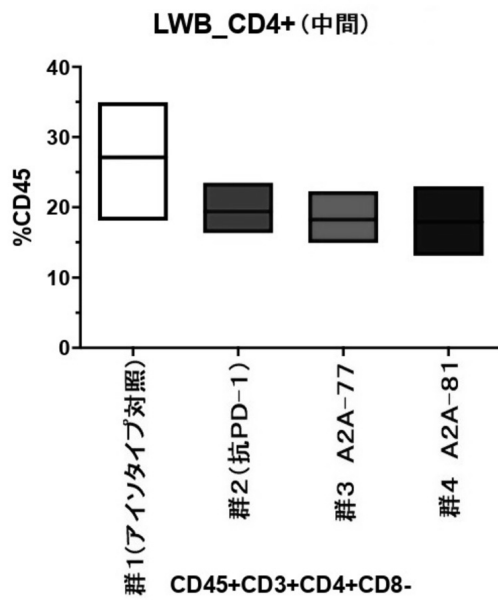
【 図 3 8 B 】



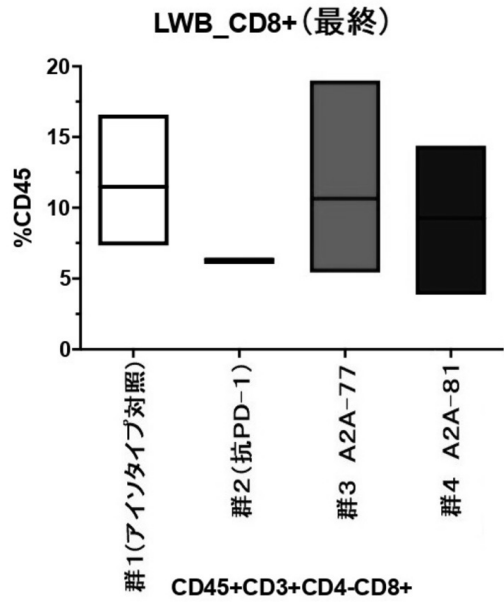
10

20

【 図 3 8 C 】



【 図 3 8 D 】

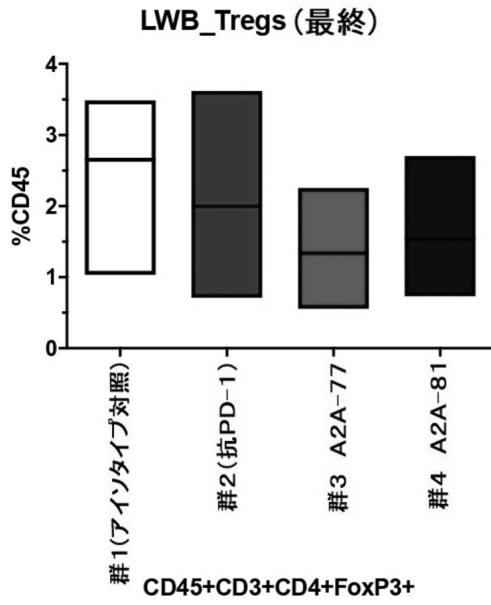


30

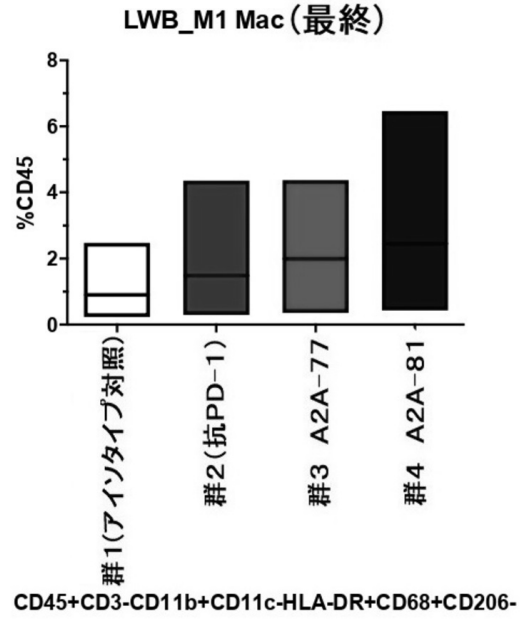
40

50

【 図 3 8 E 】



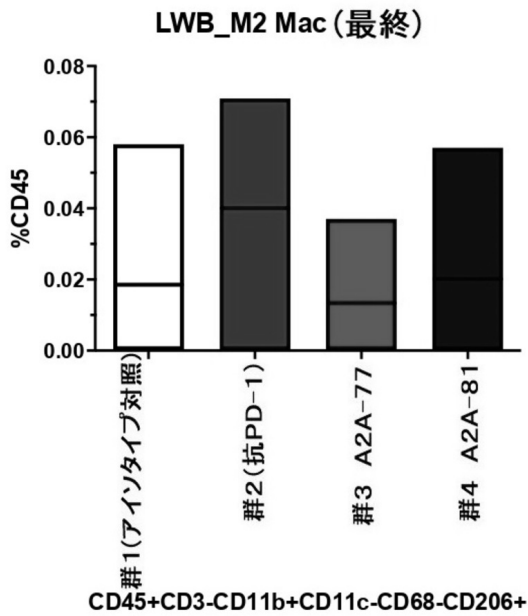
【 図 3 8 F 】



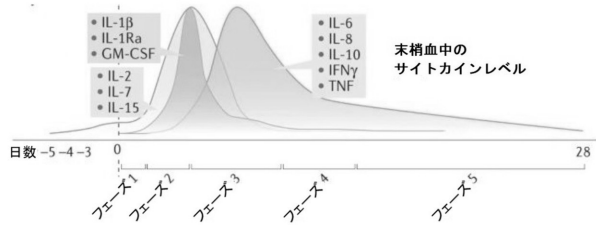
10

20

【 図 3 8 G 】



【 図 3 9 】

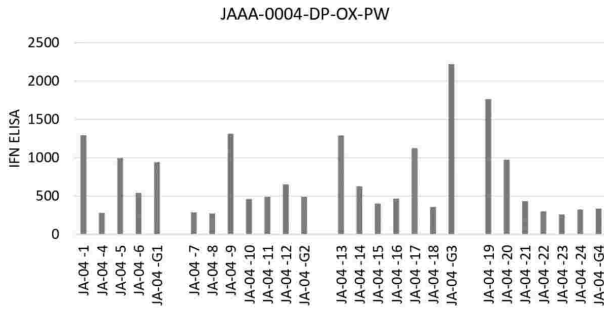


30

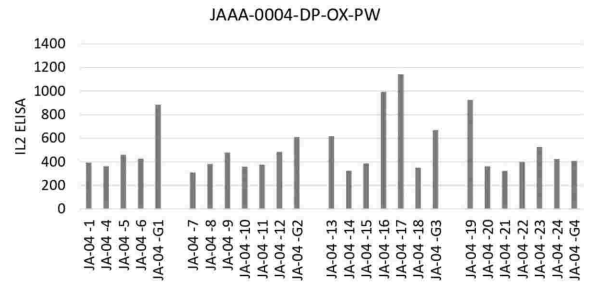
40

50

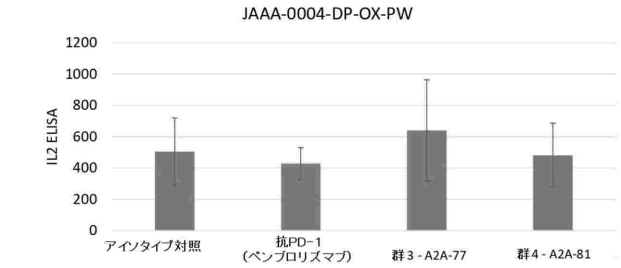
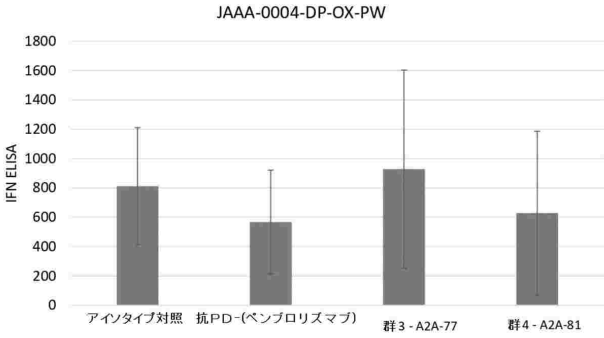
【 4 0 A 】



【 4 0 B 】

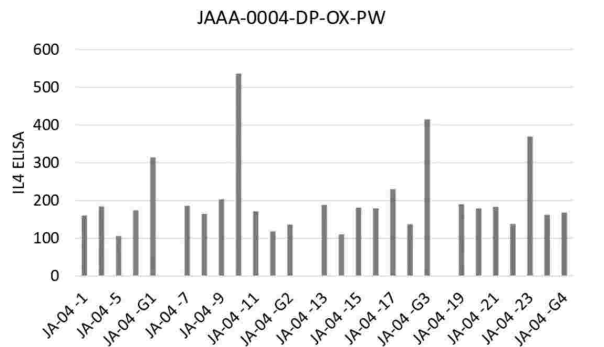


10

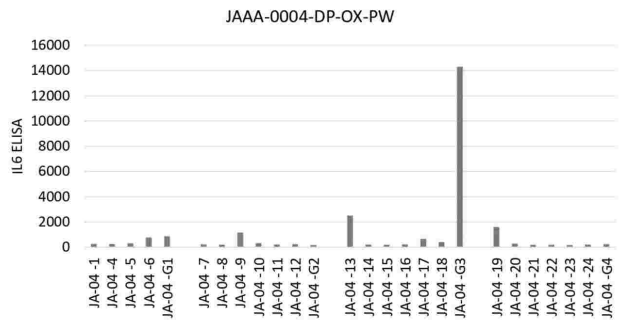


20

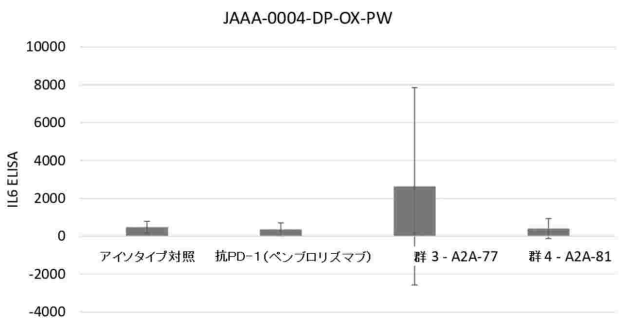
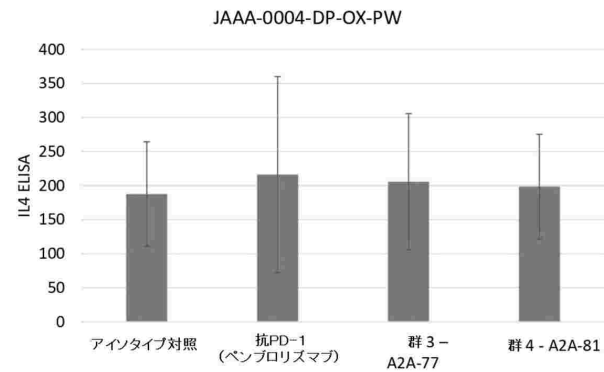
【 4 0 C 】



【 4 0 D 】



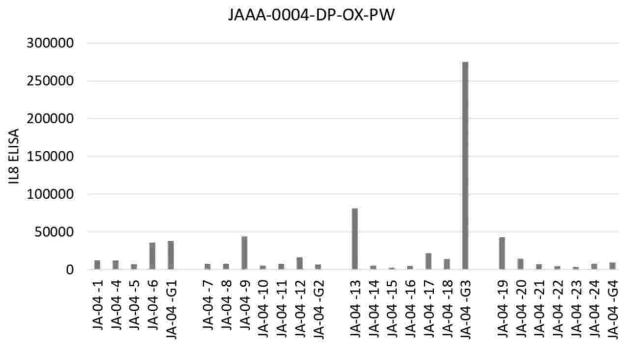
30



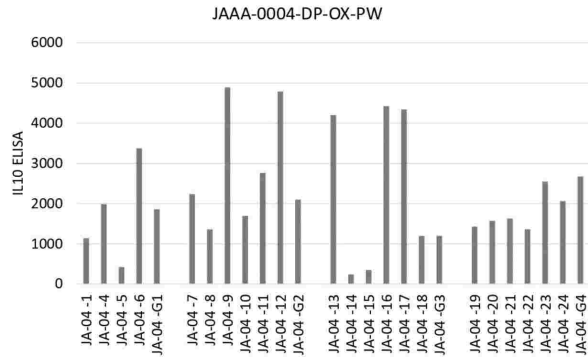
40

50

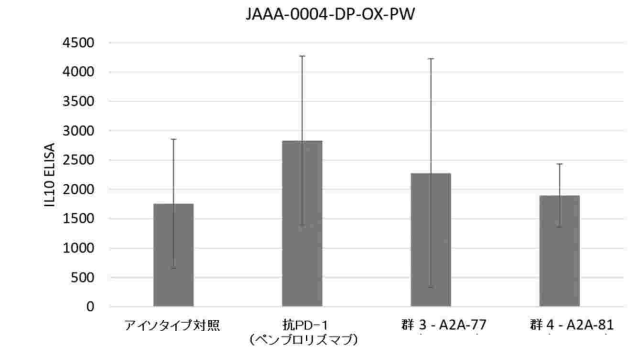
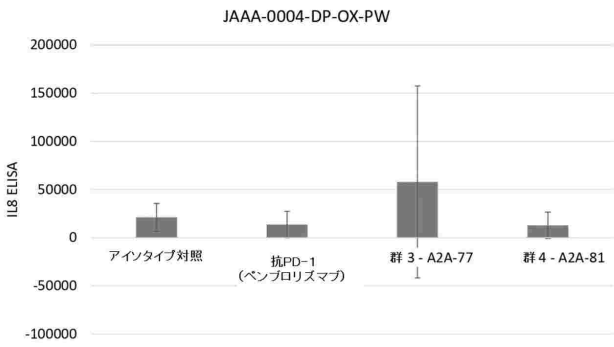
【 4 0 E 】



【 4 0 F 】

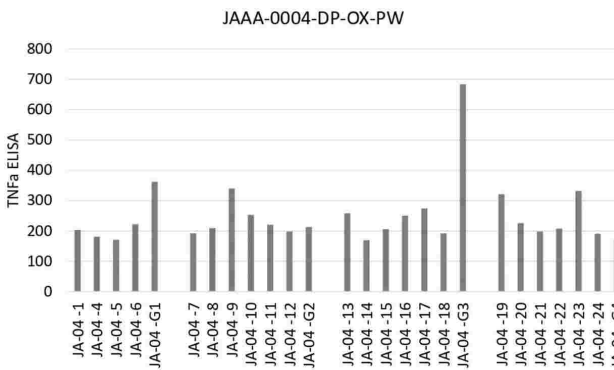


10

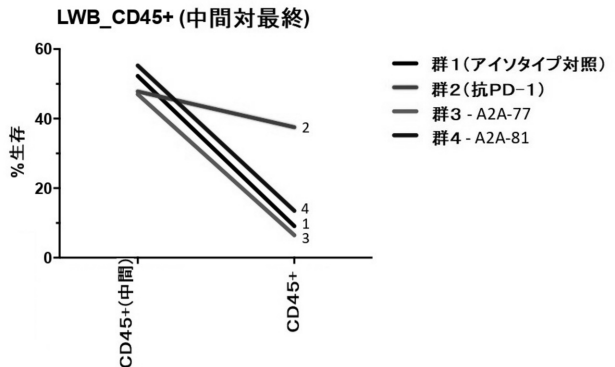


20

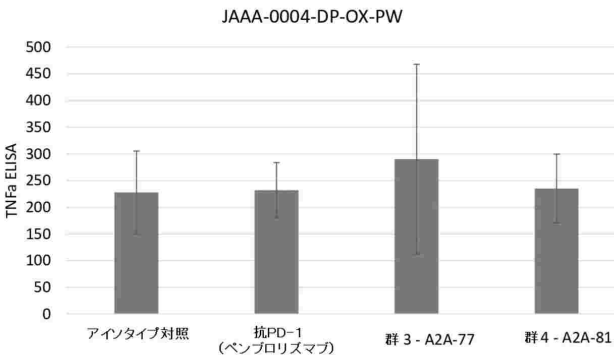
【 4 0 G 】



【 4 1 A 】



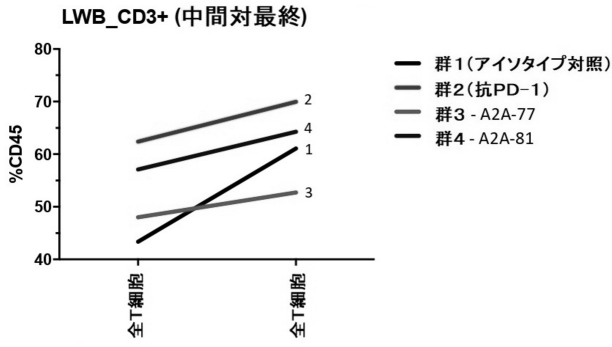
30



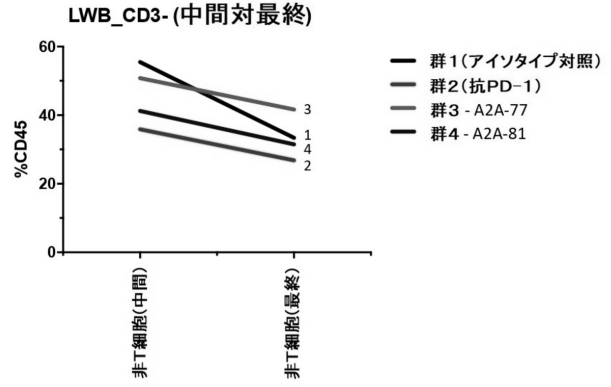
40

50

【 図 4 1 B 】

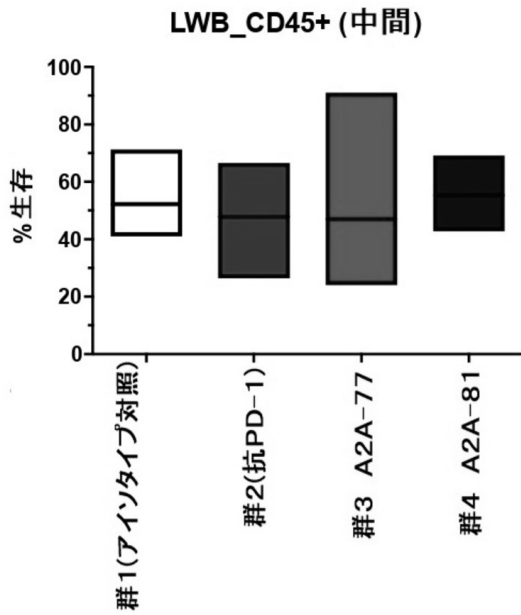


【 図 4 1 C 】

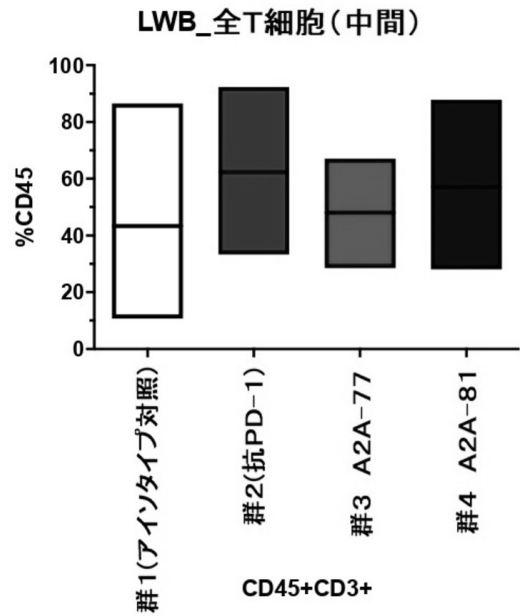


10

【 図 4 2 A 】



【 図 4 2 B 】



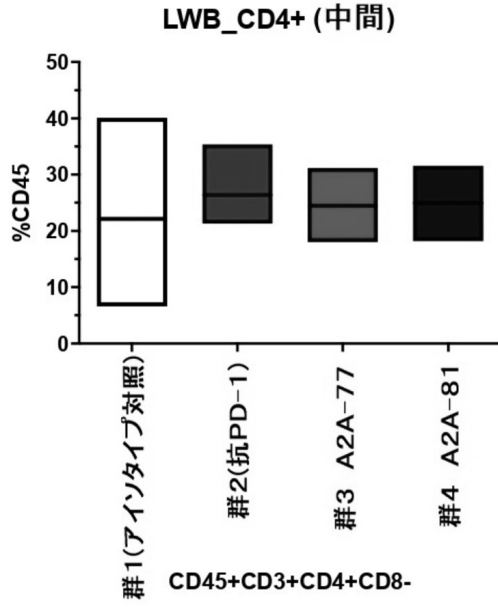
20

30

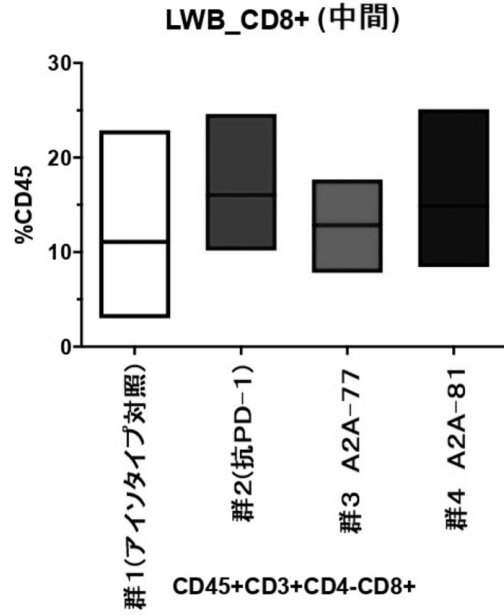
40

50

【 図 4 2 C 】



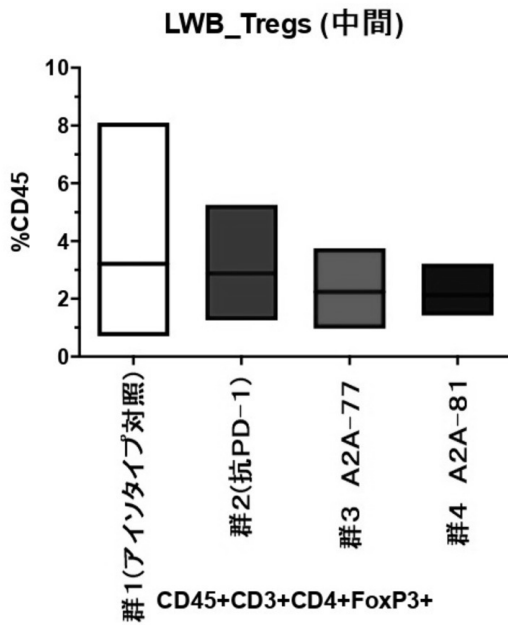
【 図 4 2 D 】



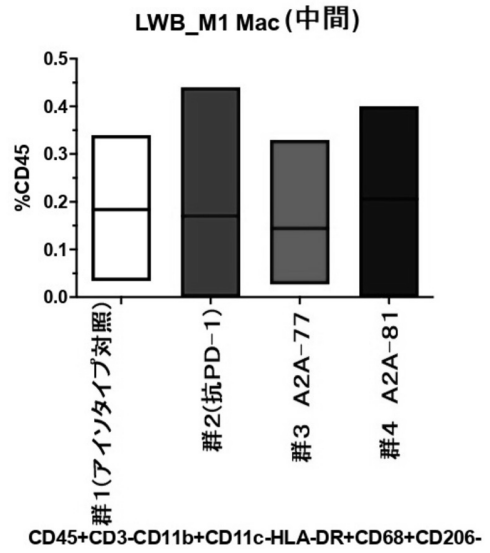
10

20

【 図 4 2 E 】



【 図 4 2 F 】

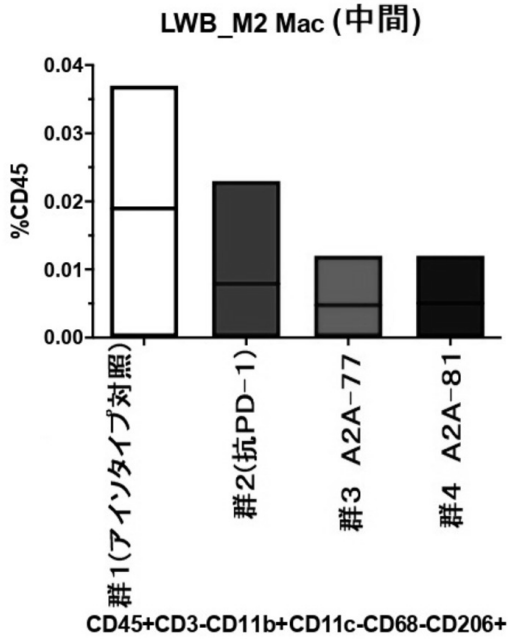


30

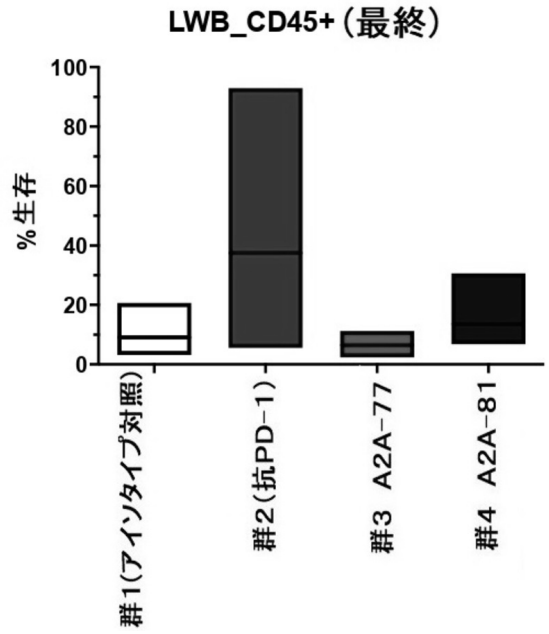
40

50

【 図 4 2 G 】



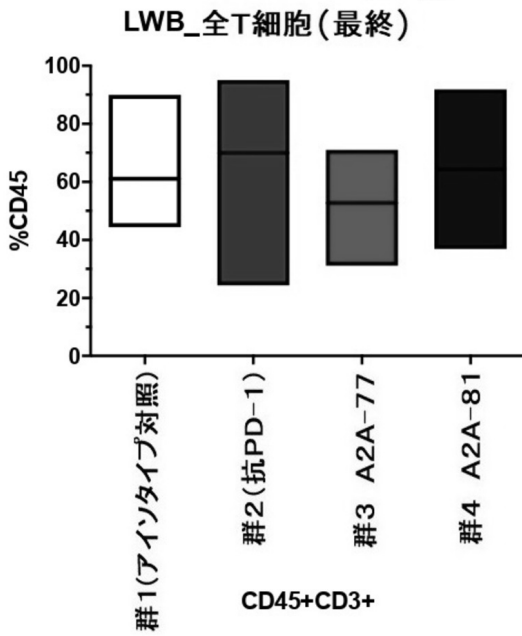
【 図 4 3 A 】



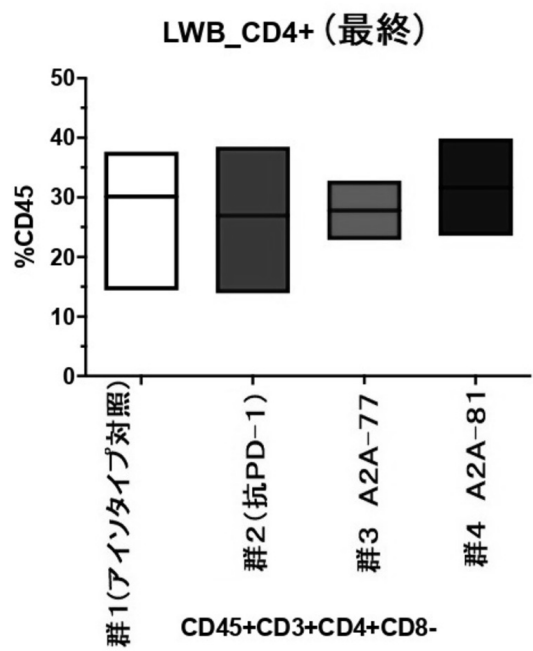
10

20

【 図 4 3 B 】



【 図 4 3 C 】

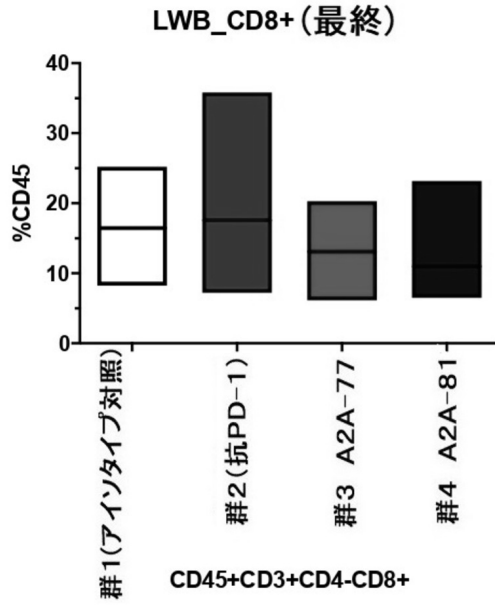


30

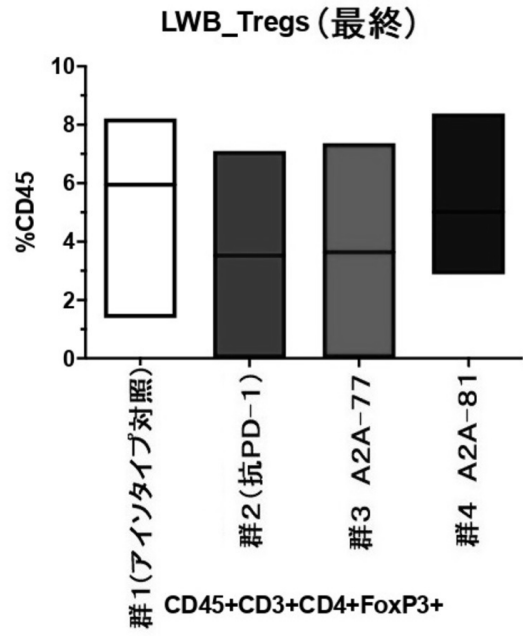
40

50

【 図 4 3 D 】



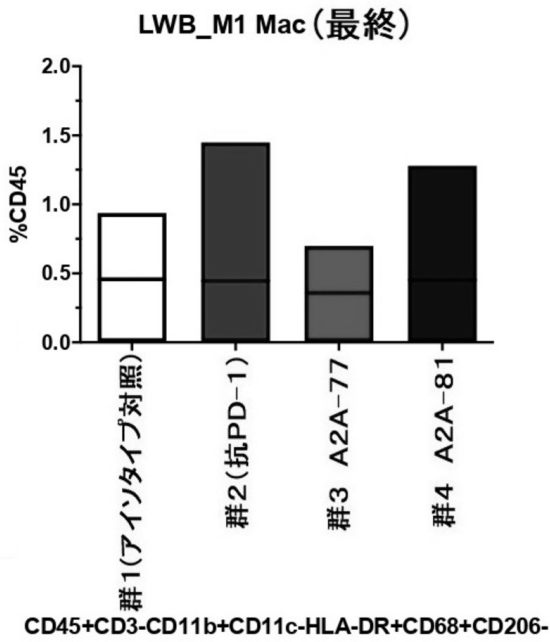
【 図 4 3 E 】



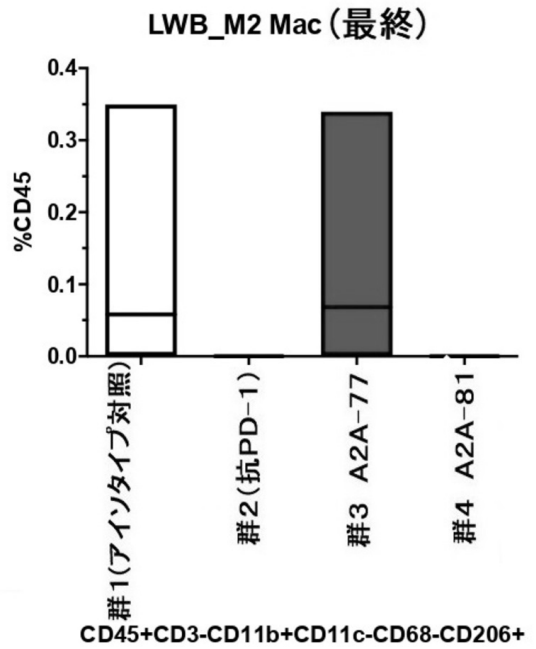
10

20

【 図 4 3 F 】



【 図 4 3 G 】

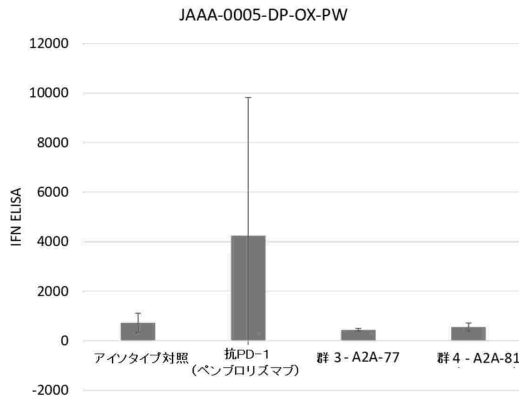
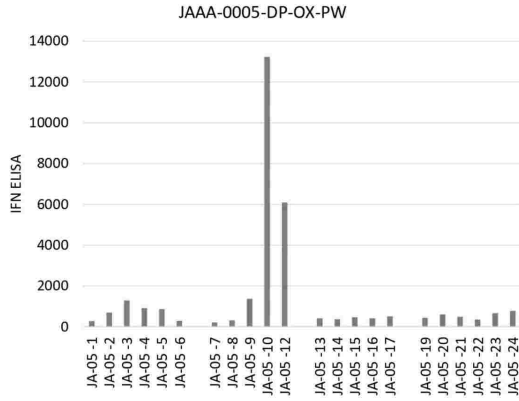


30

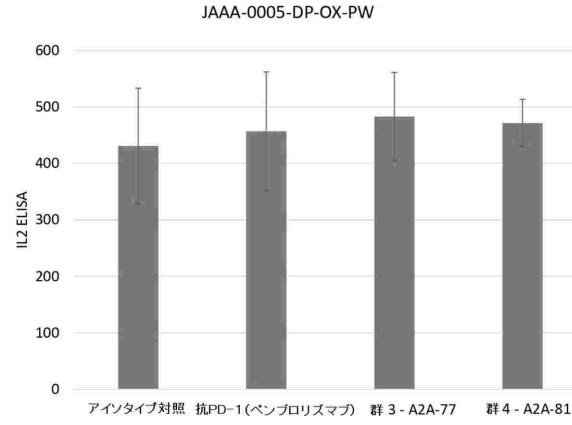
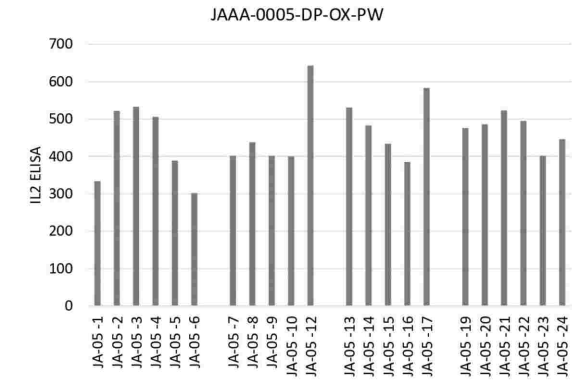
40

50

【 図 4 4 A 】



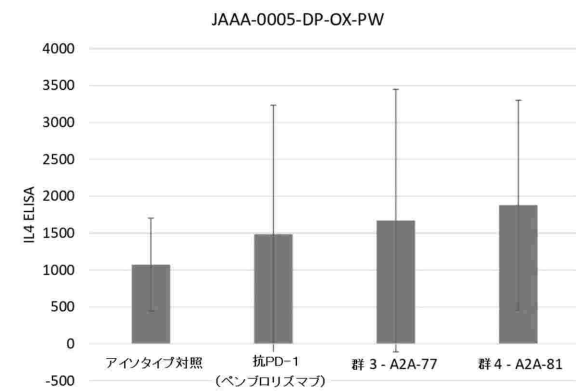
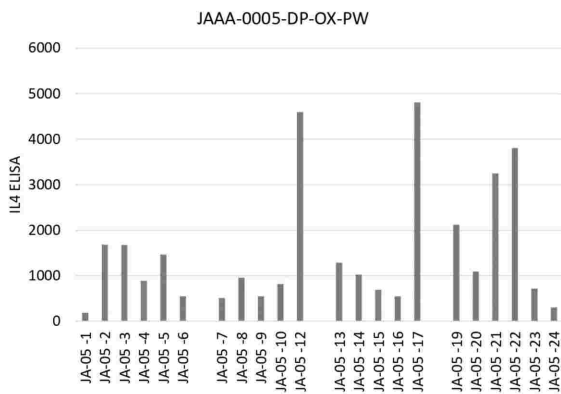
【 図 4 4 B 】



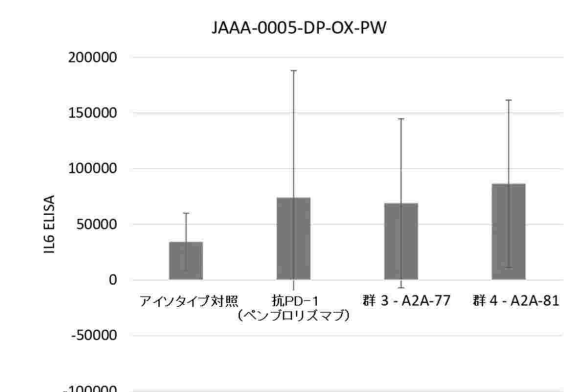
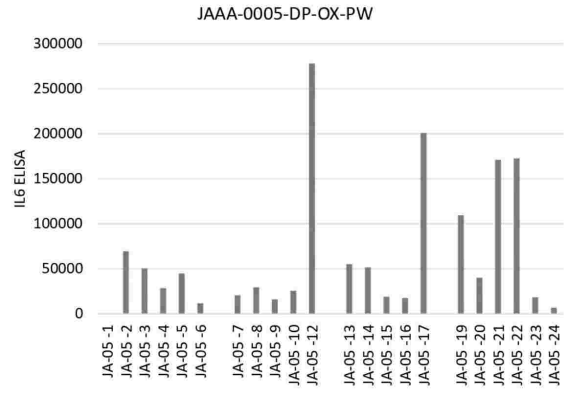
10

20

【 図 4 4 C 】



【 図 4 4 D 】

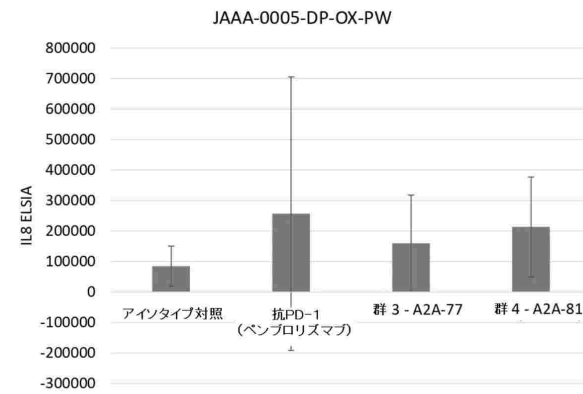
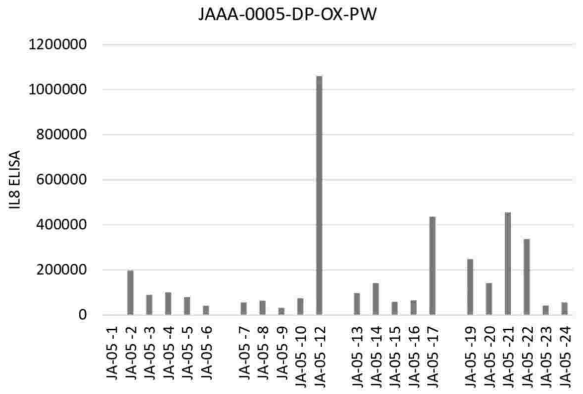


30

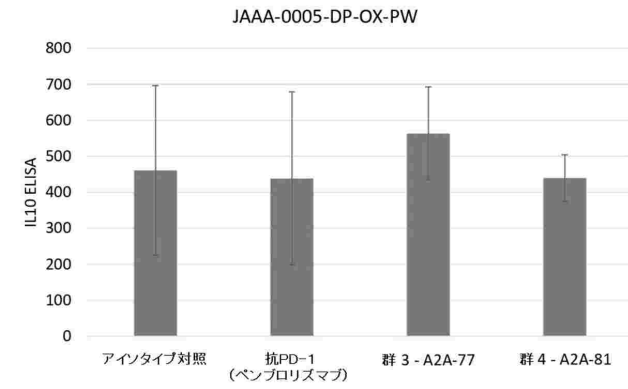
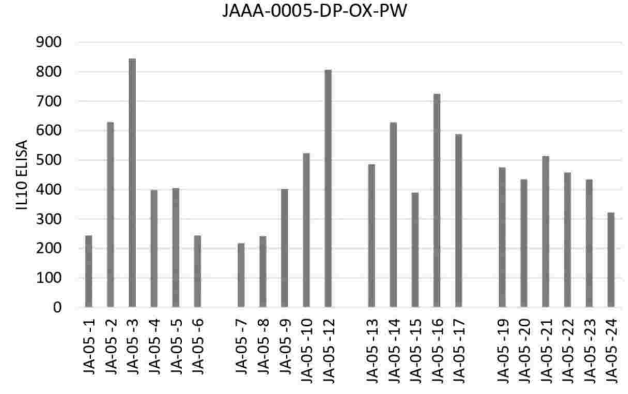
40

50

【 図 4 4 E 】



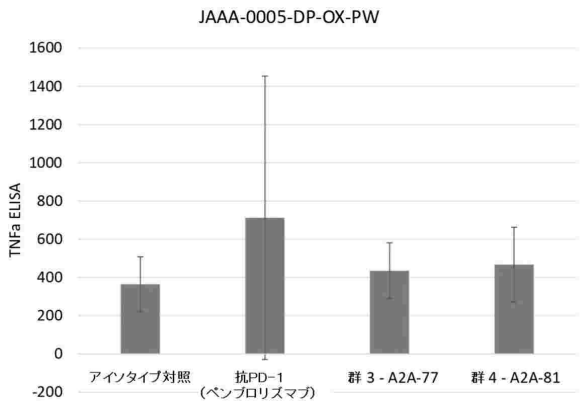
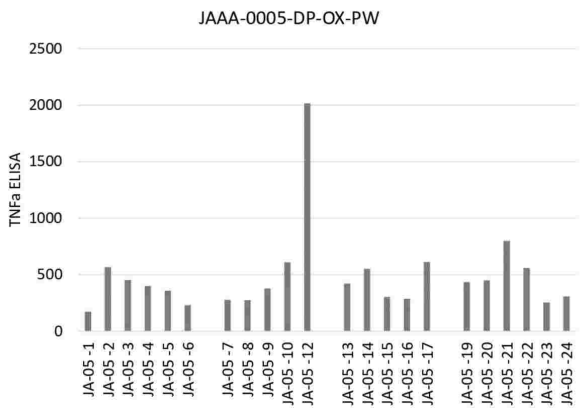
【 図 4 4 F 】



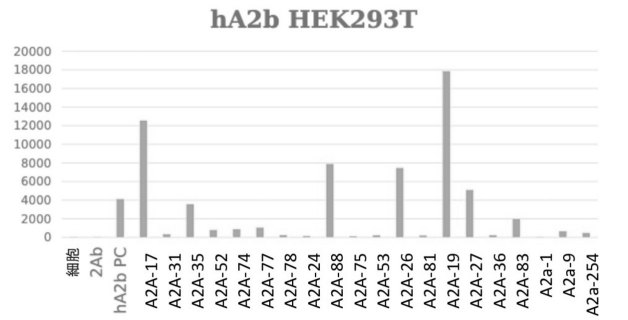
10

20

【 図 4 4 G 】



【 図 4 5 】

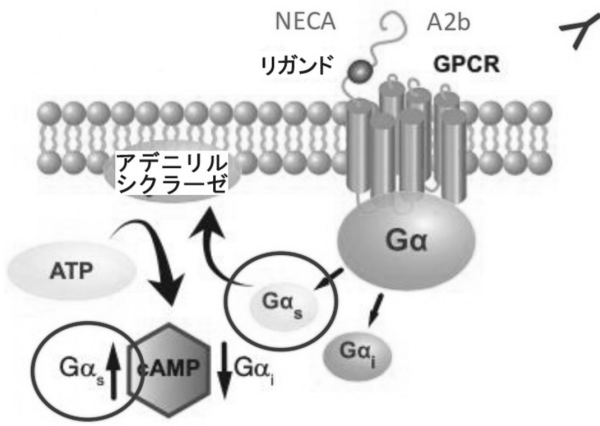


30

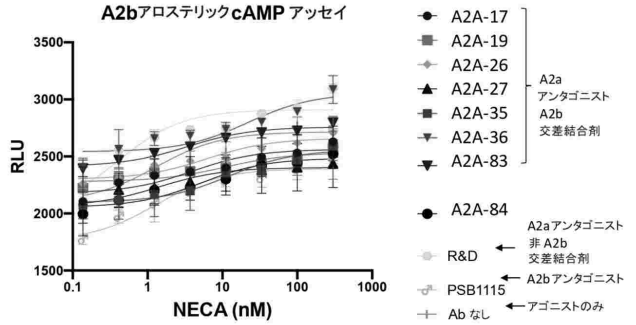
40

50

【 図 4 6 】

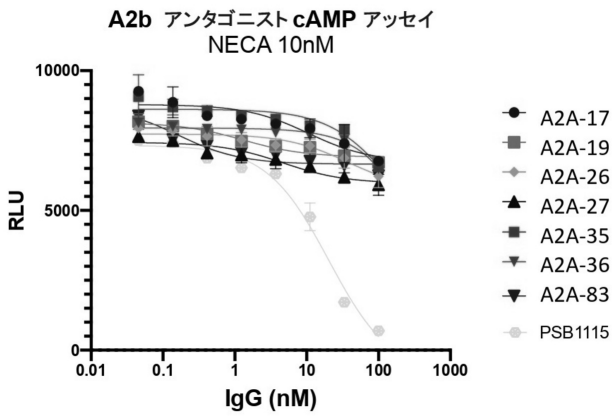


【 図 4 7 A 】

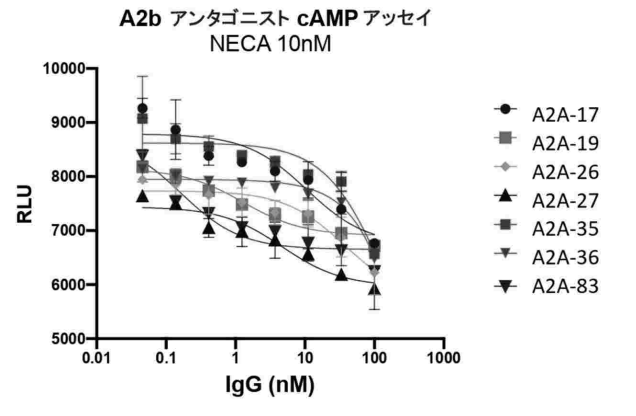


10

【 図 4 7 B 】



【 図 4 7 C 】



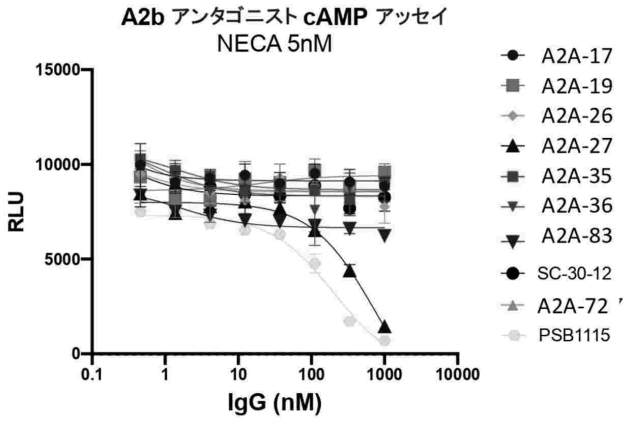
20

30

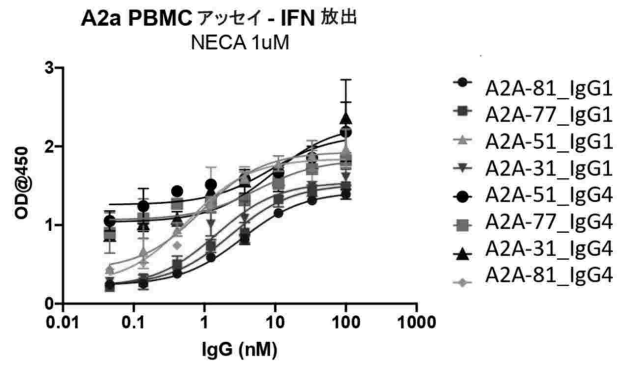
40

50

【 図 4 7 D 】

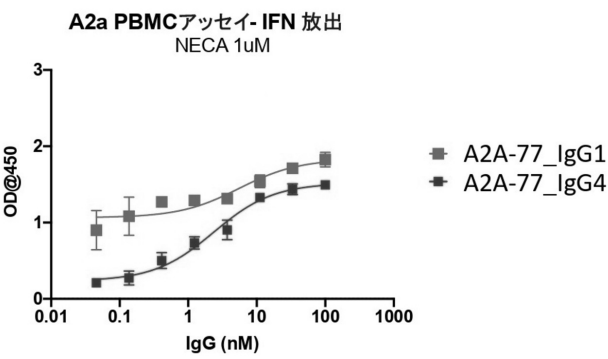


【 図 4 8 A 】

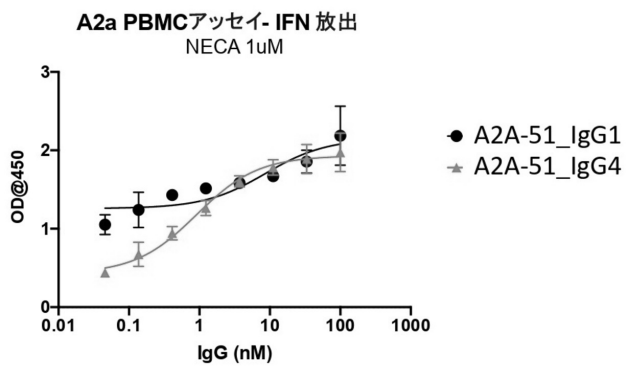


10

【 図 4 8 B 】

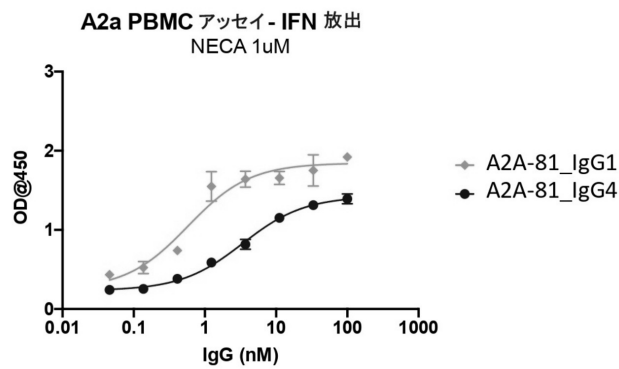


【 図 4 8 C 】

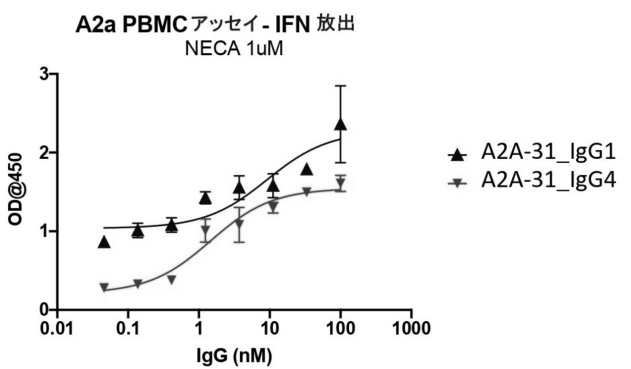


20

【 図 4 8 D 】



【 図 4 8 E 】

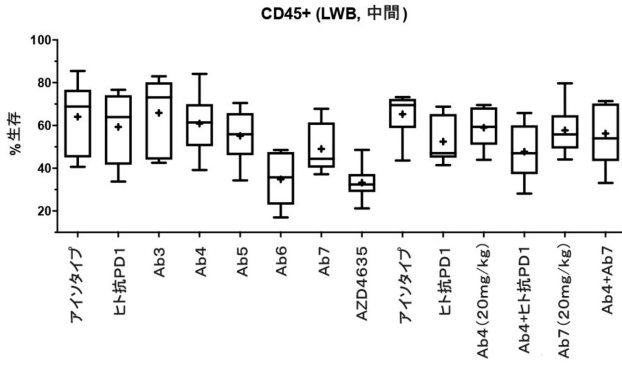


30

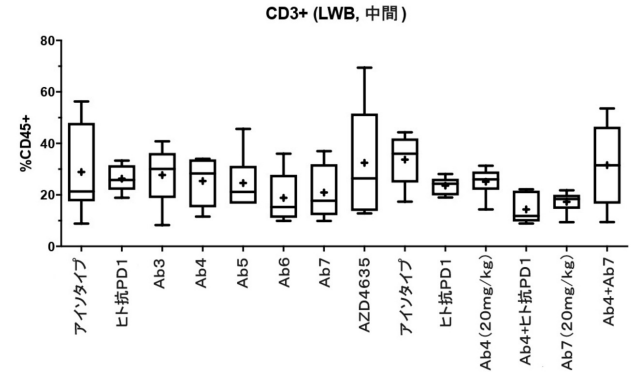
40

50

【 図 4 9 A 】

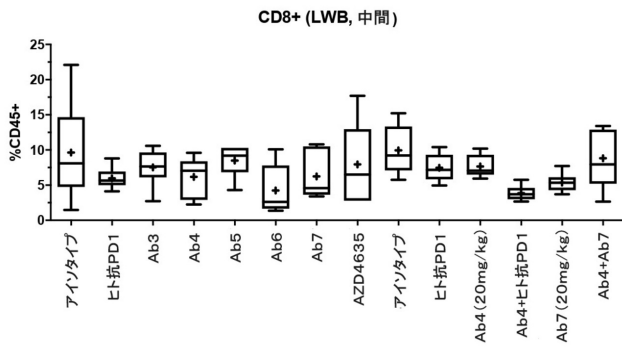


【 図 4 9 B 】

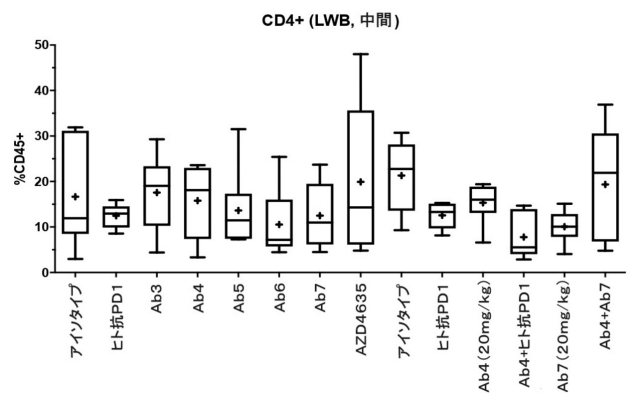


10

【 図 4 9 C 】

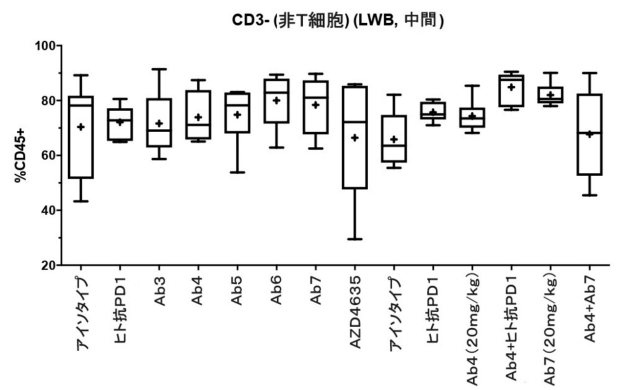


【 図 4 9 D 】

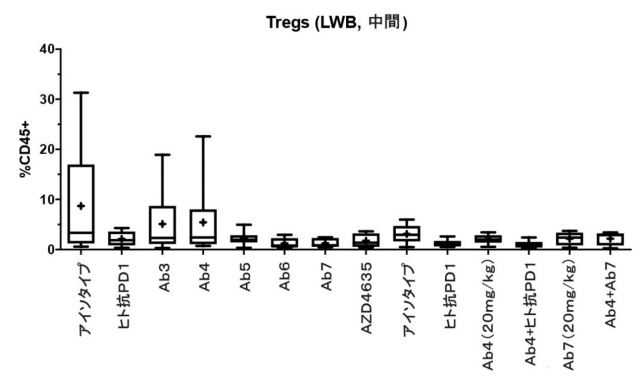


20

【 図 4 9 E 】



【 図 4 9 F 】

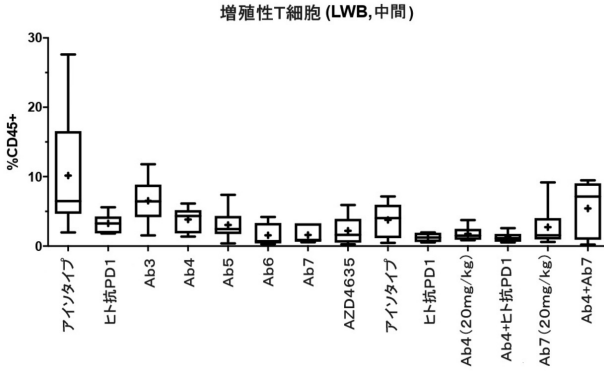


30

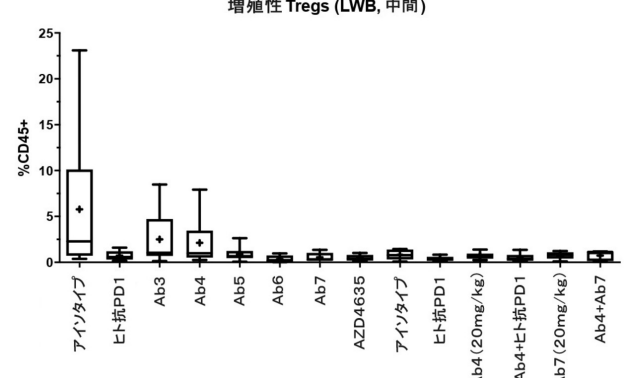
40

50

【 4 9 G 】

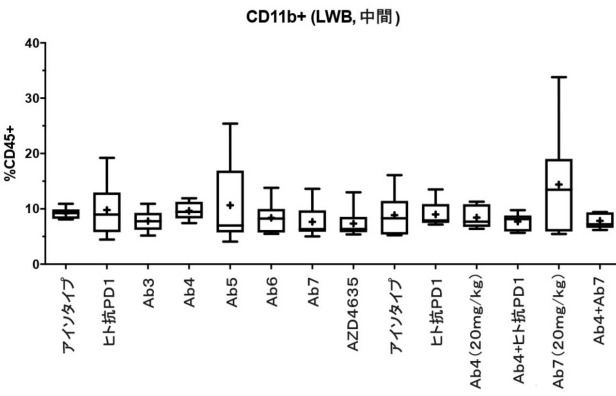


【 4 9 H 】

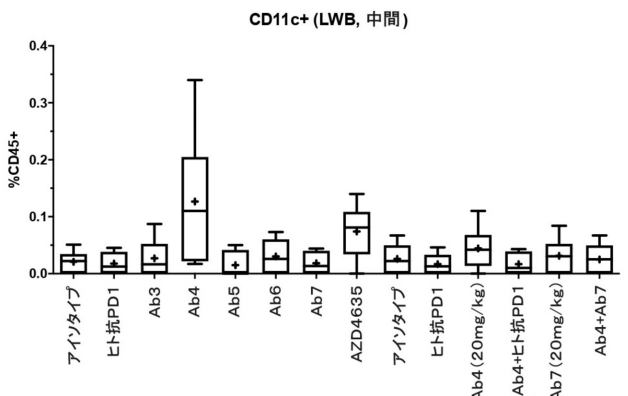


10

【 4 9 I 】



【 4 9 J 】



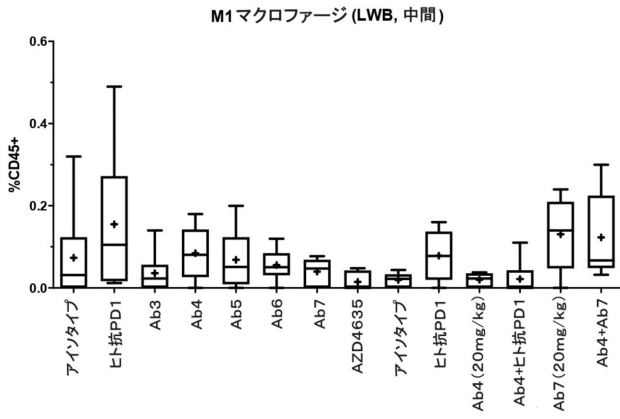
20

30

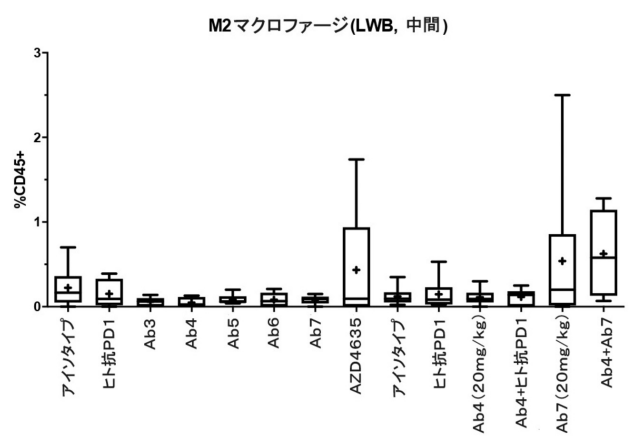
40

50

【 図 4 9 K 】

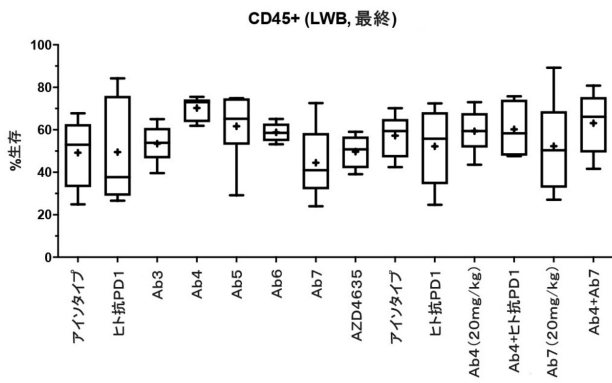


【 図 4 9 L 】

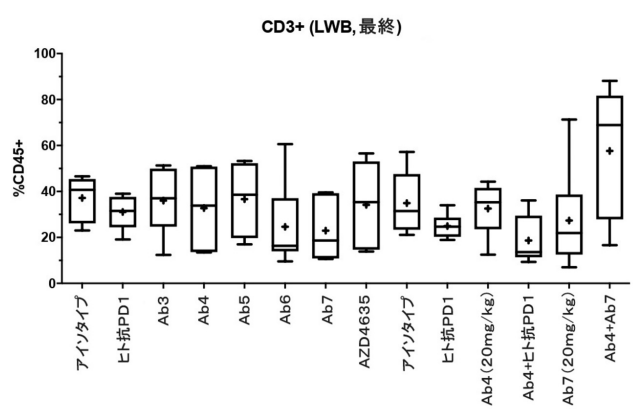


10

【 図 5 0 A 】



【 図 5 0 B 】



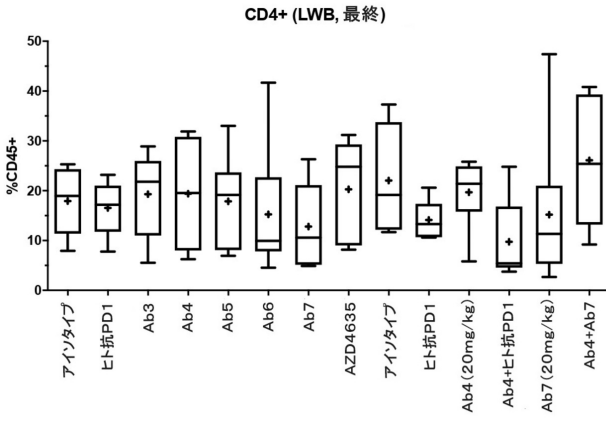
20

30

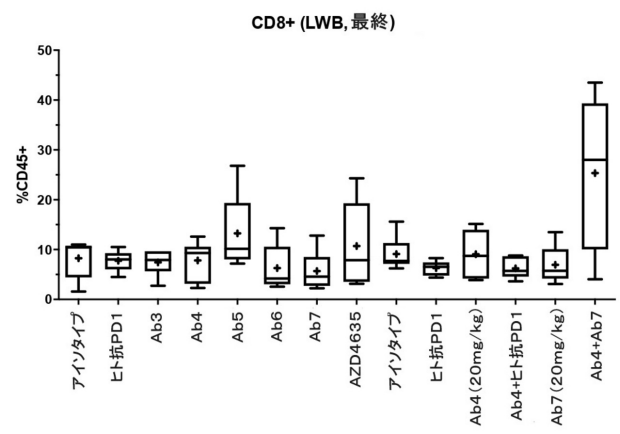
40

50

【 図 5 0 C 】

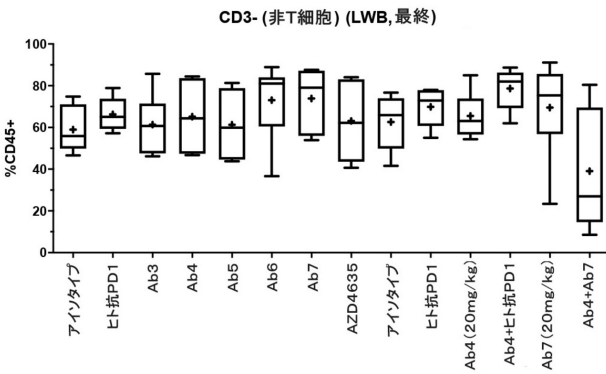


【 図 5 0 D 】

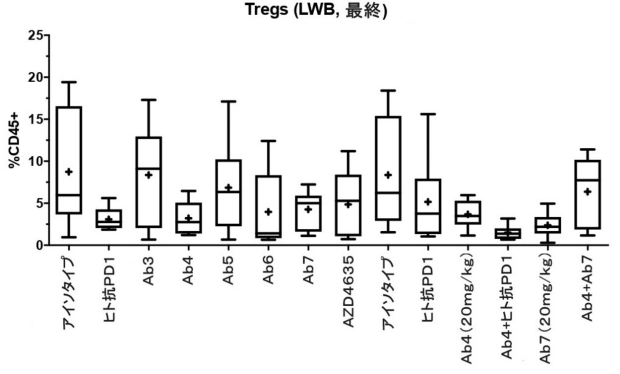


10

【 図 5 0 E 】



【 図 5 0 F 】



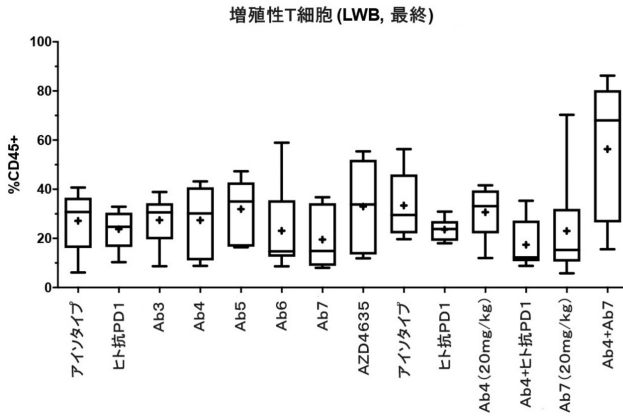
20

30

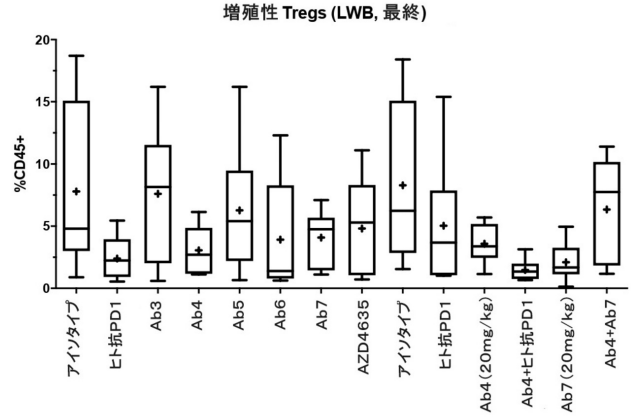
40

50

【 図 5 0 G 】

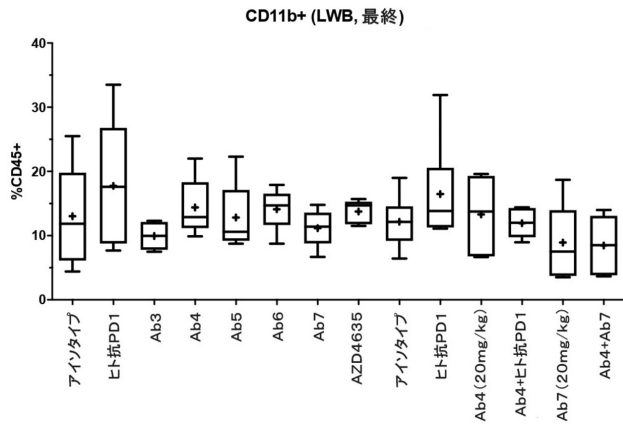


【 図 5 0 H 】

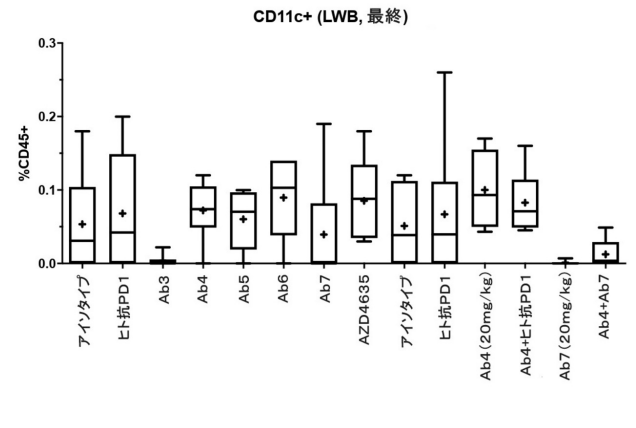


10

【 図 5 0 I 】



【 図 5 0 J 】



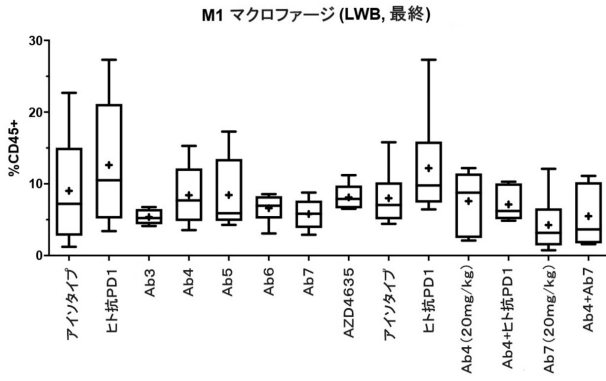
20

30

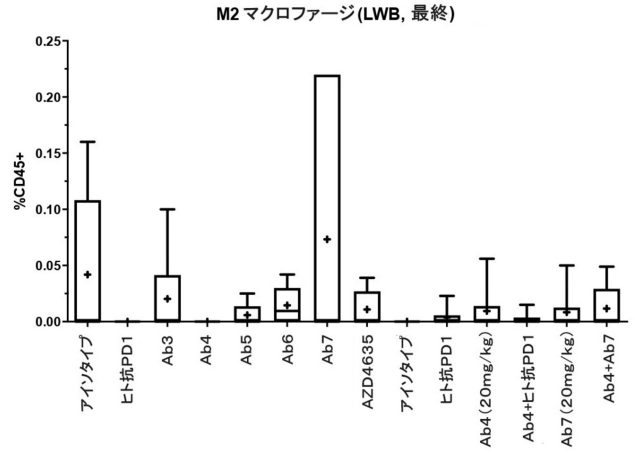
40

50

【 図 5 0 K 】

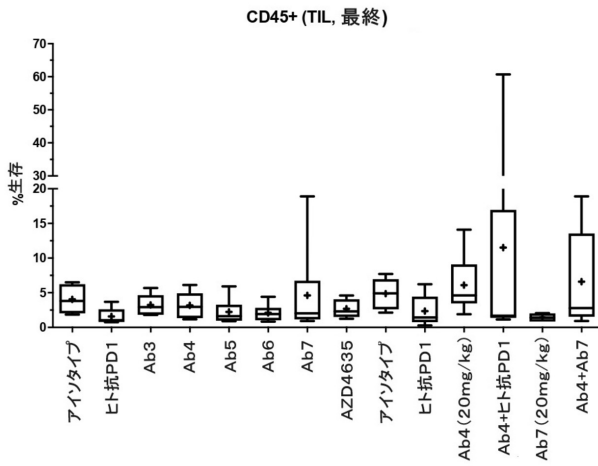


【 図 5 0 L 】

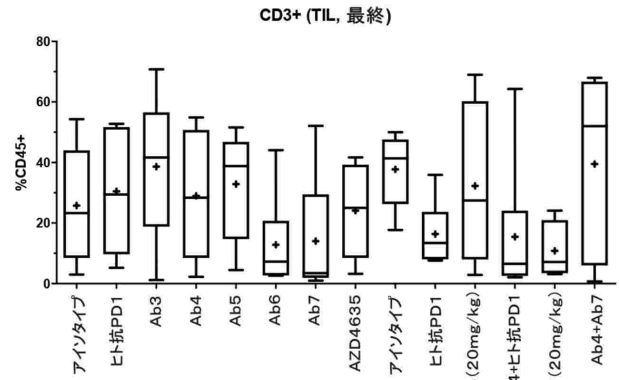


10

【 図 5 1 A 】



【 図 5 1 B 】



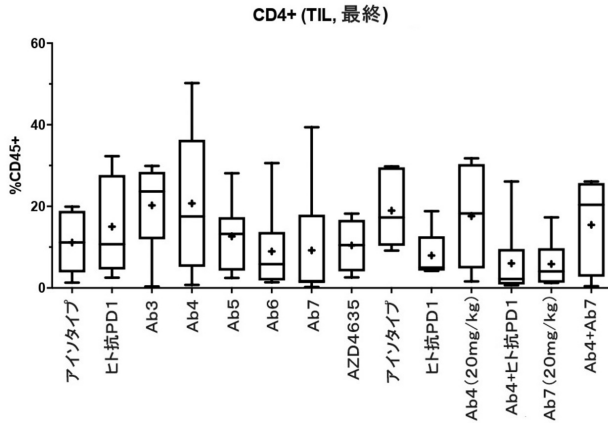
20

30

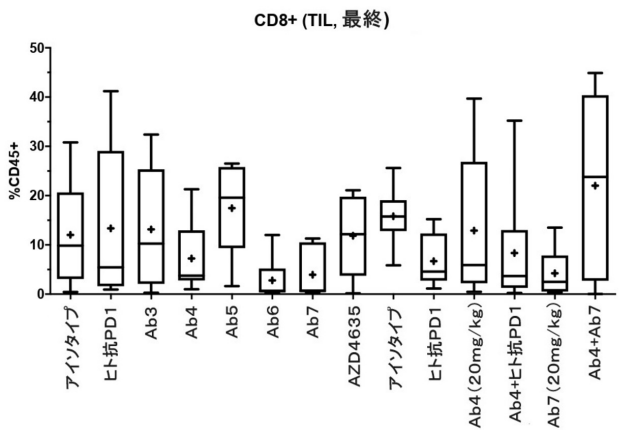
40

50

【 図 5 1 C 】

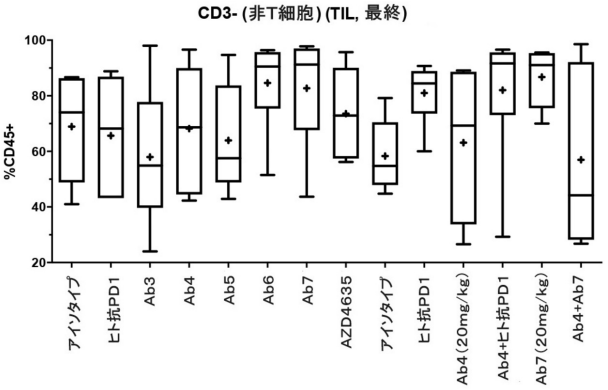


【 図 5 1 D 】

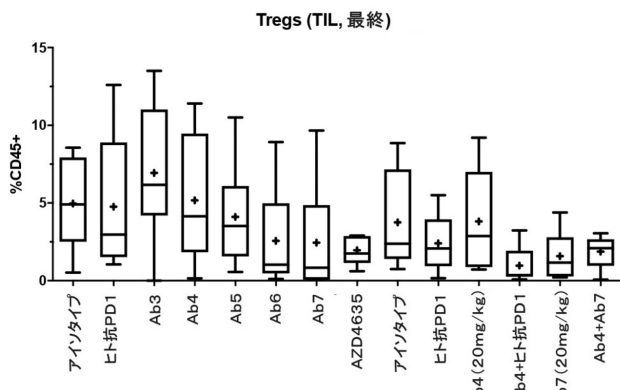


10

【 図 5 1 E 】



【 図 5 1 F 】



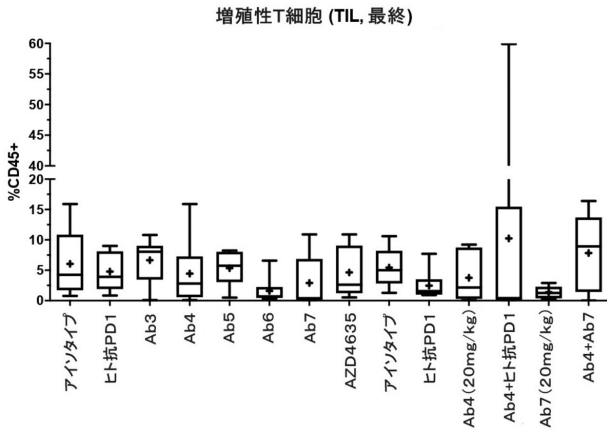
20

30

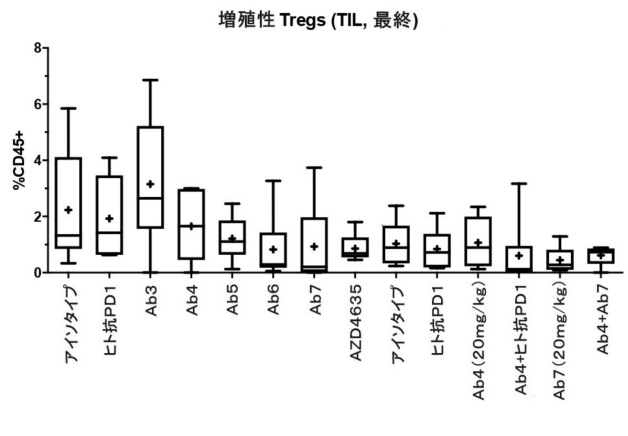
40

50

【 図 5 1 G 】

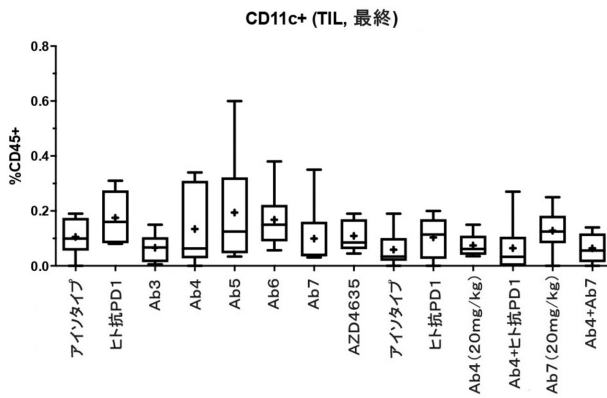


【 図 5 1 H 】

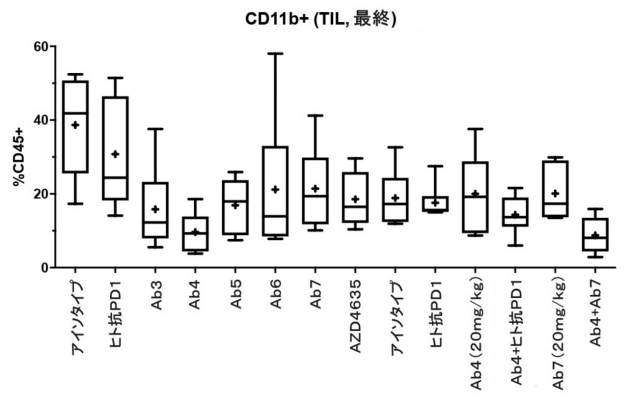


10

【 図 5 1 I 】

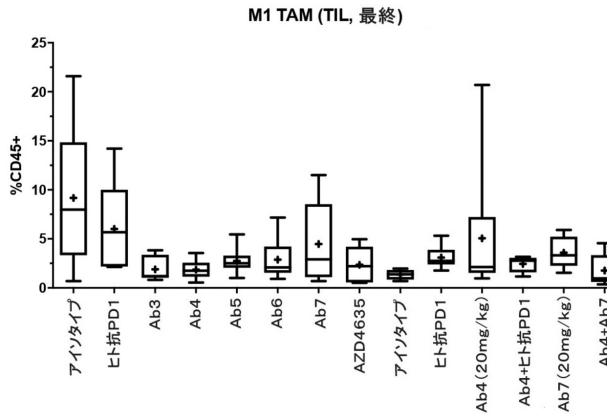


【 図 5 1 J 】

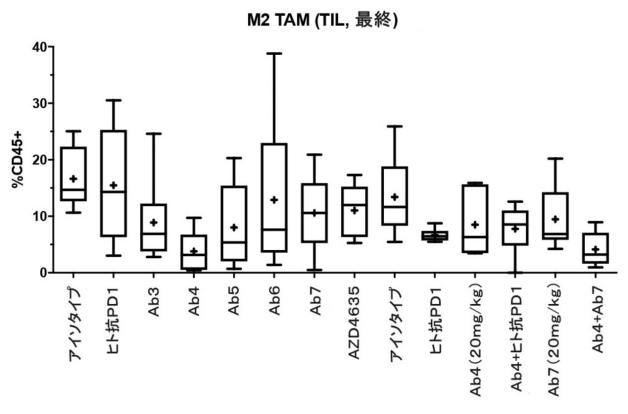


20

【 図 5 1 K 】



【 図 5 1 L 】

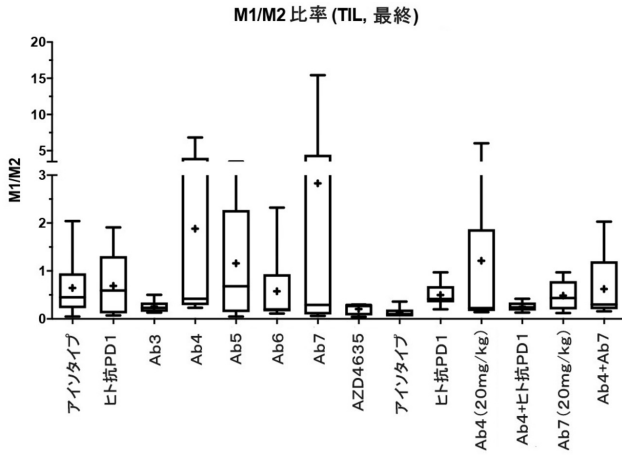


30

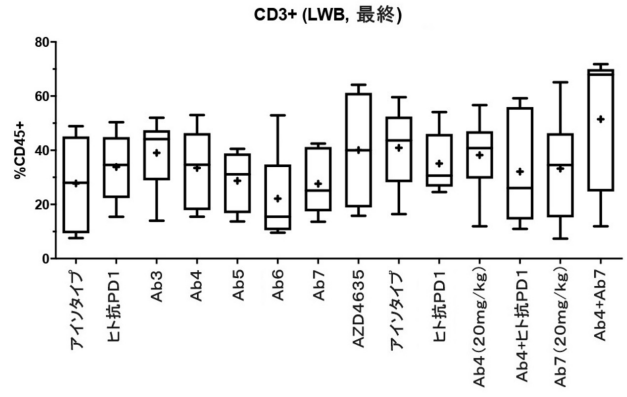
40

50

【 図 5 1 M 】

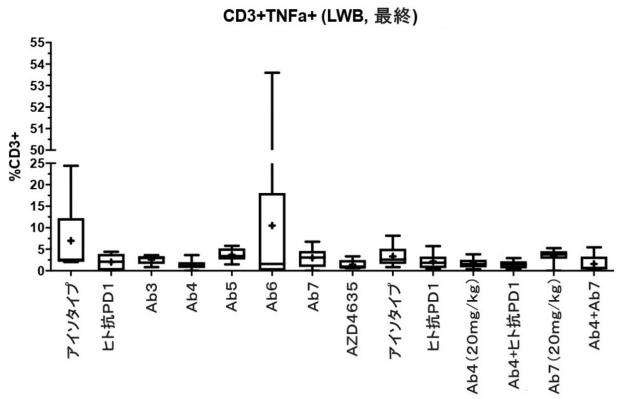


【 図 5 2 A 】

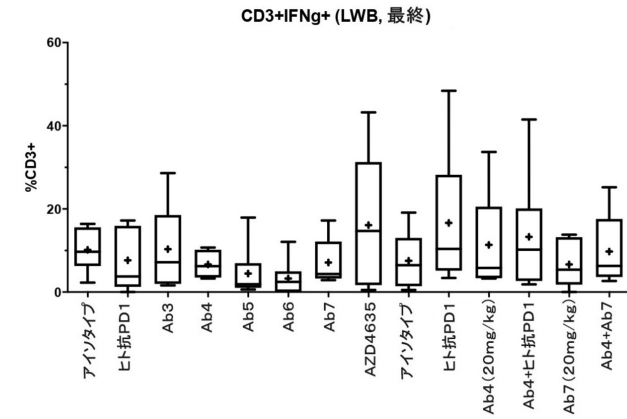


10

【 図 5 2 B 】



【 図 5 2 C 】



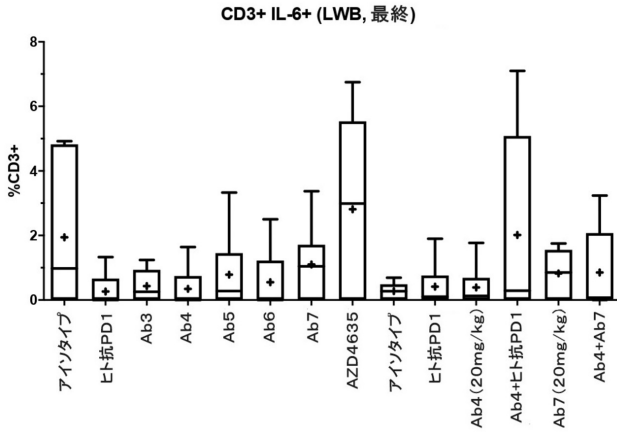
20

30

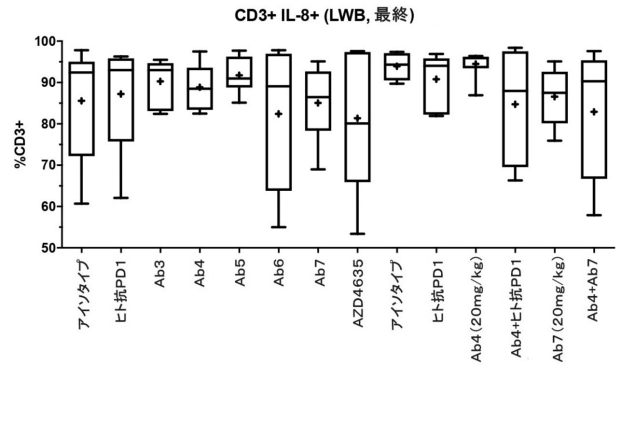
40

50

【 図 5 2 D 】

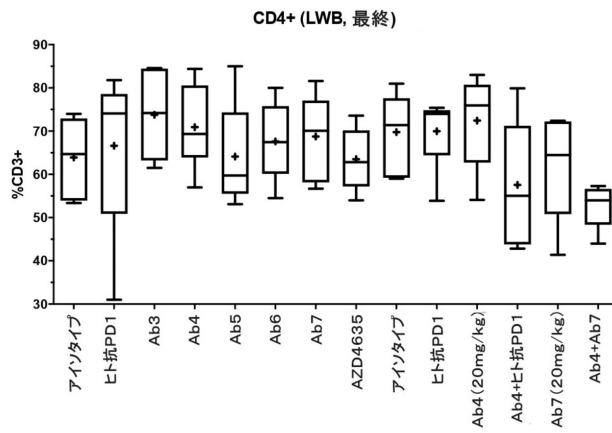


【 図 5 2 E 】

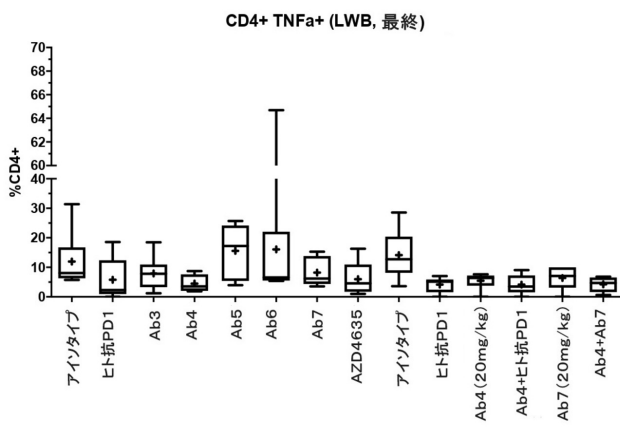


10

【 図 5 3 A 】

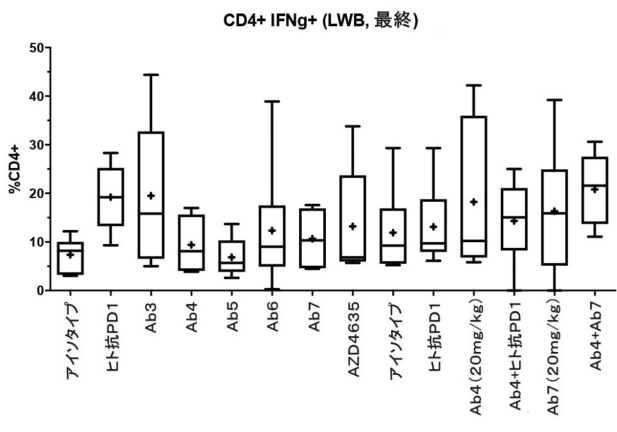


【 図 5 3 B 】

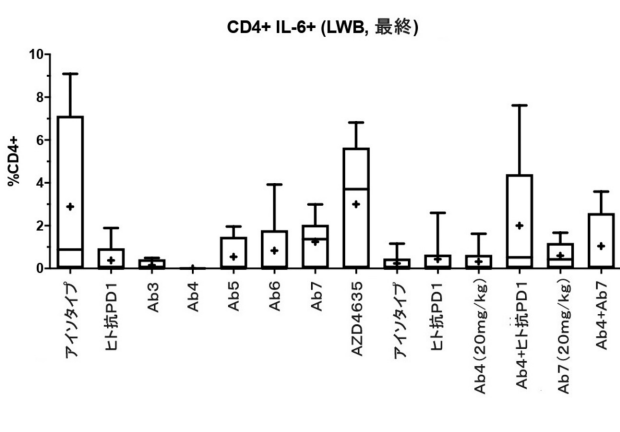


20

【 図 5 3 C 】



【 図 5 3 D 】

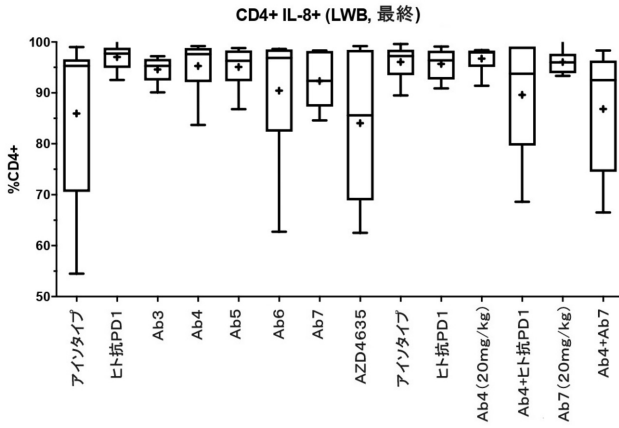


30

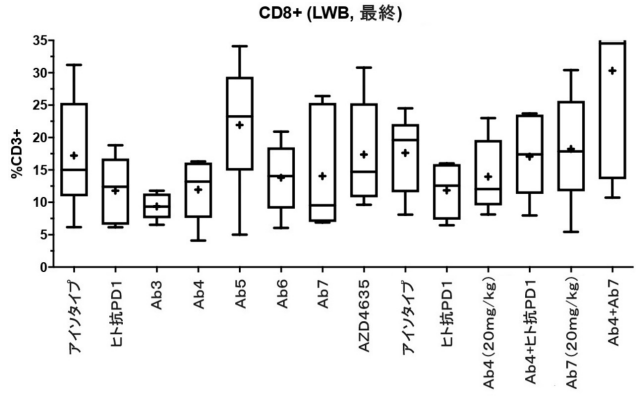
40

50

【 図 5 3 E 】

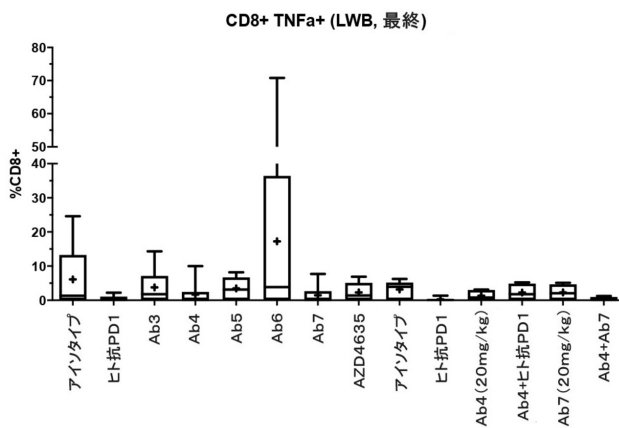


【 図 5 4 A 】

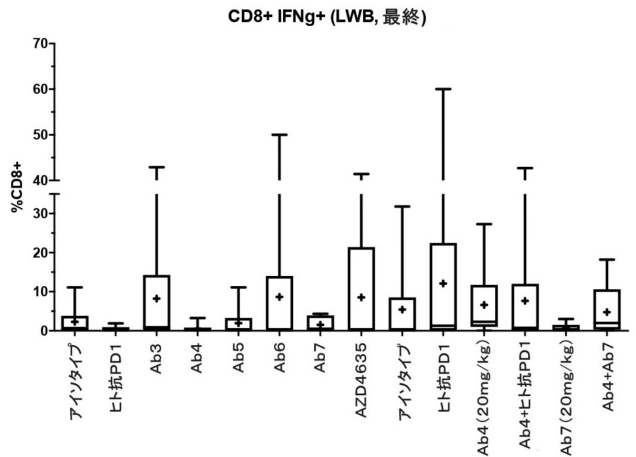


10

【 図 5 4 B 】



【 図 5 4 C 】



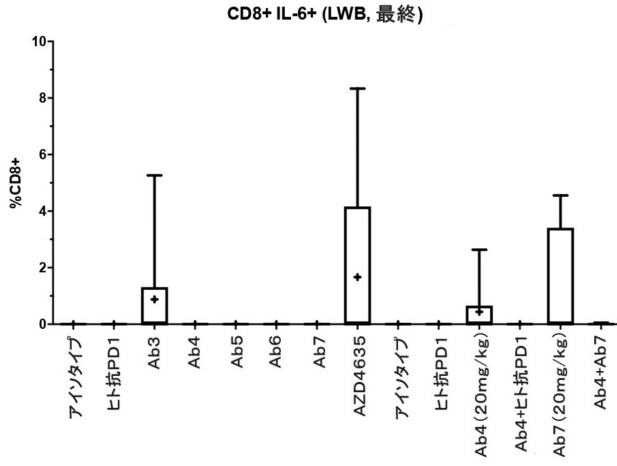
20

30

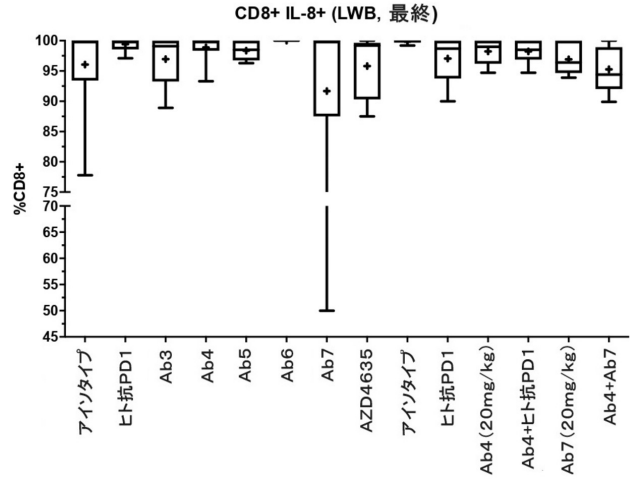
40

50

【 図 5 4 D 】

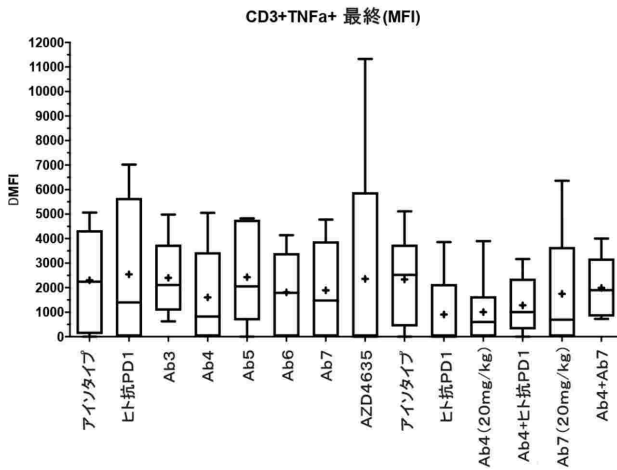


【 図 5 4 E 】

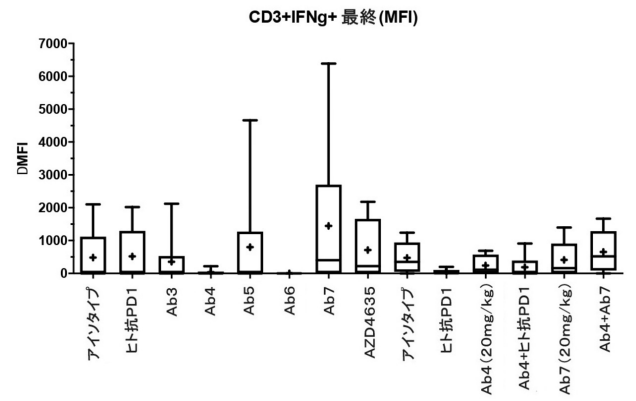


10

【 図 5 5 A 】



【 図 5 5 B 】



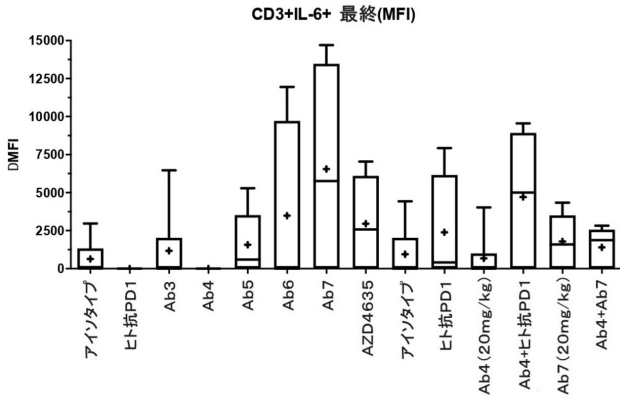
20

30

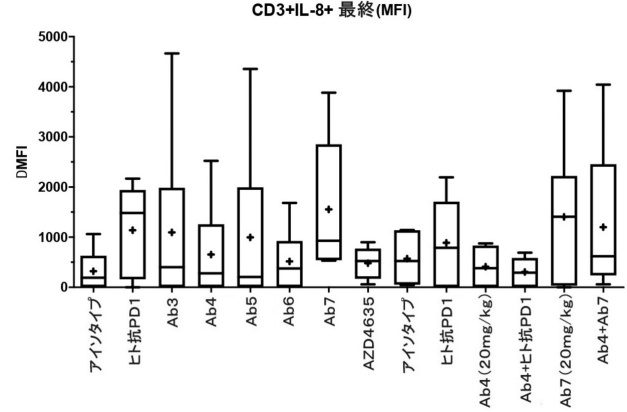
40

50

【 図 5 5 C 】

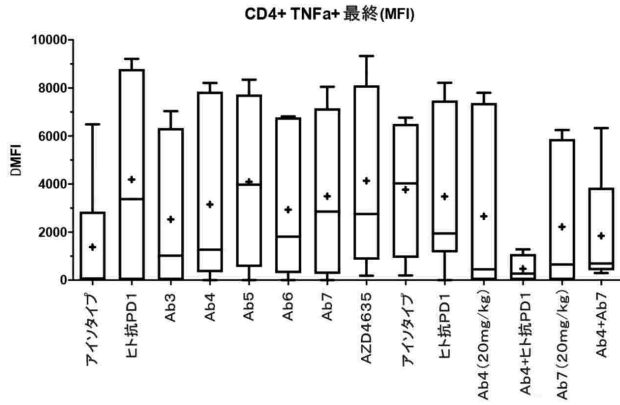


【 図 5 5 D 】

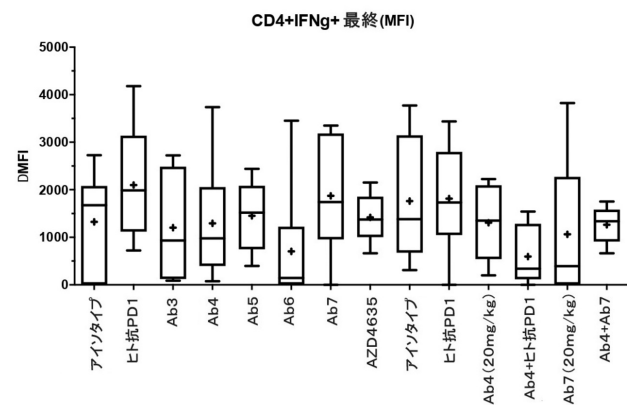


10

【 図 5 6 A 】



【 図 5 6 B 】



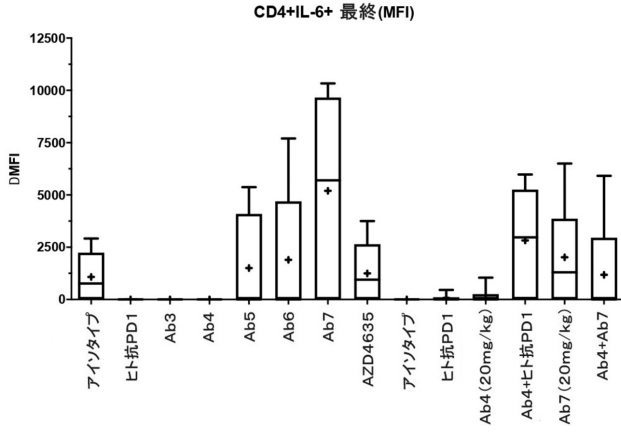
20

30

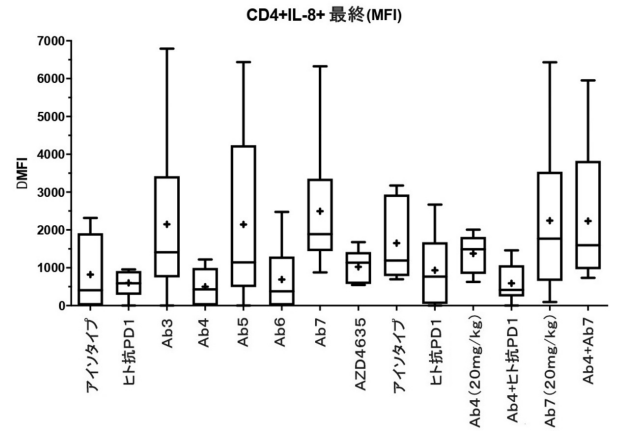
40

50

【 図 5 6 C 】

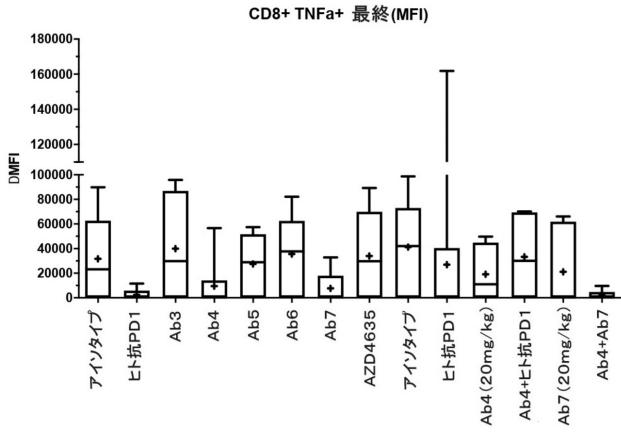


【 図 5 6 D 】

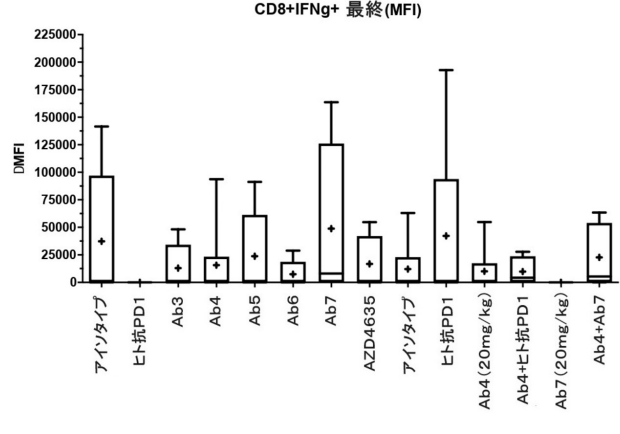


10

【 図 5 7 A 】



【 図 5 7 B 】



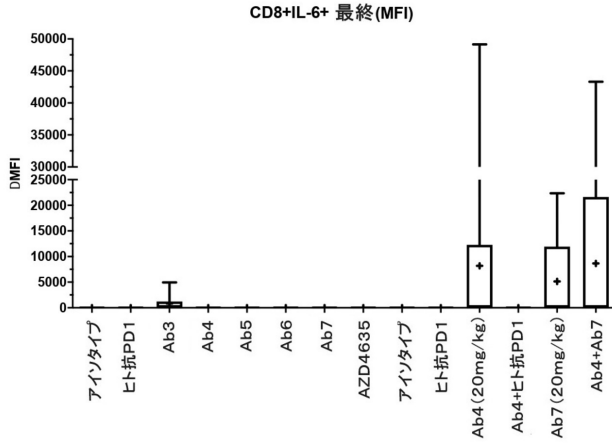
20

30

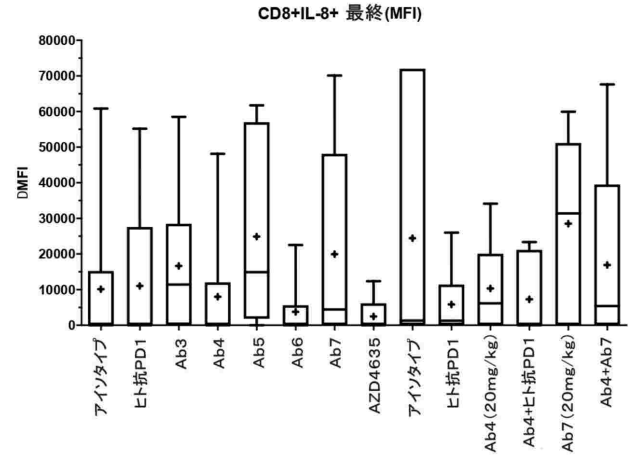
40

50

【 57C 】

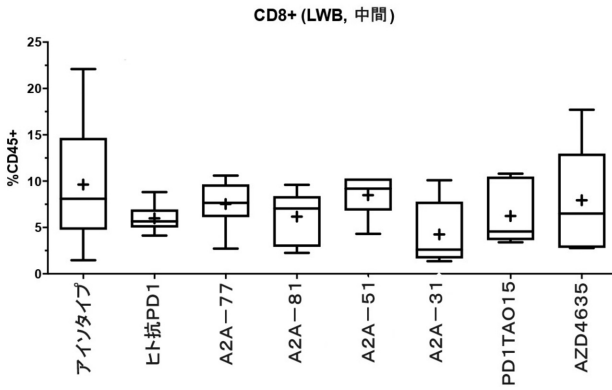


【 57D 】

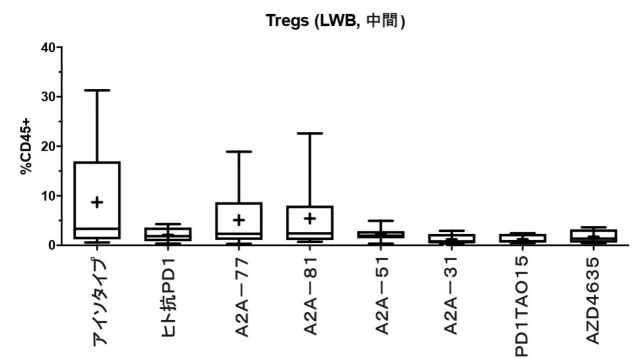


10

【 58A 】



【 58B 】



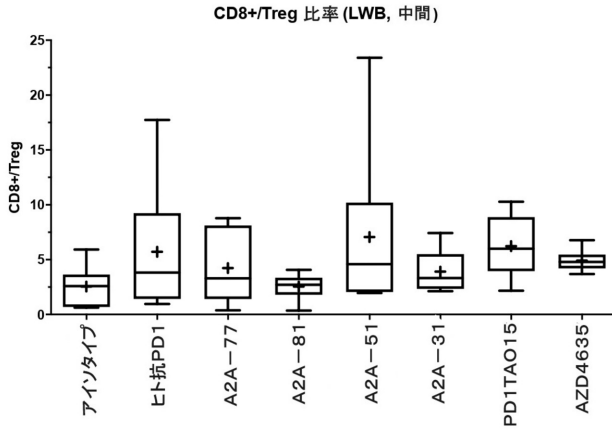
20

30

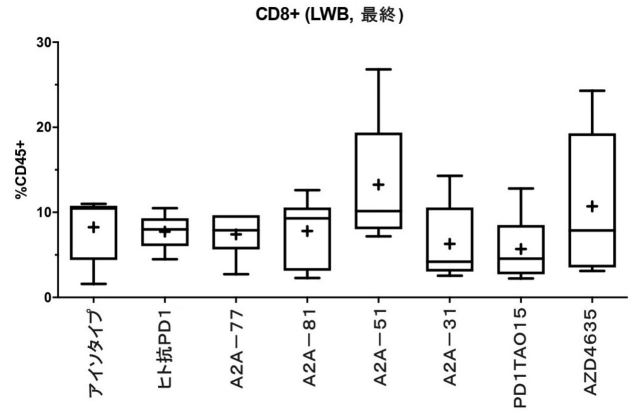
40

50

【 図 5 8 C 】

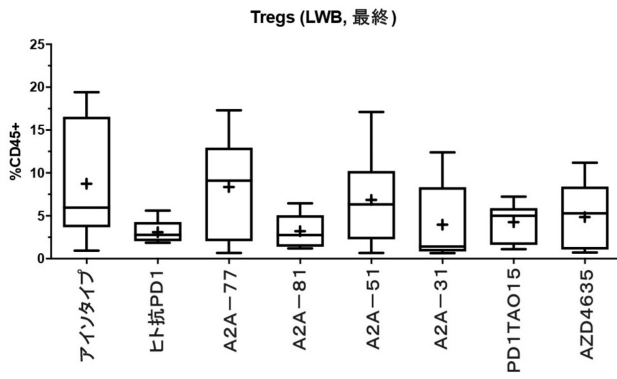


【 図 5 9 A 】

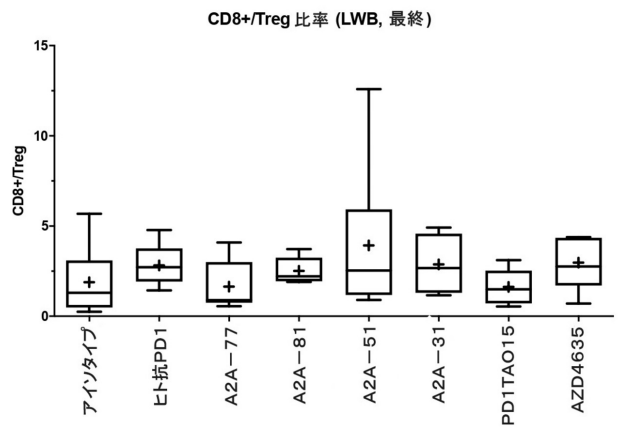


10

【 図 5 9 B 】



【 図 5 9 C 】



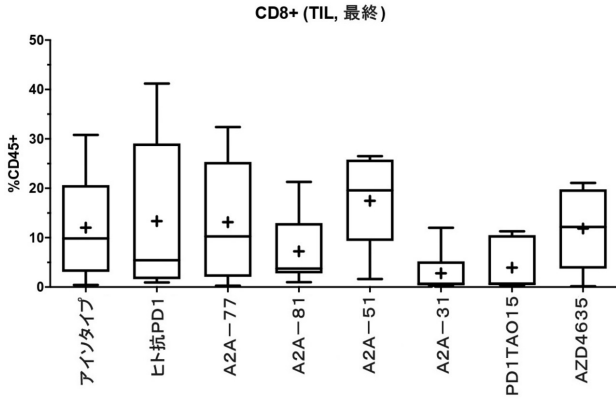
20

30

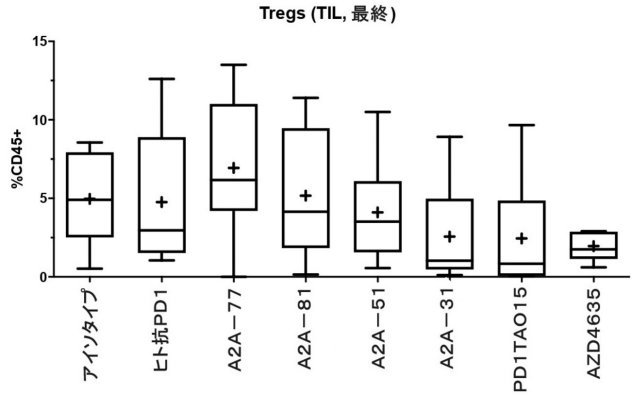
40

50

【 図 6 0 A 】

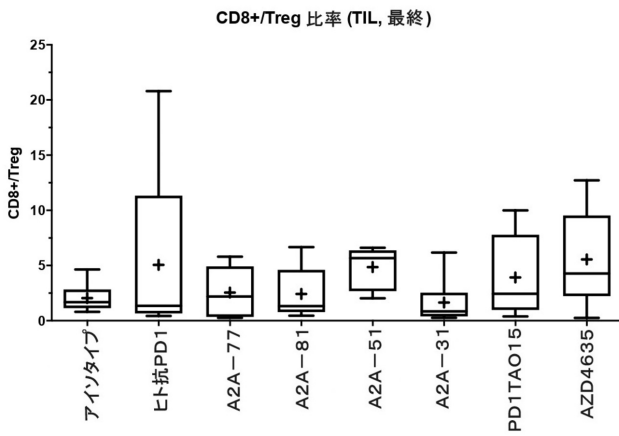


【 図 6 0 B 】



10

【 図 6 0 C 】



20

【 配列表 】

2024504384000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2022/013184

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/28; C07K 16/46; C07K 19/00; C12N 15/09; C12N 15/13 (2022.01)  
 CPC - A61K 39/39541; A61K 2039/505; C07K 16/28; C07K 2317/24; C07K 2317/565; C07K 2317/76;  
 C07K 2317/92 (2022.05)

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	US 2019/0382481 A1 (JANSSEN BIOTECH INC.) 19 December 2019 (19.12.2019) entire document	1, 4, 13, 16
A	US 2015/0388349 A1 (4-ANTIBODY AG et al) 24 December 2015 (24.12.2015) entire document	1, 4-8, 13, 16-20
A	US 2017/0315140 A1 (UNIVERSITE D'AIX MARSEILLE et al) 02 November 2017 (02.11.2017) entire document	1, 4-8, 13, 16-20
A	US 2003/0170238 A1 (GRUENBERG et al) 11 September 2003 (11.09.2003) entire document	1, 4-8, 13, 16-20
A	US 2020/0102390 A1 (TIZONA THERAPEUTICS) 02 April 2020 (02.04.2020) entire document	1, 4-8, 13, 16-20
P, X	US 2021/0179724 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORPORATION) 17 June 2021 (17.06.2021) entire document	1, 4-8, 13, 16-20

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  
26 May 2022

Date of mailing of the international search report  
JUN 15 2022

Name and mailing address of the ISA/US  
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer  
Taina Matos

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/013184

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:

10

- 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.

20

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 6 and 35 were searched.

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/013184

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.: 9-12, 21-24  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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:  
See extra sheet(s).

- 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, 4-8, 13, 16-20

30

40

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/US2022/013184

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 need to be paid.

Group I+: claims 1-8 and 13-20 are drawn to an antibody or antibody fragment, and a method for activating T cells, comprising administering the antibody or antibody fragment.

10

The first invention of Group I+ is restricted to an antibody comprising SEQ ID NO: 6. It is believed that claims 1, 4-8, 13, and 16-20 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the above embodiment.

Applicant is invited to elect additional antibody sequence(s) for each additional embodiment to be searched in a specific combination by paying an additional fee for each set of election. Each additional elected embodiment requires the selection of a single definition for each antibody sequence. An exemplary election would be an antibody comprising SEQ ID NO: 7. Additional embodiment(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. 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.

The Groups I+ formulae do not share a significant structural element, requiring the selection of alternatives for antibody sequences, and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of: a method for activating T cells, comprising administering an antibody or antibody fragment comprising a sequence, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art, as disclosed by US 2015/0368349 to 4-Antibody AG et al. (hereinafter, "4-Antibody").

20

Specifically, 4-Antibody discloses a method for activating T cells, comprising administering an antibody or antibody fragment comprising a sequence (a method for enhancing the co-stimulation of T cells comprising incubating ...T cells...with an antibody or fragment thereof...for preferential expansion of effector T cells...comprising administering to the subject an effective amount of an antibody, Para. [0152]; antibody comprising an amino acid sequence, Para. [0143]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

30

40

50

## 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 37/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	C 1 2 N 15/13	

(32)優先日 令和3年9月16日(2021.9.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,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,DK,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),OA(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,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,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,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . L i n u x

2 . T W E E N

トウェイ・ブールバード 6 8 1

(72)発明者 アクセルロッド , フミコ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ ゲートウェイ・ブールバード 6 8 1

(72)発明者 ワン , リーニャ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ ゲートウェイ・ブールバード 6 8 1

F ターム (参考) 4B065 AA92X AA94X AC12 AC20 BB19 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA22 FA74