

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291702** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.17

(51) Int. Cl. *C40B 30/06* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.09

(54) БИБЛИОТЕКИ ВАРИАНТНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ РЕЦЕПТОРОВ АДЕНОЗИНА

(31) 62/945,818

(32) 2019.12.09

(33) US

(86) PCT/US2020/064106

(87) WO 2021/119193 2021.06.17

(88) 2021.07.15

(71) Заявитель:

**ТВИСТ БАЙОСАЙЕНС
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:

**Саго Аарон, Табибазар Рэй, Гарг
Панкадж, Лю Цян (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам и композициям, относящимся к библиотекам связывания рецептора аденозина A2A, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, содержащий домен связывания аденозина A2A. Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A, как раскрыто в настоящем документе, кодируют иммуноглобулины, включая антитела и однодоменные антитела. Библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, включают разнообразие библиотек, содержащие нуклеиновые кислоты, каждая из которых кодирует заданный вариант по меньшей мере одной заранее определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. Кроме того, в настоящем документе раскрыты библиотеки белков, полученные при трансляции библиотек нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе раскрыты библиотеки клеток, экспрессирующие разнообразные библиотеки нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе.



A1

202291702

202291702

A1

БИБЛИОТЕКИ ВАРИАНТНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ РЕЦЕПТОРОВ АДЕНОЗИНА

Описание

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/945818, поданной 9 декабря 2019 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0002] Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), такие как рецепторы аденозина, связаны с широким спектром заболеваний. Возникновение антитела к GPCR затруднено из-за проблем с получением подходящего антигена, поскольку GPCR часто экспрессируются на низких уровнях в клетках и очень нестабильны при очистке. Таким образом, существует потребность в улучшенных агентах для терапевтического вмешательства, нацеленных на GPCR.

Включение посредством ссылки

[0003] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

Сущность настоящего изобретения

[0004] Настоящее изобретение относится к способам получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, предусматривающим: (a) предоставление предварительно определенных последовательностей, кодирующих: i. первое множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид первого множества полинуклеотидов кодирует вариантную последовательность, кодирующую CDR1 тяжелой цепи, ii. второе множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид второго множества полинуклеотидов кодирует вариантную последовательность, кодирующую CDR2 тяжелой цепи, iii. третье множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид третьего множества полинуклеотидов кодирует вариантную последовательность, кодирующую CDR3 тяжелой цепи, и (b) смешивание первого множества полинуклеотидов, второго множества полинуклеотидов и третьего множества полинуклеотидов с образованием библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, где антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, где однодоменное антитело содержит один переменный домен тяжелой цепи. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, где однодоменное антитело представляет собой антитело VHH. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам

[0008] Настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где каждая из нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует иммуноглобулин, связывающийся с рецептором аденозина A2A, где иммуноглобулин, связывающийся с рецептором аденозина A2A, содержит вариант домена связывания рецептора аденозина A2A, где домен связывания рецептора аденозина A2A представляет собой лиганд рецептора аденозина A2A, и где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 10000 вариантных легких цепей иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 50000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 50000 вариантных легких цепей иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 100000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 100000 вариантных легких цепей иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где длина тяжелой цепи иммуноглобулина при трансляции составляет от около 90 до около 100 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где длина тяжелой цепи иммуноглобулина при трансляции составляет от около 100 до около 400 аминокислот.

[0009] Настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где каждая из нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует однодоменное антитело против рецептора аденозина A2A, где каждая последовательность множества последовательностей содержит вариантную последовательность, кодирующую по меньшей мере одну из CDR1, CDR2, и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), где библиотека содержит по меньшей мере 30000 вариантных последовательностей, и где антитело или фрагменты антитела связываются с его антигеном с K_D менее 100 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где длина VH при трансляции составляет от около 90 до около 100 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где длина VH при трансляции составляет от около 100 до около 400 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 270 до около 300 пар оснований. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 300 до около 1200 пар оснований.

[0010] Настоящее изобретение относится к библиотекам векторов, содержащим библиотеки нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение относится к библиотекам клеток, содержащим библиотеки нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе. Настоящее изобретение относится к библиотекам клеток, содержащим библиотеки белков, как описано в настоящем документе.

[0011] Настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где каждая из нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует иммуноглобулин, связывающийся с рецептором аденозина A2A, где иммуноглобулин, связывающийся с рецептором аденозина A2A, содержит вариант домена связывания рецептора аденозина A2A, где домен связывания рецептора аденозина A2A представляет собой лиганд рецептора аденозина A2A, и где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 10000 вариантных легких цепей иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 50000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 50000 вариантных легких цепей иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 100000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 100000 вариантных легких цепей иммуноглобулина. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина тяжелой цепи иммуноглобулина при трансляции составляет от около 90 до около 100 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина тяжелой цепи иммуноглобулина при трансляции составляет от около 100 до около 400 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где вариантная тяжелая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где вариантная легкая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где вариантная тяжелая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит любую из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где вариантная легкая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит любую из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717.

[0012] Настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим множество нуклеиновых кислот, где каждая нуклеиновая кислота множества нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или его фрагмент антитела, где антитело или его фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит домен связывания рецептора аденозина A2A, где каждая нуклеиновая кислота множества нуклеиновых кислот содержит последовательность, кодирующую вариант последовательности домена связывания рецептора аденозина A2A, и где антитело или фрагмент антитела связываются с его антигеном с K_D менее 100 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 90 до около 100 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 100 до около 400 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 270 до около 300 пар оснований. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 300 до около 1200 пар оснований. Кроме того, настоящее

изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где библиотека содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот.

[0013] Настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, содержащим: множество нуклеиновых кислот, где каждая из нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует однодоменное антитело против рецептора аденозина A2A, где каждая последовательность множества последовательностей содержит вариантную последовательность, кодирующую CDR1, CDR2 или CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), где библиотека содержит по меньшей мере 30000 вариантных последовательностей, и где однодоменное антитело против рецептора аденозина A2A связывается с его антигеном с K_D менее 100 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH при трансляции составляет от около 90 до около 100 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH при трансляции составляет от около 100 до около 400 аминокислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 270 до около 300 пар оснований. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где длина VH составляет от около 300 до около 1200 пар оснований. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где библиотека вариантов содержит вариантную последовательность, кодирующую CDR1, CDR2 и CDR3. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где VH при трансляции содержит последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам нуклеиновых кислот, где VH при трансляции содержит любую из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628.

[0014] Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A, содержащим тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина: где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 540-628, и где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 629-717. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 95% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 540-628, и где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 95% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 629-717. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 540-628, и где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 629-717. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент, состоящий только из одного мономерного варибельного домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело,

антиидиотипическое (анти-Id) антитело или их антигенсвязывающие фрагменты антитела Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело или его фрагмент антитела является химерным или гуманизированным. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело имеет EC50 менее около 25 нанолярную согласно анализу сAMP. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело имеет EC50 менее около 20 нанолярную согласно анализу сAMP. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело имеет EC50 менее около 10 нанолярную согласно анализу сAMP.

[0015] Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело или фрагмент антитела содержит определяющую комплементарность область (CDR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 6-539.

[0016] Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело или фрагмент антитела содержит определяющую комплементарность область переменной тяжелой цепи (CDRH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 6-272.

[0017] Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело или фрагмент антитела содержит определяющую комплементарность область переменной легкой цепи (CDRH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 273-539.

[0018] Настоящее изобретение относится к антителам или фрагментам антител, где антитело или фрагмент антитела содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 6-539, и где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент, состоящий только из одного мономерного переменной домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или их антигенсвязывающие фрагменты антитела

[0019] Настоящее изобретение относится к способам лечения рака, предусматривающим введение антитела или фрагмента антитела, как раскрыто в настоящем документе.

[0020] Настоящее изобретение относится к способам лечения неврологического заболевания или нарушения, предусматривающим введение антитела или фрагмента антитела, как раскрыто в настоящем документе.

[0021] Настоящее изобретение относится к способам получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, предусматривающим: (a) предоставление предварительно определенных последовательностей, кодирующих: i. первое множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид первого множества полинуклеотидов кодирует по меньшей мере 1000 вариантных последовательностей, кодирующих CDR1 тяжелой цепи, ii. второе множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид второго множества полинуклеотидов кодирует по меньшей мере 1000 вариантных последовательностей, кодирующих CDR2 тяжелой цепи, iii. третье множество

полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид третьего множества полинуклеотидов кодирует по меньшей мере 1000 вариантных последовательностей, кодирующих CDR3 тяжелой цепи, и (b) смешивание первого множества полинуклеотидов, второго множества полинуклеотидов и третьего множества полинуклеотидов с образованием библиотеки нуклеиновых кислот вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, и где по меньшей мере около 70% вариантных нуклеиновых кислот кодируют антитело или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 100 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где однодоменное антитело содержит один переменный домен тяжелой цепи. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где однодоменное антитело представляет собой антитело VHH. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 50000 вариантных последовательностей. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 100000 вариантных последовательностей. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 75 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 50 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 10 нМ. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 500 вариантных последовательностей. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам, где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере пять последовательностей, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 75 нМ.

[0022] Настоящее изобретение относится к библиотекам белков, кодируемых библиотекой нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе, где библиотека белков содержит пептиды. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам белков, где библиотека белков содержит иммуноглобулины. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам белков, где библиотека белков содержит антитела. Кроме того, настоящее изобретение относится к библиотекам белков, где библиотека белков представляет собой библиотеку пептидомиметиков.

[0023] Настоящее изобретение относится к библиотекам векторов, содержащим библиотеку нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе.

[0024] Настоящее изобретение относится к библиотекам клеток, содержащим библиотеку нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе.

[0025] Настоящее изобретение относится к библиотекам клеток, содержащим библиотеку белков, как раскрыто в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

- [0026] На **фиг. 1А** показана первая схема каркаса иммуноглобулина.
- [0027] На **фиг. 1В** показана вторая схема каркаса иммуноглобулина.
- [0028] На **фиг. 2** показана схема мотива для размещения в каркасе.
- [0029] На **фиг. 3** представлена схема стадий, демонстрирующая иллюстративный технологический процесс синтеза генов, как раскрыто в настоящем документе.
- [0030] На **фиг. 4** проиллюстрирован пример вычислительной системы.
- [0031] На **фиг. 5** приведена блок-схема, иллюстрирующая структуру вычислительной системы.
- [0032] На **фиг. 6** приведена схема, демонстрирующая сеть, сконфигурированную для объединения множества вычислительных систем, множества сотовых телефонов и персональных интеллектуальных консультантов, а также сетевого хранилища данных (NAS).
- [0033] На **фиг. 7** приведена блок-схема многопроцессорной вычислительной системы, использующей совместно используемое пространство виртуальной адресной памяти.
- [0034] На **фиг. 8А** приведено схематическое изображение каркаса иммуноглобулина, содержащего домен VH, присоединенный к домену VL с помощью линкера.
- [0035] На **фиг. 8В** приведено схематическое изображение полнодоменной структуры каркаса иммуноглобулина, содержащего домен VH, присоединенный к домену VL с использованием линкера, лидерной последовательности и последовательности рIII.
- [0036] На **фиг. 8С** приведено схематическое изображение четырех каркасных элементов (FW1, FW2, FW3, FW4) и 3 переменных элементов CDR (L1, L2, L3) для домена VL или VH.
- [0037] На **фиг. 9А** показана структура глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1, голубой) в комплексе с рецептором GLP-1 (GLP-1R, серый), PDB ввод 5VAI.
- [0038] На **фиг. 9В** представлена кристаллическая структура хемокинового рецептора CXCR4 (серый) в комплексе с антагонистом циклического пептида CVX15 (синий), PDB ввод 3OR0.
- [0039] На **фиг. 9С** показана кристаллическая структура человека, сглаженная с трансмембранным доменом, выделенным серым цветом, и внеклеточным доменом (ECD), выделенным оранжевым цветом, PDB ввод 5L7D. ECD связывается с TMD через внеклеточную петлю 3 (ECL3).
- [0040] На **фиг. 9D** показана структура GLP-1R (серый цвет) в комплексе с Fab (пурпурный), PDB ввод 6LN2.
- [0041] На **фиг. 9Е** показана кристаллическая структура CXCR4 (серый цвет) в комплексе с антагонистом вирусных хемокинов и воспалительным белком 2 вирусных макрофагов (vMIP-II, зеленый цвет), PDB ввод 4RWS.
- [0042] На **фиг. 10** показана схема дизайна библиотеки, сфокусированной на GPCR. Две тяжелые цепи зародышевой линии VH1-69 и VH3-30, 4 легкие цепи зародышевой линии IGKV1-39 и IGKV3-15, а также IGLV1-51 и IGLV2-14.
- [0043] На **фиг. 11** представлен график распределения длин HCDR3 в библиотеке, сфокусированной на GPCR, по сравнению с распределением длин HCDR3 в популяциях В-клеток от трех здоровых взрослых доноров. Всего было проанализировано 2 444 718 уникальных последовательностей VH

из библиотеки GPCR и 2 481 511 уникальных последовательностей VH из коллекции В-клеток человека для построения графика распределения длин.

[0044] На **фиг. 12** приведены клон, значение ELISA, библиотека, значение ProA и значение K_D для VHH-Fc.

[0045] На **фиг. 13** приведена схема дизайна гипериммунных библиотек с фаговым дисплеем, созданных согласно настоящему изобретению.

[0046] На **фиг. 14A-14B** представлены графики кривой дозы (**фиг. 14A**) и анализ FACS (**фиг. 14B**) A2AR-90-007.

[0047] На **фиг. 15A** приведена схема конструкции тяжелой цепи IGHV3-23.

[0048] На **фиг. 15B** приведена схема конструкции тяжелой цепи IGHV1-69.

[0049] На **фиг. 15C** приведена схема конструкции легких цепей IGKV 2-28 и IGLV 1-51.

[0050] На **фиг. 15D** приведена схема теоретического разнообразия и окончательного разнообразия библиотеки GPCR.

[0051] На **фиг. 16A-16O** приведены данные проточной цитометрии с использованием вариантных иммуноглобулинов рецептора A2A (**фиг. 16A-16N**) и контроля (**фиг. 16O**).

[0052] На **фиг. 17A-17H** приведены графики кривых связывания. Кривые связывания построены с зависимостью концентрации IgG от MFI (средняя интенсивность флуоресценции).

[0053] На **фиг. 18A-18O** представлены графики кривых связывания с использованием вариантов из библиотеки иммунитета мыши (**фиг. 18A-18N**) и с использованием контроля (**фиг. 18O**).

[0054] На **фиг. 19A-19G** приведен график связывания клеток с моноклональным (MAV9497) и выбранными вариантами против аденозина A2aR. Кривые связывания построены с зависимостью концентрации IgG от MFI (средняя интенсивность флуоресценции).

[0055] На **фиг. 20A-20G** приведены графики связывания клеток при титровании от 100 нМ.

[0056] На **фиг. 21** приведены данные анализа зависимости ответа от дозы агониста, измеренные с использованием анализа cAMP.

[0057] На **фиг. 22** приведены данные анализа зависимости ответа от дозы антагониста, измеренные с использованием анализа cAMP.

[0058] На **фиг. 23** представлены результаты анализа титрования антагониста согласно cAMP.

[0059] На **фиг. 24** приведены данные для варианта A2A-1 и A2A-9 с применением анализа cAMP.

[0060] На **фиг. 25** приведены данные для варианта A2A9 с применением анализа cAMP.

[0061] На **фиг. 26** приведены данные для варианта A2A9 с применением анализа титрования антагониста cAMP.

[0062] На **фиг. 27A-27C** приведены данные для вариантных иммуноглобулинов против рецептора A2A с применением антагонистического анализа cAMP.

[0063] На **фиг. 28A-28C** приведены данные для вариантных иммуноглобулинов против рецептора A2A с применением аллостерического анализа cAMP.

[0064] На **фиг. 29A-29C** приведены данные для вариантных иммуноглобулинов против рецептора A2A с применением антагонистического анализа cAMP.

[0065] На **фиг. 30A-30C** приведены данные для вариантных иммуноглобулинов против рецептора A2A с применением антагонистического анализа cAMP.

Подробное описание настоящего изобретения

[0066] В настоящем раскрытии используются, если не указано иное, традиционные способы молекулярной биологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники.

[0067] Определения

[0068] В настоящем раскрытии различные варианты осуществления представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено только для удобства и краткости и не должно рассматриваться как строгое ограничение объема любых вариантов осуществления. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах этого диапазона с точностью до десятых долей нижнего предела, если из контекста явно не следует иное. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, должно рассматриваться как имеющее конкретно раскрытые поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные значения в этом диапазоне, например, 1,1, 2, 2,3, 5 и 5,9. Это применимо независимо от широты диапазона. Верхний и нижний пределы этих промежуточных диапазонов могут независимо быть включены в меньшие диапазоны, а также охватываются раскрытием с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включаются в раскрытие, если из контекста явно не следует иное.

[0069] Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения какого-либо варианта осуществления. Используемые в настоящем документе формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, следует понимать, что термины «содержит» и/или «содержащий» при использовании в настоящем описании определяют наличие заявленных признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов и/или компонентов, но не исключают наличия или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов, компонентов и/или их групп. В контексте настоящего изобретения термин «и/или» включает любые и все комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов.

[0070] Если специально не указано или не очевидно из контекста, в контексте настоящего изобретения термин «около» в отношении числа или диапазона чисел понимается как означающий указанное количество и числа +/- 10% от них или на 10% ниже нижнего указанного предела и на 10 % выше указанного верхнего предела для значений, перечисленных для диапазона.

[0071] Если специально не указано иное, в контексте настоящего изобретения термин «нуклеиновая кислота» охватывает двух- или трехцепочечные нуклеиновые кислоты, а также одноцепочечные молекулы. В двух- или трехцепочечных нуклеиновых кислотах цепи нуклеиновой кислоты не обязательно должны быть соэктенсивными (т.е. двухцепочечная нуклеиновая кислота не обязательно должна быть двухцепочечной по всей длине обеих цепей). Последовательности нуклеиновых кислот, если они предоставлены, перечислены в направлении от 5' к 3', если не указано иное. Способы, как раскрыто в настоящем документе, предусматривают получение выделенных нуклеиновых кислот. Способы, как

раскрыто в настоящем документе, дополнительно предусматривают получение выделенных и очищенных нуклеиновых кислот. «Нуклеиновая кислота», как упоминается в настоящем документе, может включать по меньшей мере 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 или более оснований в длину. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам синтеза любого числа полипептидов-сегментов, кодирующих нуклеотидные последовательности, включая последовательности, кодирующие нерибосомальные пептиды (NRP), последовательности, кодирующие модули нерибосомальных пептид-синтетаз (NRPS), и их синтетические варианты, полипептидные сегменты других модульных белков, таких как антитела, полипептидные сегменты из других белковых семейств, включая некодирующие ДНК или РНК, такие как регуляторные последовательности, например, промоторы, факторы транскрипции, энхансеры, siРНК, shРНК, РНКi, miРНК, малые ядрышковые РНК, полученные из микроРНК или любую представляющую интерес функциональную или структурную единицу ДНК или РНК. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, межгенная ДНК, локусы (локус), определенные в результате анализа связывания, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (siРНК), короткошпилечная РНК (shРНК), микро-РНК (miРНК), малая ядрышковая РНК, рибозимы, комплементарная ДНК (кДНК), представляющая собой ДНК-представление мРНК, обычно получаемое путем обратной транскрипции матричной РНК (мРНК) или путем амплификации, молекулы ДНК, полученные синтетическим путем или путем амплификации, геномная ДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. кДНК, кодирующая указанный в настоящем документе ген или фрагмент гена, может содержать по меньшей мере одну область, кодирующую экзонные последовательности без промежуточной интронной последовательности в геномной эквивалентной последовательности.

[0072] Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A

[0073] Настоящее изобретение относится к способам и композициям, относящимся к библиотекам связывания с рецепторами, сопряженными с G-белком, (GPCR) для рецептора аденозина A2A (ADORA2), содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, содержащий домен связывания рецептора аденозина A2A. Каркасы, как описано в настоящем документе, могут стабильно нести домен связывания рецептора аденозина A2A. Домен связывания рецептора аденозина A2A может быть сконструирован на основе поверхностных взаимодействий лиганда рецептора аденозина A2A и рецептора аденозина A2A. Библиотеки, как описано в настоящем документе, могут быть дополнительно разнообразены с предоставлением библиотек вариантов, содержащих нуклеиновые кислоты, каждая из которых кодирует заданный вариант по меньшей мере одной предварительно определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. Кроме того, в настоящем документе раскрыты библиотеки белков, которые могут быть созданы при трансляции библиотеки нуклеиновых кислот. В некоторых случаях библиотеки нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе, трансформируют в клетки с получением библиотеки клеток. Кроме того, настоящее изобретение относится к последующим применениям для библиотек, синтезированных посредством способов, как раскрыто в настоящем документе. Последующие применения включают идентификацию вариантных последовательностей нуклеиновых кислот или белковых с усиленными биологически релевантными функциями, например,

улучшенной стабильностью, аффинностью, связыванием, функциональной активностью, а также для лечения или профилактики болезненного состояния, связанного с передачей сигналов рецептора аденозина A2A.

[0074] Способы, композиции и системы, как раскрыто в настоящем документе, для оптимизации иммуноглобулинов или антител против рецептора аденозина A2A, включают подход, основанный на соотношении вариантов, который отражает естественное разнообразие последовательностей антител. В некоторых случаях библиотеки оптимизированных иммуноглобулинов или антител против рецептора аденозина A2A содержат варианты последовательности иммуноглобулина или антитела против рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях сконструированы варианты последовательности иммуноглобулина или антитела против рецептора аденозина A2A, содержащие варианты области CDR. В некоторых случаях варианты последовательности иммуноглобулина или антитела против рецептора аденозина A2A, содержащие варианты области CDR, получают путем перестановки природных последовательностей CDR в каркасе ламы, гуманизированном или химерном каркасе. В некоторых случаях такие библиотеки синтезируют, клонируют в векторы экспрессии, а продукты трансляции (антитела) оценивают на активность. В некоторых случаях фрагменты последовательностей синтезируют и затем собирают. В некоторых случаях векторы экспрессии используют для отображения и обогащения желаемого антитела, например, фагового дисплея. В некоторых случаях фаговый вектор представляет собой фагмидный вектор Fab. Давления отбора, используемые в ходе обогащения, в некоторых случаях включает аффинность связывания, токсичность, иммунологическую толерантность, стабильность или другой фактор. Такие векторы экспрессии позволяют отбирать антитела со специфическими свойствами («пэннинг»), а последующее размножение или амплификация таких последовательностей обогащает библиотеку этими последовательностями. Раунды пэннинга можно повторять любое количество раз, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более 7 раундов. В некоторых случаях каждый раунд пэннинга включает несколько промывок. В некоторых случаях каждый раунд пэннинга включает по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более 16 промывок.

[0075] В настоящем документе раскрыты способы и системы конструирования библиотек *in-silico*. Библиотеки, как описано в настоящем документе, в некоторых случаях конструируют на основе базы данных, содержащей множество последовательностей антител. В некоторых случаях база данных содержит множество вариантов последовательностей антител против различных мишеней. В некоторых случаях база данных содержит по меньшей мере 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более 5000 последовательностей антител. Иллюстративной базой данных является база данных iCAN. В некоторых случаях база данных содержит последовательности рецепторов наивных В-клеток и В-клеток памяти. В некоторых случаях последовательности рецепторов наивных В-клеток и В-клеток памяти представляют собой последовательности человека, мыши или примата. В некоторых случаях последовательности рецепторов наивных В-клеток и В-клеток памяти являются человеческими последовательностями. В некоторых случаях базу данных анализируют на специфическую для положения вариацию. В некоторых случаях антитела, как раскрыто в настоящем документе, содержат специфические для положения вариации в областях CDR. В некоторых случаях области CDR содержат несколько сайтов для вариации.

[0076] *Библиотеки каркасов*

[0077] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A находятся в каркасе. Каркас, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивает улучшение стабильности для диапазона последовательностей, кодирующих домен связывания рецептора аденозина A2A, когда они вставлены в каркас, по сравнению с немодифицированным каркасом. Примеры каркасов включают без ограничения белок, пептид, иммуноглобулин, их производные или их комбинации. В некоторых случаях каркас представляет собой иммуноглобулин. Каркасы, как описано в настоящем документе, имеют улучшенную функциональную активность, структурную стабильность, экспрессию, специфичность или их комбинацию. В некоторых случаях каркасы содержат длинные области, несущие домен связывания рецептора аденозина A2A.

[0078] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где каркас представляет собой иммуноглобулин. В некоторых случаях иммуноглобулин представляет собой антитело. В контексте настоящего изобретения термин антитело включает белки, имеющие характерную двуплечую Y-образную форму типичной молекулы антитела, а также один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Иллюстративные антитела включают без ограничения моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечный Fv (scFv) (включая фрагменты, в которых VL и VH соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического или природного линкера, что позволяет получить их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием моновалентных молекул, включая одноцепочечные Fab и scFab), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab (включая моновалентные фрагменты, содержащие домены VL, VH, CL и CH1), фрагмент F(ab')₂ (включая двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области), фрагмент Fd (включая фрагменты, содержащие фрагменты VH и CH1), фрагмент Fv (включая фрагменты, содержащие домены VL и VH одного плеча антитела), однодоменное антитело (dAb или sdAb) (включая фрагменты, содержащие домен VH), выделенную определяющую комплементарность области (CDR), диатело (включая фрагменты, содержащие двухвалентные димеры, такие как два домена VL и VH, связанные друг с другом и распознающие два разных антигена), фрагмент, состоящий только из одного мономерного переменного домена, дисульфид-связанные Fv (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или их антигенсвязывающие фрагменты антитела. В некоторых случаях библиотеки, раскрытые в настоящем документе, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где каркас представляет собой Fv-антитело, включая Fv-антитела, состоящие из минимального фрагмента антитела, который содержит полный сайт распознавания антигена и связывания антигена. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело Fv состоит из димера одной тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в тесной нековалентной ассоциации, и три гипервариабельные области каждого переменного домена взаимодействуют, определяя антигенсвязывающий сайт на поверхности димера VH-VL. Согласно некоторым вариантам осуществления шесть гипервариабельных областей придают антигенсвязывающую специфичность антителу. Согласно некоторым вариантам осуществления один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три гипервариабельные области, специфические для антигена, включая однодоменные антитела, выделенные из животных семейства верблюдовые, содержащие один переменный домен тяжелой цепи или переменную

область тяжелой цепи, как например, V_{HH} антитела или нанотела) имеет способность распознавать и связывать антиген. В некоторых случаях библиотеки, раскрытые в настоящем документе, содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где каркас представляет собой одноцепочный F_v или scF_v, включая фрагменты антитела, содержащие V_H, V_L или оба домена V_H и V_L, где оба домена присутствуют в одной полипептидной цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления полипептид F_v дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, позволяющий scF_v образовывать желаемую структуру для связывания антигена. В некоторых случаях scF_v связан с фрагментом F_c или V_{HH} связан с фрагментом F_c (включая минитела). В некоторых случаях антитело содержит молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулинов, например, молекулы, содержащие антигенсвязывающий сайт. Молекулы иммуноглобулина относятся к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4, IgA 1 и IgA 2) или подклассу.

[0079] Согласно некоторым вариантам осуществления библиотеки содержат иммуноглобулины, адаптированные к видам предполагаемой терапевтической мишени. Как правило, эти способы предусматривают «маммализацию» и предусматривают способы переноса информации о связывании антигена донора в менее иммуногенное антитело-акцептор млекопитающего с получением полезных терапевтических средств. В некоторых случаях млекопитающими являются мыши, крысы, лошади, овцы, коровы, приматы (например, шимпанзе, бабуины, гориллы, орангутанги, обезьяны), собаки, кошки, свиньи, ослы, кролики и люди. В некоторых случаях настоящее изобретение относится к библиотекам и способам феллинизации и канинизации антител.

[0080] «Гуманизированные» формы нечеловеческого антитела могут представлять собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого антитела. Гуманизированное антитело обычно представляет собой человеческое антитело (реципиентное антитело), в котором остатки одной или нескольких CDR заменены остатками одной или нескольких CDR нечеловеческого антитела (донорского антитела). Донорским антителом может быть любое подходящее нечеловеческое антитело, такое как антитело мыши, крысы, кролика, курицы или примата, не являющегося человеком, имеющее желаемую специфичность, аффинность или биологический эффект. В некоторых случаях выбранные остатки каркасной области реципиентного антитела заменяют соответствующими остатками каркасной области донорского антитела. Гуманизированное антитело может также содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в реципиентном антителе, ни в донорском антителе. В некоторых случаях эти модификации вносят для дальнейшего улучшения характеристик антитела.

[0081] «Канинизация» может включать способ переноса информации о связывании несобачьего антигена от донорского антитела в менее иммуногенное собачье антитело-акцептор с получением терапий, полезных в качестве терапевтических средств для собак. В некоторых случаях канинизированные формы несобачьего антитела согласно настоящему изобретению представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из несобачьего антитела. В некоторых случаях канинизированные антитела представляют собой последовательности собачьего антитела («акцепторное» или «реципиентное» антитело), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области несобачьих видов («донорское» антитело), таких как мышь, крыса, кролик, кошка, собака, коза, курица, крупный рогатый скот, лошадь, лама, верблюд, одногорбый верблюд, акула, нечеловекообразные приматы, человеческой, гуманизированной, рекомбинантной последовательности или сконструированной последовательности, обладающей желаемыми свойствами. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) собачьего антитела замещают соответствующими

несобачьими остатками FR. В некоторых случаях каннизированные антитела включают остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорском антителе. В некоторых случаях эти модификации вносят для дальнейшего улучшения характеристик антитела. Каннизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) собачьего антитела.

[0082] «Фелинизация» может включать способ переноса информации о связывании некошачьего антигена от донорского антитела в менее иммуногенное акцепторное кошачье антитело с получением терапий, полезных в качестве терапевтических средств для кошек. В некоторых случаях фелинизированные формы некошачьего антитела относятся к химерному антителу, которое содержит минимальную последовательность, полученную из некошачьего антитела. В некоторых случаях фелинизированные антитела представляют собой последовательности кошачьего антитела («акцепторное» или «реципиентное» антитело), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменены остатками гипервариабельной области некошачьих видов («донорское» антитело), таких как мышь, крыса, кролик, кошка, собака, коза, курица, крупный рогатый скот, лошадь, лама, верблюд, одногорбый верблюд, акула, нечеловекообразные приматы, человеческой, гуманизированной, рекомбинантной последовательности или сконструированной последовательности, обладающей желаемыми свойствами. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) кошачьего антитела заменяют соответствующими некошачьими остатками FR. В некоторых случаях фелинизированные антитела включают остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорском антителе. В некоторых случаях эти модификации вносят для дальнейшего улучшения характеристик антитела. Фелинизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) кошачьего антитела.

[0083] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где каркас не представляет собой иммуноглобулин. В некоторых случаях каркас представляет собой неиммуноглобулиновый связывающий домен. Например, каркас представляет собой антитело-миметик. Примеры антител-миметиков включают без ограничения антикалины, аффилины, молекулы аффител, аффимеры, аффитины, альфатела, авимеры, атримеры, DARПины, финомеры, белки на основе домена Кунитца, монотела, антикалины, ноттины, белки на основе повторов броненосца и бициклические пептиды.

[0084] Библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где каркас представляет собой иммуноглобулин, содержат вариации по меньшей мере в одной области иммуноглобулина. Примеры областей антитела для вариации включают без ограничения определяющую комплементарность область (CDR), переменный домен или константный домен. В некоторых случаях CDR представляет собой CDR1, CDR2 или CDR3. В некоторых случаях CDR представляет собой тяжелый домен, включая без ограничения CDRH1, CDRH2 и CDRH3. В некоторых случаях CDR представляет собой легкий домен, включая без ограничения CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых случаях переменный домен представляет собой переменный домен легкой цепи (VL) или переменный домен тяжелой цепи (VH). В некоторых случаях домен VL содержит каппа- или лямбда-цепи. В некоторых случаях константный домен представляет собой константный домен легкой цепи (CL) или константный домен тяжелой цепи (CH).

[0085] Способы, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотек, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие каркас, где каждая нуклеиновая кислота кодирует заданный вариант по меньшей мере одной предварительно определенной эталонной последовательности

нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях предварительной определенной эталонная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, и библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации по меньшей мере одного кодона, так что множество различных вариантов одного остатка в последующем белке, кодируемом синтезированной нуклеиновой кислотой, получают стандартными процессами трансляции. В некоторых случаях библиотека каркасов содержит различные нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие вариации в нескольких положениях. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие по меньшей мере один кодон домена CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL или VH. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации множества кодонов доменов CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL или VH. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариации множества кодонов каркасного элемента 1 (FW1), каркасного элемента 2 (FW2), каркасного элемента 3 (FW3) или каркасного элемента 4 (FW4). Иллюстративное число кодонов для вариации включает без ограничения по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов.

[0086] В некоторых случаях по меньшей мере одна область иммуноглобулина для вариации относится к семейству V-гена тяжелой цепи, семейству D-гена тяжелой цепи, семейству J-гена тяжелой цепи, семейству V-гена легкой цепи или семейству J-гена легкой цепи. В некоторых случаях семейство генов V легкой цепи содержит ген иммуноглобулина каппа (IGK) или ген иммуноглобулина лямбда (IGL). Иллюстративные гены включают без ограничения IGHV1-18, IGHV1-69, IGHV1-8, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30/33m, 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, и IGLV3-1. В некоторых случаях ген представляет собой IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV3-23, IGHV3, IGHV1-46, IGHV3-7, IGHV1 или IGHV1-8. В некоторых случаях ген представляет собой IGHV1-69 и IGHV3-30. В некоторых случаях ген представляет собой IGHJ3, IGHJ6, IGHJ, IGHJ4, IGHJ5, IGHJ2 или IGH1. В некоторых случаях ген представляет собой IGHJ3, IGHJ6, IGHJ или IGHJ4.

[0087] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие иммуноглобулиновые каркасы, где библиотеки синтезируют с различным числом фрагментов. В некоторых случаях фрагменты содержат CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL или VH домен. В некоторых случаях фрагменты содержат каркасный элемент 1 (FW1), каркасный элемент 2 (FW2), каркасный элемент 3 (FW3) или каркасный элемент 4 (FW4). В некоторых случаях библиотеки каркасов синтезируют с по меньшей мере или около 2 фрагментами, 3 фрагментами, 4 фрагментами, 5 фрагментами или более 5 фрагментами. Длина каждого из фрагментов нуклеиновой кислоты или средняя длина синтезированных нуклеиновых кислот может составлять по меньшей мере или около 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 или более 600 пар оснований. В некоторых случаях длина составляет от около от 50 до 600, от 75 до 575, от 100 до 550, от 125 до 525, от 150 до 500, от 175 до 475, от 200 до 450, от 225 до 425, от 250 до 400, от 275 до 375 или от 300 до 350 пар оснований.

[0088] Библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы иммуноглобулинов, как описано в настоящем документе, содержат аминокислоты различной длины при трансляции. В некоторых случаях длина каждого из аминокислотных фрагментов или средняя длина синтезированной аминокислоты может составлять по меньшей мере или около 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 или более 150 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислоты составляет от около 15 до 150, от 20 до 145, от 25 до 140, от 30 до 135, от 35 до 130, от 40 до 125, от 45 до 120, от 50 до 115, от 55 до 110, от 60 до 110, от 65 до 105, от 70 до 100 или от 75 до 95 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислоты составляет от около 22 аминокислот до около 75 аминокислот. В некоторых случаях иммуноглобулиновые каркасы содержат по меньшей мере или около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или более 5000 аминокислот.

[0089] Число вариантных последовательностей для по меньшей мере одной области иммуноглобулина для вариации синтезируют *de novo* с применением способов, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях число вариантных последовательностей синтезируют *de novo* для CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL, VH или их комбинации. В некоторых случаях число вариантных последовательностей синтезируют *de novo* для каркасного элемента 1 (FW1), каркасного элемента 2 (FW2), каркасного элемента 3 (FW3) или каркасного элемента 4 (FW4). Число вариантных последовательностей может составлять по меньшей мере или около 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 или более 500 последовательностей. В некоторых случаях число вариантных последовательностей составляет по меньшей мере или около 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 или более 8000 последовательностей. В некоторых случаях число вариантных последовательностей составляет около от 10 до 500, от 25 до 475, от 50 до 450, от 75 до 425, от 100 до 400, от 125 до 375, от 150 до 350, от 175 до 325, от 200 до 300, от 225 до 375, от 250 до 350 или от 275 до 325 последовательностей.

[0090] Вариантные последовательности для по меньшей мере одной области иммуноглобулина в некоторых случаях варьируются по длине или последовательности. В некоторых случаях по меньшей мере одна область, которую синтезируют *de novo*, относится к CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL, VH или их комбинации. В некоторых случаях по меньшей мере одна область, которую синтезируют *de novo*, относится к каркасному элементу 1 (FW1), каркасному элементу 2 (FW2), каркасному элементу 3 (FW3) или каркасному элементу 4 (FW4). В некоторых случаях вариантная последовательность содержит по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50 вариантных нуклеотидов или аминокислот по сравнению с диким типом. В некоторых случаях вариантная последовательность содержит по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 дополнительных нуклеотидов или аминокислот по сравнению с диким типом. В некоторых случаях вариантная последовательность содержит на по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 меньшей нуклеотидов или аминокислот по сравнению с диким типом. В некоторых случаях библиотеки содержат по меньшей мере или около 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или более 10^{10} вариантов.

[0091] После синтеза библиотек каркасов библиотеки каркаса можно использовать для скрининга и анализа. Например, библиотеки каркаса анализируют в отношении отображаемости и пэннинга библиотеки. В некоторых случаях отображаемость оценивают с помощью метки отбора. Примеры меток включают без ограничения радиоактивную метку, флуоресцентную метку, фермент, хемилюминесцентную метку, колориметрическую метку, аффинную метку или другие метки или метки, известные в данной области техники. В некоторых случаях меткой является гистидин, полигистидин, пус, гемагглютинин (HA) или FLAG. В некоторых случаях библиотеки каркасов анализируют путем секвенирования с использованием различных способов, включая без ограничения секвенирование одной молекулы в реальном времени (SMRT), секвенирование Polony, секвенирование путем лигирования, секвенирование с обратимым

терминатором, секвенирование с протонным обнаружением, секвенирование с ионным полупроводником, секвенирование на основе нанопор, электронное секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование Максама-Гилберта, секвенирование обрыва цепи (например, по Сэнгеру), секвенирование +S или секвенирование путем синтеза.

[0092] В некоторых случаях библиотеки каркасов анализируют на функциональную активность, структурную стабильность (например, термостабильность или стабильность при pH), экспрессию, специфичность или их комбинацию. В некоторых случаях библиотеки каркасов анализируют на каркасы, способные складываться. В некоторых случаях область антитела анализируют на функциональную активность, структурную стабильность, экспрессию, специфичность, укладку или их комбинацию. Например, область VH или область VL анализируют на функциональную активность, структурную стабильность, экспрессию, специфичность, укладку или их комбинацию.

[0093] Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A

[0094] Настоящее изобретение относится к библиотекам связывания рецептора аденозина A2A, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях каркасы представляют собой иммуноглобулины. В некоторых случаях каркасы, содержащие последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A, определяют посредством взаимодействий между доменами связывания рецептора аденозина A2A и рецептором аденозина A2A.

[0095] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, где домены связывания рецептора аденозина A2A конструируют на основе поверхностных взаимодействий на рецепторе аденозина A2A. В некоторых случаях домен связывания рецептора аденозина A2A содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях домены связывания рецептора аденозина A2A взаимодействуют с амино- или карбокси-концами рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях домены связывания рецептора аденозина A2A взаимодействуют с по меньшей мере одним трансмембранным доменом, включая без ограничения трансмембранный домен 1 (TM1), трансмембранный домен 2 (TM2), трансмембранный домен 3 (TM3), трансмембранный домен 4 (TM4), трансмембранный домен 5 (TM5), трансмембранный домен 6 (TM6) и трансмембранный домен 7 (TM7). В некоторых случаях домены связывания рецептора аденозина A2A взаимодействуют с внутриклеточной поверхностью рецептора аденозина A2A. Например, домены связывания рецептора аденозина A2A взаимодействуют с по меньшей мере одной внутриклеточной петлей, включая без ограничения внутриклеточную петлю 1 (ICL1), внутриклеточную петлю 2 (ICL2) и внутриклеточную петлю 3 (ICL3). В некоторых случаях домены связывания рецептора аденозина A2A взаимодействуют с внеклеточной поверхностью рецептора аденозина A2A. Например, домены связывания рецептора аденозина A2A взаимодействуют с по меньшей мере одним внеклеточным доменом (ECD) или внеклеточной петлей (ECL) рецептора аденозина A2A. Внеклеточные петли включают без ограничения внеклеточную петлю 1 (ECL1), внеклеточную петлю 2 (ECL2) и внеклеточную петлю 3 (ECL3).

[0096] В настоящем документе раскрыты домены связывания рецептора аденозина A2A, где домены связывания рецептора аденозина A2A конструируют на основе поверхностных взаимодействий между лигандом рецептора аденозина A2A и рецептором аденозина A2A. В некоторых случаях лиганд представляет собой пептид. В некоторых случаях лиганд представляет собой агонист рецептора аденозина

A2A. В некоторых случаях лиганд представляет собой антагонист рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях лиганд представляет собой аллостерический модулятор рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях аллостерическим модулятором является отрицательный аллостерический модулятор. В некоторых случаях аллостерическим модулятором является положительный аллостерический модулятор. Иллюстративные лиганды рецепторов аденозина A2A включают без ограничения DU172, PSB36, ZM241385, ХАС, кофеин, T4G, T4E, 6DY, 6DZ, 6DX, 6DV, 8D1b, теофиллин, UK-432097, аденозин, NECA и CGS21680.

[0097] Последовательности доменов связывания рецепторов аденозина A2A, основанные на поверхностных взаимодействиях между лигандом рецептора аденозина A2A и рецептором аденозина A2A, анализировали с использованием различных способов. Например, выполняли многовидовой вычислительный анализ. В некоторых случаях выполняли структурный анализ. В некоторых случаях выполняли анализ последовательности. Анализ последовательности может быть выполнен с использованием базы данных, известной в данной области техники. Неограничивающие примеры баз данных включают без ограничения NCBI BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu/), UniProt (www.uniprot.org/) и IUPHAR/P.I.O.S Guide to PHARMACOLOGY (guidetopharmacology.org/).

[0098] В настоящем документе раскрыты домены связывания рецептора аденозина A2A, сконструированные на основе анализа последовательностей среди различных организмов. Например, анализ последовательностей проводят для идентификации гомологичных последовательностей в разных организмах. Иллюстративные организмы включают без ограничения мышь, крысу, лошадь, овцу, корову, примата (например, шимпанзе, бабуина, гориллу, орангутанга, обезьяну), собаку, кошку, свинью, осла, кролика, рыбу, муху и человека.

[0099] После идентификации доменов связывания рецептора аденозина A2A могут быть получены библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие домены связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A содержат последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A, сконструированные на основе взаимодействий конформационных лигандов, взаимодействий пептидных лигандов, взаимодействий низкомолекулярных лигандов, внеклеточных доменов рецептора аденозина A2A или антител, нацеленных на рецептор аденозина A2A. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A содержат последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A, сконструированные на основе взаимодействий пептидных лигандов. В некоторых случаях лиганд не представляет собой лиганд антитела. Библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A могут подвергаться трансляции с получением библиотеки белков. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A транслируются с получением библиотек пептидов, библиотек иммуноглобулинов, их производных или их комбинаций. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A транслируются с получением библиотеки белков, которые далее модифицируют с получением библиотеки пептидомиметиков. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A транслируются с получением библиотек белков, которые применяют для получения малых молекул.

[00100] Способы, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотек доменов связывания рецептора аденозина A2A, содержащих нуклеиновые кислоты, причем каждая кодирует заданный вариант по меньшей мере одной предварительно определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях предварительно определенная эталонная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, и библиотека вариантов

содержит последовательности, кодирующие вариацию по меньшей мере одного кодона, так что множество различных вариантов одного остатка в последующем белке, кодируемом синтезированной нуклеиновой кислотой, получают стандартными процессами трансляции. В некоторых случаях библиотеки доменов связывания рецептора аденозина A2A содержат варианты нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие вариации во множестве положений. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию по меньшей мере одного кодона в домене связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию множества кодонов в домене связывания рецептора аденозина A2A. Иллюстративное число кодонов для вариации включает без ограничения по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов.

[00101] Способы, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотек, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие домены связывания рецептора аденозина A2A, где библиотеки содержат последовательности, кодирующие вариацию длины доменов связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариацию длины на по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов меньше по сравнению с заранее определенной эталонной последовательностью. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариацию длины на по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов больше по сравнению с заранее определенной эталонной последовательностью.

[00102] После идентификации доменов связывания рецептора аденозина A2A, домены связывания рецептора аденозина A2A могут быть помещены в каркасы, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях каркасы представляют собой иммуноглобулины. В некоторых случаях домены связывания рецептора аденозина A2A помещают в область CDRH3. Домены связывания рецептора аденозина A2A, которые можно помещать в каркасы, также могут упоминаться как мотив. Каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, могут быть сконструированы на основе связывания, специфичности, стабильности, экспрессии, складывания или последующей активности. В некоторых случаях каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, способны взаимодействовать с рецептором аденозина A2A. В некоторых случаях каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, обеспечивают высокую аффинность связывания с рецептором аденозина A2A. Иллюстративная аминокислотная последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A приведена в **Таблице 1**.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности домена связывания рецептора аденозина A2A

| SEQ ID NO | GPCR | Аминокислотная последовательность |
|-----------|------|-----------------------------------|
| | | |

| | | |
|---|------------------------|---|
| 1 | Рецептор аденозина A2A | MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLCWAVWLNSNLQNVNTNYFVVSLAAADIAV GVLAIPTAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGL VTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPKEGKNHSQGCQEGQVACLFED VVPNMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLGERARSTL QKEVHAAKSLAIVGLFALCWLPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWLMYLAIVLSHTNSV VNPFIYAYRIREFRQTRFKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDGEQVSLRLN GHPPGVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSAQESQGNTGLPDVELLSHELKGV CPEPPGLDDPLAQDGAGVS |
|---|------------------------|---|

[00103] Настоящее изобретение относится к каркасам или иммуноглобулинам, содержащим домены связывания рецептора аденозина A2A, где последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A поддерживают взаимодействие с рецептором аденозина A2A. Последовательность может быть гомологична или идентична последовательности лиганда рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A, на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A, на по меньшей мере или около 95% гомологична SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A, на по меньшей мере или около 97% гомологична SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A, на по меньшей мере или около 99% гомологична SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A, на по меньшей мере или около 100% гомологична SEQ ID NO: 1. В некоторых случаях последовательность домена связывания рецептора аденозина A2A содержит по меньшей мере часть, содержащую по меньшей мере или около 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 или более 400 аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 1.

[00104] Настоящее изобретение относится к антителам или иммуноглобулинам, где антитело или иммуноглобулин содержит последовательность, на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина, на по меньшей мере или около 95% идентична любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина, на по меньшей мере или около 97% идентична любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина, на по меньшей мере или около 99% идентична любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина, на по меньшей мере или около 100% идентична любой SEQ ID NO: 540-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина содержит по меньшей мере часть, имеющую по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более 110 аминокислот любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-717.

[00105] Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность антитела или иммуноглобулина содержит определяющие комплементарность области (CDR), содержащие последовательность как приведено в Таблицах 15-16. Согласно некоторым вариантам осуществления

[00112] Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе описаны антитела или иммуноглобулины, которые связываются с рецептором аденозина A2A. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере или около 95% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере или около 97% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере или около 99% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере или около 100% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий по меньшей мере часть, имеющую по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или более 110 аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 540-628.

[00113] В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен легкой цепи, на по меньшей мере или около 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен легкой цепи, на по меньшей мере или около 95% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен легкой цепи, на по меньшей мере или около 97% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен легкой цепи, на по меньшей мере или около 99% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен легкой цепи, на по меньшей мере или около 100% идентичный любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717. В некоторых случаях последовательность антитела или иммуноглобулина против рецептора аденозина A2A содержит переменный домен легкой цепи, содержащий по меньшей мере часть, имеющую по меньшей мере или около 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 или более 400 аминокислот последовательности согласно SEQ ID NO: 629-717.

[00114] Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 540, и легкая цепь иммуноглобулина содержит

и легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 713. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 625, и легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 714. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 626, и легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 715. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 627, и легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 716. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 628, и легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 717.

[00115] Настоящее изобретение относится к библиотекам связывания рецептора аденозина A2A, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы или иммуноглобулины, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, которые содержат вариацию типа домена, длины домена или вариацию остатка. В некоторых случаях домен представляет собой область в каркасе, содержащую домены связывания рецептора аденозина A2A. Например, область представляет собой домен VH, CDRH3 или VL. В некоторых случаях домен представляет собой домен связывания рецептора аденозина A2A.

[00116] Способы, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотеки связывания рецептора аденозина A2A нуклеиновых кислот, причем каждая кодирует заданный вариант по меньшей мере одной заранее определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях заранее определенная эталонная последовательность представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок, и библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариант по меньшей мере одного кодона, так что множество различных вариантов одного остатка в последующем белке, кодируемом синтезированной нуклеиновой кислотой, получают стандартными способами трансляции. В некоторых случаях библиотека связывания рецептора аденозина A2A содержит варианты нуклеиновых кислот, совместно кодирующие вариации во множестве положений. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариант по меньшей мере одного кодона домена VH, CDRH3 или VL. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариант по меньшей мере одного кодона в домене связывания рецептора аденозина A2A. Например, происходит вариация по меньшей мере одного кодона домена связывания рецептора аденозина A2A, как перечислено в **Таблице 1**. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию множества кодонов домена VH, CDRH3 или VL. В некоторых случаях библиотека вариантов содержит последовательности, кодирующие вариацию множества кодонов в домене связывания рецептора аденозина A2A. Иллюстративное число кодонов для вариации включает без ограничения по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов.

[00117] Способы, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивают синтез библиотеки связывания рецептора аденозина A2A нуклеиновых кислот, причем каждая кодирует заданный вариант по меньшей мере одной заранее определенной эталонной последовательности нуклеиновой кислоты, где библиотека связывания рецептора аденозина A2A содержит последовательности, кодирующие вариацию длины домена. В некоторых случаях домен представляет собой домен VH, CDRH3 или VL. В некоторых случаях домен представляет собой домен связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариацию длины, на по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов менее по сравнению с заранее определенной эталонной последовательностью. В некоторых случаях библиотека содержит последовательности, кодирующие вариацию длины, на по меньшей мере или около 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 или более 300 кодонов более по сравнению с заранее определенной эталонной последовательностью.

[00118] Настоящее изобретение относится к библиотекам связывания рецептора аденозина A2A, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, где библиотеки связывания рецептора аденозина A2A синтезируют с различным числом фрагментов. В некоторых случаях фрагменты содержат домен VH, CDRH3 или VL. В некоторых случаях библиотеки связывания рецептора аденозина A2A синтезируют с по меньшей мере или около 2 фрагментами, 3 фрагментами, 4 фрагментами, 5 фрагментами или более 5 фрагментами. Длина каждого из фрагментов нуклеиновых кислот или средняя длина синтезированных нуклеиновых кислот может составлять по меньшей мере или около 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600 или более 600 пар оснований. В некоторых случаях длина составляет около от 50 до 600, от 75 до 575, от 100 до 550, от 125 до 525, от 150 до 500, от 175 до 475, от 200 до 450, от 225 до 425, от 250 до 400, от 275 до 375 или от 300 до 350 пар оснований.

[00119] Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, как описано в настоящем документе, содержат различные длины аминокислот при трансляции. В некоторых случаях длина каждого из аминокислотных фрагментов или средняя длина синтезированных аминокислот может составлять по меньшей мере или около 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 или более 150 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислот составляет около от 15 до 150, от 20 до 145, от 25 до 140, от 30 до 135, от 35 до 130, от 40 до 125, от 45 до 120, от 50 до 115, от 55 до 110, от 60 до 110, от 65 до 105, от 70 до 100 или от 75 до 95 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислот составляет от около 22 до около 75 аминокислот.

[00120] Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A, содержащие *de novo* синтезированные варианты последовательности, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, содержат число вариантов последовательностей. В некоторых случаях число вариантов последовательностей синтезируют *de novo* для CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, CDRL3, VL, VH или их комбинации. В некоторых случаях число вариантов последовательностей синтезируют *de novo* для каркасного элемента 1 (FW1), каркасного элемента 2 (FW2), каркасного элемента 3 (FW3) или каркасного элемента 4 (FW4). В некоторых случаях число вариантов последовательностей

синтезируют *de novo* для домена связывания рецептора аденозина A2A. Например, число вариантных последовательностей составляет от около 1 до около 10 последовательностей для домена VH, около 10^8 последовательностей для домена связывания рецептора аденозина A2A, и от около 1 до около 44 последовательностей для домена VK. Число вариантных последовательностей может составлять по меньшей мере или около 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 или более 500 последовательностей. В некоторых случаях число вариантных последовательностей составляет около от 10 до 300, от 25 до 275, от 50 до 250, от 75 до 225, от 100 до 200 или от 125 до 150 последовательностей.

[00121] Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A содержащие синтезированные *de novo* вариантные последовательности, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, имеют улучшенное разнообразие. Например, варианты получают путем помещения вариантов домена связывания рецептора аденозина A2A в варианты каркаса иммуноглобулина, содержащие варианты N-концевого CDRH3 и варианты C-концевого CDRH3. В некоторых случаях варианты включают варианты созревания аффинности. Альтернативно или в комбинации варианты включают варианты в других областях иммуноглобулина, включая без ограничения CDRH1, CDRH2, CDRL1, CDRL2 и CDRL3. В некоторых случаях число вариантов библиотеки связывания рецептора аденозина A2A составляет по меньшей мере или около 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} или более 10^{20} неидентичных последовательностей. Например, библиотека, содержащая около 10 вариантных последовательностей для области VH, около 237 вариантных последовательностей для области CDRH3 и около 43 вариантных последовательностей для области VL и CDRL3, содержит 10^5 неидентичных последовательностей ($10 \times 237 \times 43$).

[00122] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против рецептора аденозина A2A, содержащие вариацию в по меньшей мере одной области антитела, где область представляет собой область CDR. В некоторых случаях антитело против рецептора аденозина A2A представляет собой однодоменное антитело, содержащее один варибельный домен тяжелой цепи, как например антитело VHH. В некоторых случаях антитело VHH содержит вариацию в одной или нескольких областях CDR. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержат по меньшей мере или около 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 или более 3000 последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержат по меньшей мере или около 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} или более 10^{20} последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3. Например, библиотеки содержат по меньшей мере 2000 последовательностей CDR1, по меньшей мере 1200 последовательностей CDR2 и по меньшей мере 1600 последовательностей CDR3. В некоторых случаях каждая последовательность не является идентичной.

[00123] В некоторых случаях CDR1, CDR2 или CDR3 относятся к варибельному домену легкой цепи (VL). CDR1, CDR2 или CDR3 варибельного домена легкой цепи (VL) могут упоминаться как CDRL1, CDRL2 или CDRL3, соответственно. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержат по меньшей мере или около 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 или более 3000 последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3 цепи VL. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержат по меньшей мере или около 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} или более 10^{20} последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3 цепи VL. Например, библиотеки содержат по меньшей мере 20 последовательностей CDR1 цепи VL, по меньшей мере 4 последовательности CDR2 цепи VL и по меньшей мере 140 последовательностей CDR3 цепи VL. В некоторых случаях библиотеки содержат по меньшей мере 2 последовательности CDR1 цепи VL, по меньшей мере 1 последовательность CDR2 цепи VL, и по меньшей мере 3000 последовательностей CDR3 цепи VL. В некоторых случаях VL представляет собой IGKV1-39, IGKV1-9, IGKV2-28, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV4-1, IGLV1-51, IGLV2-14, IGLV1-40 или IGLV3-1. В некоторых случаях VL представляет собой IGKV2-28. В некоторых случаях VL представляет собой IGLV1-51.

[00124] В некоторых случаях CDR1, CDR2 или CDR3 относятся к вариабельному домену тяжелой цепи (VH). CDR1, CDR2 или CDR3 вариабельного домена тяжелой цепи (VH) могут упоминаться как CDRH1, CDRH2 или CDRH3, соответственно. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержат по меньшей мере или около 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 или более 3000 последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3 цепи VH. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, содержат по меньшей мере или около 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} или более 10^{20} последовательностей CDR1, CDR2 или CDR3 цепи VH. Например, библиотеки содержат по меньшей мере 30 последовательностей CDR1 цепи VH, по меньшей мере 570 последовательностей CDR2 цепи VH и по меньшей мере 10^8 последовательностей CDR3 цепи VH. В некоторых случаях библиотеки содержат по меньшей мере 30 последовательностей CDR1 цепи VH, по меньшей мере 860 последовательностей CDR2 цепи VH и по меньшей мере 10^7 последовательностей CDR3 цепи VH. В некоторых случаях VH представляет собойIGHV1-18, IGHV1-69, IGHV1-8 IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30/33m, IGHV3-28, IGHV3-74, IGHV4-39 или IGHV4-59/61. В некоторых случаях VH представляет собой IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV3-23, IGHV3, IGHV1-46, IGHV3-7, IGHV1 или IGHV1-8. В некоторых случаях VH представляет собой IGHV1-69 и IGHV3-30. В некоторых случаях VH представляет собой IGHV3-23.

[00125] Библиотеки, как описано в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления содержат варьирующиеся длины CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 или CDRH3. В некоторых случаях длина CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 или CDRH3 содержит по меньшей мере или около 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 или более 90 аминокислот в длину. Например, CDRH3 содержит по меньшей мере или около 12, 15, 16, 17, 20, 21 или 23 аминокислот в длину. В некоторых случаях CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 или CDRH3 содержит диапазон от около 1 до около 10, от около 5 до около 15, от около 10 до около 20 или от около 15 до около 30 аминокислот в длину.

[00126] Библиотеки, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, имеющие вариантные последовательности CDR, как описано в настоящем документе, содержат различные длины аминокислот при трансляции. В некоторых случаях длина каждого из аминокислотных фрагментов или средняя длина синтезированных аминокислот может составлять по меньшей мере или около 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 или более 150 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислот составляет около от 15 до 150, от 20 до 145, от 25 до 140, от 30 до 135, от 35 до 130, от 40 до 125, от 45 до 120, от 50 до 115, от 55 до 110, от 60 до 110, от 65 до 105, от 70 до 100 или от 75 до 95 аминокислот. В некоторых случаях длина аминокислот составляет от около 22 аминокислот до около 75 аминокислот. В некоторых случаях антитела содержат по меньшей мере

или около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или более 5000 аминокислот.

[00127] Соотношения длин CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 или CDRH3 могут варьироваться в библиотеках, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых случаях CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 или CDRH3, содержащие по меньшей мере или около 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 или более 90 аминокислот в длину, составляют около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% библиотеки. Например, CDRH3, содержащая около 23 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 40%, CDRH3, содержащая около 21 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 30%, CDRH3, содержащая около 17 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 20%, и CDRH3, содержащая около 12 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 10%. В некоторых случаях CDRH3, содержащая около 20 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 40%, CDRH3, содержащая около 16 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 30%, CDRH3, содержащая около 15 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 20%, и CDRH3, содержащая около 12 аминокислот в длину, присутствует в библиотеке при 10%.

[00128] Библиотеки, как описано в настоящем документе, кодирующие антитело VHH, содержат варианты последовательности CDR, которые подвергаются перестановке с получением библиотеки с теоретическим разнообразием по меньшей мере или около 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} или более 10^{20} последовательностей. В некоторых случаях библиотека имеет конечное разнообразие библиотеки по меньшей мере или около 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} или более 10^{20} последовательностей.

[00129] Настоящее изобретение относится к библиотекам связывания рецептора аденозина A2A, кодирующим иммуноглобулин. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A представляет собой антитело. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A представляет собой антитело VHH. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет аффинность связывания (например, K_D) с рецептором аденозина A2A менее 1 нМ, менее 1,2 нМ, менее 2 нМ, менее 5 нМ, менее 10 нМ, менее 11 нМ, менее 13,5 нМ, менее 15 нМ, менее 20 нМ, менее 25 нМ или менее 30 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 1 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 1,2 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 2 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 5 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 10 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 13,5 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 15 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 20 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 25 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет K_D менее 30 нМ.

[00130] В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A является агонистом рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A является антагонистом рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A представляет собой аллостерический модулятор рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях аллостерический модулятор представляет собой отрицательный аллостерический

модулятор. В некоторых случаях аллостерический модулятор представляет собой положительный аллостерический модулятор. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A вызывает агонистические, антагонистические или аллостерические эффекты при концентрации по меньшей мере или около 1 нМ, 2 нМ, 4 нМ, 6 нМ, 8 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 120 нМ, 140 нМ, 160 нМ, 180 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1000 нМ или более 1000 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A представляет собой отрицательный аллостерический модулятор. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A представляет собой отрицательный аллостерический модулятор при концентрации по меньшей мере или около 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 нМ, 2 нМ, 4 нМ, 6 нМ, 8 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ или более 100 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A представляет собой отрицательный аллостерический модулятор при концентрации в диапазоне от около 0,001 до около 100, от 0,01 до около 90, от около 0,1 до около 80, от 1 до около 50, от около 10 до около 40 нМ или от около 1 до около 10 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет EC50 или IC50 по меньшей мере или около 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 или более 6 нМ. В некоторых случаях иммуноглобулин против рецептора аденозина A2A имеет EC50 или IC50 по меньшей мере или около 1 нМ, 2 нМ, 4 нМ, 6 нМ, 8 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ или более 100 нМ.

[00131] Иммуноглобулины против рецептора аденозина A2A, как описано в настоящем документе, могут иметь улучшенные свойства. В некоторых случаях иммуноглобулины против рецептора аденозина A2A являются мономерными. В некоторых случаях иммуноглобулины против рецептора аденозина A2A не склонны к агрегации. В некоторых случаях по меньшей мере или около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% иммуноглобулинов против рецептора аденозина A2A являются мономерными. В некоторых случаях иммуноглобулины против рецептора аденозина A2A термостабильны. В некоторых случаях иммуноглобулины против рецептора аденозина A2A приводят к снижению неспецифического связывания.

[00132] После синтеза библиотек связывания рецептора аденозина A2A, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, библиотеки можно использовать для скрининга и анализа. Например, библиотеки анализируют в отношении отображаемости и пэннинга библиотеки. В некоторых случаях отображаемость оценивают с помощью метки отбора. Примеры меток включают без ограничения радиоактивную метку, флуоресцентную метку, фермент, хемилюминесцентную метку, колориметрическую метку, аффинную метку или другие метки или метки, известные в данной области техники. В некоторых случаях меткой является гистидин, полигистидин, пус, гемагглютинин (HA) или FLAG. Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A могут содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, с множеством меток, таких как GFP, FLAG и Лусу, а также баркод ДНК. В некоторых случаях библиотеки анализируют путем секвенирования с использованием различных способов, включая без ограничения секвенирование одной молекулы в реальном времени (SMRT), секвенирование Polony, секвенирование путем лигирования, секвенирование с обратимым терминатором, секвенирование с протонным обнаружением, секвенирование с ионным полупроводником, секвенирование на основе нанопор, электронное секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование Максама-Гилберта, секвенирование обрыва цепи (например, по Сэнгеру), секвенирование +S или секвенирование путем синтеза.

[00133] *Системы экспрессии*

[00134] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, где библиотеки обладают улучшенной специфичностью, стабильностью, экспрессией, сворачиванием или последующей активностью. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, используют для скрининга и анализа.

[00135] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, где библиотеки нуклеиновых кислот применяют для скрининга и анализа. В некоторых случаях скрининг и анализ содержит *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo* анализ. Клетки для скрининга включают первичные клетки, взятые у живых субъектов, или клеточные линии. Клетки могут происходить от прокариот (например, бактерий и грибов) или эукариот (например, животных и растений). Примеры клеток животных включают без ограничения клетки мыши, кролика, примата и насекомого. В некоторых случаях клетки для скрининга включают клеточную линию, включая без ограничения клеточную линию яичника китайского хомячка (СНО), эмбриональную клеточную линию почки человека (НЕК) или клеточную линию почки детеныша хомячка (ВНК). В некоторых случаях нуклеиновые кислоты, как раскрыто в настоящем документе, могут также доставляться в многоклеточный организм. Примеры многоклеточных организмов включают без ограничения растение, мышшь, кролика, примата и насекомое.

[00136] Библиотеки нуклеиновых кислот или библиотеки белков, кодируемых ими, как раскрыто в настоящем документе, могут подвергаться скринингу на различные фармакологические или фармакокинетические свойства. В некоторых случаях библиотеки подвергают скринингу с использованием анализов *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Например, проверяемые *in vitro* фармакологические или фармакокинетические свойства включают без ограничения аффинность связывания, специфичность связывания и avidность связывания. Типичные фармакологические или фармакокинетические свойства *in vivo* библиотек, как раскрыто в настоящем документе, которые подвергают скринингу, включают без ограничения терапевтическую эффективность, активность, свойства доклинической токсичности, свойства клинической эффективности, свойства клинической токсичности, иммуногенность, эффективность и свойства клинической безопасности.

[00137] Фармакологические или фармакокинетические свойства, которые можно подвергать скринингу, включают без ограничения аффинность связывания с клетками и клеточную активность. Например, анализы аффинности связывания клеток или анализы клеточной активности проводят для определения агонистических, антагонистических или аллостерических эффектов библиотек, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых случаях анализ клеточной активности представляет собой анализ cAMP. В некоторых случаях библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, сравнивают с клеточным связыванием или клеточной активностью лигандов рецепторов аденозина A2A.

[00138] Библиотеки, как раскрыто в настоящем документе, могут подвергаться скринингу в клеточных или неклеточных анализах. Примеры неклеточных анализов включают без ограничения использование вирусных частиц, использование трансляционных белков *in vitro* и использование протеолипосом с рецепторами аденозина A2A.

[00139] Библиотеки нуклеиновых кислот, как описано в настоящем документе, можно подвергать скринингу с помощью секвенирования. В некоторых случаях последовательность следующего поколения используют для определения обогащения последовательностью вариантов связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях определяют распределение V-генов, распределение J-генов, семейство V-генов, количество CDR3 на длину или их комбинацию. В некоторых случаях определяют клональную частоту, клональное накопление, линейное накопление или их комбинацию. В некоторых случаях определяют количество последовательностей, последовательностей с клонами VH, клонов, клонов более 1, клонотипов, клонотипов более 1, линий, симпсонов или их комбинации. В некоторых случаях определяют процент неидентичных CDR3. Например, процент неидентичных CDR3 вычисляют как количество неидентичных CDR3 в образце, поделенное на общее количество последовательностей, содержащих CDR3 в образце.

[00140] Настоящее изобретение относится к библиотеки нуклеиновых кислот, где библиотеки нуклеиновых кислот могут экспрессироваться в векторе. Векторы экспрессии для вставки библиотек нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе, могут включать эукариотические или прокариотические векторы экспрессии. Примеры векторов экспрессии включают без ограничения векторы экспрессии млекопитающих: pSF-CMV-NEO-NH2-PPT-3XFLAG, pSF-CMV-NEO-COOH-3XFLAG, pSF-CMV-PURO-NH2-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) и pSF-CMV-PURO-NH2-CMYC, бактериальные векторы экспрессии: pSF-OXB20-BetaGal, pSF-OXB20-Fluc, pSF-OXB20 и pSF-Tac, растительные векторы экспрессии: pRI 101-AN DNA и pCambia2301, и дрожжевые векторы экспрессии: pTYB21 и pKLAC2, и векторы насекомых: pAc5.1/V5-His A и pDEST8. В некоторых случаях вектор представляет собой pcDNA3 или pcDNA3.1.

[00141] В настоящем документе раскрыты библиотеки нуклеиновых кислот, которые экспрессируются в векторе с получением конструкции, содержащей каркас, содержащий последовательности доменов связывания рецептора аденозина A2A. В некоторых случаях размер конструкции варьируется. В некоторых случаях конструкция содержит по меньшей мере или около 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, 4800, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или более 10000 оснований. В некоторых случаях конструкция содержит диапазон около от 300 до 1000, от 300 до 2000, от 300 до 3000, от 300 до 4000, от 300 до 5000, от 300 до 6000, от 300 до 7000, от 300 до 8000, от 300 до 9000, от 300 до 10000, от 1000 до 2000, от 1000 до 3000, от 1000 до 4000, от 1000 до 5000, от 1000 до 6000, от 1000 до 7000, от 1000 до 8000, от 1000 до 9000, от 1000 до 10000, от 2000 до 3000, от 2000 до 4000, от 2000 до 5000, от 2000 до 6000, от 2000 до 7000, от 2000 до 8000, от 2000 до 9000, от 2000 до 10000, от 3000 до 4000, от 3000 до 5000, от 3000 до 6000, от 3000 до 7000, от 3000 до 8000, от 3000 до 9000, от 3000 до 10000, от 4000 до 5000, от 4000 до 6000, от 4000 до 7000, от 4000 до 8000, от 4000 до 9000, от 4000 до 10000, от 5000 до 6000, от 5000 до 7000, от 5000 до 8000, от 5000 до 9000, от 5000 до 10000, от 6000 до 7000, от 6000 до 8000, от 6000 до 9000, от 6000 до 10000, от 7000 до 8000, от 7000 до 9000, от 7000 до 10000, от 8000 до 9000, от 8000 до 10000 или от 9000 до 10000 оснований.

[00142] Настоящее изобретение относится к библиотекам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, где библиотеки нуклеиновых кислот экспрессируются в клетке. В некоторых случаях библиотеки синтезируют для

экспрессии репортерного гена. Иллюстративные репортерные гены включают без ограничения ацетогидроксикислотную синтазу (AHAS), щелочную фосфатазу (AP), бета-галактозидазу (LacZ), бета-глюкоронидазу (GUS), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), лазурный флуоресцентный белок, цитриновый флуоресцентный белок, оранжевый флуоресцентный белок, вишневый флуоресцентный белок, бирюзовый флуоресцентный белок, синий флуоресцентный белок, пероксидазу хрена (HRP), люциферазу (Luc), нопалинсинтазу (NOS), октопинсинтазу (OCS), люциферазу и их производных. Способы определения модуляции репортерного гена хорошо известны в данной области техники и включают без ограничения флуорометрические способы (например, флуоресцентную спектроскопию, сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS), флуоресцентную микроскопию и определение устойчивости к антибиотикам.

[00143] Заболевания и нарушения

[00144] Настоящее изобретение относится к библиотекам связывания рецептора аденозина A2A, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие каркасы, содержащие домены связывания рецептора аденозина A2A, которые могут оказывать терапевтическое действие. В некоторых случаях библиотеки связывания рецептора аденозина A2A приводят к белку при трансляции, который применяют для лечения заболевания или нарушения. В некоторых случаях белок представляет собой иммуноглобулин. В некоторых случаях белок представляет собой пептидомиметик. Иллюстративные заболевания включают без ограничения рак, воспалительные заболевания или нарушения, метаболическое заболевание или нарушение, сердечно-сосудистое заболевание или нарушение, респираторное заболевание или нарушение, боль, заболевание или нарушение пищеварительного тракта, заболевание или нарушение репродуктивной системы, эндокринное заболевание или нарушение, или неврологическое заболевание или нарушение. В некоторых случаях неврологическое заболевание или нарушение представляет собой нейродегенеративное заболевание или нарушение. В некоторых случаях неврологическим заболеванием или нарушением является болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или рассеянный склероз. В некоторых случаях раком является солидная опухоль или рак крови. В некоторых случаях иммуноглобулины против A2AR, как раскрыто в настоящем документе, применяют в качестве моонотерапии для лечения рака. В некоторых случаях иммуноглобулины против A2AR, как раскрыто в настоящем документе, применяют в комбинации с другими терапевтическими средствами для лечения рака. В некоторых случаях иммуноглобулины против A2AR, как раскрыто в настоящем документе, усиливают противоопухолевые вакцины, блокаду контрольных точек и адоптивную Т-клеточную терапию. В некоторых случаях ингибитор рецептора аденозина A2A, как описано в настоящем документе, применяют для лечения заболевания или нарушения центральной нервной системы, почек, кишечника, легких, волос, кожи, костей или хрящей. В некоторых случаях ингибитор рецептора аденозина A2A, как раскрыто в настоящем документе, применяют для регуляции сна, ангиогенеза или модуляции иммунной системы. В некоторых случаях субъектом является млекопитающее. В некоторых случаях субъектом является мышь, кролик, собака или человек. Субъектами, подлежащими лечению способами, раскрытыми в настоящем документе, могут быть младенцы, взрослые или дети. Фармацевтические композиции, содержащие антитела или фрагменты антител, как описано в настоящем документе, можно вводить внутривенно или подкожно.

[00145] Библиотеки вариантов

[00146] Вариация кодона

[00147] Библиотеки вариантов нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе, могут содержать множество нуклеиновых кислот, где каждая нуклеиновая кислота кодирует вариантную последовательность кодона по сравнению с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях каждая нуклеиновая кислота первой популяции нуклеиновых кислот содержит вариант в одном сайте вариации. В некоторых случаях первая популяция нуклеиновых кислот содержит множество вариантов в одном сайте вариации, так что первая популяция нуклеиновых кислот содержит более одного варианта в одном и том же сайте вариации. Первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, коллективно кодирующие несколько вариантов кодонов в одном и том же сайте вариации. Первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 19 или более кодонов в одном и том же положении. Первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 60 различных триплетов в одном и том же положении, или первая популяция нуклеиновых кислот может содержать нуклеиновые кислоты, совместно кодирующие до 61 различных триплетов кодонов в одном и том же положении. Каждый вариант может кодировать кодон, который приводит к другой аминокислоте в ходе трансляции. В **таблице 3** представлен список всех возможных кодонов (и репрезентативной аминокислоты) для сайта вариации.

Таблица 2. Перечень кодонов и аминокислот

| Аминокислоты | Однобук- венный код | Трехбук- венный код | Кодоны | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | | | | | | | | |
| Аланин | A | Ala | GCA | GCC | GCG | GCT | | | |
| Цистеин | C | Cys | TGC | TGT | | | | | |
| Аспарагиновая кислота | D | Asp | GAC | GAT | | | | | |
| Глютаминовая кислота | E | Glu | GAA | GAG | | | | | |
| Фенилаланин | F | Phe | TTC | TTT | | | | | |
| Глицин | G | Gly | GGA | GGC | GGG | GGT | | | |
| Гистидин | H | His | CAC | CAT | | | | | |
| Изолейцин | I | Iso | ATA | ATC | ATT | | | | |
| Лизин | K | Lys | AAA | AAG | | | | | |
| Лейцин | L | Leu | TTA | TTG | CTA | CTC | CTG | CTT | |
| Метионин | M | Met | ATG | | | | | | |
| Аспарагин | N | Asn | AAC | AAT | | | | | |
| Пролин | P | Pro | CCA | CCC | CCG | CCT | | | |
| Глютамин | Q | Gln | CAA | CAG | | | | | |
| Аргинин | R | Arg | AGA | AGG | CGA | CGC | CGG | CGT | |
| Серин | S | Ser | AGC | AGT | TCA | TCC | TCG | TCT | |
| Треонин | T | Thr | ACA | ACC | ACG | ACT | | | |

| | | | | | | |
|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| Валин | V | Val | GTA | GTC | GTG | GTT |
| Триптофан | W | Trp | TGG | | | |
| Тирозин | Y | Tyr | TAC | TAT | | |

[00148] Популяция нуклеиновых кислот может содержать разнообразные нуклеиновые кислоты, в совокупности кодирующие до 20 вариаций кодонов в нескольких положениях. В таких случаях каждая нуклеиновая кислота в популяции содержит вариацию кодонов более чем в одном положении в одной и той же нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях каждая нуклеиновая кислота в популяции содержит вариацию кодонов при 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 или более кодонах в одной длинной нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях популяция вариантов нуклеиновых кислот содержит вариацию кодонов при 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 или более кодонах в одной нуклеиновой кислоте. В некоторых случаях популяция вариантов нуклеиновых кислот содержит вариацию кодонов при по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более кодонах в одной длинной нуклеиновой кислоте.

[00149] Высокопараллельный синтез нуклеиновых кислот

[00150] Настоящее изобретение относится к подходу в виде платформы, предусматривающему миниатюризацию, параллелизацию и вертикальную интеграцию непрерывного процесса от синтеза полинуклеотидов до сборки генов в нанолунках на кремнии с получением революционной платформы синтеза. Устройства, как раскрыто в настоящем документе, при той же занимаемой площади, что и 96-луночный планшет, обеспечивают платформу для кремниевого синтеза, способную увеличить производительность до 1000 и более раз по сравнению с традиционными способами синтеза, с производством приблизительно до 1000000 или более полинуклеотидов, или 10000 или более генов в одном высокопараллельном цикле.

[00151] С появлением секвенирования следующего поколения геномные данные с высоким разрешением стали важным фактором для исследований, которые углубляются в изучение биологической роли различных генов как в биологии нормального типа, так и в патогенезе заболеваний. В основе этого исследования лежит центральная догма молекулярной биологии и концепция «переноса последовательной информации от остатка к остатку». Геномная информация, закодированная в ДНК, транскрибируется в сообщение, которое затем транслируется в белок, являющийся активным продуктом данного биологического пути.

[00152] Другая вызывающая интерес область исследований связана с открытием, разработкой и производством терапевтических молекул, ориентированных на высокоспецифическую клеточную мишень. Библиотеки последовательностей ДНК с высоким разнообразием лежат в основе линий разработки целевых терапевтических средств. Генные мутанты используют для экспрессии белков в цикле разработки, создания и тестирования белковой инженерии, который идеально завершается оптимизированным геном для высокой экспрессии белка с высокой аффинностью к его терапевтической мишени. В качестве примера можно рассмотреть связывающий карман рецептора. Возможность одновременного тестирования всех перестановок последовательностей всех остатков в связывающем кармане позволит провести тщательное исследование, увеличивая шансы на успех. Мутагенез с насыщением, при котором исследователь пытается

создать все возможные мутации в определенном сайте внутри рецептора, представляет собой один из подходов к решению этой задачи разработки. Несмотря на то, что этот подход является дорогостоящим, требует много времени и труда, он позволяет включить каждый вариант в каждом положении. Напротив, комбинационный мутагенез, при котором несколько выбранных положений или короткая цепь ДНК могут быть сильно модифицированы, создаст неполную коллекцию вариантов с представлением данных со смещением.

[00153] Для того, чтобы ускорить линию разработки лекарственных средств, библиотека с желаемыми вариантами, доступными с заданной частотой в нужном положении, доступном для тестирования, другими словами, прецизионная библиотека, позволяет снизить затраты, а также время выполнения скрининга. Настоящее изобретение относится к способам синтеза библиотек синтетических вариантов нуклеиновых кислот, которые обеспечивают точное введение каждого предполагаемого варианта с желаемой частотой. Для конечного пользователя это означает возможность не только тщательной выборки пространства последовательностей, но и возможность эффективно запрашивать эти гипотезы, сокращая затраты и время проверки. Полногеномное редактирование может выявить важные пути, библиотеки, в которых каждый вариант и перестановку последовательности можно протестировать на предмет оптимальной функциональности, а тысячи генов можно использовать для реконструкции целых путей и геномов для реинжиниринга биологических систем с целью открытия лекарственных средств.

[00154] В первом примере само лекарственное средство может быть оптимизировано с помощью способов, раскрытых в настоящем документе. Например, для улучшения специфической функции антитела разрабатывают и синтезируют библиотеку вариантных полинуклеотидов, кодирующую часть антитела. Библиотека вариантов нуклеиновых кислот для антитела затем может быть получена с помощью способов, раскрытых в настоящем документе (например, мутагенеза ПЦР с последующей вставкой в вектор). Затем антитело экспрессируется в продуцирующей клеточной линии и подвергается скринингу на повышенную активность. Примеры скрининга включают изучение модуляции аффинности связывания с антигеном, стабильности или эффекторной функции (например, ADCC, комплемента или апоптоза). Иллюстративные области для оптимизации антитела включают без ограничения Fc-область, Fab-область, переменную область Fab-области, константную область Fab-области, переменный домен тяжелой цепи или легкой цепи (V_H или V_L), и специфические определяющие комплементарность области (CDR) V_H или V_L .

[00155] Библиотеки нуклеиновых кислот, синтезированные способами, как раскрыто в настоящем документе, могут экспрессироваться в различных клетках, связанных с болезненным состоянием. Клетки, связанные с болезненным состоянием, включают клеточные линии, образцы тканей, первичные клетки субъекта, культивируемые клетки субъекта или клетки модельной системы. Иллюстративные модельные системы включают без ограничения растительные и животные модели болезненного состояния.

[00156] Для идентификации вариантной молекулы, связанной с профилактикой, уменьшением или лечением болезненного состояния, библиотека вариантов нуклеиновых кислот, как раскрыто в настоящем документе, экспрессируется в клетке, связанной с болезненным состоянием, или в клетке, в которой болезненное состояние может быть индуцировано. В некоторых случаях используют агент для индукции болезненного состояния в клетках. Типичные инструменты для индукции болезненного состояния включают без ограничения рекомбинантную систему Cre/Lox, индукцию воспаления LPS и стрептозотонин для индукции гипогликемии. Клетки, связанные с болезненным состоянием, могут представлять собой клетки модельной системы или культивируемые клетки, а также клетки субъекта, имеющего конкретное

болезненное состояние. Иллюстративные болезненные состояния включают бактериальное, грибковое, вирусное, аутоиммунное или пролиферативное заболевание (например, рак). В некоторых случаях библиотека вариантов нуклеиновых кислот экспрессируется в модельной системе, клеточной линии или первичных клетках, полученных у субъекта, и подвергается скринингу на предмет изменения по меньшей мере одной клеточной активности. Иллюстративные клеточные активности включают без ограничения пролиферацию, развитие цикла, гибель клеток, адгезию, миграцию, репродукцию, передачу клеточных сигналов, выработку энергии, использование кислорода, метаболическую активность и старение, реакцию на повреждение свободными радикалами или любую их комбинацию.

[00157] Подложки

[00158] Устройства, используемые в качестве поверхности для синтеза полинуклеотидов, могут быть в форме подложек, которые включают без ограничения гомогенные матричные поверхности, структурированные матричные поверхности, каналы, шарики, гели и т.п. Настоящее изобретение относится к подложкам, содержащим множество кластеров, где каждый кластер содержит множество локусов, поддерживающих присоединение и синтез полинуклеотидов. В некоторых случаях подложки содержат гомогенную матричную поверхность. Например, гомогенная матричная поверхность представляет собой однородную пластину. В контексте настоящего изобретения термин «локус» относится к дискретному участку в структуре, который обеспечивает поддержку полинуклеотидов, кодирующих одну заданную последовательность, простирающихся от поверхности. В некоторых случаях локус находится на двухмерной поверхности, например, на по существу плоской поверхности. В некоторых случаях локус находится на трехмерной поверхности, например, в лунке, микролунке, канале или столбе. В некоторых случаях поверхность локуса содержит материал, который активно функционализирован для присоединения по меньшей мере одного нуклеотида для синтеза полинуклеотидов, или предпочтительно популяции идентичных нуклеотидов для синтеза популяции полинуклеотидов. В некоторых случаях полинуклеотид относится к популяции полинуклеотидов, кодирующих одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях поверхность подложки включает одну или несколько поверхностей подложки. Средняя частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных в описанной в настоящем документе библиотеке с использованием раскрытых систем и способов, часто составляет менее 1 на 1000, менее около 1 на 2000, менее около 1 на 3000 или реже без исправления ошибок.

[00159] Настоящее изобретение относится к поверхностям, поддерживающим параллельный синтез множества полинуклеотидов, имеющих различные заданные последовательности, в адресуемых локусах на общей подложке. В некоторых случаях подложка обеспечивает поддержку синтеза более 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1200000, 1400000, 1600000, 1800000, 2000000, 2500000, 3000000, 3500000, 4000000, 4500000, 5000000, 10000000 или более неидентичных полинуклеотидов. В некоторых случаях поверхности обеспечивают поддержку синтеза более 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1200000, 1400000, 1600000, 1800000, 2000000, 2500000, 3000000, 3500000, 4000000, 4500000, 5000000, 10000000 или более полинуклеотидов, кодирующих различные последовательности. В некоторых случаях по меньшей мере часть полинуклеотидов имеет идентичную последовательность или предназначена для синтеза с идентичной последовательностью. В некоторых случаях подложка обеспечивает поверхностную среду для роста полинуклеотидов, имеющих

по меньшей мере 80, 90, 100, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 оснований или более.

[00160] Настоящее изобретение относится к способам синтеза полинуклеотидов на различных локусах подложки, где каждый локус поддерживает синтез популяции полинуклеотидов. В некоторых случаях каждый локус поддерживает синтез популяции полинуклеотидов, имеющих другую последовательность, чем популяция полинуклеотидов, выращенных на другом локусе. В некоторых случаях полинуклеотидную последовательность синтезируют с избыточностью 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более по разным локусам в одном и том же кластере локусов на поверхности для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях локусы подложки располагаются во множестве кластеров. В некоторых случаях подложка содержит по меньшей мере 10, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000 или более кластеров. В некоторых случаях подложка содержит более 2000, 5000, 10000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 1100000, 1200000, 1300000, 1400000, 1500000, 1600000, 1700000, 1800000, 1900000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 12000000, 14000000, 16000000, 18000000, 20000000, 25000000, 30000000, 35000000, 40000000, 45000000, 50000000 или 100000000 или более различных локусов. В некоторых случаях подложка содержит около 10000 различных локусов. Количество локусов в пределах одного кластера варьируется в различных случаях. В некоторых случаях каждый кластер включает 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 или более локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 50-500 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 100-200 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 100-150 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 109, 121, 130 или 137 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает около 19, 20, 61, 64 или более локусов. Альтернативно или в сочетании синтез полинуклеотидов происходит на поверхности гомогенной матрицы.

[00161] В некоторых случаях число отдельных полинуклеотидов, синтезируемых на подложке, зависит от числа различных локусов, доступных в подложке. В некоторых случаях плотность локусов в кластере или на поверхности подложки составляет по меньшей мере или около 1, 10, 25, 50, 65, 75, 100, 130, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 1000 или более локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит 10-500, 25-400, 50-500, 100-500, 150-500, 10-250, 50-250, 10-200 или 50-200 мм^2 . В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов в кластере или на поверхности составляет около 10-500, около 10-200 или около 10-100 мкм. В некоторых случаях расстояние между двумя центрами соседних локусов составляет более около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов составляет менее около 200, 150, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях каждый локус имеет ширину около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкм. В некоторых случаях каждый локус имеет ширину около 0,5-100, 0,5-50, 10-75 или 0,5-50 мкм.

[00162] В некоторых случаях плотность кластеров в подложке составляет по меньшей мере или около 1 кластер на 100 мм^2 , 1 кластер на 10 мм^2 , 1 кластер на 5 мм^2 , 1 кластер на 4 мм^2 , 1 кластер на 3 мм^2 , 1 кластер на 2 мм^2 , 1 кластер на 1 мм^2 , 2 кластера на 1 мм^2 , 3 кластера на 1 мм^2 , 4 кластера на 1 мм^2 , 5 кластеров на 1 мм^2 , 10 кластеров на 1 мм^2 , 50 кластеров на 1 мм^2 или более. В некоторых случаях подложка содержит от около 1 кластера на 10 мм^2 до около 10 кластеров на 1 мм^2 . В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров составляет по меньшей мере или около 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 или 5000 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров составляет

между около 50-100, 50-200, 50-300, 50-500 и 100-2000 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров составляет между около 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 или 0,5-2 мм. В некоторых случаях каждый кластер имеет поперечное сечение от около 0,5 до около 2, от около 0,5 до около 1 или от около 1 до около 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер имеет поперечное сечение около 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 или 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер имеет внутреннее поперечное сечение около 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 или 2 мм.

[00163] В некоторых случаях подложка составляет около размер стандартного 96-луночного планшета, например, между около 100 до около 200 мм, и между около 50 и около 150 мм. В некоторых случаях подложка имеет диаметр менее или равный около 1000, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 мм. В некоторых случаях диаметр подложки составляет между около 25-1000, 25-800, 25-600, 25-500, 25-400, 25-300 или 25-200 мм. В некоторых случаях подложка имеет площадь плоской поверхности по меньшей мере около 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 12000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000 мм² или более. В некоторых случаях толщина подложки составляет около 50- 2000, 50- 1000, 100-1000, 200-1000 или 250-1000 мм.

[00164] *Материалы поверхности*

[00165] Подложки, устройства и реакторы согласно настоящему изобретению относятся к изготовленным из любого разнообразия материалов, подходящих для способов, композиций и систем, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых случаях материалы подложки изготавливают с низким уровнем связывания нуклеотидов. В некоторых случаях материалы подложки модифицируют для создания различных поверхностей, демонстрирующих высокий уровень связывания нуклеотидов. В некоторых случаях материалы подложки являются проницаемыми для видимого и/или ультрафиолетового света. В некоторых случаях материалы подложки обладают достаточной проводимостью, например, способны формировать однородные электрические поля по всей поверхности подложки или ее части. В некоторых случаях проводящие материалы подключают к электрическому заземлению. В некоторых случаях подложка является теплопроводной или изолированной. В некоторых случаях материалы являются химически стойкими и термостойкими для того, чтобы поддерживать химические или биохимические реакции, например, процессы реакции синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях подложка содержит гибкие материалы. Что касается гибких материалов, материалы могут включать без ограничения нейлон, как модифицированный, так и немодифицированный, нитроцеллюлозу, полипропилен и т.п. В некоторых случаях подложка содержит жесткие материалы. Материалы для жестких материалов могут включать без ограничения стекло, кварцевое стекло, кремний, пластмассы (например, политетрафторэтилен, полипропилен, полистирол, поликарбонат и их смеси и т.п.), металлы (например, золото, платина и т.п.). Подложка, твердый носитель или реакторы могут быть изготовлены из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, целлюлозных полимеров, полиакриламидов, полидиметилсилоксана (PDMS) и стекла. Подложки/твердые носители или микроструктуры, реакторы с ними могут быть изготовлены из комбинации перечисленных в настоящем документе материалов или любого другого подходящего материала, известного в данной области техники.

[00166] *Структура поверхности*

[00167] Настоящее изобретение относится к подложкам для способов, композиций и систем, как раскрыто в настоящем документе, где подложки имеют структуру поверхности, подходящую для способов, композиций и систем, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых случаях подложка содержит выступающие и/или углубленные элементы. Одним из преимуществ таких элементов является увеличение площади поверхности для поддержки синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях подложку с выступающими и/или углубленными элементами называется трехмерной подложкой. В некоторых случаях трехмерная подложка содержит один или несколько каналов. В некоторых случаях один или несколько локусов содержат канал. В некоторых случаях каналы доступны для нанесения реагента через устройство для нанесения, такое как устройство для нанесения материала. В некоторых случаях реагенты и/или текучие среды собирают в большой лунке в одном или нескольких каналах с сообщением по текучей среде. Например, подложка содержит множество каналов, соответствующих множеству локусов в кластере, и множество каналов сообщаются по текучей среде с одной лункой кластера. В некоторых способах библиотеку полинуклеотидов синтезируют во множестве локусов кластера.

[00168] Настоящее изобретение относится к подложкам для способов, композиций и систем, как раскрыто в настоящем документе, где подложки выполнены с возможностью синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях структура выполнена с возможностью обеспечения контролируемого потока и путей массопереноса для синтеза полинуклеотидов на поверхности. В некоторых случаях структура подложки позволяет контролировать и равномерно распределять пути массопереноса, время химического воздействия и/или эффективность промывки в ходе синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях структура подложки позволяет повысить эффективность охвата, например, посредством обеспечения достаточного объема для растущего полинуклеотида, так что исключенный объем растущим полинуклеотидом не занимает более 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее от первоначально доступного объема, доступного или подходящего для выращивания полинуклеотида. В некоторых случаях трехмерная структура позволяет управлять потоком текучей среды для того, чтобы обеспечить быстрый обмен при химическом воздействии.

[00169] Настоящее изобретение относится к подложкам для способов, композиций и систем, как раскрыто в настоящем документе, где подложки включают структуры, подходящие для способов, композиций и систем, как раскрыто в настоящем документе. В некоторых случаях сегрегация достигается физической структурой. В некоторых случаях сегрегация достигается путем дифференциальной функционализации поверхности, генерирующей активные и пассивные области для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях дифференциальная функционализация достигается посредством чередования гидрофобности по всей поверхности подложки, тем самым создавая эффекты угла смачивания водой, которые вызывают образование капель или смачивание нанесенных реагентов. Применение более крупных структур может уменьшить разбрызгивание и перекрестное загрязнение отдельных участков синтеза полинуклеотидов реагентами из соседних участков. В некоторых случаях устройство, такое как устройство для нанесения материала, используют для нанесения реагентов в различные участки синтеза полинуклеотидов. Подложки, обладающие трехмерными характеристиками, выполнены с возможностью обеспечения синтеза большого количества полинуклеотидов (например, более около 10000) с низкой частотой ошибок (например, менее около 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1:5000 или 1:10000). В некоторых случаях подложка имеет элементы с плотностью около или более около 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 или 500 элементов на мм².

[00170] Лунка подложки может иметь такую же или другую ширину, высоту и/или объем, как и другая лунка подложки. Канал подложки может иметь такую же или другую ширину, высоту и/или объем, как и другой канал подложки. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, включающей кластер, или и то, и другое составляет между около 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 или 0,5-2 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, или и то, и другое составляет менее или около 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06 или 0,05 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, или и то, и другое составляет между около 1,0 и 1,3 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, или и то, и другое составляет около 1,150 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, или и то, и другое составляет около 0,08 мм. Диаметр кластера относится к кластерам внутри двухмерной или трехмерной подложки.

[00171] В некоторых случаях высота лунки составляет около 20-1000, 50-1000, 100-1000, 200-1000, 300-1000, 400-1000 или 500-1000 мкм. В некоторых случаях высота лунки составляет менее около 1000, 900, 800, 700 или 600 мкм.

[00172] В некоторых случаях подложка содержит множество каналов, соответствующих множеству локусов в кластере, где высота или глубина канала составляет 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50 или 10-50 мкм. В некоторых случаях высота канала составляет менее 100, 80, 60, 40 или 20 мкм.

[00173] В некоторых случаях диаметр канала, локуса (например, в по существу плоской подложке) или как канала, так и локуса (например, в трехмерной подложке, где локус соответствует каналу) составляет около 1-1000, 1-500, 1-200, 1-100, 5-100 или 10-100 мкм, например, около 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях диаметр канала, локуса или как канала, так и локуса составляет менее около 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних каналов, локусов или как каналов, так и локусов составляет около 1-500, 1-200, 1-100, 5-200, 5-100, 5-50 или 5-30, например, около 20 мкм.

[00174] Модификации поверхности

[00175] Настоящее изобретение относится к способам синтеза полинуклеотидов на поверхности, где поверхность содержит различные модификации поверхности. В некоторых случаях модификации поверхности используют для химического и/или физического изменения поверхности посредством аддитивного или субтрактивного процесса для изменения одного или нескольких химических и/или физических свойств поверхности подложки или выбранного участка или области поверхности подложки. Например, модификации поверхности включают без ограничения: (1) изменение свойств смачивания поверхности, (2) функционализацию поверхности, т.е. обеспечение, модификацию или замену функциональных групп поверхности, (3) дефункционализацию поверхности, т.е. удаление поверхностных функциональных групп, (4) иное изменение химического состава поверхности, например, посредством травления, (5) увеличение или уменьшение шероховатости поверхности, (6) нанесение покрытия на поверхность, например, покрытия, которое проявляет свойства смачивания, отличные от свойств смачивания поверхности, и/или (7) осаждение частиц на поверхности.

[00176] В некоторых случаях добавление химического слоя поверх поверхности (называемого промотором адгезии) облегчает формирование структурного рисунка локусов на поверхности подложки. Иллюстративные поверхности для применения повышения адгезии включают без ограничения

стекло, кремний, диоксид кремния и нитрид кремния. В некоторых случаях промотор адгезии представляет собой химическое вещество с высокой поверхностной энергией. В некоторых случаях на поверхность подложки наносят второй химический слой. В некоторых случаях второй химический слой имеет низкую поверхностную энергию. В некоторых случаях поверхностная энергия химического слоя, нанесенного на поверхность, способствует локализации капель на поверхности. В зависимости от выбранного расположения рисунка близость локусов и/или площадь контакта с текучей средой в локусах может изменяться.

[00177] В некоторых случаях поверхность подложки или выявленные локусы, на которые наносят нуклеиновые кислоты или другие фрагменты, например, для синтеза полинуклеотидов, являются гладкими или по существу плоскими (например, двухмерными) или имеют неровности, такие как выпуклые или углубленные элементы (например, трехмерные элементы). В некоторых случаях поверхность подложки модифицируют одним или несколькими слоями различных составов. Такие представляющие интерес слои модификации включают без ограничения неорганические и органические слои, такие как металлы, оксиды металлов, полимеры, небольшие органические молекулы и т.п.

[00178] В некоторых случаях выявленные локусы подложки функционализованы одним или несколькими фрагментами, которые увеличивают и/или уменьшают поверхностную энергию. В некоторых случаях фрагмент является химически инертным. В некоторых случаях фрагмент выполнен с возможностью поддержания желаемой химической реакции, например, одного или нескольких процессов в реакции синтеза полинуклеотидов. Поверхностная энергия или гидрофобность поверхности является фактором, определяющим способность нуклеотида прикрепляться к поверхности. В некоторых случаях способ функционализации подложки предусматривает: (а) предоставление подложки, имеющей поверхность, которая содержит диоксид кремния, и (b) силанизирование поверхности с использованием подходящего силанизирующего агента, как раскрыто в настоящем документе, или иным образом известного в данной области техники, например, органофункциональной молекулой алкоксисилана. Способы и функционализирующие агенты описаны в патенте США № 5474796, который включен в настоящее документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00179] В некоторых случаях подложку функционализируют посредством контакта с дериватирующей композицией, которая содержит смесь силанов, в условиях реакции, эффективных для связывания силанов с поверхностью подложки, как правило, посредством реакционноспособных гидрофильных фрагментов, присутствующих на поверхности подложки. Силанизация обычно покрывает поверхность посредством самосборки с органофункциональными молекулами алкоксисилана. Различные функционализирующие реагенты силоксана могут быть дополнительно использованы, как известно в настоящее время в данной области техники, например, для снижения или увеличения поверхностной энергии. Органофункциональные алкоксисиланы классифицируют в соответствии с их органическими функциями.

[00180] Синтез полинуклеотидов

[00181] Способы полинуклеотидного синтеза согласно настоящему изобретению могут включать процессы на основе химии фосфорамидитов. В некоторых случаях полинуклеотидный синтез предусматривает связывание основания с фосфорамидитом. Полинуклеотидный синтез может предусматривать связывание основания путем осаждения фосфорамидита в условиях связывания, где на одно и то же основание необязательно наносят фосфорамидит более одного раза, т.е. двойное связывание.

Полинуклеотидный синтез может предусматривать экпирование непрореагировавших участков. В некоторых случаях экпирование является необязательным. Полинуклеотидный синтез также может предусматривать окисление, или стадию окисления, или стадии окисления. Полинуклеотидный синтез может предусматривать деблокирование, детритилирование и сульфуризацию. В некоторых случаях полинуклеотидный синтез предусматривает либо окисление, либо сульфуризацию. В некоторых случаях между одной или каждой стадией в ходе реакции полинуклеотидного синтеза устройство промывают, например, тетразолом или ацетонитрилом. Временные рамки для любой одной стадии в способе фосфорамидитного синтеза могут составлять менее около 2 мин, 1 мин, 50 с, 40 с, 30 с, 20 с и 10 м.

[00182] Полинуклеотидный синтез с использованием фосфорамидитного способа может предусматривать последующее добавление фосфорамидитного строительного блока (например, нуклеозидфосфорамидита) к растущей полинуклеотидной цепи с образованием фосфитной сложнотриэфирной связи. Фосфорамидитный полинуклеотидный синтез проходит в направлении от 3' к 5'. Фосфорамидитный полинуклеотидный синтез позволяет контролировать добавление одного нуклеотида к растущей цепи нуклеиновой кислоты за цикл синтеза. В некоторых случаях каждый цикл синтеза включает стадию связывания. Фосфорамидитное связывание включает образование фосфитной сложнотриэфирной связи между активированным нуклеозидфосфорамидитом и нуклеозидом, связанным с подложкой, например, посредством линкера. В некоторых случаях нуклеозидфосфорамидит добавляют в активированное устройство. В некоторых случаях нуклеозидфосфорамидит добавляют в устройство с активатором. В некоторых случаях нуклеозидфосфорамидиты добавляют в устройство при 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-кратном или более избытке по сравнению с нуклеозидами, связанными с подложкой. В некоторых случаях добавление нуклеозидфосфорамидита проводят в безводной среде, например, в безводном ацетонитриле. После добавления нуклеозидфосфорамидита устройство необязательно промывают. В некоторых случаях стадию связывания повторяют еще один или несколько раз, необязательно со стадией промывки между добавлениями нуклеозидфосфорамидита к подложке. В некоторых случаях используемый согласно настоящему изобретению способ полинуклеотидного синтеза содержит 1, 2, 3 или более последовательных стадий связывания. Перед связыванием во многих случаях нуклеозид, связанный с устройством, подвергают удалению защиты путем удаления защитной группы, где защитная группа предотвращает полимеризацию. Обычной защитной группой является 4,4'-диметокситритил (DMT).

[00183] После связывания способы фосфорамидитного полинуклеотидного синтеза необязательно предусматривают стадию экпирования. На стадии экпирования растущий полинуклеотид обрабатывают экпирующим агентом. Стадия экпирования полезна для блокирования непрореагировавших связанных с субстратом 5'-ОН групп после связывания от дальнейшего удлинения цепи, предотвращая образование полинуклеотидов с внутренними делециями оснований. Кроме того, фосфорамидиты, активированные ИН-тетразолом, могут в небольшой степени реагировать с положением Об гуанозина. Без ограничения теорией, при окислении I₂/водой этот побочный продукт, возможно посредством миграции Об-N7, может подвергаться депуринизации. Апуриновые сайты могут в конечном итоге расщепляться в ходе окончательного снятия защиты полинуклеотида, что снижает выход полноразмерного продукта. Модификации Об могут быть удалены обработкой экпирующим реагентом перед окислением I₂/водой. В некоторых случаях включение стадии экпирования в ходе полинуклеотидного синтеза снижает частоту ошибок по сравнению с синтезом без экпирования. Например, стадия экпирования предусматривает

обработку связанного с подложкой полинуклеотида смесью уксусного ангидрида и 1-метилимидазола. После стадии кэпирования устройство необязательно промывают.

[00184] В некоторых случаях после добавления нуклеозидфосфорамидита и необязательно после кэпирования и одной или нескольких стадий промывки связанную с устройством растущую нуклеиновую кислоту окисляют. На стадии окисления сложный триэфир фосфита окисляется в тетраординированный сложный триэфир фосфата, защищенный предшественник встречающейся в природе фосфат-сложнодизфирной межнуклеозидной связи. В некоторых случаях окисление растущего полинуклеотида достигают обработкой йодом и водой, необязательно в присутствии слабого основания (например, пиридина, лутидина, коллидина). Окисление можно проводить в безводных условиях с использованием, например, трет-бутилгидропероксида или (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)оксазиридина (CSO). В некоторых способах после окисления проводят стадию кэпирования. Вторая стадия кэпирования позволяет высушить устройство, так как остаточная вода от окисления, которая может сохраняться, может ингибировать последующее связывание. После окисления устройство и растущий полинуклеотид необязательно промывают. В некоторых случаях стадию окисления заменяют стадией сульфуризации с получением фосфоротиоатов полинуклеотидов, где любые стадии кэпирования могут быть выполнены после сульфуризации. Многие реагенты способны к эффективному переносу серы, включая без ограничения 3-(диметиламинометилден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тион, DDTT, 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид, также известный как реагент Бокажа, и N,N,N'-тетраэтилтиурамдисульфид (TETD).

[00185] Для того, чтобы последующий цикл включения нуклеозида происходил посредством связывания, защищенный 5'-конец растущего полинуклеотида, связанного с устройством, удаляют, так что первичная гидроксильная группа становится реакционноспособной со следующим нуклеозидфосфорамидитом. В некоторых случаях защитной группой является DMT, и деблокирование происходит с помощью трихлоруксусной кислоты в дихлорметане. Проведение детритилирования в течение длительного времени или более сильными, чем рекомендовано, растворами кислот может привести к усилению депуринизации полинуклеотида, связанного с твердой подложкой, и, таким образом, снизить выход желаемого полноразмерного продукта. Способы и композиции согласно настоящему изобретению, как раскрыто в настоящем документе, обеспечивают контролируемые условия деблокирования, ограничивающие нежелательные реакции депуринизации. В некоторых случаях связанный с устройством полинуклеотид промывают после деблокирования. В некоторых случаях эффективная промывка после деблокирования способствует получению синтезированных полинуклеотидов с низким коэффициентом ошибок.

[00186] Способы синтеза полинуклеотидов в общем предусматривают повторяющуюся последовательность следующих стадий: нанесение защищенного мономера на активно функционализированную поверхность (например, локус) для связывания либо с активированной поверхностью, либо с линкером, либо с мономером с удаленной защитной группой, удаление защитной группы с нанесенного мономера, так чтобы он стал реакционноспособным с применяемым далее защищенным мономером, и нанесение другого защищенного мономера для связывания. Одна или несколько промежуточных стадий предусматривают окисление или сульфуризацию. В некоторых случаях одна или несколько стадий промывки предшествуют или следуют за одной или всеми стадиями.

[00187] Способы полинуклеотидного синтеза на основе фосфорамидитов предусматривают ряд химических стадий. В некоторых случаях одна или несколько стадий синтеза предусматривают циклизацию реагентов, где одна или несколько стадий способа предусматривают нанесение на устройство

реагента, подходящего для данной стадии. Например, реагенты подвергают циклизации посредством ряда стадий жидкого осаждения и вакуумной сушки. Для подложек, содержащих трехмерные элементы, такие как лунки, микролунки, каналы и т.п., реагенты необязательно пропускают через одну или несколько областей устройства через лунки и/или каналы.

[00188] Способы и системы, как раскрыто в настоящем документе, относятся к устройствам для полинуклеотидного синтеза для синтеза полинуклеотидов. Синтез может быть параллельным. Например, по меньшей мере или около по меньшей мере 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 или более полинуклеотидов могут быть синтезированы параллельно. Общее количество полинуклеотидов, которые могут быть синтезированы параллельно, может составлять 2-100000, 3-50000, 4-10000, 5-1000, 6-900, 7-850, 8-800, 9-750, 10-700, 11-650, 12-600, 13-550, 14-500, 15-450, 16-400, 17-350, 18-300, 19-250, 20-200, 21-150, 22-100, 23-50, 24-45, 25-40, 30-35. Специалистам в данной области техники понятно, что общее количество полинуклеотидов, синтезированных параллельно, может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например 25-100. Общее количество полинуклеотидов, синтезируемых параллельно, может находиться в пределах любого диапазона, определяемого любым из значений, служащих конечными точками диапазона. Общая молярная масса полинуклеотидов, синтезированных в устройстве, или молярная масса каждого из полинуклеотидов может составлять по меньшей мере или по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000 пикомоль и более. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов в устройстве может составлять по меньшей мере или около по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 нуклеотидов или менее. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов в устройстве может составлять самое большее или около самое большее 500, 400, 300, 200, 150, 100, 50, 45, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 нуклеотидов или менее. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов в устройстве может составлять 10-500, 9-400, 11-300, 12-200, 13-150, 14-100, 15-50, 16-45, 17-40, 18-35, 19-25. Специалистам в данной области техники понятно, что длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов в устройстве может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 100-300. Длина каждого из полинуклеотидов или средняя длина полинуклеотидов внутри устройства может находиться в пределах любого диапазона, определяемого любым из значений, служащих конечными точками диапазона.

[00189] Способы полинуклеотидного синтеза на поверхности, раскрытые в настоящем документе, позволяют проводить синтез с высокой скоростью. Например, по меньшей мере 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 нуклеотидов в час или более. Нуклеотиды включают аденин, гуанин, тимин, цитозин, уридиновые строительные блоки или их аналоги/модифицированные варианты. В некоторых случаях библиотеки полинуклеотидов синтезируют параллельно на подложке. Например, устройство, содержащее около или по меньшей мере около 100, 1000, 10000, 30000, 75000, 100000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000 или 5000000 выявленных локусов способно поддерживать синтез по меньшей мере такого же количества различных полинуклеотидов, где полинуклеотид, кодирующий отдельную последовательность, синтезируется в выявленном локусе. В некоторых случаях библиотеку полинуклеотидов синтезируют на устройстве с низким коэффициентом ошибок, как раскрыто в настоящем документе, за менее около три месяца, два месяца, один месяц, три недели, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 дня, 24 часа или менее. В

некоторых случаях более крупные нуклеиновые кислоты, собранные из библиотеки полинуклеотидов, синтезированной с низким коэффициентом ошибок с использованием подложек и способов, как раскрыто в настоящем документе, получают за менее около три месяца, два месяца, один месяц, три недели, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 дня, 24 часа или менее.

[00190] В некоторых случаях способы, как раскрыто в настоящем документе, приводят к получению библиотеки нуклеиновых кислот, содержащей варианты нуклеиновые кислоты, различающиеся во множестве сайтов кодонов. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может иметь 1 сайт, 2 сайта, 3 сайта, 4 сайта, 5 сайтов, 6 сайтов, 7 сайтов, 8 сайтов, 9 сайтов, 10 сайтов, 11 сайтов, 12 сайтов, 13 сайтов, 14 сайтов, 15 сайтов, 16 сайтов, 17 сайтов, 18 сайтов, 19 сайтов, 20 сайтов, 30 сайтов, 40 сайтов, 50 сайтов или более сайтов вариантных кодонов.

[00191] В некоторых случаях один или несколько сайтов вариантных кодонов могут быть соседними. В некоторых случаях один или несколько сайтов вариантных кодонов могут не быть соседними и разделены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более кодонами.

[00192] В некоторых случаях нуклеиновая кислота может содержать множество сайтов вариантных кодонов, где все сайты вариантных кодонов расположены рядом друг с другом, образуя участок сайтов вариантных кодонов. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может содержать множество сайтов вариантных кодонов, при этом ни один из вариантных кодонов не находится рядом друг с другом. В некоторых случаях нуклеиновая кислота может содержать множество сайтов вариантных кодонов, где некоторые сайты вариантных кодонов являются соседними друг с другом, образуя участок сайтов вариантных кодонов, а некоторые сайты вариантных кодонов являются соседними друг с другом.

[00193] Со ссылкой на чертежи, на **фиг. 3** приведен иллюстративный технологический процесс синтеза нуклеиновых кислот (например, генов) из более коротких нуклеиновых кислот. Технологический процесс в общем делится на стадии: (1) синтез *de novo* библиотеки одноцепочечных нуклеиновых кислот, (2) объединение нуклеиновых кислот в более крупные фрагменты, (3) исправление ошибок, (4) контроль качества и (5) отгрузка. Перед синтезом *de novo* предварительно выбирают предполагаемую последовательность нуклеиновой кислоты или группу последовательностей нуклеиновых кислот. Например, предварительно выбирают группу генов для создания.

[00194] После того, как выбраны большие нуклеиновые кислоты для создания, создают библиотеку предварительно определенных нуклеиновых кислот для синтеза *de novo*. Известны различные подходящие способы создания массивов полинуклеотидов высокой плотности. В примере технологического процесса предоставляют поверхностный слой устройства. В примере химический состав поверхности изменен для улучшения процесса полинуклеотидного синтеза. Области с низкой поверхностной энергией создают для отталкивания жидкости, а области с высокой поверхностной энергией создают для притяжения жидкостей. Сама поверхность может иметь форму плоской поверхности или иметь вариации формы, такие как выступы или микроуглубления, которые увеличивают площадь поверхности. В примере технологического процесса выбранные молекулы с высокой поверхностной энергией выполняют двойную функцию поддержки химии ДНК, как раскрыто в публикации международной патентной заявки WO/2015/021080, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00195] Получение массивов полинуклеотидов *in situ* проводят на твердой подложке и используют однонуклеотидный процесс удлинения для параллельного удлинения множества олигомеров. Устройство для нанесения, такое как устройство для нанесения материала, предназначено для

высвобождения реагентов ступенчатым образом, так что множество полинуклеотидов параллельно удлиняются по одному остатку за раз с получением олигомеров с предварительно определенной последовательностью нуклеиновой кислоты **302**. В некоторых случаях полинуклеотиды отщепляются от поверхности на этой стадии. Отщепление предусматривает расщепление газом, например, аммиаком или метиламином.

[00196] Полученные библиотеки полинуклеотидов помещают в реакционную камеру. В этом иллюстративном технологическом процессе реакционная камера (также называемая «нанореактор») представляет собой лунку с силиконовым покрытием, содержащую реагенты для ПЦР и погруженную в библиотеку полинуклеотидов **303**. До или после герметизации **304** полинуклеотидов добавляют реагент для высвобождения полинуклеотидов с подложки. В иллюстративном технологическом процессе полинуклеотиды высвобождаются после герметизации нанореактора **305**. После высвобождения фрагменты одноцепочечных полинуклеотидов гибридизуются для того, чтобы охватить весь диапазон длины последовательности ДНК. Возможна частичная гибридизация **305**, поскольку каждый синтезированный полинуклеотид разработан с возможностью иметь небольшую часть, перекрывающуюся с по меньшей мере одним другим полинуклеотидом в пуле.

[00197] После гибридизации начинают реакцию ПСА. В ходе полимеразных циклов полинуклеотиды отжигаются до комплементарных фрагментов, а гэпы заполняются полимеразой. Каждый цикл случайным образом увеличивает длину различных фрагментов в зависимости от того, какие полинуклеотиды находят друг друга. Комплементарность среди фрагментов позволяет формировать полный большой участок двухцепочечной ДНК **306**.

[00198] После завершения ПСА нанореактор отделяют от устройства **307** и располагают для взаимодействия с устройством, имеющим праймеры для ПЦР **308**. После герметизации нанореактор подвергают реакции ПЦР **309** и амплифицируют более крупные нуклеиновые кислоты. После ПЦР **310** наноканалу открывают **311**, добавляют реагенты для исправления ошибок **312**, камеру закрывают **313** и происходит реакция исправления ошибок с удалением несовпадающих пар оснований и/или цепей с плохой комплементарностью из двухцепочечных продуктов амплификации ПЦР **314**. Нанореактор открывают и разъединяют **315**. Затем продукт с исправленными ошибками подвергают дополнительным стадиям обработки, таким как ПЦР и молекулярное бар-кодирование, а затем упаковывают **322** для транспортировки **323**.

[00199] В некоторых случаях принимаются меры контроля качества. После исправления ошибок стадии контроля качества предусматривают, например, взаимодействие с пластиной, содержащей праймеры секвенирования для амплификации продукта с исправленными ошибками **316**, герметизацию пластины в камере, содержащей продукт амплификации с исправленными ошибками **317**, и проведение дополнительного раунда амплификации **318**. Нанореактор открывают **319** и продукты объединяют **320** и секвенируют **321**. После того, как проведено приемлемое определение контроля качества, упакованный продукт **322** утверждается для транспортировки **323**.

[00200] В некоторых случаях нуклеиновую кислоту, полученную в ходе технологического процесса, такого как показанный на **фиг. 3**, подвергают мутагенезу с использованием раскрытых в настоящем документе перекрывающихся праймеров. В некоторых случаях библиотеку праймеров создают путем получения *in situ* на твердой подложке и используют процесс однонуклеотидного удлинения для параллельного удлинения нескольких олигомеров. Устройство для нанесения, такое как устройство для нанесения материала, предназначено для высвобождения реагентов ступенчатым образом, так что

множество полинуклеотидов параллельно удлиняются по одному остатку за раз с получением олигомеров с предварительно определенной последовательностью нуклеиновой кислоты 302.

[00201] Вычислительные системы

[00202] Любая из систем, как раскрыто в настоящем документе, может быть функционально связана с компьютером и может быть автоматизирована через компьютер локально или удаленно. В различных случаях способы и системы согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать программы программного обеспечения в вычислительных системах и их применение. Соответственно, компьютеризированное управление синхронизацией функций дозирования/герметизации/пополнения, такое как организация и синхронизация движения устройства для нанесения материала, действия дозирования и создания вакуума, находится в рамках настоящего изобретения. Вычислительные системы могут быть запрограммированы на интерфейс между заданной пользователем последовательностью оснований и положением устройства для нанесения материала для того, чтобы доставлять правильные реагенты в определенные области подложки.

[00203] Вычислительную систему 400, показанную на **фиг. 4**, можно рассматривать как логическое устройство, которое может считывать инструкции с носителя 411 и/или сетевого порта 405, который может быть дополнительно подключен к серверу 409, имеющему фиксированный носитель 412. Система, такая как показанная на **фиг. 4**, может включать в себя центральный процессор 401, дисководы 403, дополнительные устройства ввода, такие как клавиатура 415 и/или мышь 416, и дополнительный монитор 407. Передача данных может осуществляться через указанную среду передачи данных на сервер в локальном или удаленном месте. Среда передачи данных может включать любые средства передачи и/или приема данных. Например, средой передачи данных может быть сетевое соединение, беспроводное соединение или интернет-соединение. Такое соединение может обеспечивать связь через всемирную компьютерную сеть. Предполагается, что данные, относящиеся к настоящему изобретению, могут передаваться по таким сетям или соединениям для приема и/или просмотра пользователем 422, как показано на **фиг. 4**.

[00204] Как проиллюстрировано на **фиг. 5**, высокоскоростной кэш 504 может быть подключен к процессору 502 или встроен в него для обеспечения высокоскоростной памяти для инструкций или данных, которые недавно или часто использовались процессором 502. Процессор 502 соединен с северным мостом 506 шиной процессора 508. Северный мост 506 соединен с оперативным запоминающим устройством (RAM) 510 шиной памяти 512 и управляет доступом к RAM 510 посредством процессора 502. Северный мост 506 также соединен с южным мостом 514 шиной системного контроллера 516. Южный мост 514, в свою очередь, соединен с периферийной шиной 518. Периферийной шиной может быть, например, PCI, PCI-X, PCI Express или другая периферийная шина. Северный мост и южный мост часто называются набором микросхем процессора и управляют передачей данных между процессором, RAM и периферийными компонентами по периферийной шине 518. В некоторых альтернативных конструкциях функции северного моста могут быть встроены в процессор вместо использования отдельной микросхемы северного моста. В некоторых случаях система 500 может включать ускоряющую плату 522, присоединенную к периферийной шине 518. Ускоритель может включать программируемые пользователем вентиляемые матрицы (FPGA) или другое оборудование для ускорения определенной обработки. Например, ускоритель можно использовать для адаптивной реструктуризации данных или для вычисления алгебраических выражений, используемых при обработке расширенного набора.

[00205] Программное обеспечение и данные хранятся на внешнем запоминающем устройстве **524** и могут быть загружены в RAM **510** и/или кэш **504** для использования процессором. Система **500** включает операционную систему для управления системными ресурсами, неограничивающие примеры операционных систем включают Linux, Windows™, MACOS™, BlackBerry OSTM, iOS™ и другие функционально эквивалентные операционные системы, а также прикладное программное обеспечение, работающее поверх операционной системы, для управления хранением данных и оптимизацией в соответствии с примерами настоящего раскрытия. В этом примере система **500** также включает сетевые интерфейсные платы (NIC) **520** и **521**, соединенные с периферийной шиной для обеспечения сетевых интерфейсов для внешнего хранилища, такого как сетевое хранилище (NAS), и других компьютерных систем, которые можно использовать для распределенной параллельной обработки.

[00206] На **фиг. 6** приведена схема, показывающая сеть **600** с множеством компьютерных систем **602a** и **602b**, множеством сотовых телефонов и персональных интеллектуальных консультантов **602c** и сетевым хранилищем данных (NAS) **604a** и **604b**. В иллюстративных случаях системы **602a**, **602b** и **602c** могут управлять хранилищем данных и оптимизировать доступ к данным, хранящимся в сетевых хранилищах данных (NAS) **604a** и **604b**. Математическая модель может использоваться для данных и оцениваться с использованием распределенной параллельной обработки в компьютерных системах **602a** и **602b**, а также в системах **602c** сотовых телефонов и персональных интеллектуальных консультантов. Компьютерные системы **602a** и **602b**, и сотовые телефоны, и персональные интеллектуальные консультанты **602c** также могут обеспечивать параллельную обработку для адаптивной реструктуризации данных, хранящихся в сетевых хранилищах данных (NAS) **604a** и **604b**. На **фиг. 6** приведен только пример, и большое многообразие других компьютерных конструкций и систем может быть использовано в сочетании с различными примерами настоящего раскрытия. Например, блейд-сервер можно использовать для обеспечения параллельной обработки. Блейд-процессоры могут быть соединены через соединительную плату с обеспечением параллельной обработки. Хранилище также можно подключить к соединительной плате или в качестве сетевого хранилища данных (NAS) через отдельный сетевой интерфейс. В некоторых примерах процессоры могут поддерживать отдельные области памяти и передавать данные через сетевые интерфейсы, соединительную плату или другие разъемы для параллельной обработки другими процессорами. В других случаях некоторые или все процессоры могут использовать общее пространство виртуальной адресной памяти.

[00207] На **фиг. 7** приведена блок-схема многопроцессорной вычислительной системы **700**, использующей совместно используемое пространство виртуальной адресной памяти в соответствии с иллюстративным случаем. Система включает множество процессоров **702a-f**, которые могут осуществлять доступ к подсистеме совместно используемой памяти **704**. Система включает множество процессоров **706a-f** программируемых аппаратных процессоров с алгоритмом памяти (MAP) в подсистеме памяти **704**. Каждый MAP **706a-f** может содержать память **708a-f** и одну или несколько программируемых пользователем вентильных матриц (FPGA) **710a-f**. MAP обеспечивает конфигурируемый функциональный блок, и конкретные алгоритмы или части алгоритмов могут быть представлены FPGA **710a-f** для обработки в тесной координации с соответствующим процессором. Например, MAP можно использовать для оценки алгебраических выражений, касающихся модели данных, и для выполнения адаптивной реструктуризации данных в иллюстративных случаях. В этом примере каждый MAP глобально доступен для всех процессоров для этих целей. В одной конфигурации каждый MAP может использовать прямой доступ к памяти (DMA) для доступа к ассоциативной памяти **708a-f**, позволяя выполнять задачи независимо и асинхронно от

соответствующего микропроцессора 702a-f. В этой конфигурации MAP может передавать результаты непосредственно на другой MAP для конвейерной обработки и параллельного выполнения алгоритмов.

[00208] Вышеуказанные компьютеризированные структуры и системы являются только примерами, и широкий спектр других компьютеризированных структур и систем, сотовых телефонов и персональных интеллектуальных консультантов можно использовать в связи с иллюстративными случаями, включая системы, использующие любую комбинацию общих процессоров, сопроцессоров, FPGA и других программируемых логических устройств, систем на одном кристалле (SOC), специализированных интегральных схем (ASIC) и других обрабатывающих и логических элементов. В некоторых случаях вся вычислительная система или часть вычислительной системы может быть реализована в программном или аппаратном обеспечении. Любое разнообразие носителей данных можно использовать в связи с иллюстративными случаями, включая оперативную память, жесткие диски, флэш-память, ленточные накопители, дисковые массивы, сетевые хранилища (NAS) и другие локальные или распределенные устройства и системы хранения данных.

[00209] В иллюстративных случаях вычислительная система может быть реализована с использованием программных модулей, выполняемых на любой из вышеперечисленных или других компьютеризированных структурах и системах. В других случаях функции системы могут быть частично или полностью реализованы во встроенных программах, программируемых логических устройствах, таких как программируемые пользователем вентильные матрицы (FPGA), как показано на **фиг. 5**, системах на одном кристалле (SOC), прикладных интегральных схемах (ASIC) или других обрабатывающих или логических элементах. Например, Set Processor и Optimizer могут быть реализованы с аппаратным ускорением посредством использования карты аппаратного ускорителя, такой как карта ускорителя **522**, показанная на **фиг. 5**.

[00210] Следующие примеры приведены для более ясной для специалистов в данной области техники иллюстрации сущности и практического применения раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничивающие объем каких-либо заявленных вариантов осуществления. Если не указано иное, все части и проценты приведены по массе.

Примеры

[00211] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Настоящие примеры, наряду со Способами, как раскрыто в настоящем документе, настоящим представляют предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Их изменения и другие варианты использования, которые охватываются сущностью настоящего раскрытия, как определено объемом формулы изобретения, очевидны специалистам в данной области техники.

[00212] Пример 1. функционализация поверхности устройства

[00213] Устройство функционализировали для поддержки присоединения и синтеза библиотеки полинуклеотидов. Поверхность устройства сначала очищали влажным образом с использованием раствора «пиранья», содержащего 90% H₂SO₄ и 10% H₂O₂, в течение 20 минут. Устройство промывали в нескольких стаканах с деионизированной водой, выдерживали под краном с деионизированной

водой в течение 5 мин и сушили N_2 . Затем устройство вымачивали в NH_4OH (1:100, 3 мл:300 мл) в течение 5 минут, промывали деионизированной водой с помощью ручного держателя, замачивали в трех последовательных стаканах с деионизированной водой на 1 мин каждый раз, а затем снова промывали деионизированной водой с использованием ручного держателя. Затем устройство подвергали плазмохимической очистке, подвергая поверхность устройства действию O_2 . Устройство SAMCO PC-300 использовали для плазмохимического травления O_2 при мощности 250 Вт в течение 1 мин в нисходящем режиме.

[00214] Очищенную поверхность устройства активно функционализировали раствором, содержащим N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксибутирамид, с использованием системы печи для газофазного осаждения YES-1224P со следующими параметрами: от 0,5 до 1 торр, 60 мин, 70 °C, 135 °C испаритель. На поверхность устройства наносили покрытие резиста с использованием устройства для нанесения раствора с центрифугированием Brewer Science 200X. Фоторезист SPR™ 3612 наносили с использованием центрифугирования на устройство при 2500 оборотах в минуту в течение 40 с. Устройство предварительно обжигали в течение 30 мин при 90 °C с использованием горячей пластины Brewer. Устройство подвергали фотолитографии с использованием устройства для фотолитографии Karl Suss MA6. На устройство воздействовали в течение 2,2 с и проявляли в течение 1 мин в MSF 26A. Остатки проявителя промывали с помощью ручного держателя, устройство замачивали в воде на 5 мин. Устройство обжигали в течение 30 мин при 100 °C в печи с последующим визуальным осмотром дефектов литографии с помощью Nikon L200. Для удаления остаточного резиста применяли процесс удаления непроявленного фоторезиста с помощью устройства SAMCO PC-300 для плазмохимического травления O_2 при мощности 250 Вт в течение 1 мин.

[00215] Поверхность устройства пассивно функционализировали с 100 мкл раствора перфтороктилтрихлорсилана, смешанного с 10 мкл легкого минерального масла. Устройство помещали в камеру, проводили нагнетание в течение 10 мин, затем закрывали клапан на насосе и оставляли на 10 мин. Камеру вентилировали воздухом. С устройства удаляли покрытие резиста, выполняя два погружения в течение 5 минут в 500 мл NMP при 70 °C с обработкой ультразвуком при максимальной мощности (9 на системе Crest). Затем устройство вымачивали в течение 5 минут в 500 мл изопропанола при комнатной температуре с обработкой ультразвуком при максимальной мощности. Устройство погружали в 300 мл 200-градусного этанола и сушили с помощью N_2 . Функционализированную поверхность активировали для выполнения функции носителя для полинуклеотидного синтеза.

[00216] **Пример 2. Синтез 50- мерной последовательности на устройстве для олигонуклеотидного синтеза**

[00217] Двухмерное устройство для синтеза олигонуклеотидов собирали в проточную ячейку, которая была соединена с проточной ячейкой (Applied Biosystems (ABI394 DNA Synthesizer"). Двухмерное устройство для синтеза олигонуклеотидов, однородно функционализированное N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксибутирамидом (Gelest), применяли для синтеза иллюстративного полинуклеотида размером 50 п.н. («50-мерный полинуклеотид») с использованием способов полинуклеотидного синтеза, как раскрыто в настоящем документе.

[00218] Последовательность 50-мера была такой, как описано в SEQ ID NO.: 2. 5'AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCAT##TTTTTTTTTTT3' (SEQ ID NO.: 2), где # означает тимидин-сукцинилгексамид CED фосфорамидит (CLP-2244 от ChemGenes), который

представляет собой расщепляемый линкер, обеспечивающий высвобождение олигонуклеотидов с поверхности в ходе удаления защиты.

[00219] Синтез проводили с использованием стандартной химии синтеза ДНК (связывание, кэпирование, окисление и деблокирование) в соответствии с протоколом в **Таблице 3** и синтезатора ABI.

Таблица 3. Протоколы синтеза

| Таблица 3 | | |
|---|---|------------------|
| Общее название процесса синтеза ДНК | Стадия процесса | Время (с) |
| WASH (поток промывки ацетонитрилом) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 23 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| Добавление основания ДНК (фосфорамидит + поток активатора) | Многократная продувка активатором | 2 |
| | Активатор в проточную ячейку | 6 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную ячейку | 6 |
| | Активатор в проточную ячейку | 0,5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную ячейку | 5 |
| | Активатор в проточную ячейку | 0,5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную ячейку | 5 |
| | Активатор в проточную ячейку | 0,5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную ячейку | 5 |
| | Инкубация в течение 25 с | 25 |
| WASH (поток промывки ацетонитрилом) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 15 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| Добавление основания ДНК (фосфорамидит + поток активатора) | Многократная продувка активатором | 2 |
| | Активатор в проточную ячейку | 5 |

| Таблица 3 | | |
|-------------------------------------|---|-----------|
| Общее название процесса синтеза ДНК | Стадия процесса | Время (с) |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную ячейку | 18 |
| | Инкубация в течение 25 с | 25 |
| WASH (поток промывки ацетонитрилом) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 15 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| Кэпирование (CapA+B, 1:1, Flow) | CapA+B в проточную ячейку | 15 |
| WASH (поток промывки ацетонитрилом) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 15 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| Окисление (поток окислителя) | окислитель в проточную ячейку | 18 |
| WASH (поток промывки ацетонитрилом) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 15 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 15 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 23 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| Промывка системы ацетонитрилом | 4 | |

| Таблица 3 | | |
|--|---|-----------|
| Общее название процесса синтеза ДНК | Стадия процесса | Время (с) |
| | ацетонитрилом | |
| Доблокирование (поток деблокирующего средства) | деблокирующее средство в проточную ячейку | 36 |
| WASH (поток промывки ацетонитрилом) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Продувка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 18 |
| | Продувка системы N2 | 4,13 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4,13 |
| | Ацетонитрил в проточную ячейку | 15 |

[00220] Комбинацию фосфорамидит/активатор доставляли аналогично доставке основной части реагентов через проточную кювету. Стадии сушки не выполняли, так как среда все время оставалась «влажной» от реагента.

[00221] Ограничитель потока удаляли с синтезатора ABI 394 для того, чтобы обеспечить более быстрый поток. Без ограничителя потока скорости потока для амидитов (0,1 М в ACN), активатора (0,25 М бензоилтиотетразола («ВТТ», 30-3070-xx от GlenResearch) в ACN) и Ox (0,02 М I2 в 20% пиридине, 10 % воды и 70% THF) составляли около ~100 мкл/с для ацетонитрила («ACN»), для реагентов кэпирования (смесь CapA и CapB 1:1, где CapA представляет собой уксусный ангидрид в THF /пиридине, а CapB представляет собой 16% 1-метилимидизола в THF) около ~200 мкл/с, а для деблокирующего средства (3% дихлоруксусной кислоты в толуоле) около ~300 мкл/с (по сравнению с ~50 мкл/с для всех реагентов с ограничителем потока). Наблюдали за временем полного вытеснения окислителя, соответствующим образом корректировали время подачи химических средств и вводили дополнительную промывку ACN между различными химическими средствами. После полинуклеотидного синтеза с чипа снимали защиту в газообразном аммиаке в течение ночи при давлении 75 пси. На поверхность наносили пять капель воды для извлечения полинуклеотидов. Затем извлеченные полинуклеотиды анализировали на чипе малых РНК BioAnalyzer.

[00222] **Пример 3. Синтез 100-мерной последовательности на устройстве для синтеза олигонуклеотидов**

[00223] Тот же самый процесс, как описано в примере 2 для синтеза 50-мерной последовательности, применяли для синтеза 100-мерного полинуклеотида («100-мерный полинуклеотид», 5' CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATAC

CATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCAT##TTTTTTTTTTTЗ', где # означает тимидин-сукцинил гексамид CED фосфорамидит (CLP-2244 от ChemGenes), SEQ ID NO.: 3) на двух разных кремниевых чипах, первый из которых однородно функционализирован N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксибутирамидом, а второй функционализирован 5/95 смесью ацетоксиундецилтриэтоксисилана и н-децилтриэтоксисилана, и полинуклеотиды, экстрагированные с поверхности, анализировали на устройстве BioAnalyzer.

[00224] Все десять образцов для двух чипов дополнительно подвергали ПЦР-амплификации с использованием прямого (5'ATGCGGGGTTCTCATCATCЗ', SEQ ID NO.: 4) и обратного (5'CGGGATCCTTATCGTCATCGЗ', SEQ ID NO.: 5) праймеров в 50 мкл смеси для ПЦР (25 мкл NEB Q5 mastermix, 2,5 мкл 10 мкМ прямого праймера, 2,5 мкл 10 мкМ обратного праймера, 1 мкл полинуклеотида, экстрагированного с поверхности, и вода до 50 мкл) с использованием следующей программы термоцикла:

98 °С, 30 с

98 °С, 10 с, 63 °С, 10 с, 72 °С, 10 с, повтор 12 циклов

72 °С, 2 мин

[00225] Продукты ПЦР также анализировали на BioAnalyzer, демонстрируя острые пики в положении 100-мера. Затем образцы, амплифицированные с помощью ПЦР, клонировали и секвенировали по Сэнгеру. В таблице 4 обобщены результаты секвенирования по Сэнгеру для образцов, взятых из пятен 1–5 с чипа 1, и для образцов, взятых из пятен 6–10 с чипа 2.

Таблица 4. Результаты секвенирования

| Пятно | Частота ошибок | Эффективность цикла |
|-------|----------------|---------------------|
| 1 | 1/763 п.о. | 99,87% |
| 2 | 1/824 п.о. | 99,88% |
| 3 | 1/780 п.о. | 99,87% |
| 4 | 1/429 п.о. | 99,77% |
| 5 | 1/1525 п.о. | 99,93% |
| 6 | 1/1615 п.о. | 99,94% |
| 7 | 1/531 п.о. | 99,81% |
| 8 | 1/1769 п.о. | 99,94% |
| 9 | 1/854 п.о. | 99,88% |
| 10 | 1/1451 п.о. | 99,93% |

[00226] Таким образом, высокое качество и однородность синтезированных полинуклеотидов были повторены на двух чипах с разным химическим составом поверхности. В целом, 89% 100-меров, которые секвенировали, были идеальными последовательностями без ошибок, что соответствует 233 из 262.

[00227] В Таблице 5 приведены характеристики ошибок для последовательностей, полученных из образцов полинуклеотидов из пятен 1-10

Таблица 5. Характеристики ошибок

| ID образца/№ пятна | OSA_00 46/1 | OSA_0 047/2 | 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_0 054/9 | OSA_00 55/10 |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Всего последова- тельности | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| качество секвенирован ия | 25 из 28 | 27 из 27 | 26 из 30 | 21 из 23 | 25 из 26 | 29 из 30 | 27 из 31 | 29 из 31 | 28 из 29 | 25 из 28 |
| качество олигнуклеоти дов | 23 из 25 | 25 из 27 | 22 из 26 | 18 из 21 | 24 из 25 | 25 из 29 | 22 из 27 | 28 из 29 | 26 из 28 | 20 из 25 |
| Количество совпадений ROI | 2500 | 2698 | 2561 | 2122 | 2499 | 2666 | 2625 | 2899 | 2798 | 2348 |
| Мутация ROI | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| Удаление нескольких оснований ROI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Малая вставка ROI | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Удаление одного основания ROI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Количество больших делеций | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Мутация: G>A | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| Мутация: T>C | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Количество ошибок ROI | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| Коэффици- ент ошибок ROI | Ошиб- ка: ~1 в 834 | Ошибк а: ~1 в 1350 | Ошибка : ~1 в 1282 | Ошиб- ка: ~1 в 708 | Ошиб- ка: ~1 в 2500 | Ошиб- ка: ~1 в 2667 | Ошибка : ~1 в 876 | Ошиб- ка: ~1 в 2900 | Ошибк а: ~1 в 1400 | Ошиб- ка: ~1 в 2349 |
| ROI минус коэффици- ент ошибок | MP Ошиб- ка: ~1 в | MP Ошибк а: ~1 в | MP Ошибка : ~1 в | MP Ошиб- ка: ~1 в | MP Ошиб- ка: ~1 в | MP Ошиб- ка: ~1 в | MP Ошибка : ~1 в | MP Ошиб- ка: ~1 в | MP Ошибк а: ~1 в | MP Ошиб- ка: ~1 в |

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|
| праймера | 763 | 824 | 780 | 429 | 1525 | 1615 | 531 | 1769 | 854 | 1451 |
|----------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|

[00228] **Пример 4. Конструирование каркасов антител**

[00229] Для создания каркасов проводили структурный анализ, анализ секвенирования коллекции тяжелой цепи и специфический анализ наборов данных высокопроизводительного секвенирования гетеродимеров. Каждую тяжелую цепь связывали с каждым каркасом легкой цепи. Каждому каркасу тяжелой цепи присваивали 5 различных вариантов длинной петли CDRH3. Каждому каркасу легкой цепи присваивали 5 различных каркасов L3. Стебли CDRH3 тяжелой цепи выбирали из часто наблюдаемых стеблей длинной петли H3 (10 аминокислот на N-конце и C-конце), обнаруживаемых как у индивидуумов, так и у сегментов V-гена. L3 каркаса легкой цепи выбирали из гетеродимеров, содержащих длинные H3. Использовали прямые гетеродимеры на основе информации из банка данных белков (PDB) и наборов данных глубокого секвенирования, в которых были зафиксированы стебли CDR H1, H2, L1, L2, L3 и CDRH3. Затем различные каркасы форматировали для фагового отображения для оценки экспрессии.

[00230] *Структурный анализ*

[00231] Около 2017 структур антитела анализировали, из которых наблюдали 22 структуры с длинными CDRH3 с по меньшей мере 25 аминокислот в длину. Тяжелые цепи включали следующие: IGHV1-69, IGHV3-30, IGHV4-49 и IGHV3-21. Идентифицированные легкие цепи включали следующие: IGLV3-21, IGKV3-11, IGKV2-28, IGKV1-5, IGLV1-51, IGLV1-44 и IGKV1-13. В анализе несколько раз наблюдали четыре комбинации гетеродимеров, включая: IGHV4-59/61-IGLV3-21, IGHV3-21-IGKV2-28, IGHV1-69-IGKV3-11 и IGHV1-69-IGKV1-5. Анализ последовательностей и структур выявил дисульфидные связи внутри CDRH3 в нескольких структурах с упаковкой объемных боковых цепей, таких как тирозин, в стебле, что обеспечивает длительную стабильность H3. Также наблюдали вторичные структуры, включая бета-поворот-бета-листы и поддомен «hammerhead».

[00232] *Анализ коллекции*

[00233] Анализ коллекции проводили на 1083875 последовательностях IgM+/CD27-наивных В-клеточных рецепторов (BCR) и 1433011 последовательностях CD27+, полученных с помощью объективного 5'RACE от 12 здоровых контролей. 12 здоровых контролей включали равное количество мужчин и женщин и состояли из 4 европейцев, 4 азиатов и 4 латиноамериканцев. Анализ коллекции показал, что менее 1% коллекции человека содержит BCR с CDRH3 длиной более 21 аминокислоты. Смещение V-гена наблюдали в подколлекции длинных CDR3, при этом IGHV1-69, IGHV4-34, IGHV1-18 и IGHV1-8 демонстрировали преимущественное обогащение BCR с длинными петлями H3. Смещение относительно длинных петель наблюдали для IGHV3-23, IGHV4-59/61, IGHV5-51, IGHV3-48, IGHV3-53/66, IGHV3-15, IGHV3-74, IGHV3-73, IGHV3-72 и IGHV2-70. Было показано, что каркас IGHV4-34 является аутореактивным и имеет короткий период полужизни.

[00234] Жизнеспособные варианты каркаса N-концевого и C-концевого CDRH3 для длинных петель также конструировали на основе эталонной коллекции 5'RACE. Наблюдали около 81065 CDRH3 аминокислот длиной 22 аминокислоты или более. Путем сравнения каркасов V-гена удалось избежать специфических для каркаса вариаций стебля H3 для того, чтобы позволить клонировать разнообразие каркаса во множественные эталоны каркаса.

[00235] *Анализ гетеродимера*

[00236] Анализ гетеродимеров проводили на каркасах. Анализировали варианты последовательности и длины каркасов.

[00237] *Структурный анализ*

[00238] Структурный анализ проводили с использованием каркасов GPCR вариантов последовательностей и анализировали длины.

[00239] **Пример 5. Получение библиотек антител GPCR**

[00240] Библиотеки конструировали и синтезировали *de novo* на основе поверхностей взаимодействия GPCR-лиганд и структур каркаса. См. Пример 4. 10 вариантов последовательностей конструировали для переменного домена тяжелой цепи, 237 вариантов последовательностей конструировали для определяющей комплементарности области тяжелой цепи 3 и 44 варианты последовательности конструировали для переменного домена легкой цепи. Фрагменты синтезировали в виде трех фрагментов, используя способы, подобные описанным в примерах 1-3.

[00241] После синтеза *de novo* получали 10 вариантов последовательностей для переменного домена тяжелой цепи, 236 вариантов последовательностей получали для определяющей комплементарности области тяжелой цепи 3 и 43 варианты последовательности получали для области, содержащей переменный домен легкой цепи и CDRL3, на основе которых конструировали 9 вариантов переменного домена легкой цепи. Получали библиотеку с около 10^5 разнообразием ($10 \times 236 \times 43$). Это подтверждали с помощью секвенирования следующего поколения (NGS) с 16 миллионами прочтений.

[00242] Затем различные легкие и тяжелые цепи тестировали на экспрессию и складывание белков. 10 вариантов последовательностей для переменного домена тяжелой цепи включали следующие: IGHV1-18, IGHV1-69, IGHV1-8 IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30/33m, IGHV3-28, IGHV3-74, IGHV4-39 и IGHV4-59/61. Из 10 вариантов последовательностей IGHV1-18, IGHV1-69 и IGHV3-30/33m показали улучшенные характеристики, такие как повышенная термостабильность. 9 вариантов последовательностей переменного домена легкой цепи включали следующие: IGKV1-39, IGKV1-9, IGKV2-28, IGKV3-11, IGKV3-15, IGKV3-20, IGKV4-1, IGLV1-51 и IGLV2-14. Из 9 вариантов последовательностей, IGKV1-39, IGKV3-15, IGLV1-51 и IGLV2-14 показали улучшенные характеристики, такие как повышенная термостабильность.

[00243] **Пример 6. Библиотеки GPCR**

[00244] Пример описывает получение библиотек GPCR.

[00245] **Материалы и способы**

[00246] *Получение стабильных клеточных линий и фаговых библиотек*

[00247] Полноразмерный ген GLP-1R человека (UniProt-P43220) с N-концевой меткой FLAG и C-концевой меткой GFP, клонированный в вектор pCDNA3.1(+) (ThermoFisher), трансфицировали в

суспензию клеток яичника китайского хомячка (CHO) с получением стабильной клеточной линии, экспрессирующую GLP-1R. Экспрессию мишени подтверждали с помощью FACS. Клетки, экспрессирующие > 80% GLP-1R согласно GFP, затем непосредственно использовали для отборов на основе клеток.

[00248] Комбинации каркасов IGHV1-69, IGHV3-30 тяжелой цепи зародышевой линии и IGKV1-39, IGKV3-15, IGLV1-51, IGLV2-14 легкой цепи зародышевой линии использовали в библиотеке с фаговым дисплеем, сфокусированной на GPCR, и кодировали все шесть разновидностей CDR, с помощью пулов олигонуклеотидов, синтезированных аналогично примерам 1-3, приведенным выше. CDR также подвергали скринингу для того, чтобы убедиться, что они не имеют проблем, связанных с обрабатываемостью, криптических сайтов сплайсинга или широко используемых сайтов рестрикции нуклеотидов. Варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL) связывали линкером (G4S)₃. Полученную библиотеку генов scFv (VH-линкер-VL) клонировали в вектор фагового дисплея pADL 22-2c (Antibody Design Labs) с помощью рестриционного расщепления NotI и электропорировали в электрокомпетентные клетки *E. coli* TG1 (Lucigen). Окончательная библиотека имела размер $1,1 \times 10^{10}$, что подтверждали с помощью NGS.

[00249] *Стратегия пэннинга и скрининга, используемая для выделения клонов scFv агониста GLP-1R*

[00250] Перед пэннингом на клетках CHO, экспрессирующих GLP-1R, фаговые частицы блокировали 5% BSA/PBS и удаляли неспецифические связующие на родительских клетках CHO. Для истощения родительских клеток CHO аликвоту входного фага вращали со скоростью 14 оборотов в минуту с 1×10^8 родительских клеток CHO в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Затем клетки осаждали центрифугированием при 1200 оборотах в минуту в течение 10 минут в настольной центрифуге Eppendorf с ротором 5920RS/4x1000 для того, чтобы истощить неспецифические связующие клеток CHO. Фаговый супернатант, лишенный связывающих клеток CHO, затем переносили в 1×10^8 клеток CHO, экспрессирующих GLP-1R. Фаговый супернатант и клетки CHO, экспрессирующие GLP-1R, вращали со скоростью 14 оборотов в минуту в течение 1 часа при комнатной температуре для отбора по связующим GLP-1R. После инкубации клетки несколько раз промывали $1 \times$ PBS/0,5% Tween для удаления несвязывающихся клонов. Для элюирования фага, связанного с клетками GLP-1R, клетки инкубировали с трипсином в буфере PBS в течение 30 минут при 37 °C. Клетки осаждали центрифугированием при 1200 оборотах в минуту в течение 10 минут. Выходной супернатант, обогащенный клонами, связывающими GLP-1R, амплифицировали в клетках *E. coli* TG1 для использования в качестве входного фага для следующего раунда отбора. Эту стратегию отбора повторяли в течение пяти раундов. Каждый раунд истощался на фоне родительского CHO. Амплифицированный выходной фаг из раунда использовали в качестве входного фага для последующего раунда, и строгость промывок увеличивали в каждом последующем раунде отбора с большим количеством промывок. После пяти раундов отбора по 500 клонов из каждого раунда 4 и раунда 5 секвенировали по Сэнгеру для идентификации уникальных клонов.

[00251] *Анализ секвенирования следующего поколения*

[00252] Фагмидную ДНК получали минимально из выходных бактериальных стоков всех раундов пэннинга. Варибельную тяжелую цепь (VH) амплифицировали с помощью ПЦР из фагмидной ДНК с использованием прямого праймера ACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACC и обратного

праймера TGAACCGCCTCCACCGCTAG. Продукт ПЦР непосредственно использовали для получения библиотеки с использованием набора для получения библиотеки КАРА HyperPlus (Кара Biosystems, продукт № KK8514). Для того, чтобы увеличить разнообразие библиотеки, в образцы добавляли 15% PhiX Control, приобретенный у Illumina, Inc. (продукт № FC-110-3001). Затем библиотеку загружали на Illumina's 600 cycle MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, продукт № MS-102-3003) и запускали на устройстве MiSeq.

[00253] *Реформатирование и высокопроизводительная (HT) очистка IgG*

[00254] Клетки Expi293 трансфицировали с использованием ExpiFectamine (ThermoFisher, A14524) с ДНК тяжелой и легкой цепей при соотношении 2:1, и супернатанты собирали через 4 дня после трансфекции до того, как жизнеспособность клеток упала ниже 80%. Очистку проводили с использованием либо King Fisher (ThermoFisher) с магнитными шариками с белком А, либо наконечников колонок с белком А Phynexus (Hamilton). Для крупномасштабного производства клонов IgG, которые оценивали в исследованиях на мышах *in vivo*, использовали систему очистки ВЭЖХ Akta (GE).

[00255] Характеристика IgG и контроль качества. Очищенные IgG для положительных связывающих GLP-1R (всплески) подвергали характеристике их чистоты с помощью высокочувствительного анализа LabChip GXII Touch HT Protein Express. Дитиотреитол (DTT) использовали для превращения IgG до VH и VL. Концентрации IgG измеряли с помощью Lunatic (UnChain). IgG для исследований на мышах *in vivo* дополнительно охарактеризовали с помощью ВЭЖХ и проверяли на уровни эндотоксина (Endosafe® nexgen-PTS™ Endotoxin Testing, Charles River) с дозой менее 5 единиц эндотоксина на кг.

[00256] *Анализ связывания и проточная цитометрия*

[00257] Клоны IgG GLP-1R тестировали в анализе связывания в сочетании с анализом проточной цитометрии следующим образом: клетки CHO, экспрессирующие FLAG-GLP-1R-GFP (CHO-GLP-1R), и родительские клетки CHO инкубировали со 100 нМ IgG в течение 1 часа на льду, трижды промывали и инкубировали с Alexa 647 конъюгированным козьим античеловеческим антителом (1:200) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-605-044) в течение 30 минут на льду с последующими тремя промывками, центрифугированием для осаждения клеток между каждой стадией промывки. Все инкубации и промывки проводили в буфере, содержащем PBS+1% BSA. Для титрования IgG серийно разбавляли 1:3, начиная со 100 нМ до 0,046 нМ. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, и всплески (всплеск представляет собой IgG, который специфически связывается с CHO-GLP-1R) идентифицировали путем измерения сигнала GFP по сравнению с сигналом Alexa 647. Данные проточной цитометрии анализов связывания с 100 нМ IgG представлены в виде точечных диаграмм. Анализ связывания с титрованием IgG представлены в виде кривых связывания, на которых нанесены концентрации IgG в зависимости от MFI (средняя интенсивность флуоресценции).

[00258] *Конкурентный анализ лигандов*

[00259] Конкурентный анализ лигандов включал совместную инкубацию первичного IgG с 1 мкМ GLP-1 (7-36). Для каждой точки данных готовили IgG (600 нМ) в проточном буфере (PBS+1%BSA) и разбавляли 1:3 до 8 точек титрования. Пептид GLP-1 7-36 (2 мкМ) получали аналогично с буфером Flow (PBS+1% BSA). Каждая лунка содержала 100000 клеток, к которым добавляли 50 мкл IgG и 50 мкл пептида (=плюс) или только буфер без пептида (=минус). Клетки и смесь IgG/пептид инкубировали в течение 1 часа

на льду и после промывки добавляли вторичное антитело (козье античеловеческое APC, Jackson ImmunoResearch Laboratories, продукт № 109-605-044), разведенное 1:200 в PBS + 1% BSA. Его инкубировали на льду в течение 30 минут (50 мкл на лунку) перед промывкой и ресуспендированием в 60 мкл буфера. Наконец, результаты анализа измеряли на устройстве Intellicyt® IQue3 со скоростью 4 секунды на лунку.

[00260] Результаты

[00261] *Конструирование библиотеки GPCR-сфокусированного антитела основано на мотивах связывания GPCR и антителах против GPCR*

[00262] Все известные взаимодействия GPCR, которые включают взаимодействия GPCR с лигандами, пептидами, антителами, эндогенными внеклеточными петлями и малыми молекулами, анализировали для картирования молекулярных детерминант связывания GPCR. Кристаллические структуры почти 150 пептидов, лигандов или антител, связанных с ECD около 50 GPCR (<http://www.gpcrdb.org>), использовали для идентификации мотивов связывания GPCR. Из этого анализа было извлечено более 1000 мотивов связывания GPCR. Кроме того, путем анализа всех выявленных структур GPCR (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/GPCR-EXP/) идентифицировали более 2000 мотивов связывания из эндогенных внеклеточных петель GPCR. Наконец, путем анализа структур более 100 низкомолекулярных лигандов, связанных с GPCR, идентифицировали редуцированную аминокислотную библиотеку из 5 аминокислот (Tyr, Phe, His, Pro и Gly), которая может воспроизвести многие из структурных контактов этих лигандов. Подбиблиотеку с этим уменьшенным аминокислотным разнообразием помещали в мотив SxxxxxC. Всего идентифицировали более 5000 мотивов связывания GPCR (**фиг. 9А-9Е**). Эти мотивы связывания помещали в одну из пяти различных стволовых областей: CARDLRELECEEWТxxxxxSRGPCVDPRGVAGSFDVW, CARDMYYDFxxxxxEVVPADDAFDIW, CARDGRGSLPRPKGGPxxxxxYDSSSEDSGGAFDIW, CARANQHFxxxxxGYHYYGMDVW, SAKHMSMQxxxxxRADLVGDAFDVW.

[00263] Эти стволовые области выбирали из структурного антитела со сверхдлинными HCDR3. Зародышевые линии антитела специфически выбирали для того, чтобы переносить эти сверхдлинные HCDR3. Анализ структуры и последовательности человеческих антител с длиной более 21 аминокислоты выявил смещение V-гена в антителе с длинными CDR3. Наконец, на основе этого анализа выбирали зародышевые гены IGHV (IGHV1-69 и IGHV3-30), IGKV (IGKV1-39 и IGKV3-15) и IGLV (IGLV1-51 и IGLV2-14) на основе этого анализа.

[00264] В дополнение к разнообразию HCDR3, ограниченное разнообразие также вводили в другие 5 CDR. Было 416 вариантов HCDR1 и 258 вариантов HCDR2 в домене IGHV1-69, 535 вариантов HCDR1 и 416 вариантов HCDR2 в домене IGHV3-30, 490 вариантов LCDR1, 420 LCDR2 и 824 варианта LCDR3 в домене IGKV1-39, 490 вариантов LCDR1, 265 LCDR2 и 907 вариантов LCDR3 в домене IGKV3-15, 184 варианта LCDR1, 151 вариант LCDR2 и 824 варианта LCDR3 в домене IGLV1-51, 967 вариантов LCDR1, 535 вариантов LCDR2 и 922 варианта LCDR3 в домене IGLV2-14 (**фиг. 10**). Эти варианты CDR выбирали путем сравнения CDR зародышевой линии с околозародышевым пространством одиночных, двойных и тройных мутаций, наблюдаемых в CDR в коллекции V-гена по меньшей мере у двух из 12 людей-доноров. Все CDR предварительно проверяли на предмет отсутствия проблем с обрабатываемостью, криптических сайтов сплайсинга или сайтов рестрикции нуклеотидов. CDR синтезировали в виде пула

олигонуклеотидов и включали в выбранные каркасы антитела. Гены тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) связывали линкером (G₄S)₃. Полученный пул генов scFv (VH-линкер-VL) клонировали в вектор фагового дисплея на N-конце минорного белка M13оболочки гена-3. Окончательный размер библиотеки GPCR составляет 1×10^{10} в формате scFv. Секвенирование следующего поколения (NGS) проводили на окончательной фаговой библиотеке для анализа распределения длин HCDR3 в библиотеке для сравнения с распределением длин HCDR3 в популяциях В-клеток от трех здоровых взрослых доноров. Последовательности HCDR3 от трех использованных здоровых доноров получали из общедоступной базы данных с более чем 37 миллионами последовательностей рецепторов В-клеток³¹. Длина HCDR3 в библиотеке GPCR намного больше, чем длина HCDR3, наблюдаемая в последовательностях коллекции В-клеток. В среднем медиана длины HCDR3 в библиотеке GPCR (которая демонстрирует двухфазный характер распределения) в два или три раза больше (от 33 до 44 аминокислот), чем медиана длины, наблюдаемая в последовательностях природной коллекции В-клеток (от 15 до 17 аминокислот) (**фиг. 11**). Двухфазное распределение длины HCDR3 в библиотеке GPCR в основном вызвано двумя группами стеблей (8aa, 9aaxxxxx10aa, 12aa) и (14aa, 16aa xxxxx18aa, 14aa), используемых для представления мотивов в HCDR3.

[00265] Пример 7. Библиотеки VHH

[00266] Конструировали синтетические библиотеки VHH. Для библиотеки «VHH Ratio» со специально разработанным разнообразием CDR 2391 последовательность VHH (база данных iCAN) выравнивали с использованием Clustal Omega для определения консенсуса в каждом положении, и каркас получали на основе консенсуса в каждом положении. CDR всех 2391 последовательностей анализировали на позиционно-специфическую вариацию, и это разнообразие вводили в конструкцию библиотеки. Для библиотеки «VHH Shuffle» с разнообразием перетасовки CDR базу данных iCAN сканировали на наличие уникальных CDR в последовательностях нанотел. Идентифицировали 1239 уникальных CDR1, 1600 уникальных CDR2 и 1608 уникальных CDR3, и каркас получали на основе консенсуса в каждом положении каркаса среди 2391 последовательностей в базе данных iCAN. Каждую из уникальных CDR индивидуально синтезировали и перетасовывали в консенсусной структуре с получением библиотеки с теоретическим разнообразием $3,2 \times 10^9$. Затем библиотеку клонировали в фагмидном векторе с использованием расщепления рестрикционными ферментами. Для библиотеки «VHH hShuffle» (синтетическая «человеческая» библиотека VHH с разнообразием перетасовки CDR) базу данных iCAN сканировали на наличие уникальных CDR в последовательностях нанотел. Идентифицировали 1239 уникальных CDR1, 1600 уникальных CDR2 и 1608 уникальных CDR3, а каркасы 1, 3 и 4 получали из каркаса зародышевой линии человека DP-47. Каркас 2 получали на основе консенсуса в каждом положении каркаса среди 2391 последовательностей в базе данных iCAN. Каждую из уникальных CDR индивидуально синтезировали и перетасовывали в частично гуманизованном каркасе с использованием инструмента NUGE для создания библиотеки с теоретическим разнообразием $3,2 \times 10^9$. Затем библиотеку клонировали в фагмидный вектор с помощью инструмента NUGE.

[00267] Систему Carterra SPR использовали для оценки аффинности связывания и распределения аффинности для вариантов VHH-Fc. VHH-Fc демонстрируют диапазон аффинности для TIGIT, начиная с нижней границы KD 12 нМ и заканчивая верхней границей KD 1685 нМ (данные не показаны). На **фиг. 12** представлены конкретные значения для клонов VHH-Fc для ELISA, белка А (мг/мл) и KD (нМ).

[00268] **Пример 8. Гипериммунная библиотека иммуноглобулинов против рецептора A2A**

[00269] Гипериммунную библиотеку иммуноглобулинов (IgG) получали с использованием способов, аналогичных описанным в примере 7. Кратко, гипериммунную библиотеку IgG получали путем анализа баз данных последовательностей рецепторов человеческих наивных В-клеток и В-клеток памяти, состоящих из более 37 миллионов уникальных последовательностей IgH от каждого из 3 здоровых доноров. В результате анализа получали более двух миллионов последовательностей CDRH3, которые индивидуально конструировали с использованием способов, аналогичных примерам 1-3. Последовательности CDRH3 включали в библиотеку VHH hShuffle, описанную в примере 9. Определяли, что конечное разнообразие библиотеки составляет $1,3 \times 10^{10}$. Схематическое изображение конструирования приведено на **фиг. 13**.

[00270] 73 из 88 уникальных клонов имели значения MFI клеток-мишеней в 2 раза выше, чем у родительских клеток. 15 из 88 уникальных клонов имели значения MFI клеток-мишеней в 20 раз выше, чем у родительских клеток. Данные для варианта A2AR-90-007 против рецептора аденозина A2A приведены на **фиг. 14A-14B**.

[00271] В этом примере показано получение библиотеки VHH для A2AR с высокой аффинностью и значениями K_D в субнаномолярном диапазоне.

[00272] **Пример 9. Библиотеки GPCR с различными CDR**

[00273] Библиотеку GPCR получали с использованием схемы рандомизации CDR.

[00274] Кратко, библиотеки GPCR конструировали на основе последовательностей антитела против GPCR. Анализировали более шестидесяти различных антител против GPCR, и последовательности этих GPCR модифицированы с использованием схемы рандомизации.

[00275] Конструирование тяжелой цепи IGHV3-23 приведено на **фиг. 15A**. Как видно на **фиг. 15A**, CDRH3 IGHV3-23 имела четыре различные длины: 23 аминокислоты, 21 аминокислота, 17 аминокислот и 12 аминокислот, причем каждая длина имеет свое разнообразие остатков. Соотношение для четырех длин было следующим: 40% для CDRH3 из 23 аминокислот в длину, 30% для CDRH3 из 21 аминокислот в длину, 20% для CDRH3 из 17 аминокислот в длину и 10% для CDRH3 из 12 аминокислот в длину. Определили, что разнообразие CDRH3 составляет $9,3 \times 10^8$, а разнообразие полной тяжелой цепи IGHV3-23 составляет $1,9 \times 10^{13}$.

[00276] Конструирование тяжелой цепи IGHV1-69 приведено на **фиг. 15B**. Как видно на **фиг. 15B**, CDRH3 IGHV1-69 имеет четыре различные длины: 20 аминокислот, 16 аминокислот, 15 аминокислот и 12 аминокислот, причем каждая длина имеет свое разнообразие остатков. Соотношение для четырех длин было следующим: 40% для CDRH3 из 20 аминокислот в длину, 30% для CDRH3 из 16 аминокислот в длину, 20% для CDRH3 из 15 аминокислот в длину и 10% для CDRH3 из 12 аминокислот в длину. Определили, что разнообразие CDRH3 составляет 9×10^7 , а разнообразие полной тяжелой цепи IGHV-69 составляет $4,1 \times 10^{12}$.

[00277] Конструирование легких цепей IGKV 2-28 и IGLV 1-51 приведено на **фиг. 15C**. Последовательности CDR легкой цепи антитела анализировали на позиционно-специфические вариации.

Выбирали два каркаса легкой цепи с фиксированными длинами CDR. Определили, что теоретическое разнообразие составляет 13800 и 5180 для каппа и легких цепей, соответственно.

[00278] Окончательное теоретическое разнообразие определяли равным $4,7 \times 10^{17}$, а конечная полученная библиотека Fab имела разнообразие 6×10^9 . См. **фиг. 15D**.

[00279] **Пример 10. Библиотеки связывания рецептора аденозина A2A с различными CDR**

[00280] Библиотеку связывания рецептора аденозина A2A получали с использованием схемы рандомизации CDR, аналогично описанной в примере 9.

[00281] Кратко, библиотеку связывания рецептора аденозина A2A конструировали на основе последовательностей антител против GPCR. Анализировали более шестидесяти различных антител против GPCR, и последовательности этих GPCR модифицировали с использованием схемы рандомизации CDR. Вариантные IgG против рецептора аденозина A2A, сконструированные с использованием схемы рандомизации CDR, очищали и анализировали для определения аффинности на основе клеток и для функционального анализа.

[00282] **Пример 11. Вариантные иммуноглобулины A2A**

[00283] Вариантные иммуноглобулины против A2AR анализировали в различных функциональных анализах.

[00284] Во-первых, фаговые библиотеки scFv иммуноглобулина против A2AR подвергали пэннингу на клетках и иммобилизованных белках A2a и скринингу. Номера выходных фагов из каждого раунда отбора показаны в **Таблицах 7-8**.

Таблица 7.

| Мишень | Библиотека | Раунд 1 | Раунд 2 | Раунд 3 | Раунд 4 | Раунд 5 |
|----------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| HEK293-A2a Клетки | Мышиная иммунная | $2,7 \times 10^6$ | $4,1 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^8$ |
| A2a белок | Гуманизированная Синтетическая | $4,1 \times 10^6$ | $8,0 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^8$ | $1,2 \times 10^7$ | $5,8 \times 10^7$ |
| A2a белок + ZM241385 | Гуманизированная Синтетическая | $5,2 \times 10^6$ | $4,5 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$ | $3,0 \times 10^7$ | $6,7 \times 10^7$ |
| A2a белок | Мышиная иммунная | $4,3 \times 10^7$ | $5,8 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ | $4,8 \times 10^7$ | $3,2 \times 10^7$ |
| A2a белок + ZM241385 | Мышиная иммунная | $2,4 \times 10^7$ | $3,7 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^8$ | $6,0 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^6$ |

Таблица 8.

| Мишень | Библиотека | Раунд 1 | Раунд 2 | Раунд 3 | Раунд 4 | Раунд 5 |
|-------------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| HEK293-A2a Клетки | Иммунная | $1,3 \times 10^6$ | $3,1 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$ |
| A2a белок | Синтетическая | $5,2 \times 10^6$ | $3,7 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^8$ | $1,2 \times 10^7$ | $4,9 \times 10^7$ |
| A2a белок + ZM241385 | Синтетическая | $6,7 \times 10^6$ | $2,9 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^7$ |
| A2a белок | Иммунная | $8,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^7$ | $9,0 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^7$ | $2,8 \times 10^7$ |
| A2a белок + ZM241385 | Иммунная | $6,0 \times 10^6$ | $1,7 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$ | $4,6 \times 10^7$ | $1,9 \times 10^7$ |

[00285] Пример 12. Скрининг связывания антител

[00286] Отобранные иммуноглобулины против A2AR из групп, перечисленных в **Таблицах 15-18**, анализировали на связывание с мишенями, как перечислено в таблицах.

[00287] *Клетки HEK293-A2a*

[00288] Данные проточной цитометрии, показывающие связывание с клетками HEK293-A2a с использованием иммуноглобулинов из библиотек вариантов, получали с использованием 100 нМ IgG и сравнивали с обнаруженным связыванием в родительских клетках. Связывание с использованием вариантов из иммунной библиотеки показано на **фиг. 16А-16Н**. Контроль показан на **фиг. 160**, показывающем связывание клеток с моноклональным антителом против человеческого A2aR (MAB9497). Выбранные варианты оценивали на связывание при концентрациях, титрованных от 100 нМ. Полученные кривые показаны на **фиг. 17А-17Н**. Кривые связывания строили на основе зависимости концентрации IgG от MFI (средняя интенсивность флуоресценции). Связывание с использованием вариантов из мышинной иммунной библиотеки показано на **фиг. 18А-18Н**. Контроль показан на **фиг. 180**, показывающем связывание клеток с моноклональным антителом против человеческого A2aR (MAB9497). Выбранные варианты оценивали на связывание при концентрациях, титрованных от 100 нМ. Полученные кривые показаны на **фиг. 19А-19Г**. Кривые связывания строили на основе зависимости концентрации IgG от MFI (средняя интенсивность флуоресценции).

[00289] *Связывания белка*

[00290] Очищенные иммуноглобулины A2a из **таблиц 15-18** анализировали на связывание при титровании от 100 нМ. Результаты для выбранных вариантов показаны на **фиг. 20А-20Г**.

[00291] Пример 13. Ответ агониста в анализе cAMP LANCE®

[00292] Анализ зависимости ответа от дозы агониста выполняли с использованием анализа cAMP LANCE® в 384-луночном формате с использованием 2500 клеток/луночка в соответствии с инструкциями производителя. Стимуляцию клеток с помощью NECA и CGS 21680 проводили в течение 30

минут при комнатной температуре. Показания получали на планшетном считывателе EnVision в лазерном режиме. Данные показаны на **фиг. 21**. Z'-фактор вычисляли для NECA с по меньшей мере 16 фоновыми и 16 максимальными сигнальными точками ($Z' = 0,80$). Вычисленная EC_{50} (M) для NECA = $2,7 \times 10^{-7}$ и для CGS 21680 = $4,3 \times 10^{-7}$.

[00293] Пример 14. Ответ антагониста в анализе cAMP LANCE®

[00294] Анализ зависимости ответа от дозы антагониста выполняли с использованием анализа cAMP LANCE® в 384-луночном формате с использованием 2500 клеток на лунку и 1 мкМ NECA (контрольный агонист) в соответствии с инструкциями производителя. Стимуляцию клеток ZM241385 проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Показания получали на планшетном считывателе EnVision в лазерном режиме. Данные показаны на **фиг. 22**. Вычисленная IC_{50} (M) для ZM241385 = $1,25 \times 10^{-5}$.

[00295] Пример 15. cAMP титрование антагониста A2A

[00296] Клетки высевали при 3000 клеток на лунку и предварительно инкубировали с фиксированным 100 нМ IgG в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей стимуляцией титрованием NECA в течение 30 минут при комнатной температуре в соответствии с инструкциями производителя. Буфер представлял собой PBS + 0,1% BSA + 0,5 мМ IBMX. Результаты показаны на **фиг. 23**. Абсолютная IC_{50} показана в **Таблице 9**, что указывает на то, что A2A-1 является отрицательным аллостерическим модулятором.

Таблица 9.

| | + нет антитела | A2A – 1 | R&D контрольное антитело |
|-----------|----------------|---------|--------------------------|
| IC_{50} | 0,03040 | 0,2816 | 2,253 |

[00297] Пример 16. Аллостерический cAMP анализ LANCE®

[00298] A2A-1 и A2A-9 анализировали на предмет аллостерической модуляции. Клетки предварительно инкубировали с титрованным IgG в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей стимуляцией фиксированной концентрацией NECA. Результаты показаны на **фиг. 24**. Значения IC_{50} показаны в **Таблице 10**, что указывает на то, что A2A-1 является отрицательным аллостерическим модулятором.

Таблица 10.

| | A2A – 1 | A2A – 9 | R&D контрольное антитело |
|----------------------|---------|---------|--------------------------|
| Абсолютная IC_{50} | 1,833 | 4,106 | 9,432 |

[00299] Пример 17. Аллостерический cAMP Perkin Elmer анализ A2A

[00300] A2A-9 анализировали, как описано в примере 15. Полученные кривые ответа показаны на **фиг. 25**. Вычисленная IC_{50} для A2A-9 показана в **Таблице 11**.

Таблица 11.

| | | A2A – 9 | R&D контрольное антитело | нет антитела |
|--|--|---------|--------------------------|--------------|
| | | | | |

| | | | | |
|-----------------|--|---------|---------|---------|
| Абсолютная IC50 | | ~0,4513 | ~0,5126 | ~0,2556 |
|-----------------|--|---------|---------|---------|

[00301] Пример 18. сАМР титрования антагониста А2А

[00302] А2А-9 анализировали, как описано в примере 16. Полученные кривые ответа показаны на **фиг. 26**. Вычисленные значения IC50 приведены в **Таблице 12**. Результаты показывают, что А2А-9 является антагонистом.

Таблица 12.

| | | |
|-----------------|---------|---------------------------|
| | А2А – 9 | R&D контрольное антителио |
| Абсолютная IC50 | 4,106 | 9,432 |

[00303] Пример 19. Антагонистический анализ сАМР А2А

[00304] Выбранные варианты анализировали на связывание с мишенью. Иммуноглобулины титровали с тремя повторениями и инкубировали на клетках в течение 1 часа, после чего инкубировали с 0,5 мкМ НЕСА в течение 30 минут. Кривые связывания, показывающие соотношение относительных единиц флуоресценции (RFU) при 665 нм/615 нм по сравнению с нМ IgG в логарифмической шкале, показаны на **фиг. 27А-27С**. Окончательные исследования связывания обнаружили функциональные антителиа в созданных библиотеках, как указано в **Таблице 13** и **Таблице 14**.

Таблица 13.

| Мишень | Библиотека | Переформатированное | Функциональное |
|----------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------|
| НЕК293-А2а Клетки | Мышиная иммунная | 14 | |
| А2а белок | Гуманизированная Синтетическая | 95 | 2 |
| А2а белок + ZM241385 | Гуманизированная Синтетическая | 95 | 3 |
| А2а белок | Мышиная иммунная | 12 | 1 |
| А2а белок + ZM241385 | Мышиная иммунная | 22 | 0 |

Таблица 14.

| Мишень | Библиотека | Переформатированное | Функциональное |
|----------------------|---------------|---------------------|----------------|
| НЕК293-А2а Клетки | Иммунная | 14 | |
| А2а белок | Синтетическая | 95 | 2 |
| А2а белок + ZM241385 | Синтетическая | 95 | 5 |
| А2а белок | Иммунная | 29 | 4 |
| А2а белок + ZM241385 | Иммунная | 10 | 5 |

[00305] Пример 20. Функциональные клеточные анализы сАМР А2АР

[00306] Аллостерические и антагонистические анализы сАМР проводили с использованием клеточных линий А2А.

[00307] Кратко, клетки предварительно инкубировали с анти-А2АR антителом при концентрации 100 нМ с последующим 3-кратным титрованием со стимуляцией NECA от 100 мкМ. Данные функционального аллостерического анализа сАМР представлены на **фиг. 28А-28С**. ZM241385 функционировал как антагонист. «нет антитела» действовал только как агонист.

[00308] Для функционального антагонистического анализа сАМР клетки предварительно инкубировали с анти-А2АR антителом, 3-кратно титровали от 100 нМ с последующей стимуляцией NECA при 0,5 мкМ. Данные показаны на **фиг. 29А-29С**. Клетки также предварительно инкубировали с анти-А2АR антителом, 3-кратно титровали от 100 нМ с последующей стимуляцией NECA при 10 мкМ. Данные показаны на **фиг. 30А-30С**.

[00309] На основе данных для титрования NECA, титрования IgG (NECA 0,5 мкМ) и титрования IgG (NECA 10 мкМ), варианты А2АR А2А-17, А2А-19, А2А-24, А2А-26 и А2А-27 продемонстрировали улучшение функцию в анализах сАМР.

[00310] Пример 21. Иллюстративные последовательности

Таблица 15. CDR варибельной тяжелой цепи

| Вариант А2АR | SEQ ID NO | Последовательность CDR1 | SEQ ID NO | Последовательность CDR2 | SEQ ID NO | Последовательность CDR3 |
|--------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| 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 | DSGSYYDWFDP |
| 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 | GFTFNNTY | 110 | SGSGGD | 199 | ARGYWRWRLRRYDY |
| A2A - 17 | 22 | GFNIGNT | 111 | NPNYGT | 200 | DYGSSSFYDY |
| 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 | HEVEYYGPSSWFAY |
| 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 | YPGSGN | 212 | EDDYGWYFGV |
| A2A - 30 | 35 | GYRLTGY | 124 | DPASGD | 213 | HEDPIYYGNYVFAY |
| 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 | VIYYYYGSSDYTLDY |
| 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 | SSGGDS | 225 | DYYGSSWHFDV |
| 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 | GTFTDY | 141 | LPGSGG | 230 | PYDYDFDY |
| A2A - 48 | 53 | GYTFTSS | 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 | DYIYAMDY |
| A2A - 54 | 59 | GYTFTDY | 148 | DPANGD | 237 | GDYGSSYAMDY |
| A2A - 55 | 60 | GYEFSSS | 149 | YPGTGN | 238 | YYYGSSAFAY |
| A2A - 56 | 61 | GFTFSSY | 150 | DPGTGG | 239 | IYYDYSAMDY |
| A2A - 57 | 62 | GFIFSDF | 151 | DPEDG | 240 | DYYGSSYLDY |
| A2A - 58 | 63 | GFNIKDY | 152 | NPNNGG | 241 | DYYGSFHRRWYFDV |
| A2A - 59 | 64 | GYTFTDY | 153 | NINNGG | 242 | DYHGSSFYWYFDV |
| A2A - 60 | 65 | GYTFTEY | 154 | NFDGSS | 243 | YYDSSYYAMDY |
| A2A - 61 | 66 | GFTFSTY | 155 | YPGDTD | 244 | GIAVAGTFDY |

| | | | | | | |
|----------|----|----------|-----|----------|-----|--|
| A2A - 62 | 67 | GYTFTNY | 156 | NPNNGG | 245 | HALLWYYYAMDY |
| A2A - 63 | 68 | GFTFSDH | 157 | NPNSGI | 246 | VSYSGLSHY |
| A2A - 64 | 69 | GFTFDDY | 158 | NTNTGN | 247 | SNWNYFDY |
| A2A - 65 | 70 | GSAFSAS | 159 | DPDNGD | 248 | PRDSGSPFAS |
| A2A - 66 | 71 | GFTFSSY | 160 | YPKDGS | 249 | SRGYYYGSSYGYVDV |
| 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 | DATGTFAY |
| 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 | GYTFTEY | 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 |
| A2A - 88 | 93 | GFTFRTY | 182 | SAEGSN | 271 | DGRGSLPRPKGGFIGALS FHWPFGRWLGGSYGTY DSSEDSGGAFDI |
| A2A - 89 | 94 | GFTFNNTY | 183 | SYGGSD | 272 | DGRGSLPRPKGGFIGDLS FHWPFGRWLKGSYGTY DSSEDSGGAFDI |

Таблица 16. CDR варибельной легкой цепи

| Вариант A2AR | SEQ ID NO | Последовательность CDR1 | SEQ ID NO | Последова- тельность CDR2 | SEQ ID NO | Последова- тельность CDR3 |
|-----------------|-----------------|----------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|
| A2A - 1 | 273 | RSSQSLVYSDGNTYLN | 362 | KVSNRDS | 451 | MQGTHWPRT |
| A2A - 2 | 274 | KASQDIDDDMN | 363 | EATTLVP | 452 | LQHDNFPMYT |
| A2A - 3 | 275 | KSSQSVLYSSNNKNYLA | 364 | WASTRES | 453 | QYYSTPYT |
| A2A - 4 | 276 | RASQSVSSNLA | 365 | GASTRAT | 454 | QYYSTPLT |

| | | | | | | |
|----------|-----|------------------|-----|---------|-----|------------|
| A2A - 5 | 277 | KASQDIDDDMN | 366 | EATTLVP | 455 | LQHDNFPWT |
| A2A - 6 | 278 | RASQGISSWLA | 367 | AASSLQS | 456 | QQTNSFPRT |
| A2A - 7 | 279 | KASQDVDDDMN | 368 | EATTLVP | 457 | LQHDNFPWT |
| A2A - 8 | 280 | KASQNVGTNVA | 369 | SASYRYS | 458 | QRFNNYPLT |
| A2A - 9 | 281 | KASQNVGSSVA | 370 | STSYRYS | 459 | QQYNSYPLT |
| A2A - 10 | 282 | RASQSISDYLH | 371 | YASQSIG | 460 | QNGHSFPLT |
| A2A - 11 | 283 | KASRNVGTNVA | 372 | SASYRYS | 461 | QQYNSYPLT |
| A2A - 12 | 284 | RASQSISDYLH | 373 | YASQSIG | 462 | QNGHSFPHT |
| A2A - 13 | 285 | KASQNVGTNVA | 374 | SASYRYS | 463 | QQYNIYPLT |
| A2A - 14 | 286 | RASQSISNYLH | 375 | YASQSIG | 464 | QNGHSFPLT |
| A2A - 15 | 287 | RASQSIGRYLN | 376 | AASSLHS | 465 | QOSYVTPWT |
| A2A - 16 | 288 | RASQSIGTYLN | 377 | GASTLHS | 466 | QOSYSAPWT |
| A2A - 17 | 289 | KASQSVRNDVV | 378 | RGNTLRP | 467 | QQYYGIPLT |
| A2A - 18 | 290 | RASQSVTTYLN | 379 | SASSLQS | 468 | QQTYATPWT |
| A2A - 19 | 291 | RASQSISDYLN | 380 | TASTLQS | 469 | EQSYSTPWT |
| A2A - 20 | 292 | KASHSVDYDGDNYMN | 381 | WASTRLT | 470 | LQHIEYPFT |
| A2A - 21 | 293 | KSSQSVLYSSNKNYFA | 382 | DAPNRAT | 471 | QQGYTTPYT |
| A2A - 22 | 294 | RASQDIGRSL | 383 | DASRFIS | 472 | QWSNSWPYT |
| A2A - 23 | 295 | RASQSIGRYLN | 384 | AASSLHS | 473 | QOSYVTPWT |
| A2A - 24 | 296 | KASQSVRNDVV | 385 | RGNTLRP | 474 | QQYYGIPLT |
| A2A - 25 | 297 | KASQSVDYDGDNYMN | 386 | RANRLVD | 475 | QNGHSFPLT |
| A2A - 26 | 298 | RASQTISRYLN | 387 | SASTLQS | 476 | QOSYSTPHT |
| A2A - 27 | 299 | RASQSIGSYLN | 388 | GASNLQS | 477 | QQGYSAPRT |
| A2A - 28 | 300 | RASRSISSYLN | 389 | AASSLPS | 478 | QOSYSTPRT |
| A2A - 29 | 301 | KVSQDVRTAVA | 390 | DTSYLAS | 479 | QOSYSWSLT |
| A2A - 30 | 302 | GGGNDIGSSMY | 391 | WMSNLAS | 480 | QQYSTYPFA |
| A2A - 31 | 303 | RASQSISDYLN | 392 | GASPRES | 481 | QQDNIWPYT |
| A2A - 32 | 304 | GGGNDIGSSMY | 393 | DASRFIS | 482 | QQSNEDPPFT |
| A2A - 33 | 305 | RASESVDSFGNNFMN | 394 | HTSRLNS | 483 | QQNNEVPRT |
| A2A - 34 | 306 | RASSSVTYIH | 395 | AVSRLDS | 484 | HQSNEDPYT |
| A2A - 35 | 307 | RASQSIGRYLN | 396 | AASSLHS | 485 | QOSYVTPWT |
| A2A - 36 | 308 | KASQSVRNDVV | 397 | RGNTLRP | 486 | QQYYGIPLT |
| A2A - 37 | 309 | KASHSVDYDGDNYMN | 398 | DASRFIS | 487 | LRASYRT |
| A2A - 38 | 310 | RASESVNSYGNFSMH | 399 | DASRFIS | 488 | LQYGESPLT |
| A2A - 39 | 311 | RSSKSLHSSGNAYVY | 400 | YTSKPNS | 489 | QHGYGIPLT |
| A2A - 40 | 312 | RASQSIGTYLN | 401 | AASSLES | 490 | QQTYNTPWT |
| A2A - 41 | 313 | RASSRVSSSYLY | 402 | ATYSLDY | 491 | LQHGERPLT |
| A2A - 42 | 314 | GASQSIGTIIH | 403 | DTSYLAS | 492 | QQGNTRPWT |
| A2A - 43 | 315 | RASENIYVPLN | 404 | DASRFIS | 493 | QQYNSFPLYT |
| A2A - 44 | 316 | RASQSVSSSYLA | 405 | GASSRAT | 494 | QQYGSSPIT |
| A2A - 45 | 317 | KSSQSLLYSGEKTPY | 406 | WASTRLT | 495 | QQSNEDSWT |

| | | | | | | |
|----------|-----|------------------|-----|---------|-----|-------------|
| A2A - 46 | 318 | QSSQDIFNYLE | 407 | TASNLDT | 496 | QQGYSTPPEIT |
| A2A - 47 | 319 | RSTRNILSNMP | 408 | NANTLAE | 497 | LQHWNYPYM |
| A2A - 48 | 320 | RASQDISNNLH | 409 | EISGWLS | 498 | QQSNSWSLLT |
| A2A - 49 | 321 | SASQSMSNNLH | 410 | LASNLGY | 499 | RQNGHSFPLT |
| A2A - 50 | 322 | RASQDISNNLH | 411 | WASTRLT | 500 | QQWSDYPFT |
| A2A - 51 | 323 | SASSLSYMH | 412 | GASPRES | 501 | RQMSSYPPT |
| A2A - 52 | 324 | SASSSVSYMN | 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 | AQNRELPFT |
| A2A - 59 | 331 | KASQDVGTAIT | 420 | SASKRNT | 509 | LHHYGTPTYT |
| A2A - 60 | 332 | KASQDVGTSVA | 421 | PASYRSS | 510 | QQGSSNPLT |
| A2A - 61 | 333 | RASQVIDDDIN | 422 | LGSNRAP | 511 | HQSYTTPHT |
| A2A - 62 | 334 | RASQEISGYLT | 423 | SASHRSS | 512 | QQWDNNPYT |
| A2A - 63 | 335 | RASQSISRYLN | 424 | KASSLER | 513 | LQPNSYPWT |
| A2A - 64 | 336 | RASQGISSWLD | 425 | TPFSLQS | 514 | QHYDDLPLT |
| A2A - 65 | 337 | KASQNMGSNVA | 426 | EASTRFS | 515 | QQYSSYPLR |
| A2A - 66 | 338 | RASQGILGYLN | 427 | STSNLLL | 516 | RQLSSNPLT |
| A2A - 67 | 339 | RASESVDNYGISFMS | 428 | DASRFIS | 517 | QQINSWPLT |
| A2A - 68 | 340 | KSSQSLLYSGEKTYPY | 429 | EASNRYT | 518 | QQWSSYPPIA |
| A2A - 69 | 341 | RASQGLRHDLG | 430 | WASNRES | 519 | QKYSSTPYT |
| A2A - 70 | 342 | HASESVSVAGTSL LH | 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 | RASQSVSSSYLA | 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 | RASQISDY LH | 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 | GTWDTLSAGV |
| A2A - 89 | 361 | SGSSSNIGNHYVS | 450 | DNTKRPSG | 539 | GTWDASLSTWV |

Таблица 17. Последовательности варибельной тяжелой цепи

| Вариант A2AR | SEQ ID NO | Последовательность |
|--------------|-----------|---|
| A2A - 1 | 540 | QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWSWVRQPPGKG LEWIGEIYPSGNTYYNPSLKSRTVISVDKSKNQFSLKLNVSVAADTA VYYCARDEGYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 2 | 541 | EVQLLESgaeVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGGPFQDYWGQGLTMVTVSS |
| A2A - 3 | 542 | EVQLLESgaeVKKPGASVKASCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSD DTAVYYCARVYSYGFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 4 | 543 | AGQLQESGGGLVKPGGSLRPSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGL EWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDNWAFDLWGQGLTVTVSS |
| A2A - 5 | 544 | GGALVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQATGKG LEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLHLQMNSLRDEDT AVYYCARTWYSSSPFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 6 | 545 | EVQLLESGGGLVKPGGSPRLSCAASGFTFSNYSMNWVRQAPGKGL EWVSSISSSSYIYYADSVNGRFTISRDKNSLYLQMNSLRAEDT AVCYCARDSSGSYYDWFDPWGQGLTVTVSS |
| A2A - 7 | 546 | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRRAPGKGL EWVSAISGGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKYSNYFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 8 | 547 | EVQLQQPGPGLVKPSLSLSHTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKL EWMGYISYDGSNNYNPSLKNRITSITRDTSKNQFFLKLSSVTDDTA TYYCARVHHYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS |
| A2A - 9 | 548 | EVQLQQSGPGLVKPSQSLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGKKL EWMGYIRYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTDDTA TYYCARVHHYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS |
| A2A - 10 | 549 | EVQLQQSGPGLVKPSQSLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKL EWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTA TYYCARDPYYYGSSYFDYWGQGTTLTVSS |
| A2A - 11 | 550 | EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDYYMAWVRQVPEKGL EWWANINYDGSSTIYLDLKSRTISRDNKNSLYLQMSSLKSEDA TYYCAREYYYGSSSFAYWGQGTTLTVSS |
| A2A - 12 | 551 | EVNPVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFNDYYMAWVRQVPEKG LEWWANINYDGSSTIYLDLKSRTISRDNKNSLYLQMSSLKSEDT |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | ATYYCAREYYYGSSSFAYWGQGLTVTSA |
| A2A – 13 | 552 | GGEVVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDFGMHWVRQAPEKG LEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSED TAMYYCARREFAYWGQGLTVTSA |
| A2A – 14 | 553 | EVKLEESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSDYGMHWVRQAPEKGL EWVAYISSGSGTIYYEDTVKGRFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEGT AIYYCARPNYHGSSPFAYWGQGLTVTSA |
| A2A – 15 | 554 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGL EWVSGISGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGKWRWRLGRRYDYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 16 | 555 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMWVRQAPGKGL LEWVSSISGGGDTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAARGYWRWRLRRYDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 17 | 556 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIGNTYMHWFRQAPGKGL EWVGVINPNYGTTRYNDYKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYGSSSFYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 18 | 557 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFGYAMWVRQAPGKGL EWVSVISGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGYPRWRLGRRYDYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 19 | 558 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMWVRQAPGKGL LEWVSTISGGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAARGYKRWRLGRRYDYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 20 | 559 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFANFYWMWVRQAPGKGL LEWVGVWFYPKSGSIKYNDYKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTGLYGYDLHWYFDVWGQGLTVTVSS |
| A2A – 21 | 560 | QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVCSKASGGSSISGGYYWNWVRQATG QGLEWMGWMNPNSGNRGSAAQKQGRVTMTRDTSTSTVYMEISS LRSEDYAVYYCARDEVAAGLFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 22 | 561 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTEYITHWVRQAPGKGL EWVGMIHPSGSIYNDYKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARHEVEYYGPSWFAFAYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 23 | 562 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGL EWVSGISGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGKWRWRLGRRYDYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 24 | 563 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIGNTYMHWFRQAPGKGL EWVGVINPNYGTTRYNDYKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYGSSSFYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 25 | 564 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGNYWMWVRQAPGKGL LEWVGRIDPANGDTKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREGDNSNYAMDYWGQGLTVTVSS |
| A2A – 26 | 565 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVRQAPGKGL |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | EWVSGISGSAGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGHWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 27 | 566 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMAWVRQAPGKGL EWVSAISGSGGSTYFADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGYWRWRLWRRYDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 28 | 567 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSQAMSWVRQAPGKGL EWVSSISGSGVSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGRWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 29 | 568 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYSTGYDISWVRQAPGKGL EWVARIYPGSGNTYYDDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREDDYGWYFGVWGQGLVTVSS |
| A2A – 30 | 569 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYRLTGYWIEWVRQAPGKG LEWVGRIDPASGDTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARHEDPIYYGNYVFAYWGQGLVTVSS |
| A2A – 31 | 570 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYLFTDYNMNVWRQAPGKG LEWVGWIYPGTGNTYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCTALYYGSSWERYFDVWGQGLVTVSS |
| A2A – 32 | 571 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFIDYGMHWVRQAPGKGL EWVGVINPNYGTTRYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARQGSNYGGYFDVWGQGLVTVSS |
| A2A – 33 | 572 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFPFSSYAMTWVRQAPGKGL EWVSGISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAARGYWRWRLGRRADYWGQGLVTVSS |
| A2A - 34 | 573 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNFNTYAMNVWRQAPGKG LEWVGVIYPGNSDTTYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTGVIYYYGSSDYTLDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 35 | 574 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMWVRQAPGKGL EWVSGISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAAARGKWRWRLGRRYDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 36 | 575 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIGNTYMHWFRQAPGKGL EWVGVINPNYGTTRYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYGSSSFDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 37 | 576 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYVWHWVRQAPGKG LEWVANINHDSNTYYLDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCASSMITRFAYWGQGLVTVSS |
| A2A – 38 | 577 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFLTSYNIDWVRQAPGKGL EWVGGVDPETDDTAYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCANYYYGSSAFAYWGQGLVTVSS |
| A2A – 39 | 578 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYMSWVRQAPGKGL EWVGDINPNNGGTTYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCTKAYYSNYGVMYFWGQGLVTVSS |

| | | |
|----------|-----|--|
| A2A – 40 | 579 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNFRSYAMSWVRQAPGKG LEWVSVISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAARGGWRWRLGRRYDYWGQGT LVTVSS |
| A2A – 41 | 580 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSLSIYGISWVRQAPGKGLE WVGDISPGSGSTNYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAGPYYYGSSRYYAMDYWGQGT LVTVSS |
| A2A - 42 | 581 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSYNINWVRQAPGKGL EWVATISSGGDSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCERDYYGSSWHFDVWGQGT LVTVSS |
| A2A – 43 | 582 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMYWVRQAPGKGL EWWASISDGGSYTYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARYIWYYGSSWSWYFDAWGQGT LVTVSS |
| A2A – 44 | 583 | EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSAYDIYWVRQPTGKGL EWWSAIGTAGDTYYPGSVKGRFIISRESAKNSVYLQMNSLRAGDTA VYYCAVGYNWIFDLWGQGT LVTVSS |
| A2A – 45 | 584 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYSFTGYDISWFRQAPGKGL EWVGEILPGSGGTNYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCTSGNYDAMDYWGQGT LVTVSS |
| A2A – 46 | 585 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGGYISSNWWSWVRQATGQ GLEWMANIEQDGSEKNYVQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARGEYSRLWYFDLWGQGT LVTVSS |
| A2A – 47 | 586 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDYMKWVRQAPGKGL EWVGEILPGSGGTNYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARPYDYDFDYWGQGT LVTVSS |
| A2A – 48 | 587 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTSSWMHVARQAPGKG LEWVGWLYPRDGSTEYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCITTVVADWYFDVWGQGT LVTVSS |
| A2A – 49 | 588 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFNDDYTNWVRQAPGKG LEWVGNINPNNGAMIYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARKGDGGSYAAMDYWGQGT LVTVSS |
| A2A – 50 | 589 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYSFTGYDISWVRQAPGKGL EWVGWIYPKDGSTKYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCITTVVADWYFDVWGQGT LVTVSS |
| A2A - 51 | 590 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFNDYYINWVRQAPGKGL EWVGDINPNNGANIYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARNYGSSYYALDYWGQGT LVTVSS |
| A2A – 52 | 591 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFNDYYINWVRQAPGKGL EWVGDINPNNGGTTYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARQGSNYGGYFDVWGQGT LVTVSS |
| A2A – 53 | 592 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIIDDYMHWVRQAPGKGL EWWGMITDTGEPTDADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT |

| | | |
|----------|-----|---|
| | | AVYYCVYDYIYAMDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 54 | 593 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDYDMYWVRQAPGKGL LEWVGRIDPANGDTKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARGDYGSSYAMDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 55 | 594 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYEFSSSWMNWVRQAPGKGL LEWVGWIYPGTGNTNYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCANYYYGSSAFAYWGQGLVTVSS |
| A2A – 56 | 595 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGLPWVRQAPGKGL EWVGAIDPGTGGTASNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARIYYDYSAMDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 57 | 596 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFSDFYMAWVRQAPGKGL EWVGRIDPEDGDEHADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDYYGSSYLDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 58 | 597 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFNIKDYMHVVRQAPGKGL LEWVGDIINNGGTTYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDYYGSFHRRWYFDVWGQGLVTVSS |
| A2A - 59 | 598 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTDYNIDWVRQAPGKGL EWVGDININNGGTTYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYHGSSFYWYFDVWGQGLVTVSS |
| A2A – 60 | 599 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTEYITHWVRQAPGKGL EWWANINFDGSSTYILDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARYYDSSYAMDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 61 | 600 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSTYIMSWVRQATGQG LEWVGIIYPGDTDRYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGIAVAGTFDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 62 | 601 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTNYLIEWVRQAPGKGL EWVGDINPNNGGTYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVRHALLWYYYAMDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 63 | 602 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSDHYMTWVRQATGQG LEWVGWMNPNSGITGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARVSYSGSLHYWGQGLVTVSS |
| A2A – 64 | 603 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFDDYAMHWVRQATGQ GLEWVGVINNTGNPTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRS EDTAVYYCARSNWNFYDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 65 | 604 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSASFASWMNLVRQAPGKGL EWVGVDPDNGDTEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCSKPRDSGPFASWGQGLVTVSS |
| A2A – 66 | 605 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMYWVRQAPGKGL EWVGVWYIPKDGSTKYNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSRYYYGSSYGYDYWGQGLVTVSS |
| A2A – 67 | 606 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGHTITSYGINWVRQAPGKGL |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | EWVGEILPGSGTSDYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCATNWGFAYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 68 | 607 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFSGYTMHWVRQAPGKG LEWVGEIDPSDFANYNDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDYGSSYEFTYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 69 | 608 | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGGYISSN WWSWVRQATGQ GLEWMGRIKTKTDGGTIDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAKGYSGSV D YWGQGLTVTVSS |
| A2A - 70 | 609 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSNIKDYIHWVRQAPGKGL EWWATISDGGSYIFDDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDATGTFAYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 71 | 610 | QVQLQESGPGLVKPSGTL SLTCAVSGGSISSN WWSWVRQPPGRG LEWIGEIYHSGSTNYNPSLKS RVTISVDKPKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCAREVVSGMIGTVFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 72 | 611 | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTISTYDIYWVRQATGKGL EWWSAIGTAGDTYYPDSVRGRFTISR EDARNSLYLQMNSLRTGDT AVYYCATGYNWIFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 73 | 612 | QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTYDIYWVRQTTGKGL ELVSAIGTAGDTYYPDSVKGRFTISR ENARNSLYLQMNSLRAGDTA VYYCAVGYNWIFDFWGQGLTVTVSS |
| A2A - 74 | 613 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYDMYWVRQTTGKG LEWVSAIGTAGDTYYPDSVKGRFTISR ESAKNSLYLQMNSLRAGD TAVYYCTVGYNWIFDFWGHGTLTVTVSS |
| A2A - 75 | 614 | QVQLQESGPGLVKPSGTL SLTCAVSGGSISSN WWSWVRQPPGKG LEWIGEIYHSGNTNYNPSLKS RVTMSVDKSKNQFSLNLHSVTAADT AVYYCAREVVSGMIGTIFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 76 | 615 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMYWVRQPTGKGL EWWSAIGTAGDTYYPDSVKGRFTISR ESAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCAVGYNWIFDFWGQGLTVTVSS |
| A2A - 77 | 616 | QVQLQESGPGLVKPSGTL SLTCAVSGGSISSN WWSWVRQPPGKG LEWIGEIYHSGNTNYNPSLKS RVTMSVDKSKNQFSLNLHSVTAADT AVYYCAREVVSGMIGTIFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 78 | 617 | EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYDIYWVRQPTGKGLE WVSAIGTAGDTYYPGSVKGRFIISR ESAKNSVYLQMNSLRAGDTA VYYCAVGYNWVFDLWGQGLTVTVSS |
| A2A - 79 | 618 | QVQLQESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSSWVRQVPGKG LEWVSGITWNGDRSGYADSVKGRFTISR DN AKNSLYLQMNSLRAE DTALYYCVRDGLTGIFDYWGQGLTVTVSS |
| A2A - 80 | 619 | QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTISTYDIYWVRQATGKGL EWWSAIGTAGDTYYPGSVKGRFTISR ENAKNSLYLQMNSLRAGDT AVYYCASGYNWIFDYWGQGLTVTVSS |

| | | |
|----------|-----|--|
| A2A – 81 | 620 | QVQLQESGPGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGKG LEWIGEIYHSGSTNYNPSLKSRTISVDKSKNQFSLKLGSVTAADTA VYYCAREVVSGLYGTIFDYWGQGTTLTVSS |
| A2A – 82 | 621 | EVQLQQSGPGLVKPSQSLSTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKL EWMGYISYGGSNNDYNPSLKNRISITRDSSKNQFFLKLNSVTTEDTA TYYCARDYDYFDYWGQGTTLTVSS |
| A2A – 83 | 622 | EVQRVQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGKG LEWIGQIYPGDGDTNYNGKFEGKATLTADKSSSTAYMQLTSLTSD DSAVYYCARGAYWGQGTTLTVSS |
| A2A – 84 | 623 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGYTFTEYITHWVRQAPGKGL EWWATISGGGSYTNFPDSVKGRFTISRDNANTLFLQMTSLRSED TAMYYCARPNYSGSSPFAYWGQGTTLTVSA |
| A2A - 85 | 624 | EVQLQQSGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTAYAISWVRQPPGKGLE WLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTD DRTA RYYCARSRGYGGSSYGYFDVWGTGTTVTVSS |
| A2A – 86 | 625 | EVQLQESGPGLAQPSQTLPLTCSVIGYSITSDYWNWIRKFPNGKLE YMGYINYSGSTYINPSLKSRTISITRDTSKNQYYLQNSVTTED TAT YYCTRKLDWDGYFDVWGTGTTVTVSS |
| A2A – 87 | 626 | EVQLQQSEAEVLRPGAPVKLSCTASGFNIKNTYMHWVKQRPEQGL EWIGRIDPANGNTKYAPKFQGKATITADTSSNTAYLQSSLASE DS AVYFCARGSPYGYDGHYVMDYWGQGTSVTVSS |
| A2A – 88 | 627 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRTYGMHWVRQAPGKG LEWVAVISAEGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGRGSLRPRKGGFIGALSFHWPFGRWLGGSYGTYDS SEDSGGAFDIWGQGTTLTVSS |
| A2A – 89 | 628 | QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFNNGMHWVRQAPGKG LEWVAVISYGGSDKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDGRGSLRPRKGGFIGDLSFHWPFGRWLGKSYGTYDS SEDSGGAFDIWGQGTTLTVSS |

Таблица 18. Варибельная легкая цепь

| Вариант | SEQ ID NO | Последовательность |
|-------------|-----------|---|
| A2AR | | |
| A2A - 1 | 629 | ELVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPG QSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQGTHTWPRTFGQGTKVDIK |
| A2A - 2 | 630 | ELTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGAAI FIIQEATTLVPGIPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLQHDN FPMYTFGQGTKLEIK |
| A2A – 3 | 631 | ELVLTQSPDSLAVSLGERATFNCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | YCQQYYSTPYTFGQGTKVDIK |
| A2A – 4 | 632 | ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSS TPLTFGGGKVEIK |
| A2A – 5 | 633 | ELTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDIDDDMNWYQQKPGEAAI FIIQEATTLVPGIPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLQHDN FPWTFGQGTKVDTK |
| A2A – 6 | 634 | ELQMTQSPSSVSASVGDKVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKGP LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFPTISSLQPEDFATYYCQQTNS FPRTLGGQTKLEIK |
| A2A – 7 | 635 | ELTLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQDVDDDMNWYQQKPGEAAI FIIQEATTLVPGIPRFSGSGYGTDFLTINNIESEDAAYYFCLQHDN FPWTFGQGTRLEIK |
| A2A – 8 | 636 | DIVMTQAQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFLTVTNVQSEDLAEYFCQR FNNYPLTFGAGTKLEIK |
| A2A – 9 | 637 | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSATCKASQNVGSSVAWFQKPGQSPK ALIYSTSYRYSVGPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQYN SYPLTFGAGTKLEIK |
| A2A – 10 | 638 | DIVMTQAPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDYLHWYQQKSHEPRL LIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFLTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSF PLTFGAGTKLEIK |
| A2A – 11 | 639 | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASRNVGTNVAWYQQKLGQSP KTLIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQY NSYPLTFGAGTKLEIK |
| A2A – 12 | 640 | DIQMTQTPATLSVTPGDRVSLSCRASQISDYLHWYQQKSHEPRL LIKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFLTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSF PHTLGSQTKLEIK |
| A2A - 13 | 641 | DIQMIQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFLTIGNVQSEDLVEYFCQQ YNIYPLTFGAGTKLELK |
| A2A - 14 | 642 | DIVMTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQISNYLHWYQQKSHEPRL IKYASQSIGIPSRFSGSGSGSDFLTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFP LTFGGGKLELK |
| A2A - 15 | 643 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIGRYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYVT PWTFGGGKLEIK |
| A2A - 16 | 644 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIGTYLNWYQQKPGKAPKL LIYGASTLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQSYSA PWTFGGGKVEIK |
| A2A - 17 | 645 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVRNDVVWYQQKPGKAPK |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | LLIYRGNTLRPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYY GIPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 18 | 646 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVTTYLNWYQQKPGKAPKL LIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQTYAT PWTFGGGTKVEIK |
| A2A - 19 | 647 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDYLNWYQQKPGKAPKL LIYASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCEQSYST PWTFGGGTKLEIK |
| A2A - 20 | 648 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASHVDYDGDNYMNWYQQKPG KAPKLLIYWASTRLTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC LQHIEYPFTFGQGTKLEIK |
| A2A - 21 | 649 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSVLYSSNNKNYFAWYQQP GKAPKLLIYDAPNRATGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQGYTTPYTFGGGTKVEIK |
| A2A - 22 | 650 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGRSLSWYQQKPGKAPKL LIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQWSNSW PYTFGQGTKLEIK |
| A2A - 23 | 651 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYVT PWTFGGGTKLEIK |
| A2A - 24 | 652 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRNDVVWYQQKPGKAPK LLIYRGNTLRPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYY GIPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 25 | 653 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPG KAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QNGHSFPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 26 | 654 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISR YLNWYQQKPGKAPKL LIYASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PHTFGGGTKVEIK |
| A2A - 27 | 655 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGSYLNWYQQKPGKAPKL LIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYS APRTFGGGTKLEIK |
| A2A - 28 | 656 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLPSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP RTFGGGTKLEIK |
| A2A - 29 | 657 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKVSQDVRTAVAWYQQKPGKAPK LLIYDTSYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS WSLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 30 | 658 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGGGNDIGSSMYWYQQKPGKAPK LLIYWMSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYS TYPFALGQGTKLEIK |

| | | |
|----------|-----|---|
| A2A - 31 | 659 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDYLNWYQQKPGKAPKL LIYGASPRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNIW PYTFGQGTKLEIK |
| A2A - 32 | 660 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGGGNDIGSSMYWYQQKPGKAPK LLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNE DPPFTFGQGTKLEIK |
| A2A - 33 | 661 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVD SFGNNFMN WYQQKPG KAPKLLIYHTSRLNSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QNNEVPRTFGQGTKLEIK |
| A2A - 34 | 662 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSVTYIHWYQQKPGKAPKLLI YAVSRLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQSNEDP YTFGQGTKLEIK |
| A2A - 35 | 663 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGRYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYVT PWTFGGGKVEIK |
| A2A - 36 | 664 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRNDVVWYQQKPGKAPK LLIYRGNTLRPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYY GIPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 37 | 665 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASHVDYDGDNYMNWYQQKPG KAPKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL RYASYRTFGQGTKLEIK |
| A2A - 38 | 666 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVNSYGN SFMHWYQQKPG KAPKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCL QYGESPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 39 | 667 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSKLLHSSGNAYVYWYQQKPG KAPKLLIYYTSKPN SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ HHYGIPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 40 | 668 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGTYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLES GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYNT PWTFGGGKVEIK |
| A2A - 41 | 669 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSRVSSSYLYWYQQKPGKAPK LLIYATYSLDYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHG ERPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 42 | 670 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASQSIGTIIHWYQQKPGKAPKLLI YDTSYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTRP WTFGQGTKLEIK |
| A2A - 43 | 671 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYVPLNWYQQKPGKAPKL LIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSF PLYTFGQGTKLEIK |
| A2A - 44 | 672 | ELVLTQSPGTL SLPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS |

| | | |
|----------|-----|---|
| | | SPITFGQGTKVDIK |
| A2A - 45 | 673 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSGEKTYPYWYQQKPG KAPKLLIWASTRLTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSNEDSWTFGQGKLEIK |
| A2A - 46 | 674 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQDIFNYLEWYQQKPGKAPKL LIYTASNLD TGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYS TPPEITFGGGTKVEIK |
| A2A - 47 | 675 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTRNILSNMPWYQQKPGKAPKL LIYNANTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWN YPYMFQGQTKLEIK |
| A2A - 48 | 676 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNNLHWYQQKPGKAPKL LIYEISGWLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNSW SLLTFGQGKLEIK |
| A2A - 49 | 677 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQSMSNNLHWYQQKPGKAPKL LIYLASN LGYGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCRQNGH SFPLTFGQGKLEIK |
| A2A - 50 | 678 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNNLHWYQQKPGKAPKL LIYWASTRLTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSD YPFTFGQGKLEIK |
| A2A - 51 | 679 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSLSYMHWYQQKPGKAPKLL IYGASPRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCRQMSSYP PTFGQGKLEIK |
| A2A - 52 | 680 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLL IYEISGWLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLRYASYR TFGQGKLEIK |
| A2A - 53 | 681 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNMGSNVAWYQQKPGKAPK LLIYSASHRSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWN YPRITFGQGKLEIK |
| A2A - 54 | 682 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNGGTNVDWYQQKPGKAPK LLIYEISGWLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYY WPPTFGQGKLEIK |
| A2A - 55 | 683 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYVPLNHWYQQKPGKAPKL LIYLASYRFTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQING WPYTFGQGKLEIK |
| A2A - 56 | 684 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNMGSNVAWYQQKPGKAPK LLIYAATRLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCRQHY SSPPTFGQGKLEIK |
| A2A - 57 | 685 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNGGTNVDWYQQKPGKAPK LLIYVASNQGTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYY TYPLTFGQGKLEIK |
| A2A - 58 | 686 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQGVDTNVAWYQQKPGKAPK |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | LLIYSSSISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQNRELPF TFGQGTKLEIK |
| A2A - 59 | 687 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAITWYQQKPGKAPKL LIYSASKRNTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLHHYG TPYTFGQGTKLEIK |
| A2A - 60 | 688 | DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPK LLIYPASYRSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOGSS NPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 61 | 689 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIDDDINWYQQKPGKAPKL LIYLGSNRAPGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQSYTT PHTFGGGTKVEIK |
| A2A - 62 | 690 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQEISGYLTWYQQKPGKAPKL LIYSASHRSSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWDN NPYTFGQGTKLEIK |
| A2A - 63 | 691 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKL LIYKASSLERGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQPNSY PWTFGGGTKVEIK |
| A2A - 64 | 692 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLDWYQQKPGKAPKL LIYTPFSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYDDL PLTFGGGTKVEIK |
| A2A - 65 | 693 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNMGSNVAWYQQKPGKAPK LLIYEASTRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSS YPLRFGQGTKLEIK |
| A2A - 66 | 694 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGILGYLNWYQQKPGKAPKL LIYSTSNLLLGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCRQLSSN PLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 67 | 695 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMSWYQQKPGK APKLLIYDASRFISGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOI NSWPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 68 | 696 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSQSLLYSGEKTYPYWYQQKPG KAPKLLIYEASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQWSSYPPIAFGQGTKLEIK |
| A2A - 69 | 697 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGLRHDLGWYQQKPGKAPK LLIYWASNRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKYS STPYTFGGGTKVEIK |
| A2A - 70 | 698 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASESVSVAGTSLHWYQQKPGK APKLLIYAASNRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ HWSSFPLTFGQGTKLEIK |
| A2A - 71 | 699 | ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSQGISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYST PLTFGGGTKVEIK |

| | | |
|----------|-----|--|
| A2A - 72 | 700 | ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PPTFGQGTRLEIK |
| A2A - 73 | 701 | ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PLTFGPGTKVDIK |
| A2A - 74 | 702 | ELVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLAEDVAVYYCQQYY STPLTFGGGTKVEIK |
| A2A - 75 | 703 | ELVMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSF PITFGQGTRLEIK |
| A2A - 76 | 704 | ELVMTQSPATLSVSLGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPLTFGGGTKVEIK |
| A2A - 77 | 705 | ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQRISYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSRVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGGGTKLETK |
| A2A - 78 | 706 | ELTLTQSPATLSLSPGERATLSCRAIQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS PLTFGGGTRLEIK |
| A2A - 79 | 707 | ELTLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGN SYTFGQGTKVDIK |
| A2A - 80 | 708 | ELTLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRATGTPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYGS SPPTFGQGTRLEIK |
| A2A - 81 | 709 | ELVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYST PITFGGGTKLEIK |
| A2A - 82 | 710 | DIVITQAPKFLVVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKL LIYYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFITVQAEDLAVYFCQQDY RSPLTFGAGTKLELK |
| A2A - 83 | 711 | DIQMKQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSGDLAEYFCQQ YNSYPLTFGAGTKLEIK |
| A2A - 84 | 712 | DIVMTQAPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMYWYQQKPGSSPRF LIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEATAATYYCQQWN SNPLTFAGTKLEIK |
| A2A - 85 | 713 | DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISSYLNWYQQKSHESPRL LIKYASQISGIPSRFSGSGSGTDFTLTISNSVEPEDVGVYYCQNGHSF |

| | | |
|----------|-----|--|
| | | PLTFGAGTKLELK |
| A2A - 86 | 714 | DIKITQSPSSLSASLGDTITITCHASQNINVWLNRYQQKPGNIPKLLI YKASNLHTGVPSRFSGSGSGTGFTLTISLQPEDATYYCQQGQSYP LTFGAGTKLEIK |
| A2A - 87 | 715 | DIQMNQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGSNVAWYQQKPGQSP KALIYSASYRYSGVDPDRFTGSGSGTDFTPTISNVQSEDLAEYFCQQY NSYPLTFGAGTKLELK |
| A2A - 88 | 716 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGISSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRASGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWD TSLSAGVFGGGTKLTVL |
| A2A - 89 | 717 | QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSNIGNHYVSWYQQLPGTAPK LLIYDNTKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTW DASLSTWVFGGGTKLTVL |

[00311] Несмотря на то, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и раскрыты в настоящем документе, специалистам в данной области техники очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в данной области техники очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отклонения от настоящего раскрытия. Следует понимать, что различные альтернативы вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытых в настоящем изобретении, могут применяться при практическом осуществлении настоящего раскрытия. Предполагается, что следующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения и их эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Библиотека нуклеиновых кислот, содержащая множество нуклеиновых кислот, где каждая из нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует иммуноглобулин, связывающийся с рецептором аденозина A2A, где иммуноглобулин, связывающийся с рецептором аденозина A2A, содержит вариант домена связывания рецептора аденозина A2A, где домен связывания рецептора аденозина A2A представляет собой лиганд рецептора аденозина A2A, и где библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 10000 вариантных легких цепей иммуноглобулина.

2. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 50000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 50000 вариантных легких цепей иммуноглобулина.

3. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 100000 вариантных тяжелых цепей иммуноглобулина и по меньшей мере 100000 вариантных легких цепей иммуноглобулина.

4. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот.

5. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем длина тяжелой цепи иммуноглобулина при трансляции составляет от около 90 до около 100 аминокислот.

6. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем длина тяжелой цепи иммуноглобулина при трансляции составляет от около 100 до около 400 аминокислот.

7. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем вариантная тяжелая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628.

8. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем вариантная легкая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717.

9. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем вариантная тяжелая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит любую из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628.

10. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 1, причем вариантная легкая цепь иммуноглобулина при трансляции содержит любую из последовательностей согласно SEQ ID NO: 629-717.

11. Библиотека нуклеиновых кислот, содержащая множество нуклеиновых кислот, где каждая нуклеиновая кислота множества нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует антитело или его фрагмент антитела, где антитело или его фрагмент антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит домен связывания рецептора аденозина A2A, где каждая нуклеиновая кислота множества нуклеиновых кислот содержит последовательность, кодирующую вариант последовательности домена связывания рецептора аденозина A2A, и где антитело или фрагмент антитела связываются с его антигеном с K_D менее 100 нМ.

12. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 11, причем длина VH составляет от около 90 до около 100 аминокислот.

13. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 11, причем длина VH составляет от около 100 до около 400 аминокислот.

14. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 11, причем длина VH составляет от около 270 до около 300 пар оснований.

15. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 11, причем длина VH составляет от около 300 до около 1200 пар оснований.

16. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 11, причем библиотека содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот.

17. Библиотека нуклеиновых кислот, содержащая множество нуклеиновых кислот, где каждая из нуклеиновых кислот кодирует последовательность, которая при трансляции кодирует однодоменное антитело против рецептора аденозина A2A, где каждая последовательность множества последовательностей содержит вариантную последовательность, кодирующую CDR1, CDR2 или CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH), где библиотека содержит по меньшей мере 30000 вариантных последовательностей, и где однодоменное антитело против рецептора аденозина A2A связывается с его антигеном с K_D менее 100 нМ.

18. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем длина VH при трансляции составляет от около 90 до около 100 аминокислот.

19. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем длина VH при трансляции составляет от около 100 до около 400 аминокислот.

20. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем длина VH составляет от около 270 до около 300 пар оснований.

21. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем длина VH составляет от около 300 до около 1200 пар оснований.

22. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем библиотека вариантов содержит вариантную последовательность, кодирующую CDR1, CDR2 и CDR3.

23. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем VH при трансляции содержит последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную любой из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628.

24. Библиотека нуклеиновых кислот по п. 17, причем VH при трансляции содержит любую из последовательностей согласно SEQ ID NO: 540-628.

25. Антитело или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A, содержащие тяжелую цепь иммуноглобулина и легкую цепь иммуноглобулина:

а. где тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 540-628, и

б. где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 629-717.

26. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 95% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 540-628, и где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 95% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 629-717.

27. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем тяжелая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 540-628, и где легкая цепь иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 629-717.

28. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечный Fvs (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент, состоящий только из одного мономерного переменного домена, дисульфид-связанный Fvs (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или их антигенсвязывающие фрагменты антитела

29. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем антитело или его фрагмент антитела является химерным или гуманизированным.

30. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем антитело имеет EC₅₀ менее около 25 нанолярную согласно анализу сAMP.

31. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем антитело имеет EC₅₀ менее около 20 нанолярную согласно анализу сAMP.

32. Антитело или фрагмент антитела по п. 25, причем антитело имеет EC₅₀ менее около 10 нанолярную согласно анализу сAMP.

33. Антитело или фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела содержит определяющую комплементарность область (CDR), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 6-539.

34. Антитело или фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела содержит определяющую комплементарность область переменной тяжелой цепи (CDRH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 6-272.

35. Антитело или фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела содержит определяющую комплементарность область переменной легкой цепи (CDRH), содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере около 90% идентичную последовательности согласно любому из SEQ ID NO: 273-539.

36. Антитело или фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела содержит последовательность согласно любому из SEQ ID NO: 6-539, и где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, привитое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, синтетическое антитело, химерное антитело, верблюжье антитело, одноцепочечный Fvs (scFv), одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fd, фрагмент Fv, однодоменное антитело, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), диатело, фрагмент, состоящий только из одного мономерного переменного домена, дисульфид-связанный Fvs (sdFv), интратело, антиидиотипическое (анти-Id) антитело или их антигенсвязывающие фрагменты антитела

37. Способ лечения рака, включающий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 25-36.

38. Способ лечения неврологического заболевания или нарушения, включающий введение антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 25-36.

39. Способ получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A_{2A} или его фрагмент антитела, включающий:

(a) предоставление предварительно определенных последовательностей, кодирующих:

i. первое множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид первого множества полинуклеотидов кодирует по меньшей мере 1000 вариантных последовательностей, кодирующих CDR1 тяжелой цепи,

ii. второе множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид второго множества полинуклеотидов кодирует по меньшей мере 1000 вариантных последовательностей, кодирующих CDR2 тяжелой цепи,

iii. третье множество полинуклеотидов, где каждый полинуклеотид третьего множества полинуклеотидов кодирует по меньшей мере 1000 вариантных последовательностей, кодирующих CDR3 тяжелой цепи, и

(b) смешивание первого множества полинуклеотидов, второго множества полинуклеотидов и третьего множества полинуклеотидов с образованием библиотеки нуклеиновых кислот вариантных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела, и где по меньшей мере около 70% вариантных нуклеиновых кислот кодируют антитело или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 100 нМ.

40. Способ по п. 39, в котором антитело против рецептора аденозина A2A или его фрагмент антитела представляет собой однодоменное антитело.

41. Способ по п. 40, в котором однодоменное антитело содержит один варибельный домен тяжелой цепи.

42. Способ по п. 40, в котором однодоменное антитело представляет собой антитело VHH.

43. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 50000 вариантных последовательностей.

44. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 100000 вариантных последовательностей.

45. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 10^5 неидентичных нуклеиновых кислот.

46. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 75 нМ.

47. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 50 нМ.

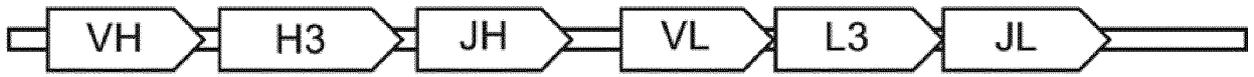
48. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере одну последовательность, кодирующую антитело против рецептора аденозина A2A или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 10 нМ.

49. Способ по п. 48, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере 500 вариантных последовательностей.

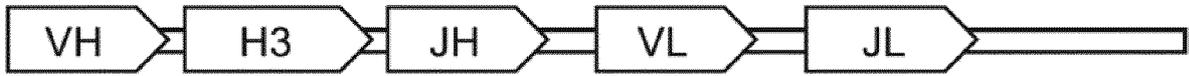
50. Способ по п. 39, в котором библиотека нуклеиновых кислот содержит по меньшей мере пять последовательностей, кодирующих антитело или фрагмент антитела, которые связываются с рецептором аденозина A2A с K_D менее 75 нМ.

51. Библиотека белков, кодируемых библиотекой нуклеиновых кислот по любому из пп. 1-24, причем библиотека белков содержит пептиды.

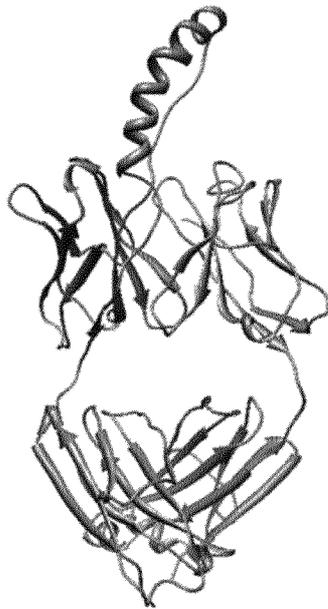
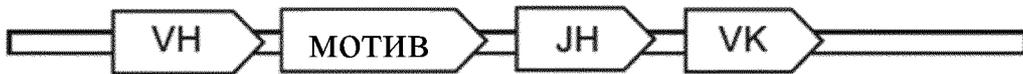
52. Библиотека белков по п. 51, причем библиотека белков содержит иммуноглобулины.
53. Библиотека белков по п. 51, причем библиотека белков содержит антитела.
54. Библиотека белков по п. 51, причем библиотека белков представляет собой библиотеку пептидомиметиков.
55. Библиотека векторов, содержащая библиотеку нуклеиновых кислот по любому из пп. 1-24.
56. Библиотека клеток, содержащая библиотеку нуклеиновых кислот по любому из пп. 1-24.
57. Библиотека клеток, содержащая библиотеку белков по любому из пп. 51-54.



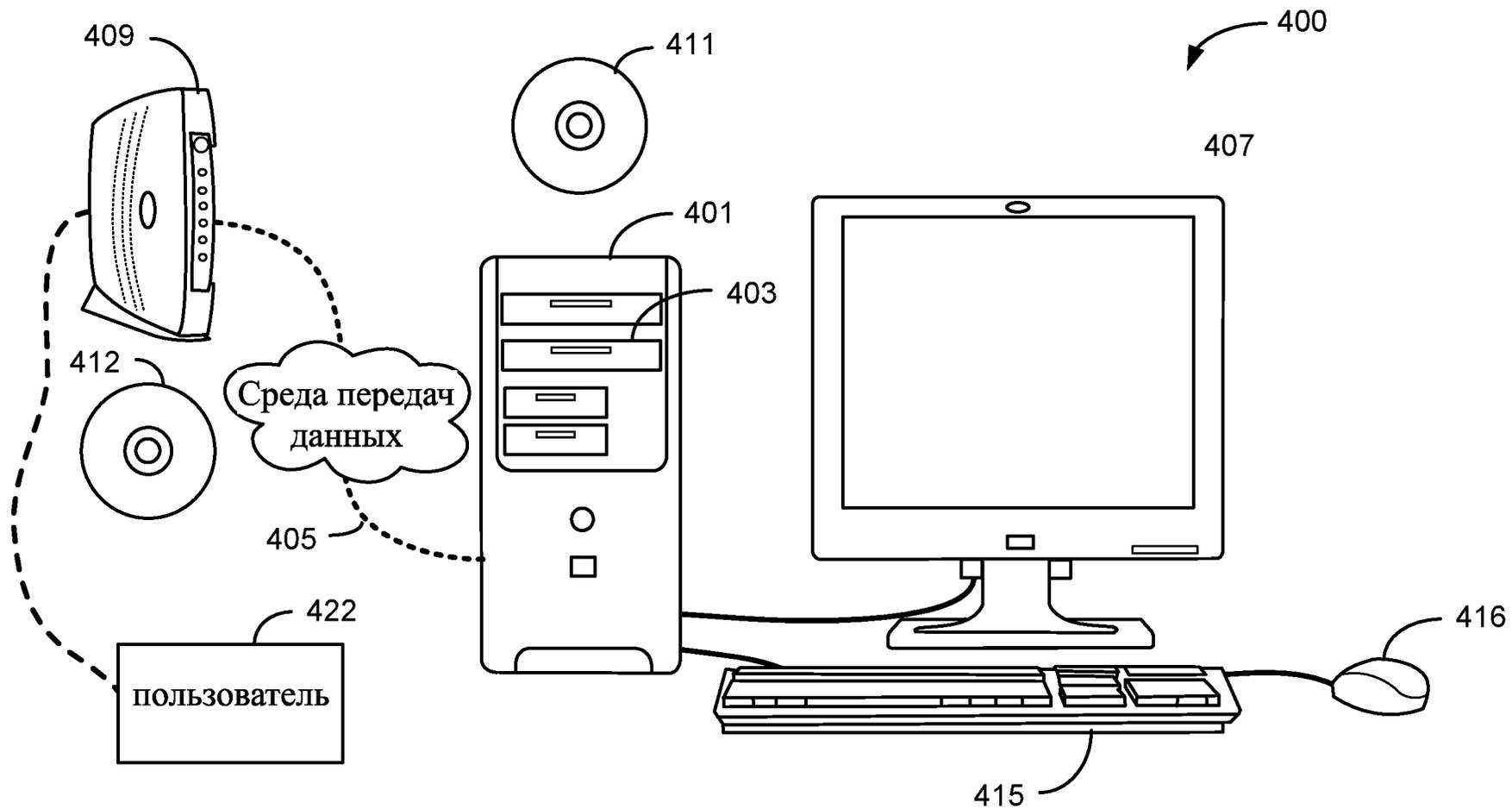
Фиг. 1А



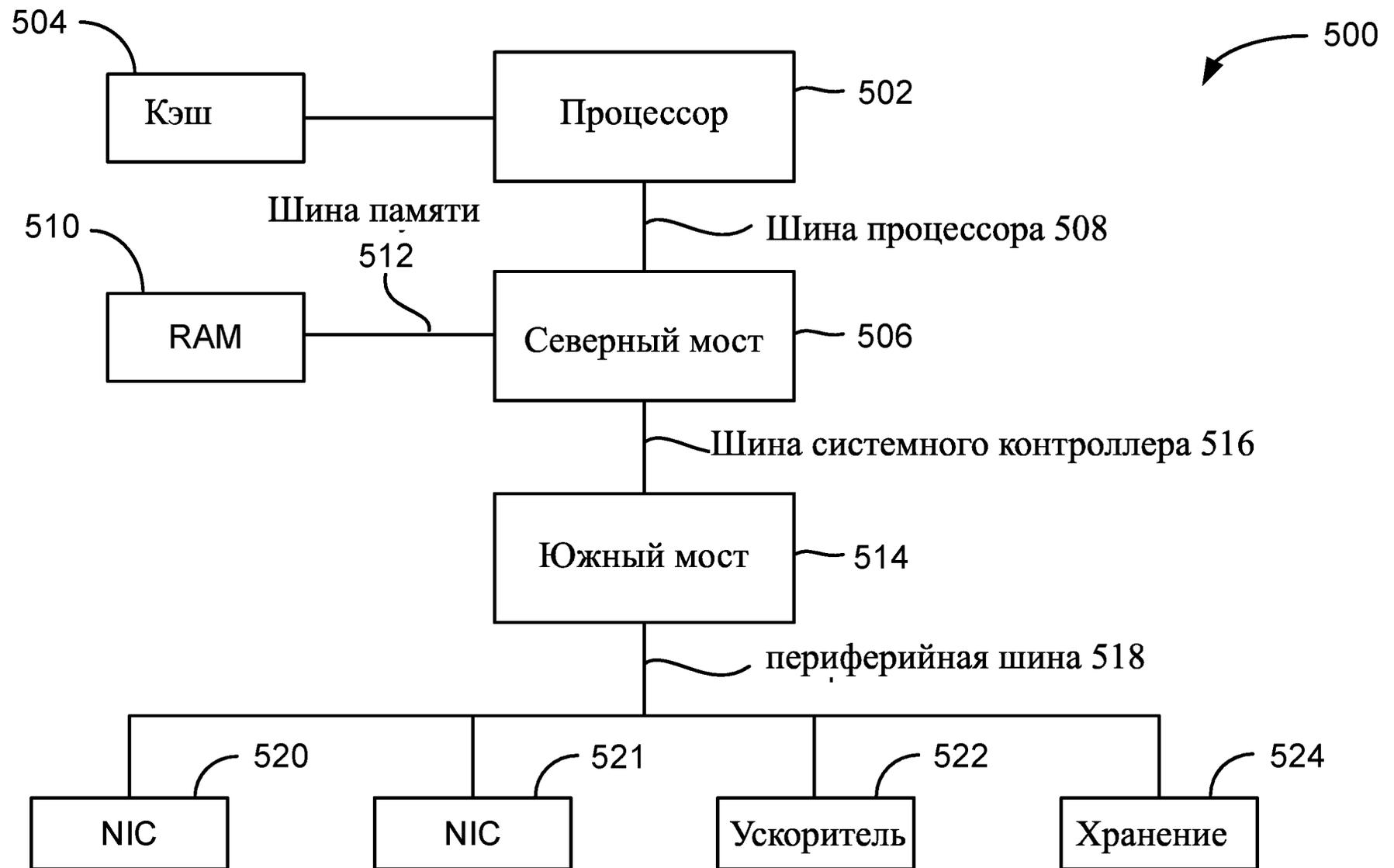
Фиг. 1В



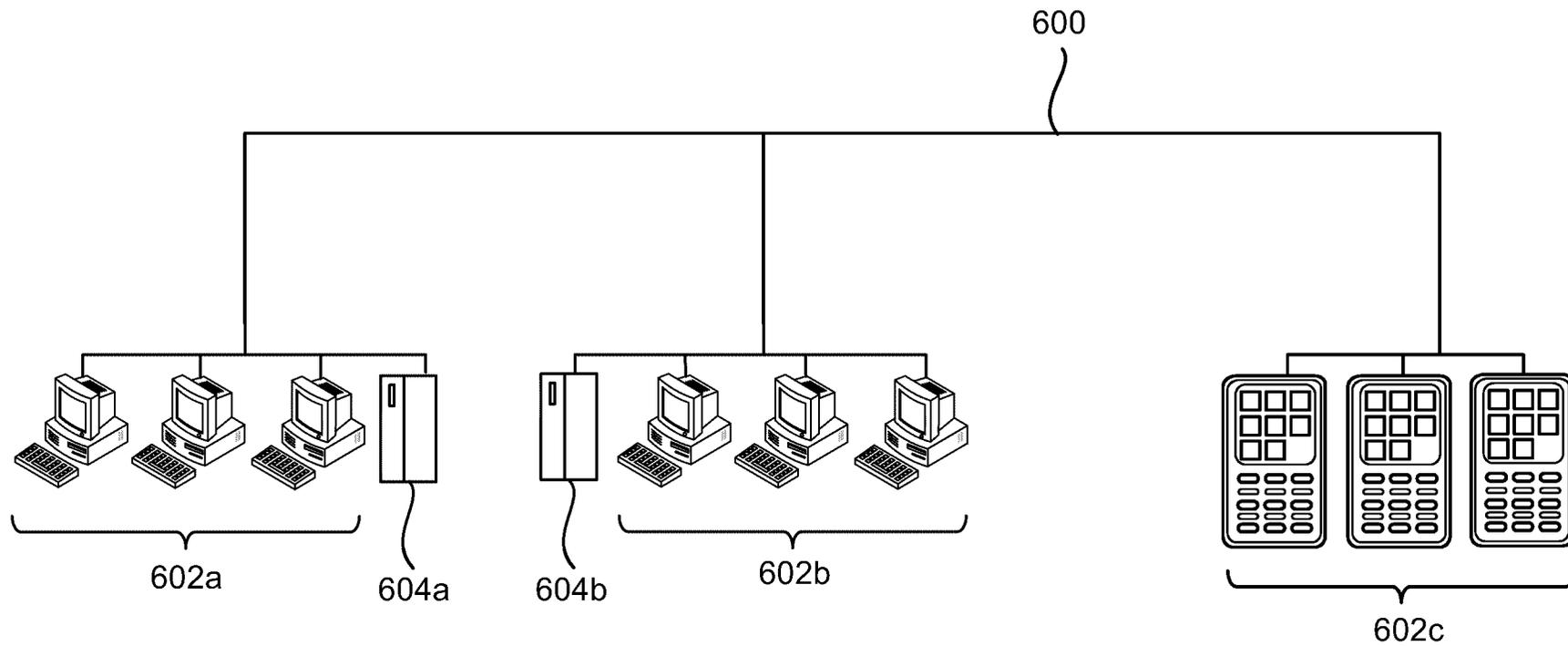
Фиг. 2



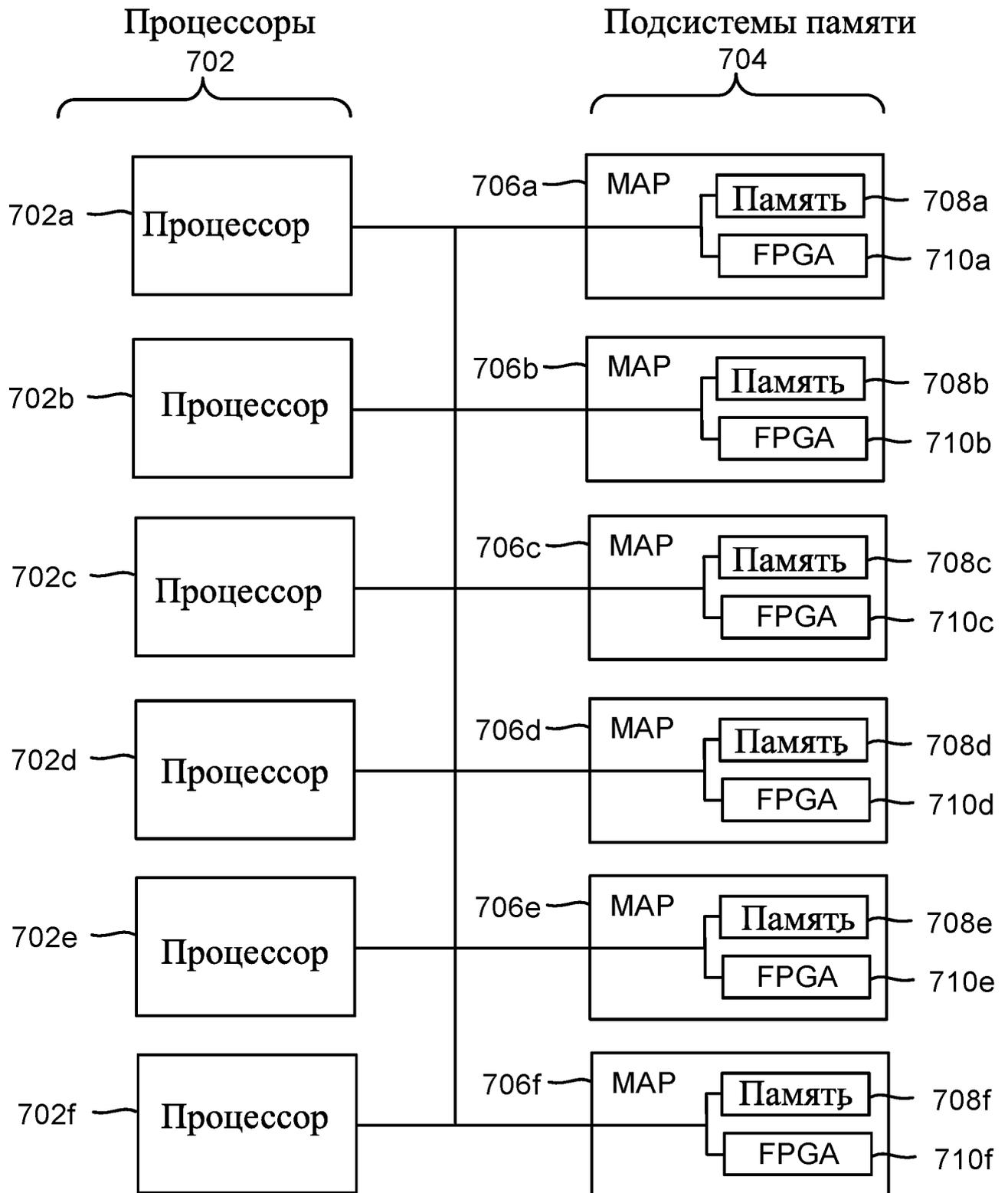
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



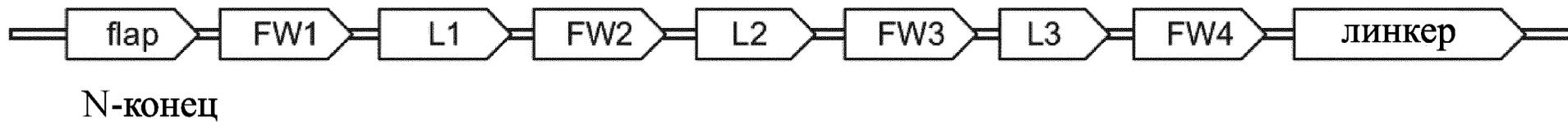
Фиг. 7



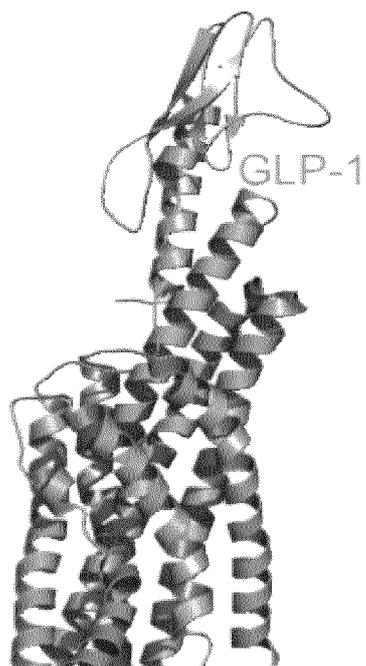
Фиг. 8А



Фиг. 8В

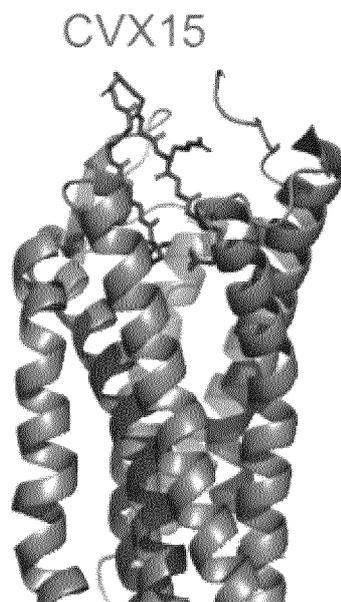


Фиг. 8С



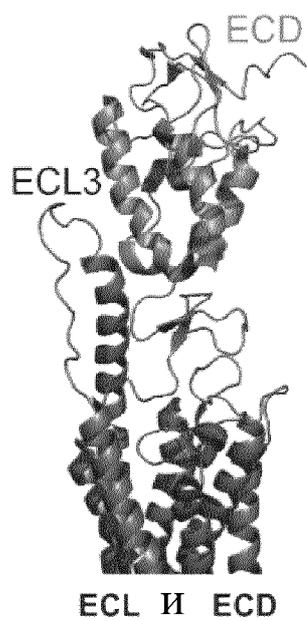
Спиральный пептид

Фиг. 9А



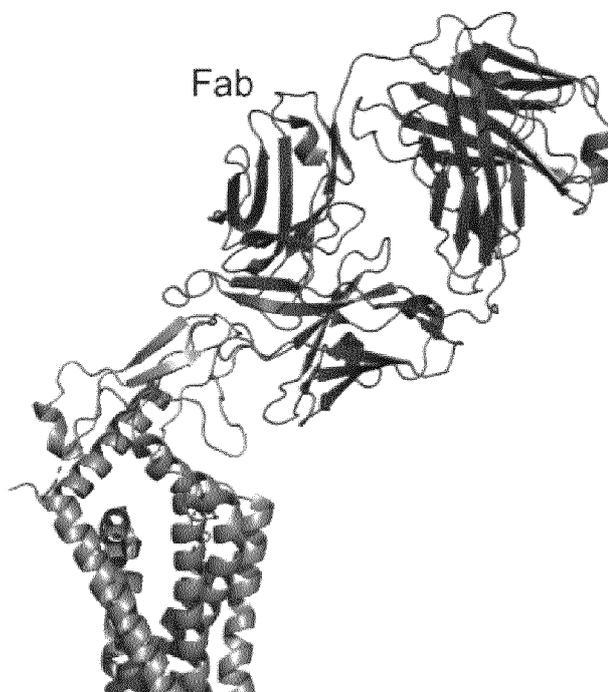
Петлевой пептид

Фиг. 9В



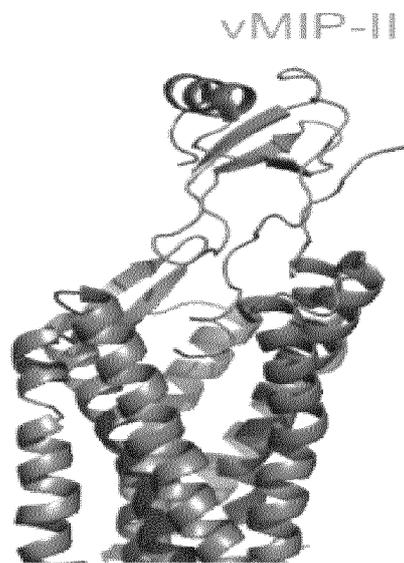
ECL и ECD

Фиг. 9С



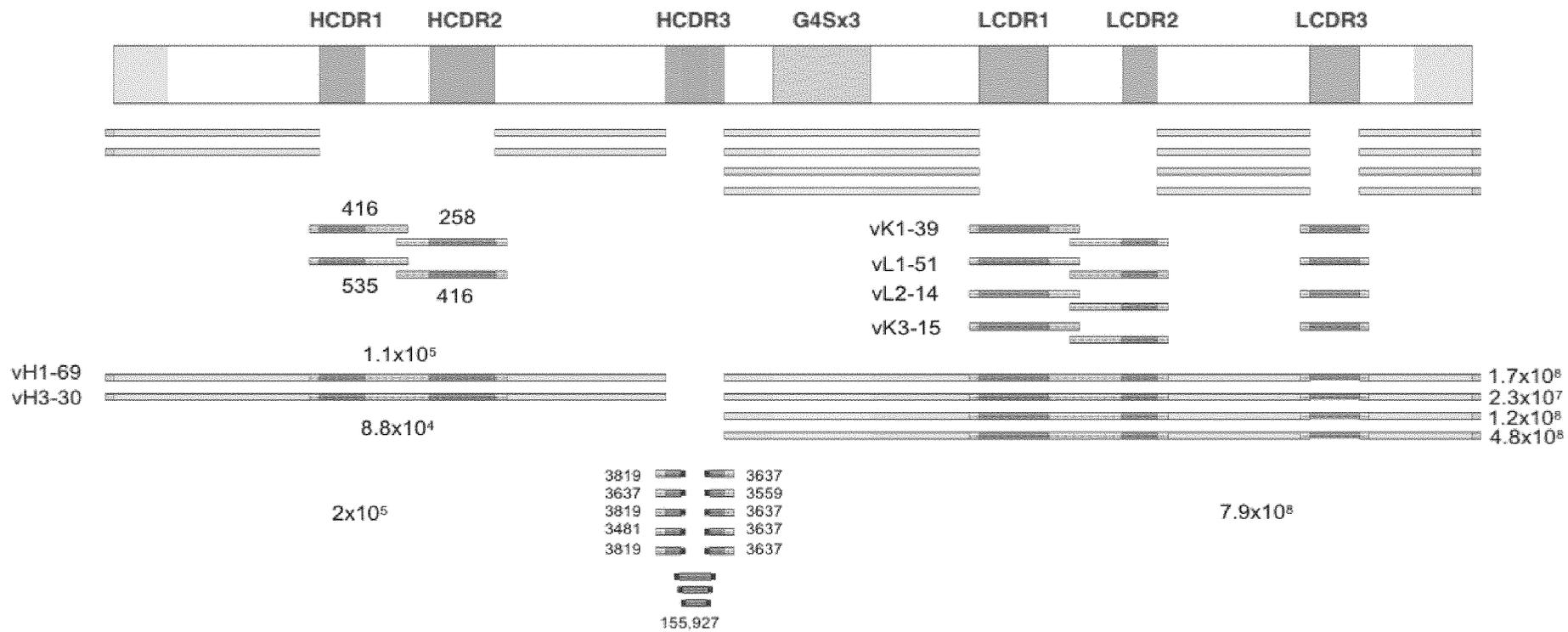
Анти-GPCR-антитело

Фиг. 9D



хемокин

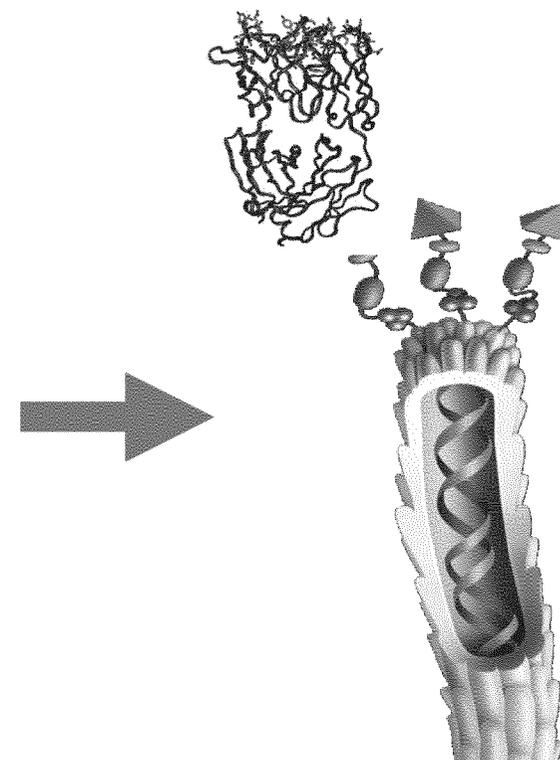
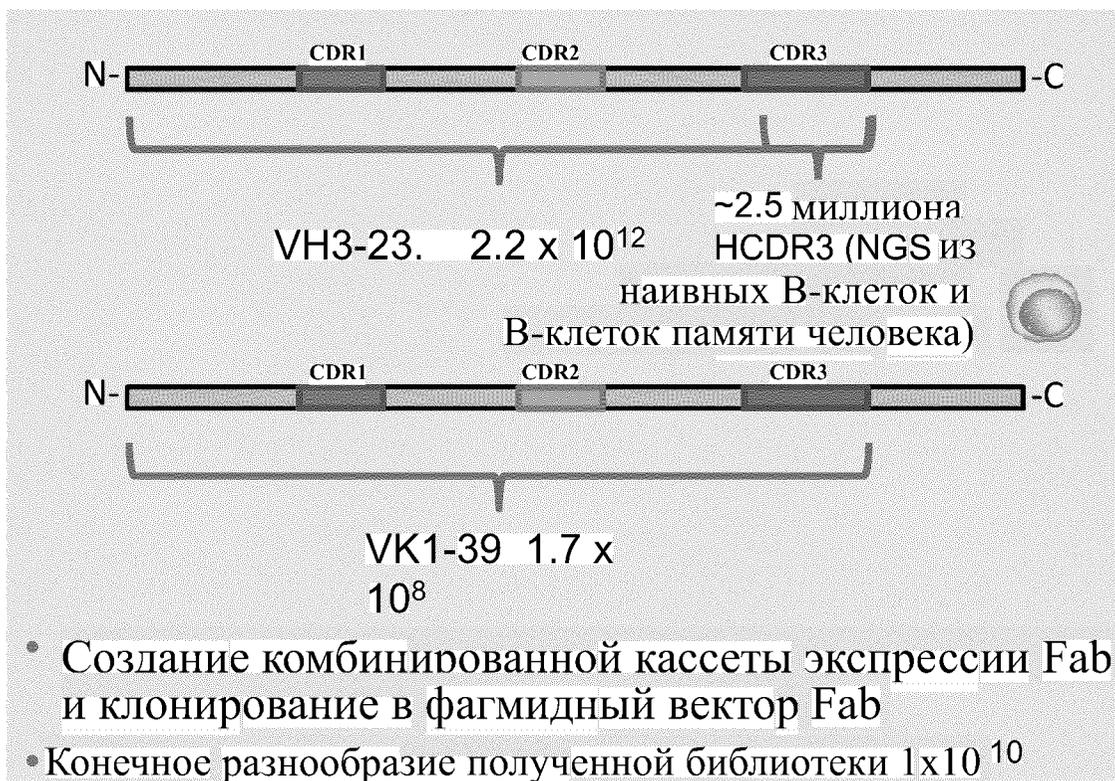
Фиг. 9Е



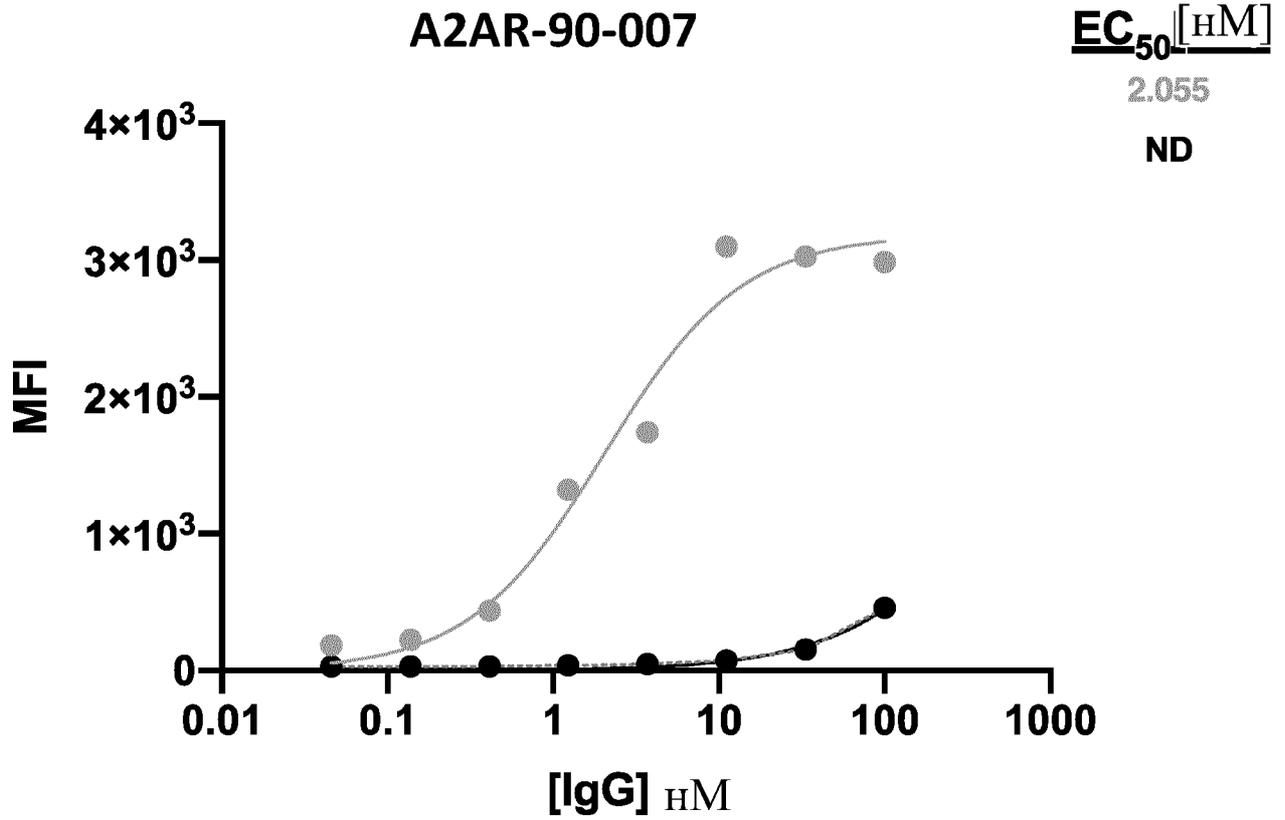
Фиг. 10

| Клон | ELISA | Библиотека | ProA (МГ/МЛ) | K _D (НМ) |
|---------|-------|--------------|-----------------|---------------------|
| 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 | 12.3 | 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 Shuffle | 0.21 | 99 |
| TB31-18 | 4.1 | VHH hShuffle | 0.36 | 99 |
| TB30-5 | 9.3 | VHH Shuffle | 0.05 | 100 |

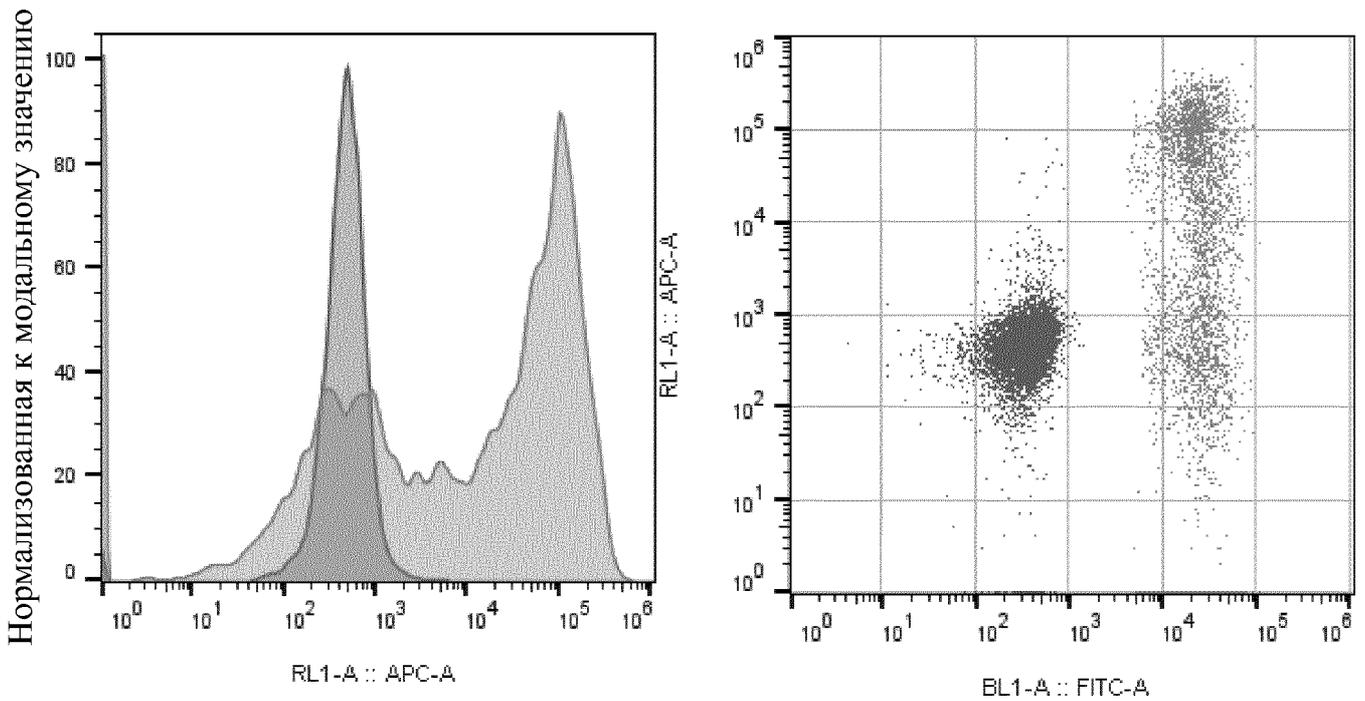
Фиг. 12



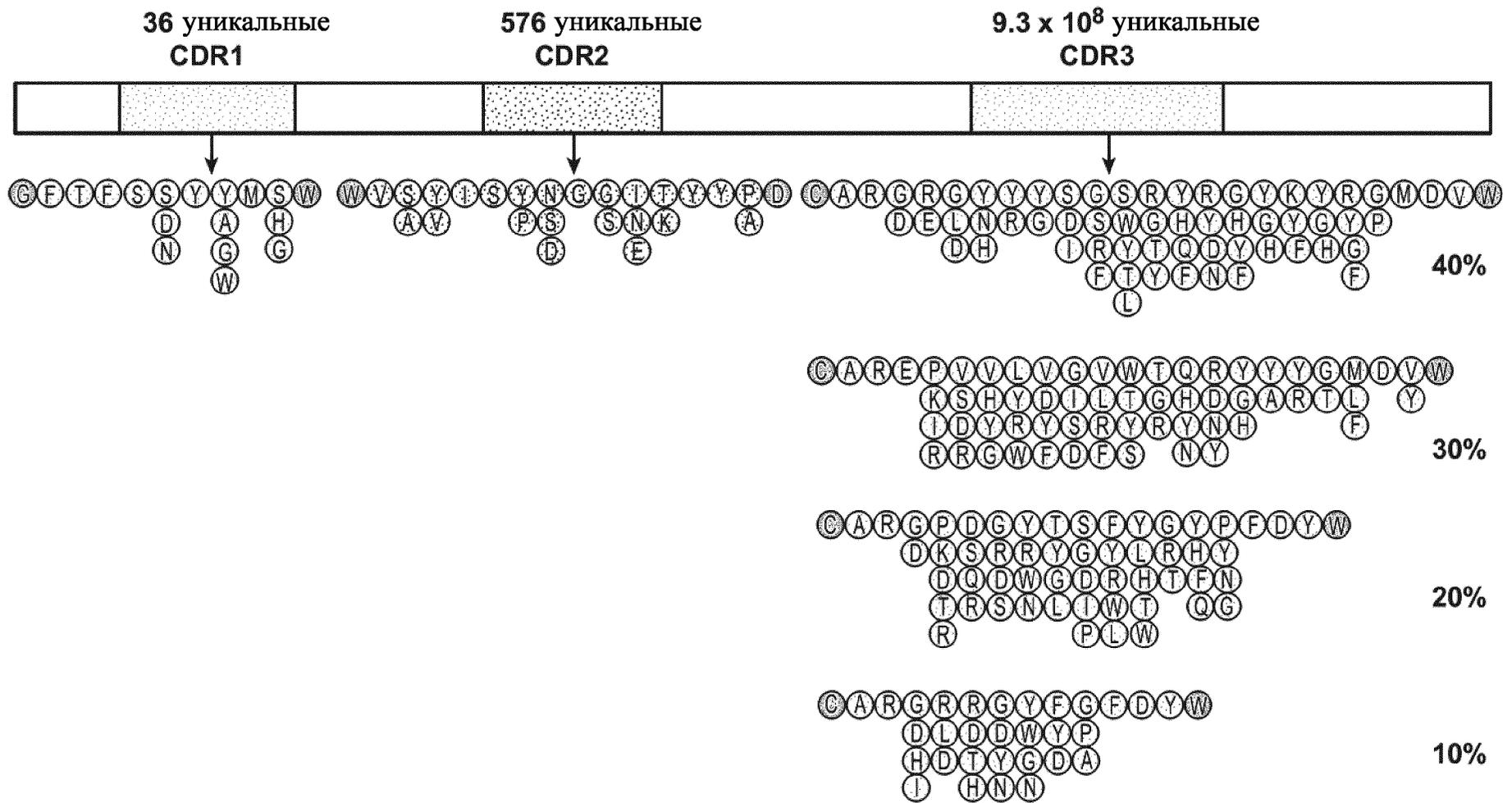
Фиг. 13



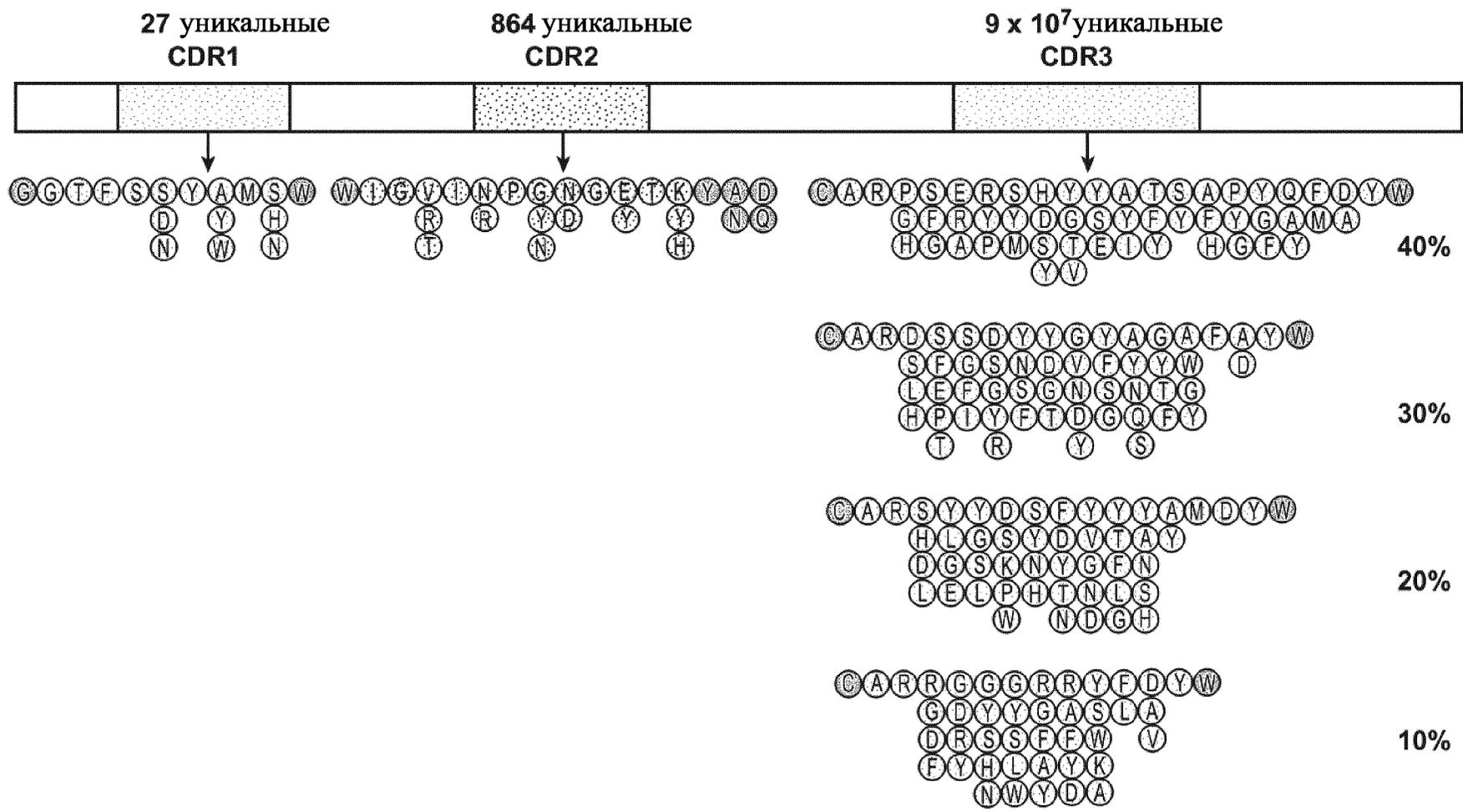
Фиг. 14А



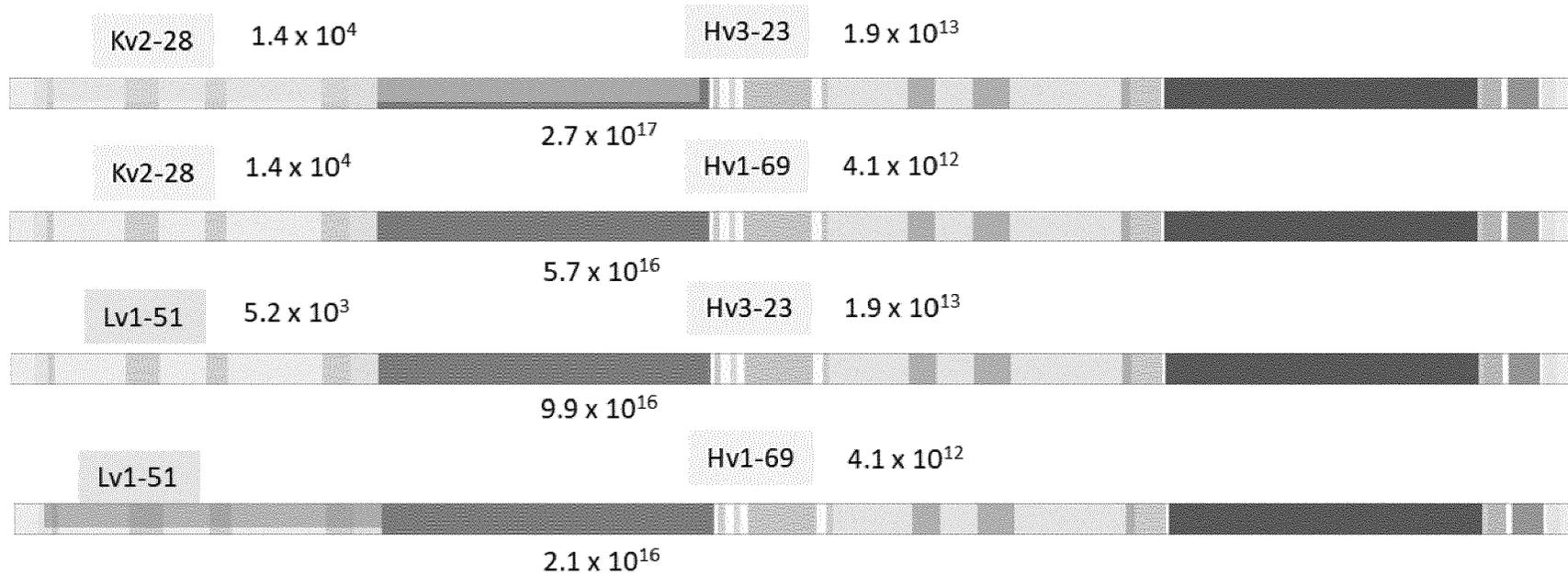
Фиг. 14В



Фиг. 15А



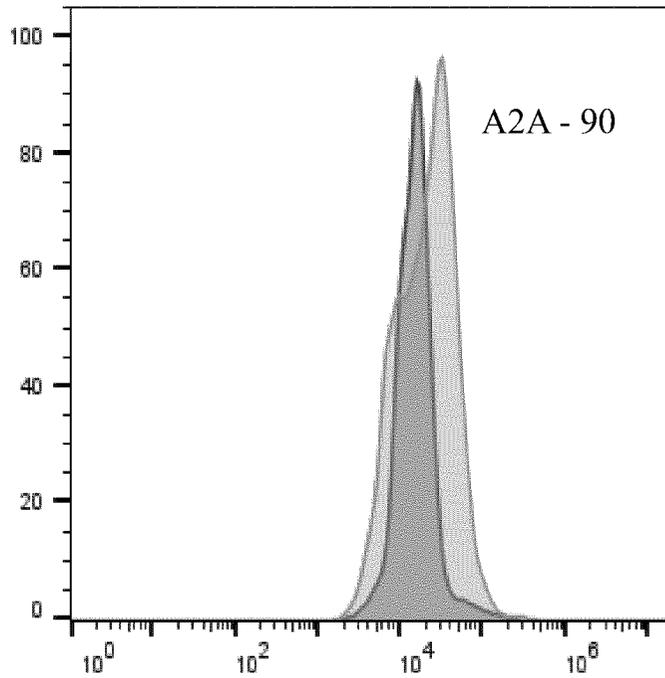
Фиг. 15В



Фиг. 15D

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_A01.fcs | Синглеты A2a | 5196 | 20962 |
| Well_A05.fcs | Родительские синглеты | 1476 | 14426 |

Нормализованная к модальному значению

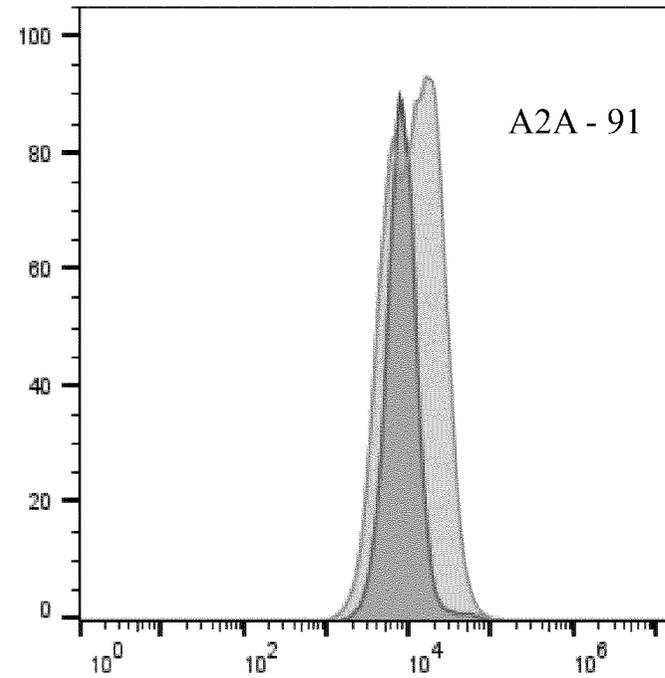


RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 16А

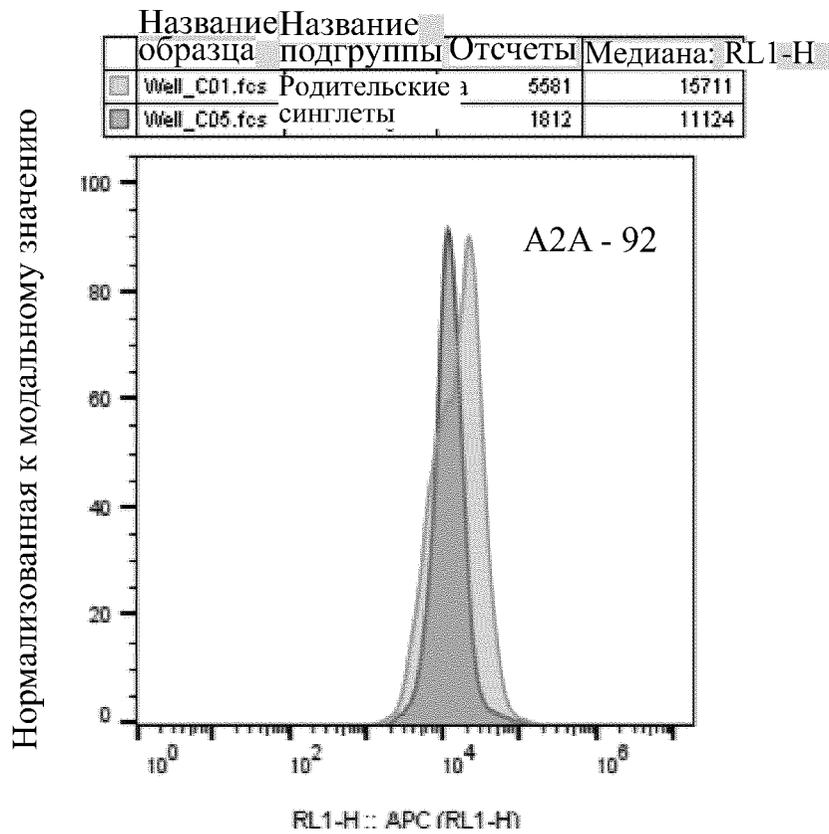
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_B01.fcs | Синглеты A2a | 5736 | 10989 |
| Well_B05.fcs | Родительские синглеты | 2054 | 7718 |

Нормализованная к модальному значению

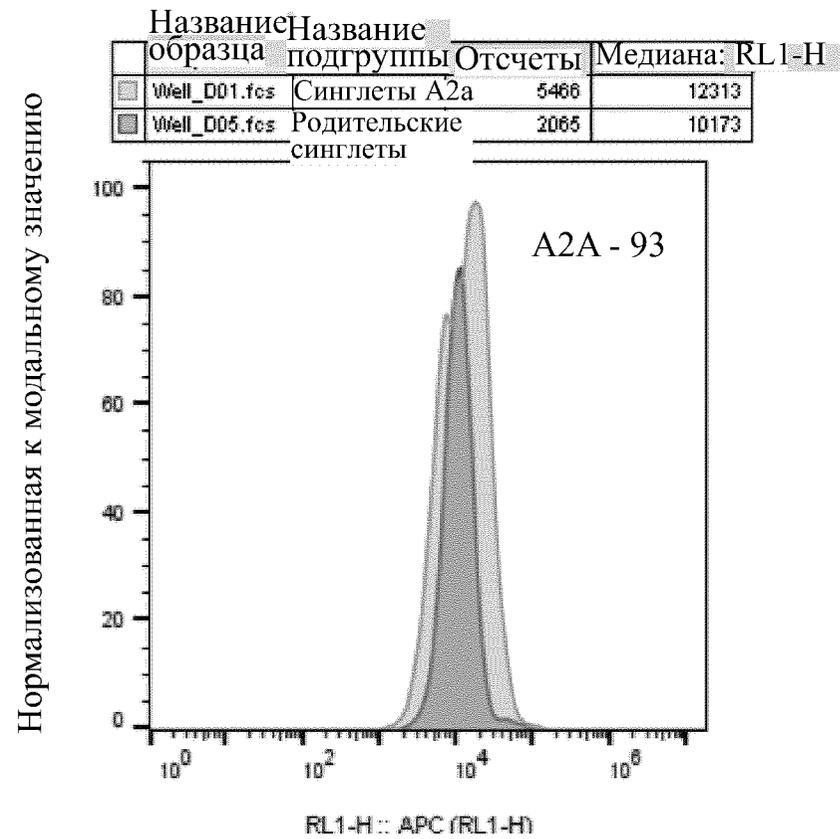


RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 16В

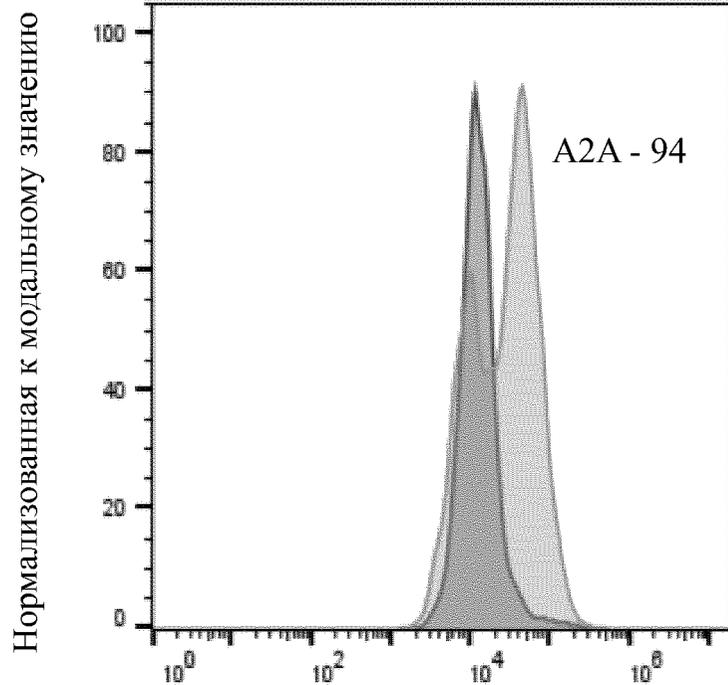


Фиг. 16C



Фиг. 16D

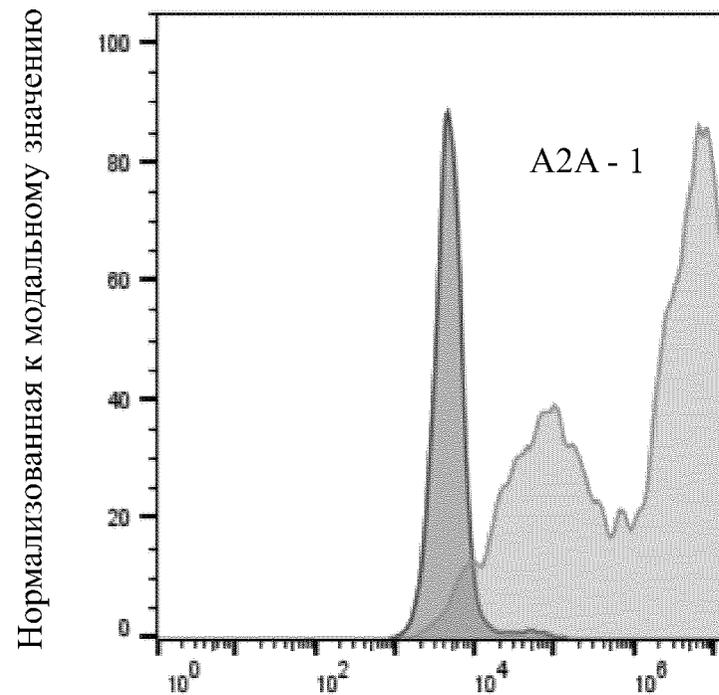
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_ED1.fcs | Синглеты A2a | 5297 | 28082 |
| Well_ED5.fcs | Родительские синглеты | 2021 | 11538 |



RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 16E

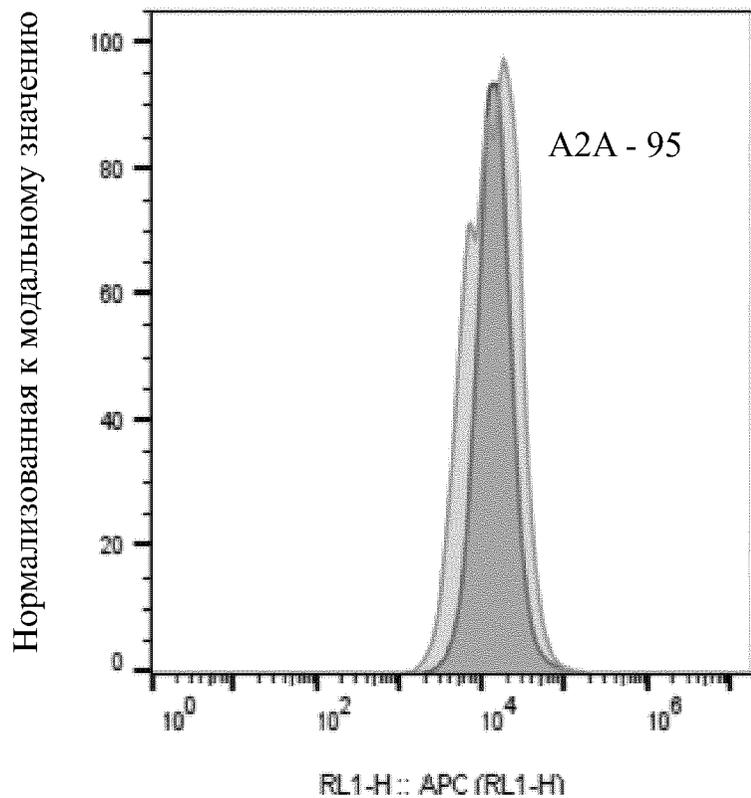
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_F01.fcs | Синглеты A2a | 5386 | 1.68E8 |
| Well_F05.fcs | Родительские синглеты | 1805 | 4425 |



RL1-H :: APC (RL1-H)

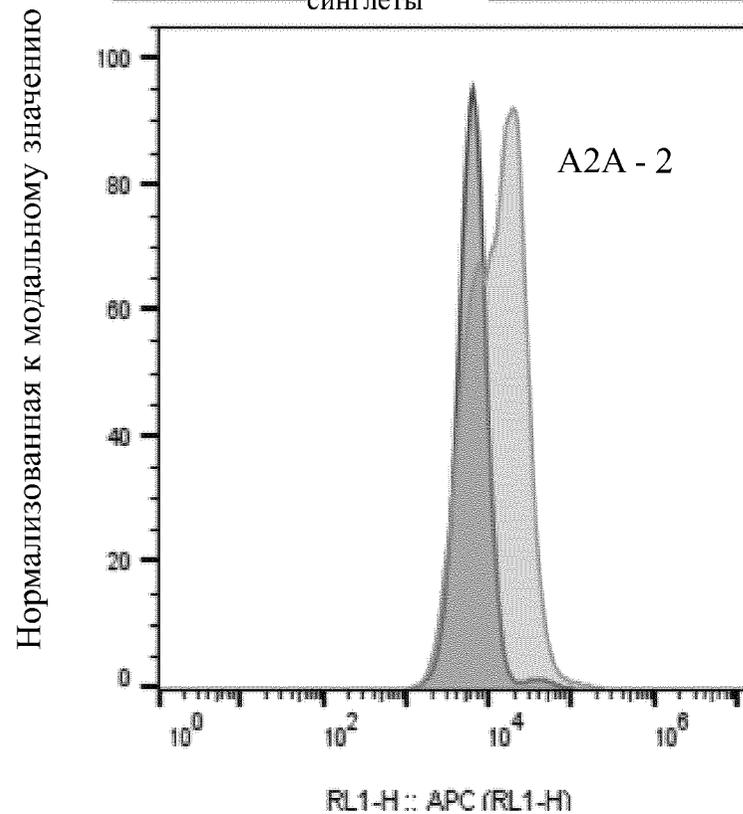
Фиг. 16F

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_G01.fcs | Синглеты A2a | 5182 | 12876 |
| Well_G05.fcs | Родительские синглеты | 1977 | 13193 |



Фиг. 16G

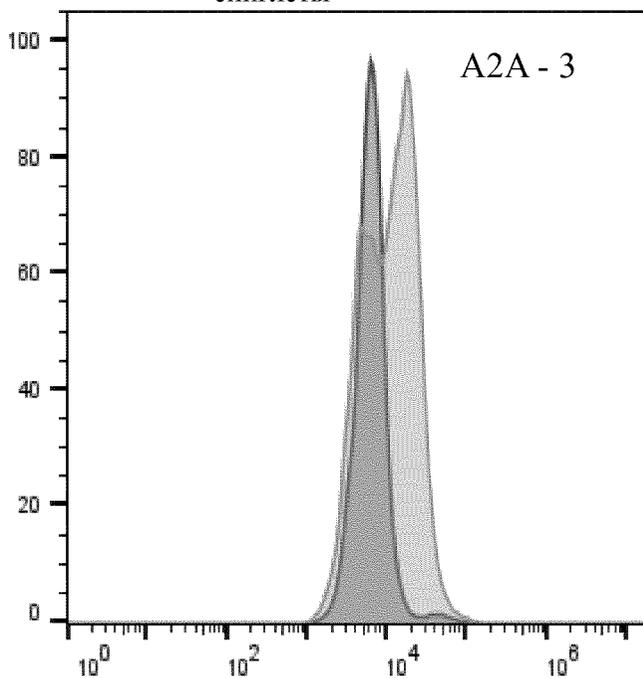
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_H01.fcs | Синглеты A2a | 5104 | 12115 |
| Well_H05.fcs | Родительские синглеты | 2382 | 5952 |



Фиг. 16H

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_A02.fcs | Синглеты A2a | 5132 | 10725 |
| Well_A06.fcs | Родительские синглеты | 1764 | 6000 |

Нормализованная к модальному значению

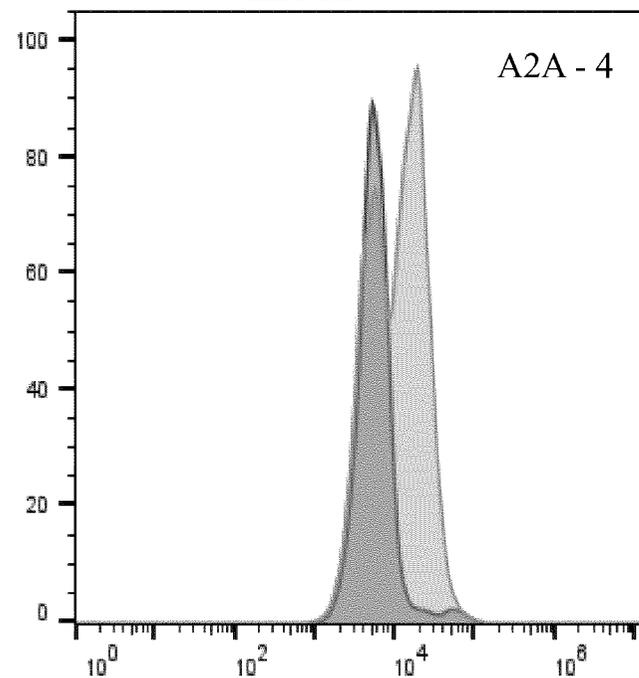


RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 16I

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_B02.fcs | Синглеты A2a | 5450 | 10681 |
| Well_B06.fcs | Родительские синглеты | 1908 | 5269 |

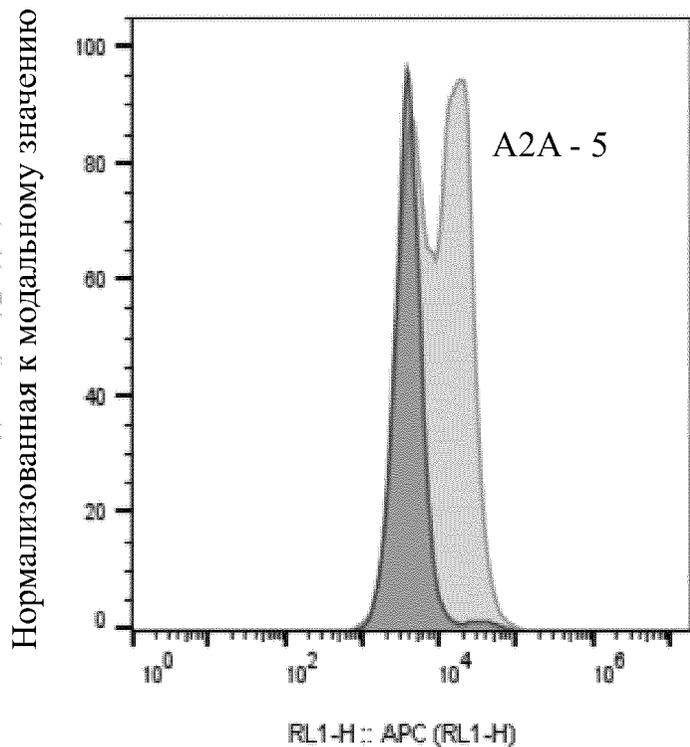
Нормализованная к модальному значению



RL1-H :: APC (RL1-H)

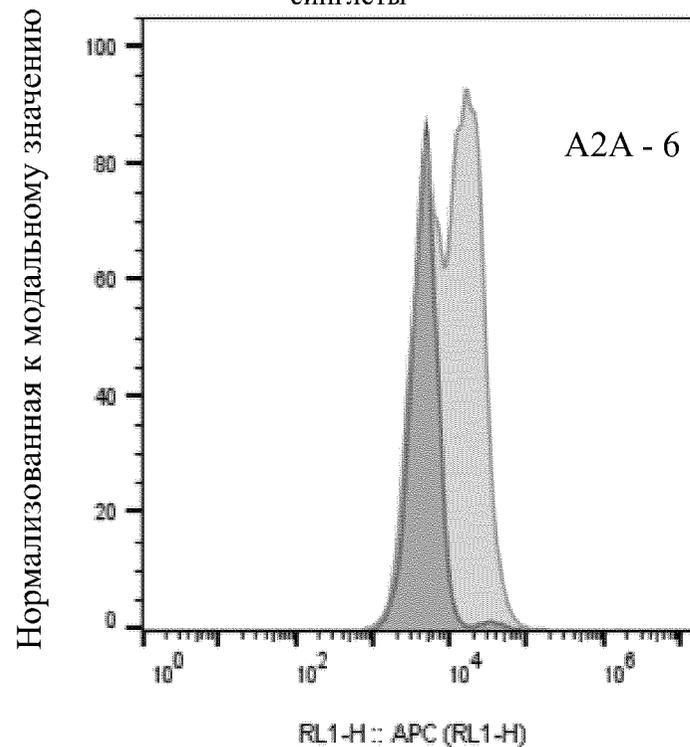
Фиг. 16J

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|--------------------|---------|----------------|
| Well_CD6.fcs | Род. синглеты | 2327 | 3731 |
| Well_CD2.fcs | Синглеты A2a | 5809 | 9043 |



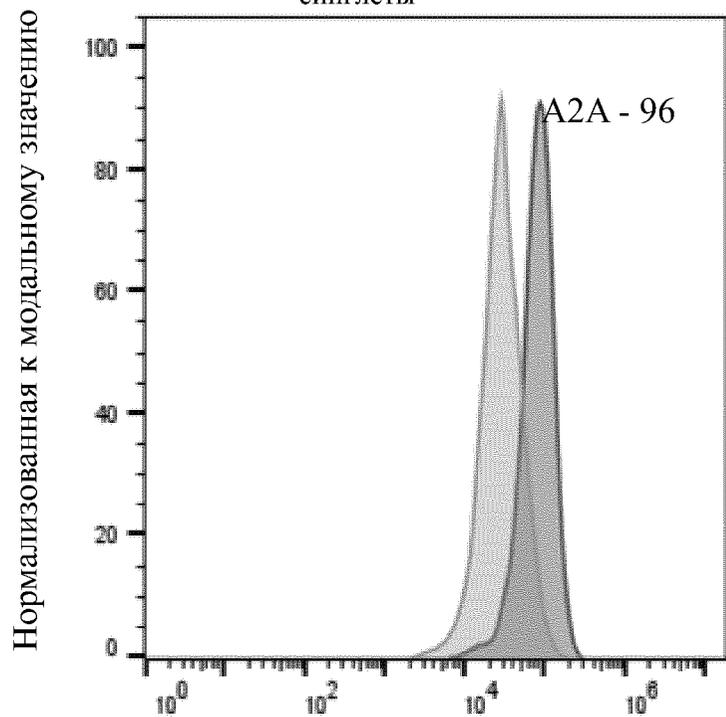
Фиг. 16К

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_D02.fcs | Синглеты A2a | 5690 | 9768 |
| Well_D06.fcs | Родительские синглеты | 1718 | 4515 |



Фиг. 16L

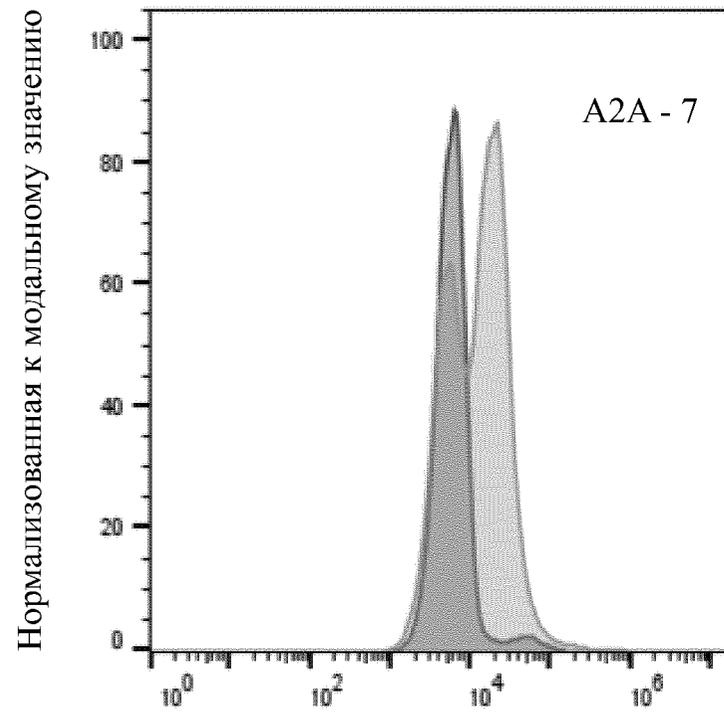
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_E02.fcs | Синглеты A2a | 5734 | 26855 |
| Well_E06.fcs | Родительские синглеты | 2536 | 76888 |



RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 16M

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_F02.fcs | Синглеты A2a | 5646 | 12363 |
| Well_F06.fcs | Родительские синглеты | 1816 | 5600 |

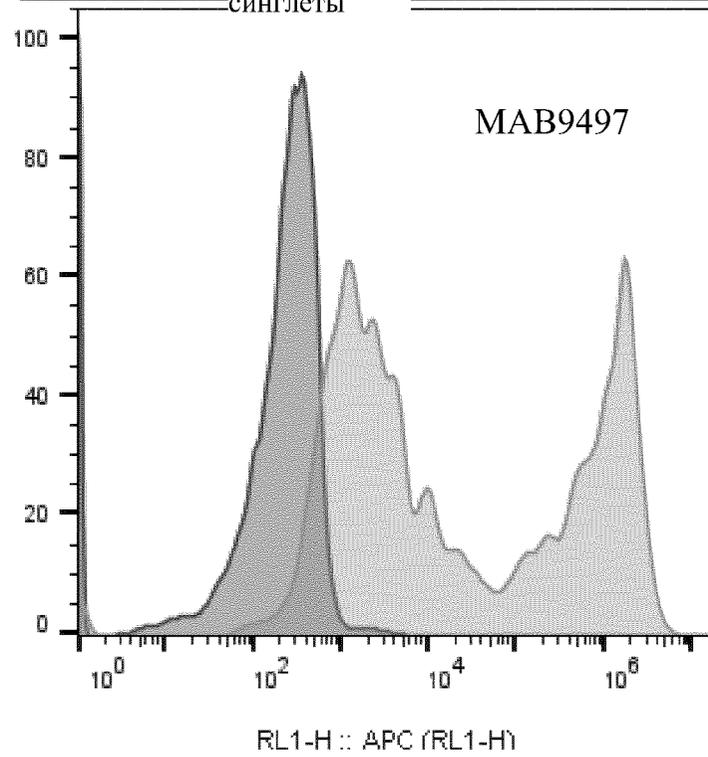


RL1-H :: APC (RL1-H)

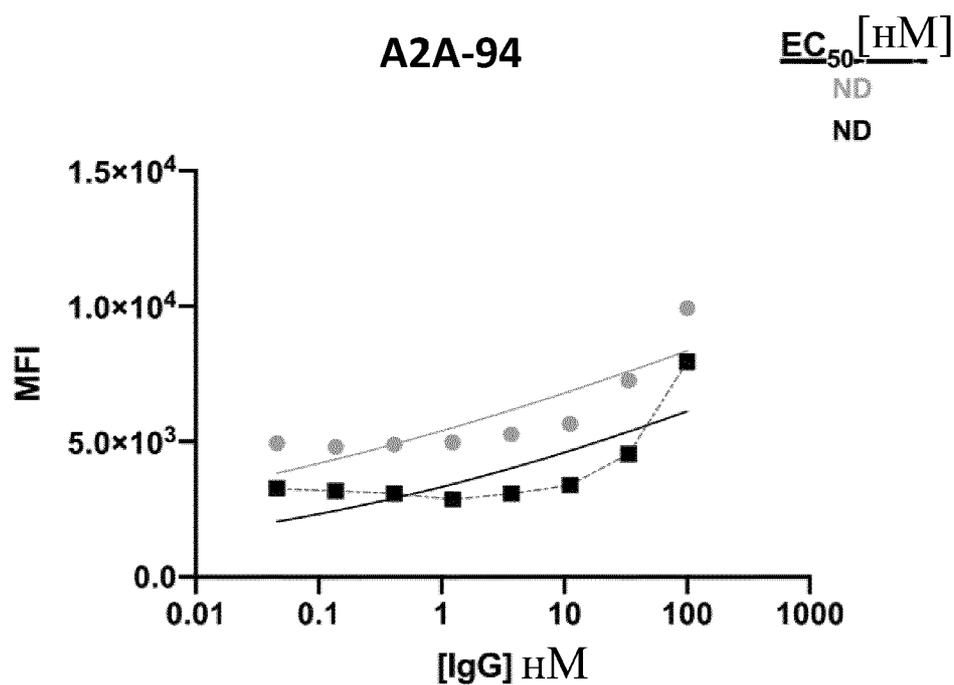
Фиг. 16N

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_H12.fcs | Синглеты A2a | 960 | 7502 |
| Well_H12.fcs | Родительские синглеты | 5538 | 230 |

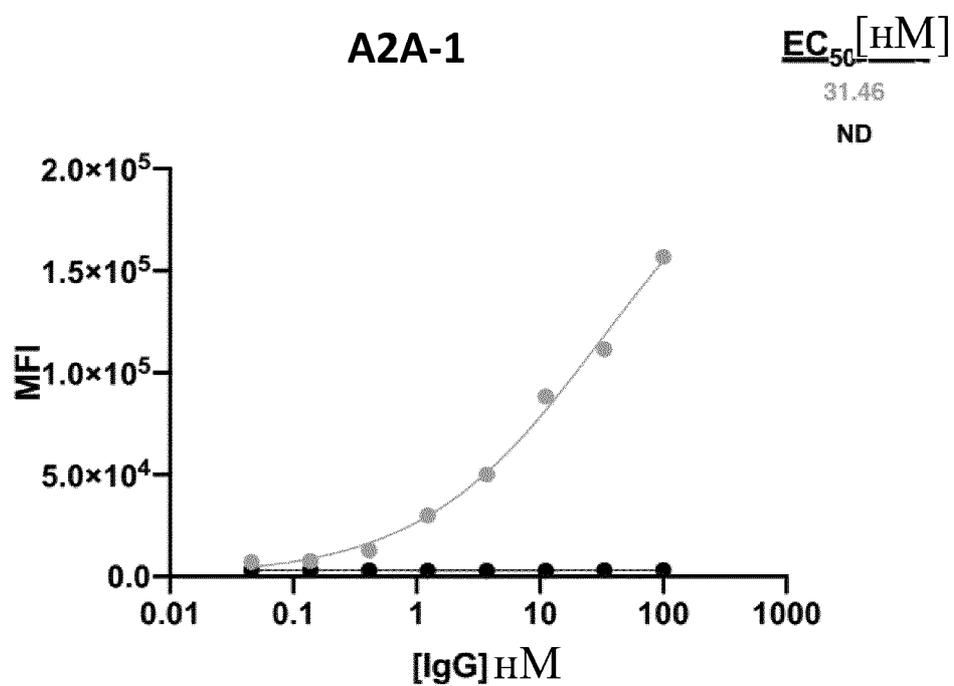
Нормализованная к модальному значению



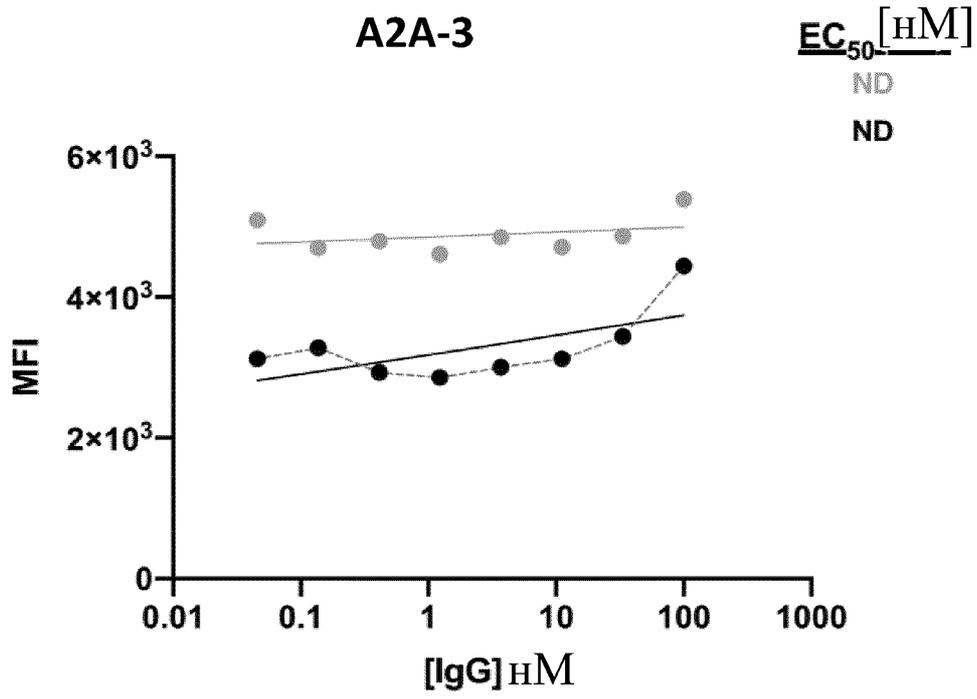
Фиг. 160



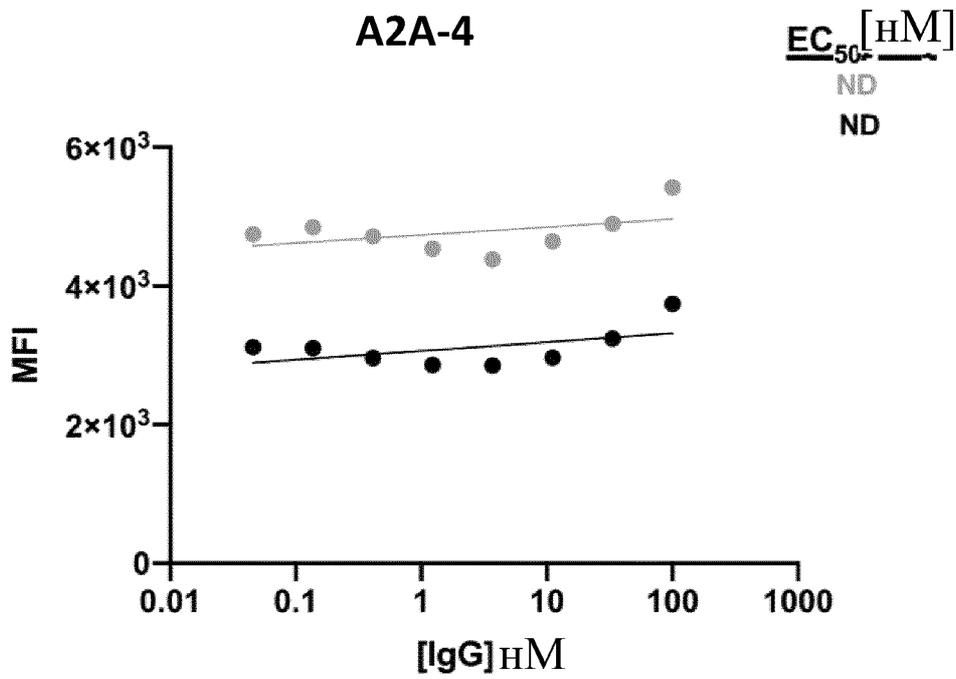
Фиг. 17А



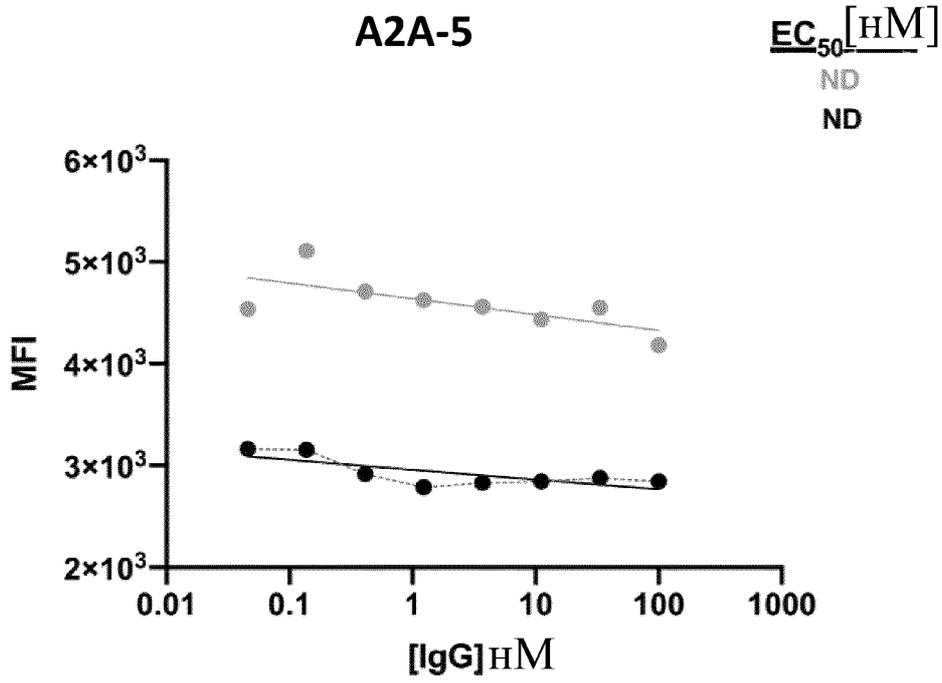
Фиг. 17В



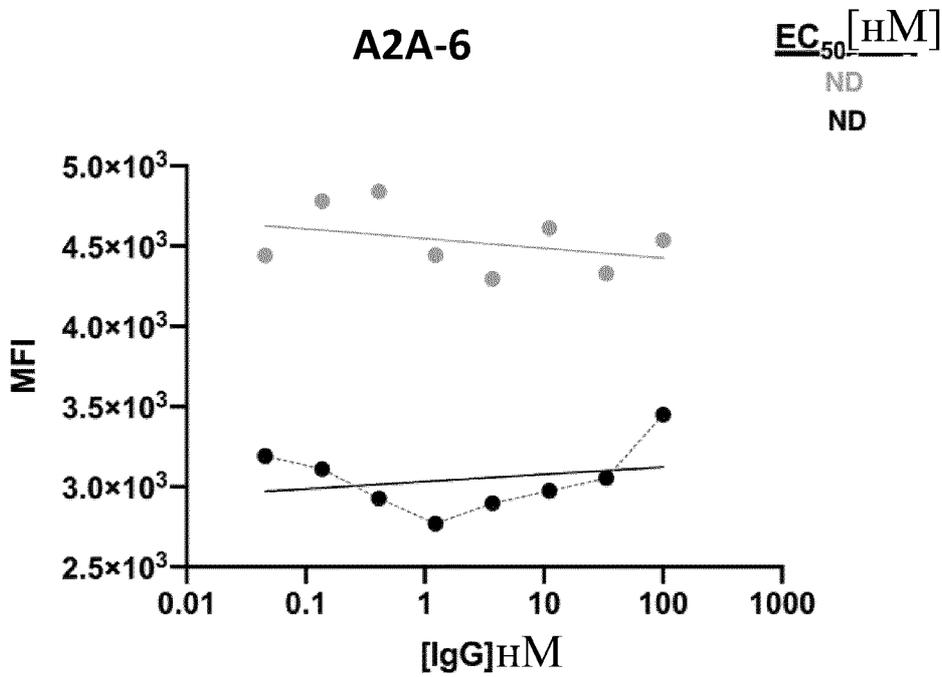
Фиг. 17С



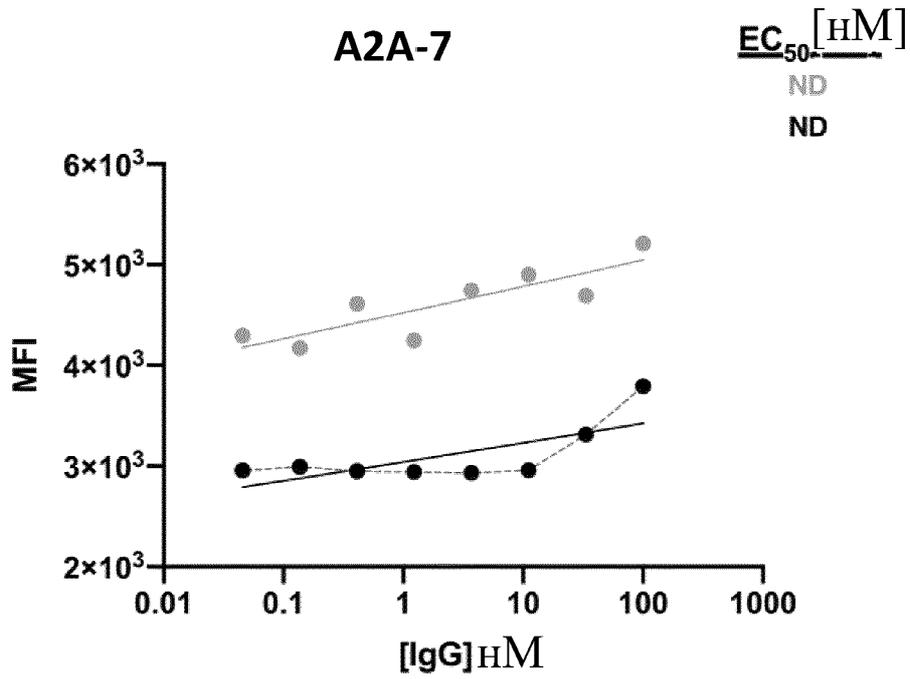
Фиг. 17D



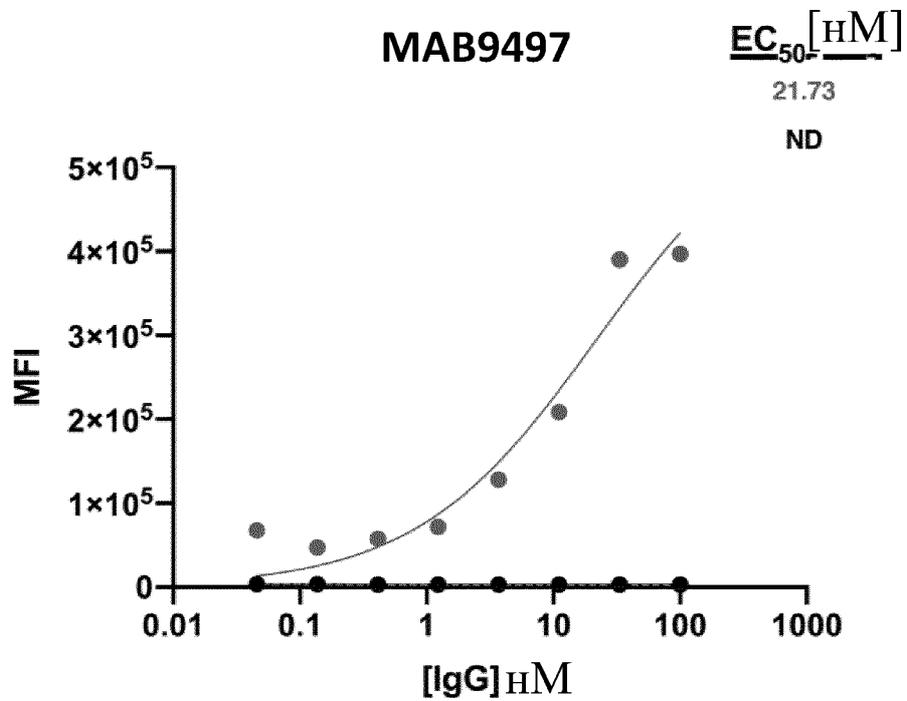
Фиг. 17E



Фиг. 17F



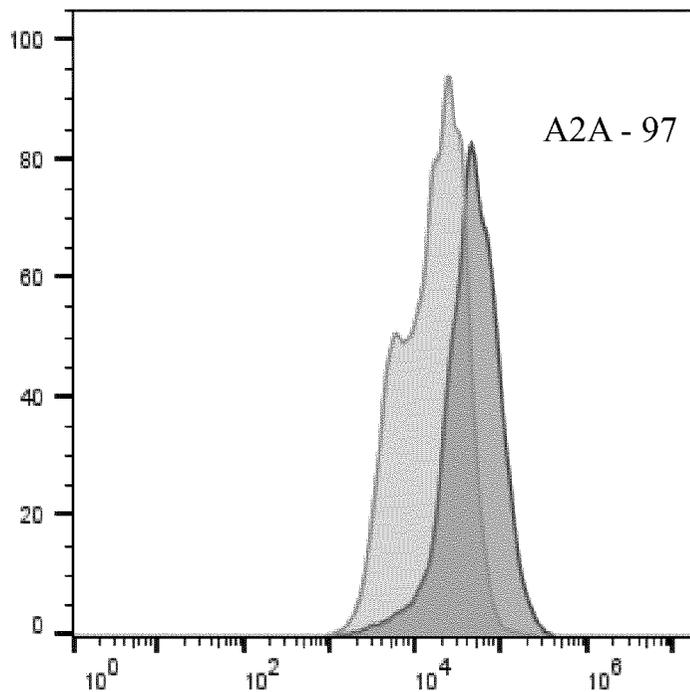
Фиг. 17G



Фиг. 17H

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_A03.fcs | Синглеты A2a | 4868 | 16033 |
| Well_A07.fcs | Родительские синглеты | 1904 | 43898 |

Нормализованная к модальному значению

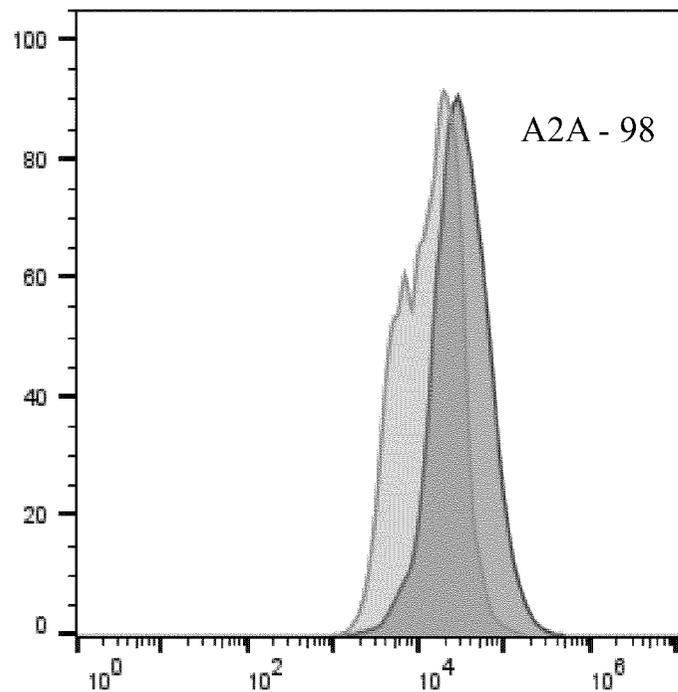


RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 18А

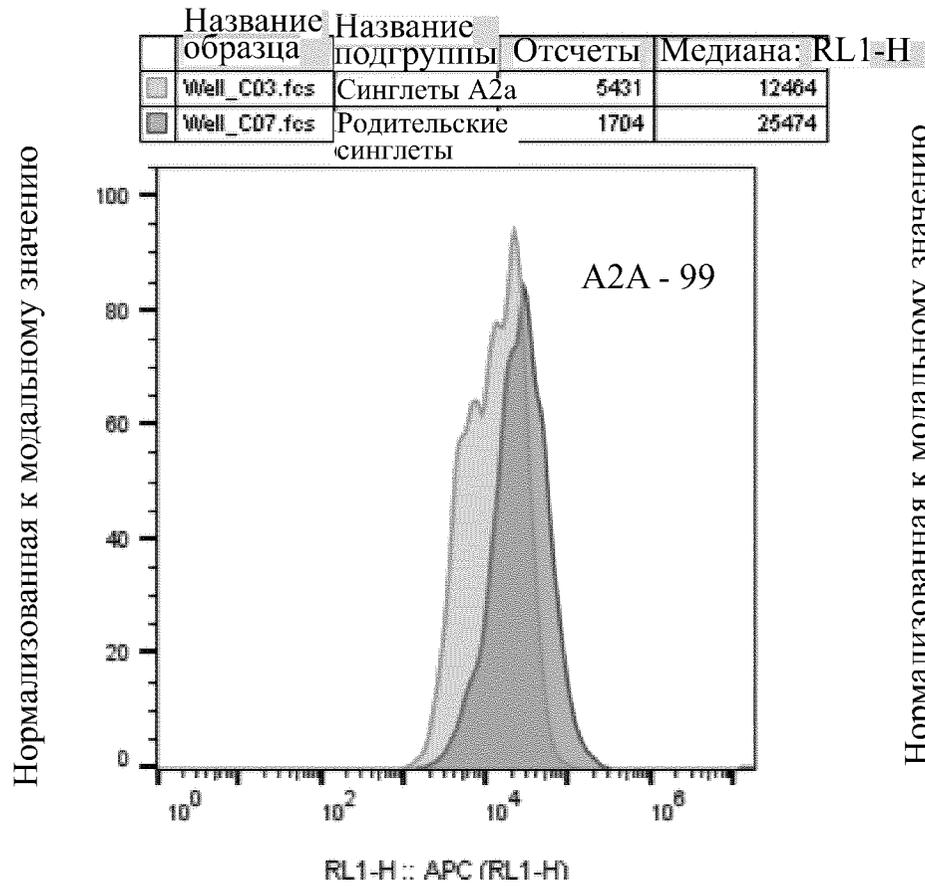
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_B03.fcs | Синглеты A2a | 5538 | 13247 |
| Well_B07.fcs | Родительские синглеты | 1748 | 28774 |

Нормализованная к модальному значению

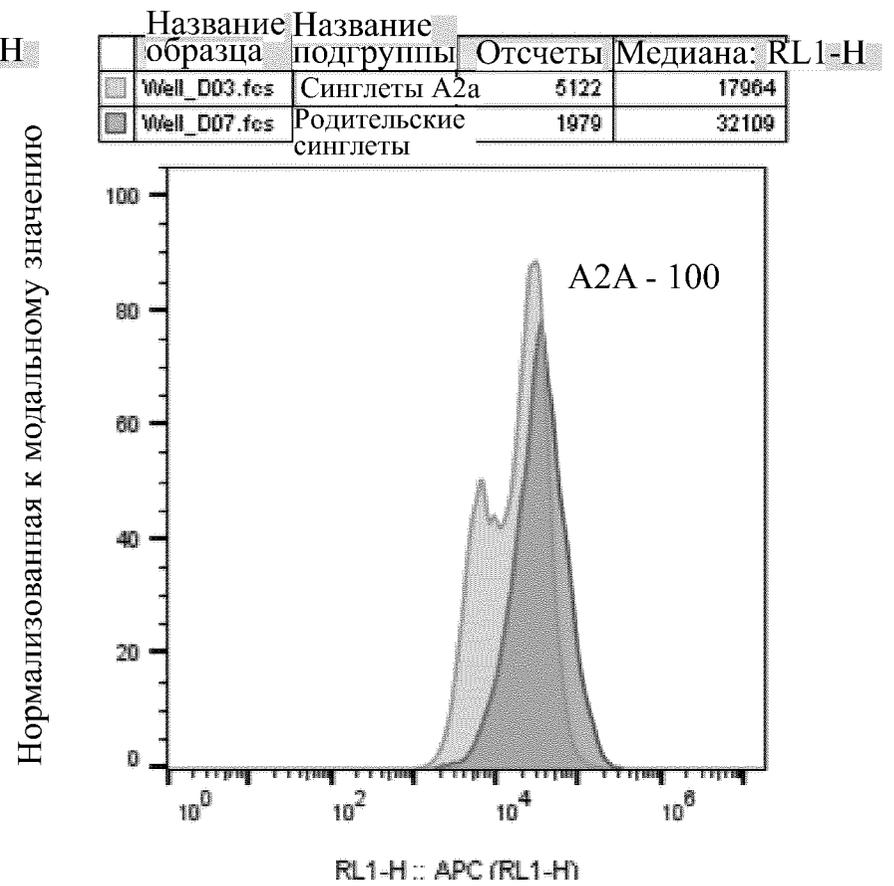


RL1-H :: APC (RL1-H)

Фиг. 18В



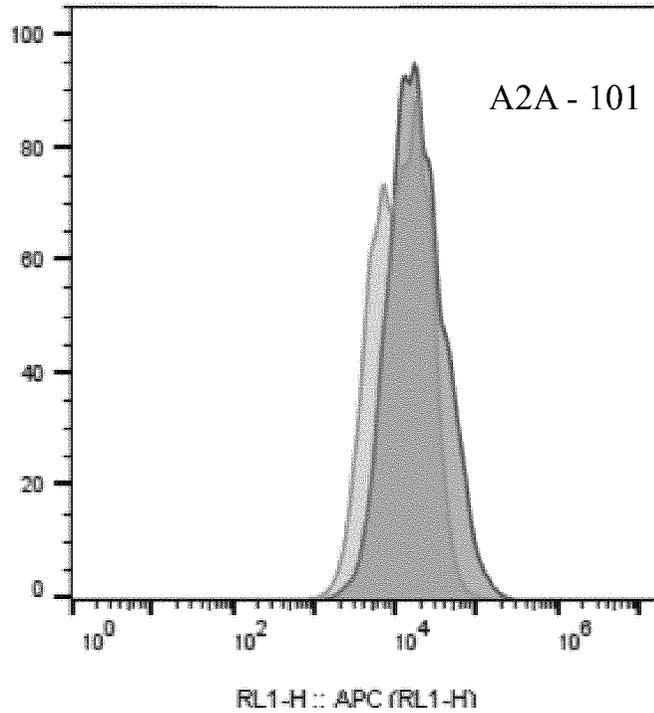
Фиг. 18С



Фиг. 18D

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_E03.fcs | Синглеты A2a | 5307 | 11124 |
| Well_E07.fcs | Родительские синглеты | 2114 | 16428 |

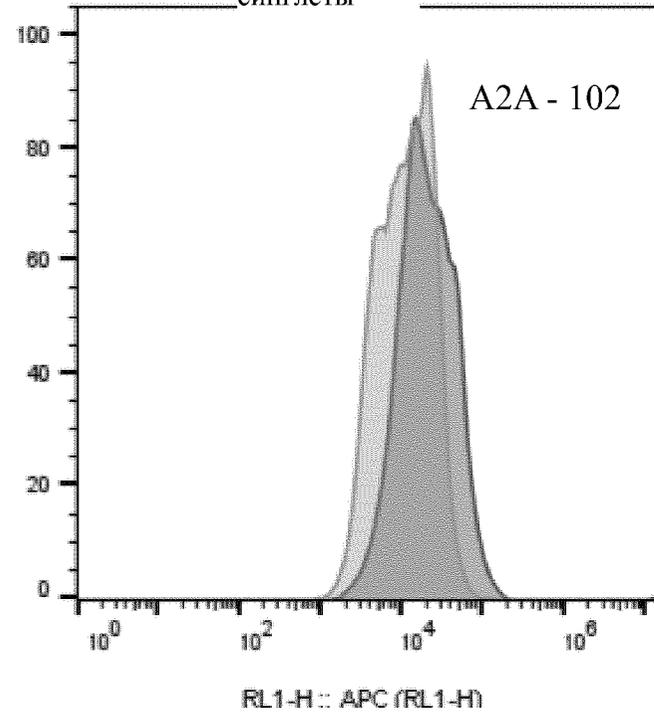
Нормализованная к модальному значению



Фиг. 18E

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_F03.fcs | Синглеты A2a | 5064 | 10945 |
| Well_F07.fcs | Родительские синглеты | 1417 | 18633 |

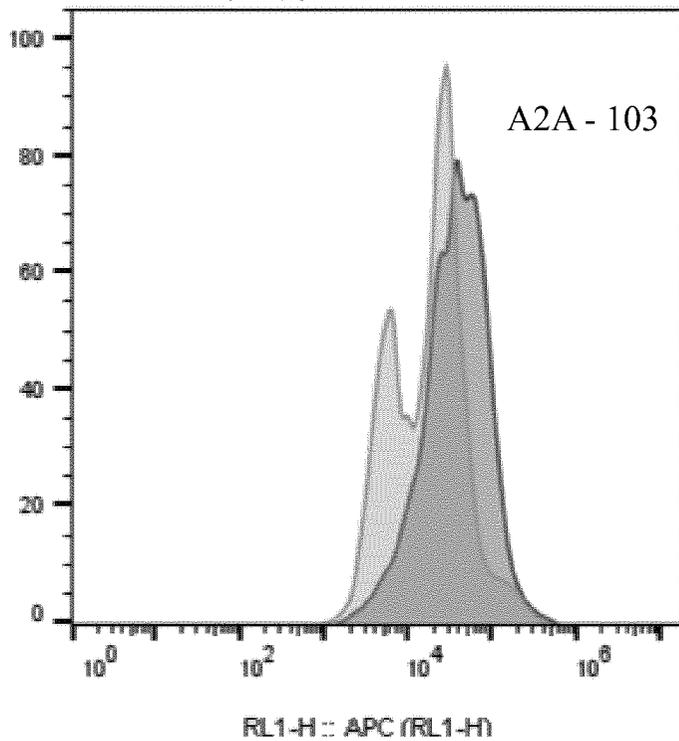
Нормализованная к модальному значению



Фиг. 18F

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_G03.fcs | Синглеты A2a | 5094 | 19092 |
| Well_G07.fcs | Родительские синглеты | 1086 | 36270 |

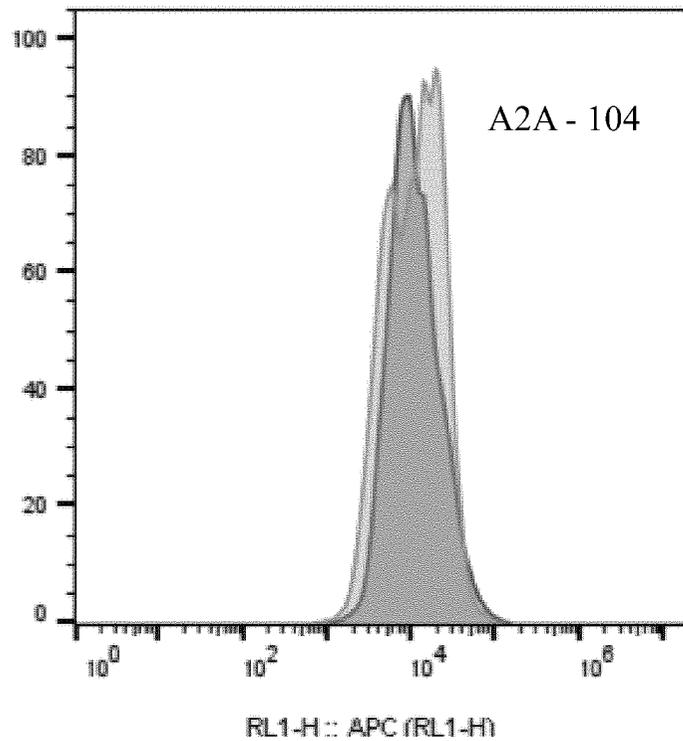
Нормализованная к модальному значению



Фиг. 18G

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_H03.fcs | Синглеты A2a | 4839 | 10638 |
| Well_H07.fcs | Родительские синглеты | 2023 | 9650 |

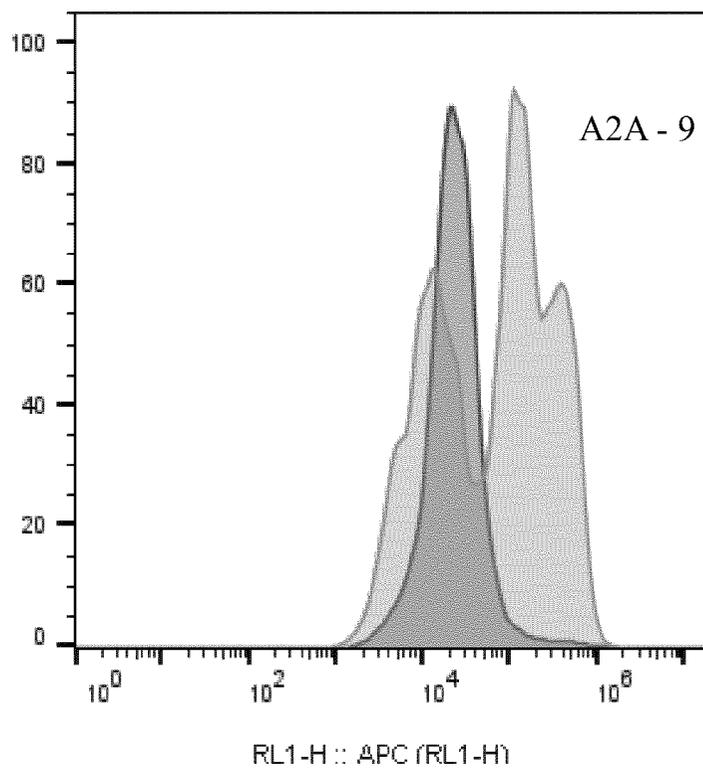
Нормализованная к модальному значению



Фиг. 18H

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_A04.fcs | Синглеты A2a | 4534 | 80401 |
| Well_A08.fcs | Родительские синглеты | 1390 | 21392 |

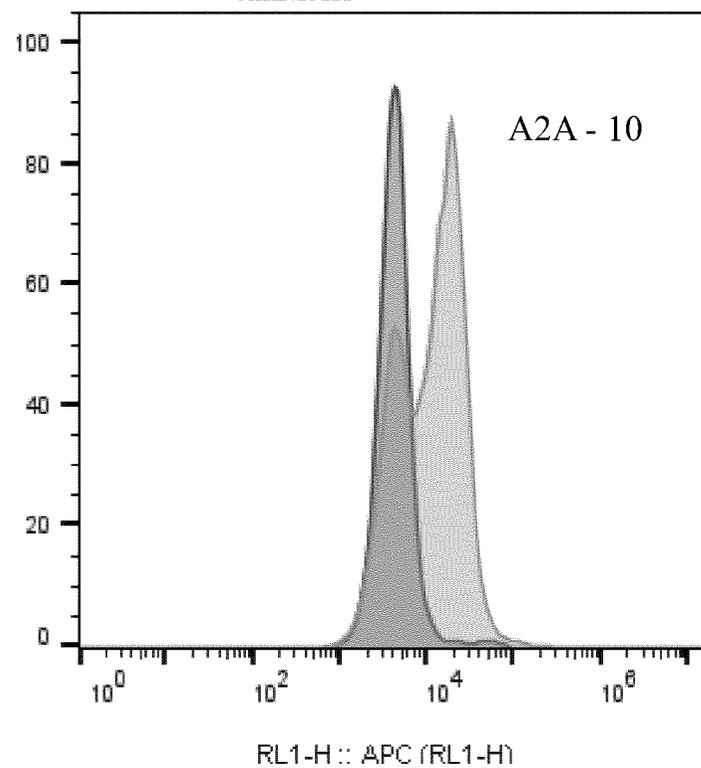
Нормализованная к модальному значению



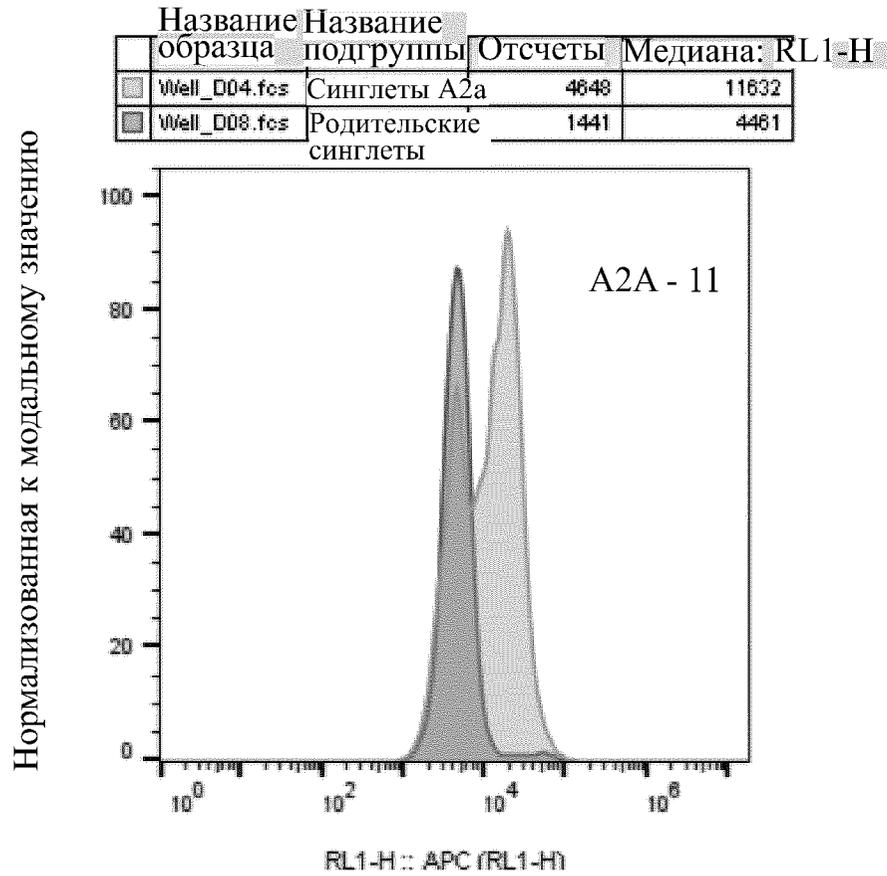
Фиг. 18I

| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_B04.fcs | Синглеты A2a | 4683 | 11775 |
| Well_B08.fcs | Родительские синглеты | 1712 | 4046 |

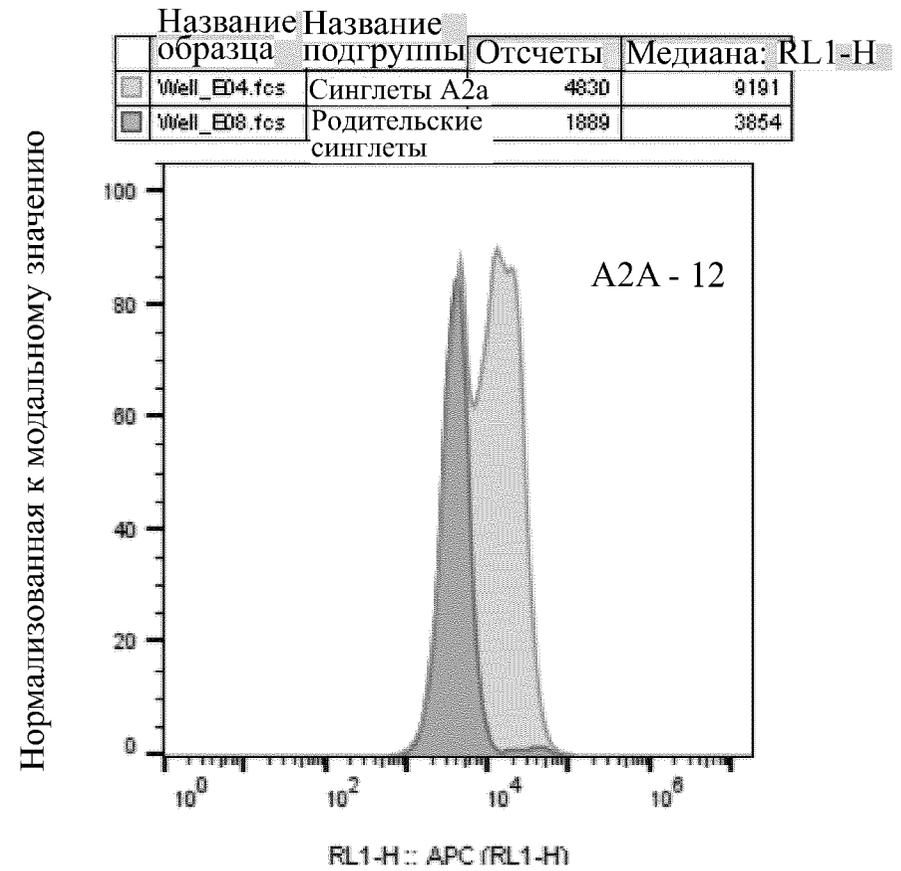
Нормализованная к модальному значению



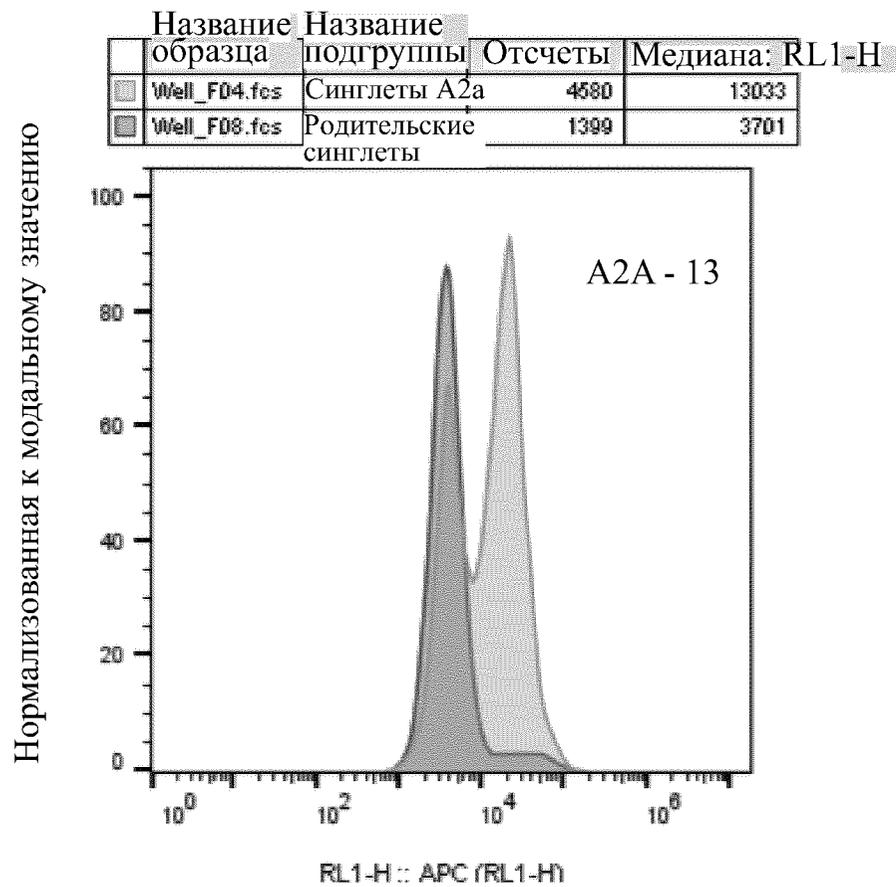
Фиг. 18J



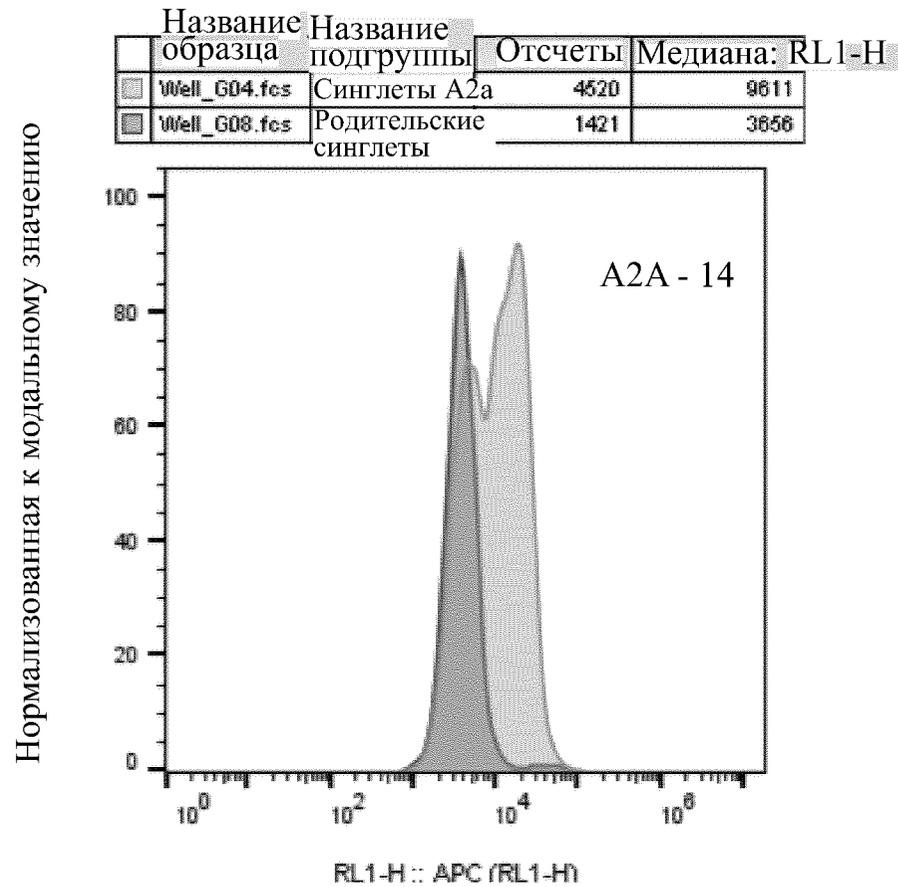
Фиг. 18K



Фиг. 18L



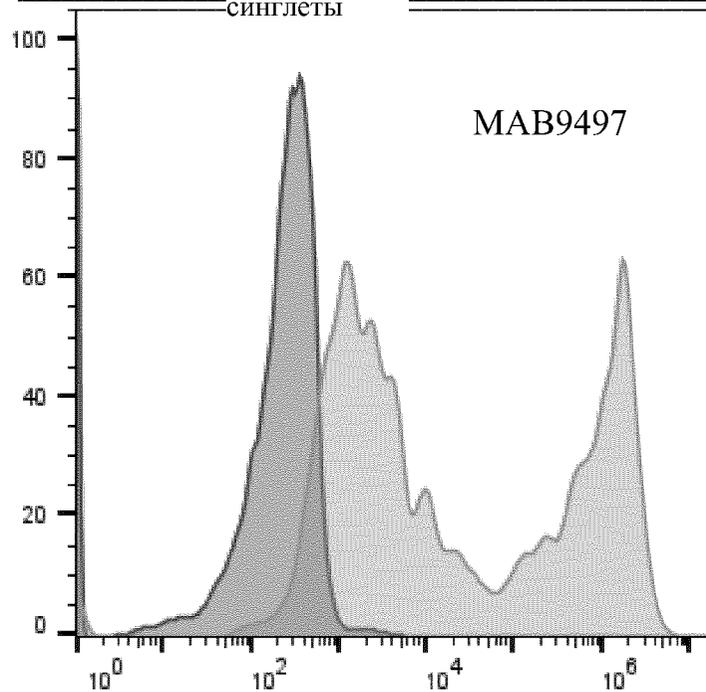
Фиг. 18М



Фиг. 18N

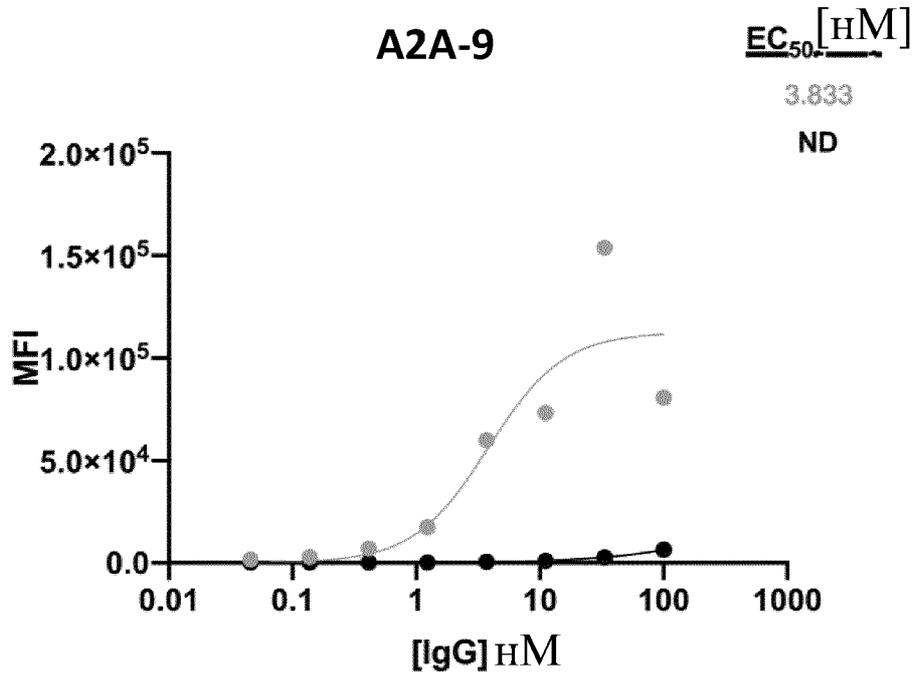
| Название образца | Название подгруппы | Отсчеты | Медиана: RL1-H |
|------------------|-----------------------|---------|----------------|
| Well_H12.fcs | Синглеты A2a | 960 | 7502 |
| Well_H12.fcs | Родительские синглеты | 5538 | 230 |

Нормализованная к модальному значению

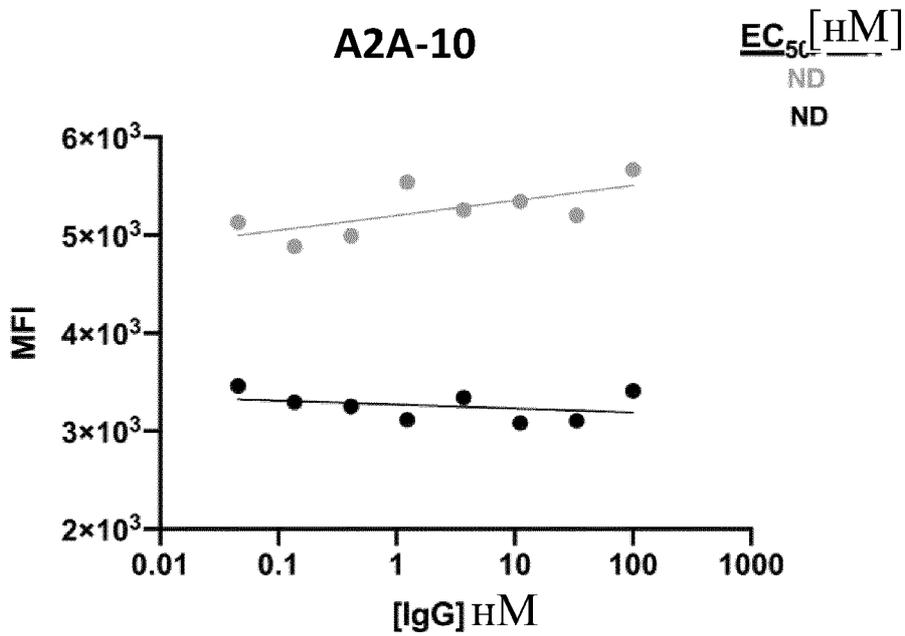


RL1-H :: APC (RL1-H)

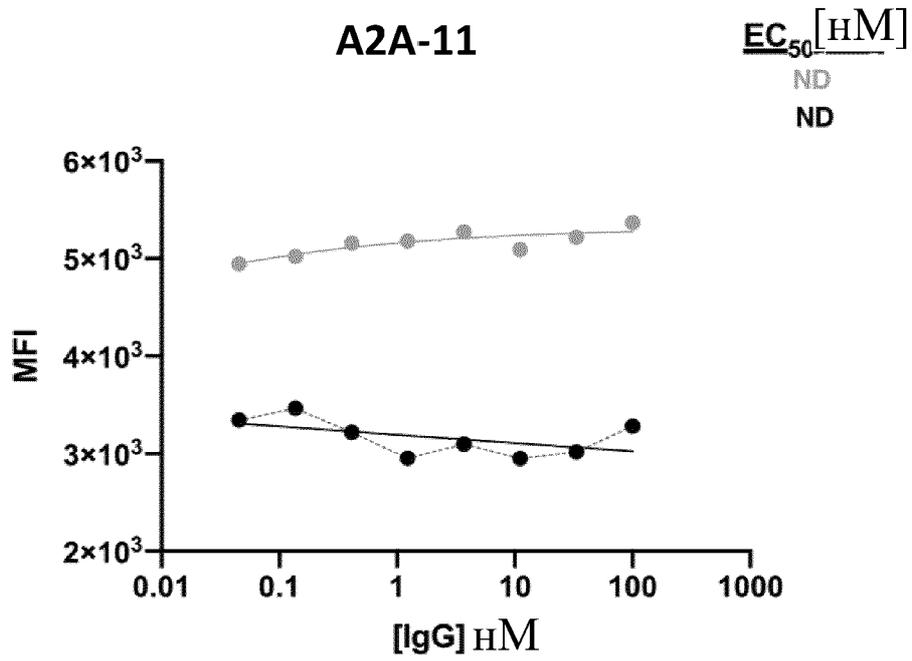
Фиг. 180



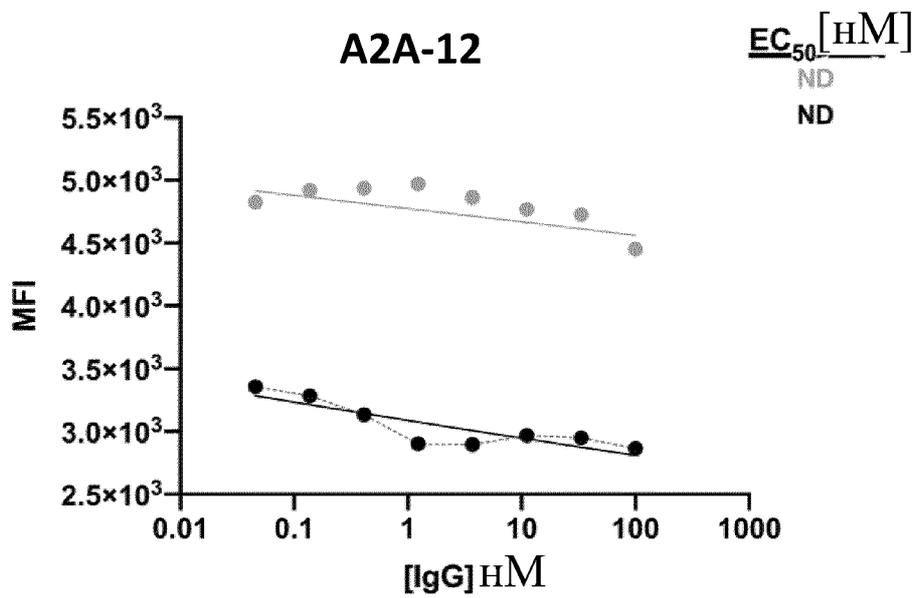
Фиг. 19А



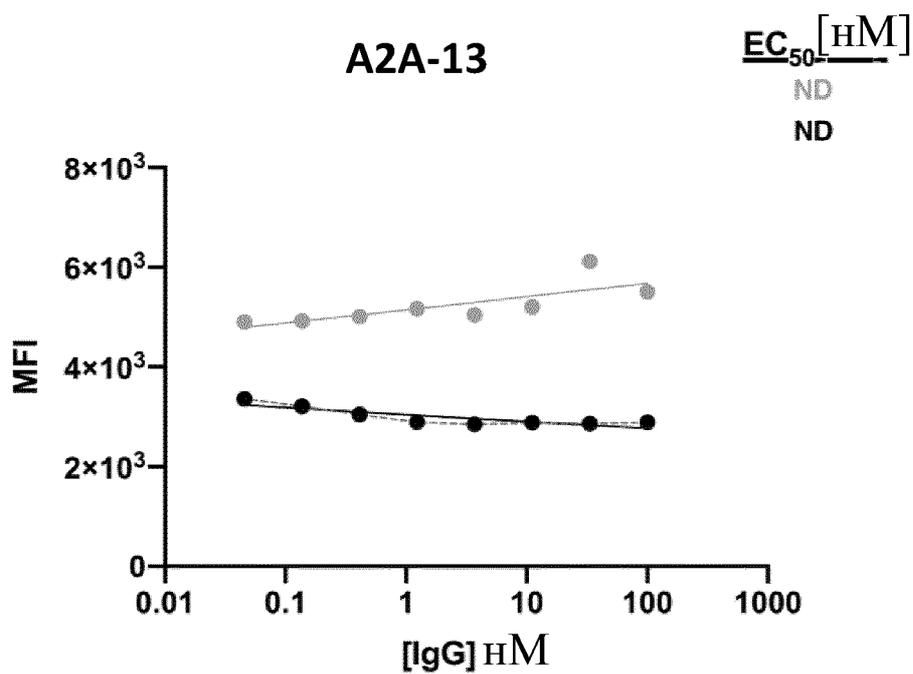
Фиг. 19В



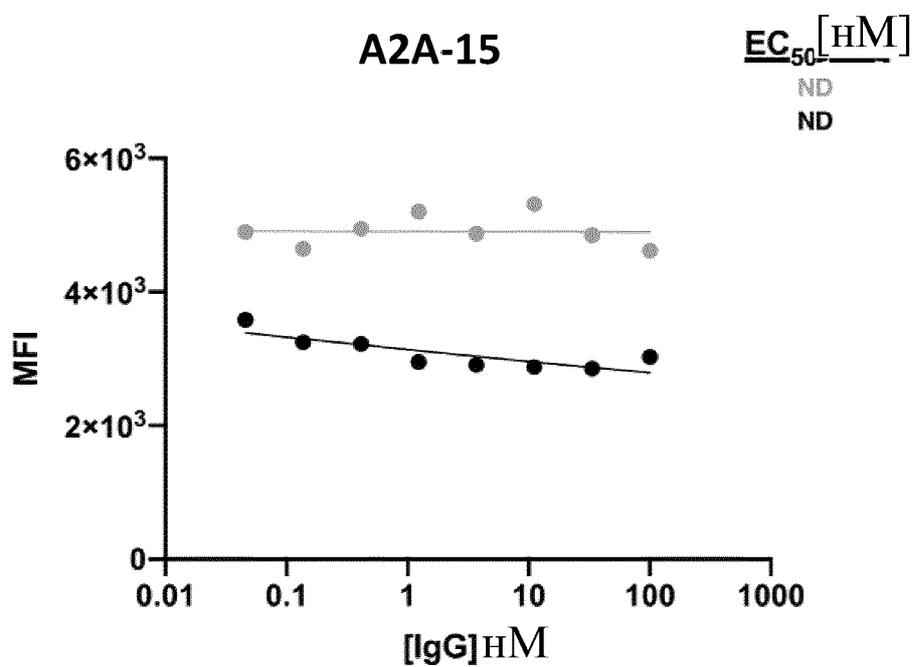
Фиг. 19С



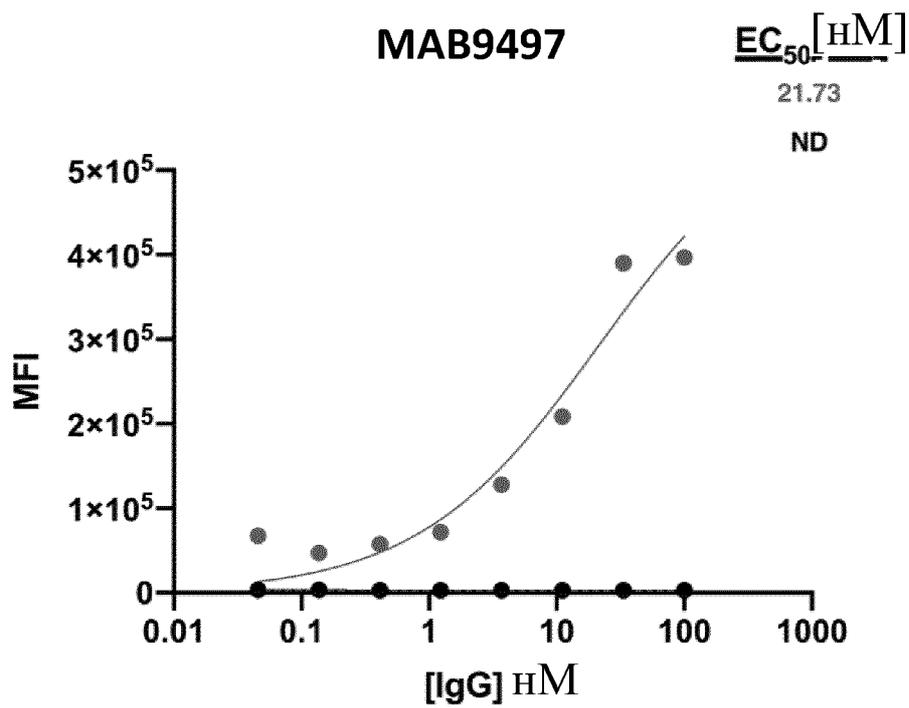
Фиг. 19D



Фиг. 19Е

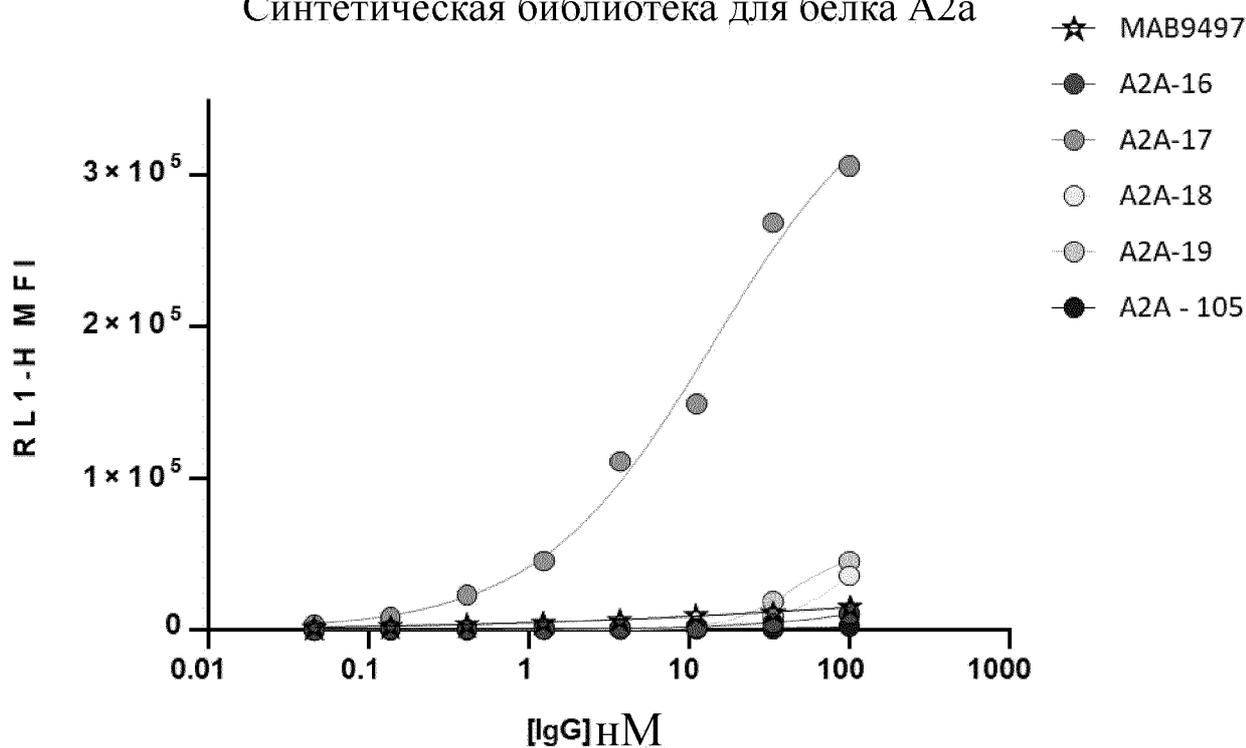


Фиг. 19F



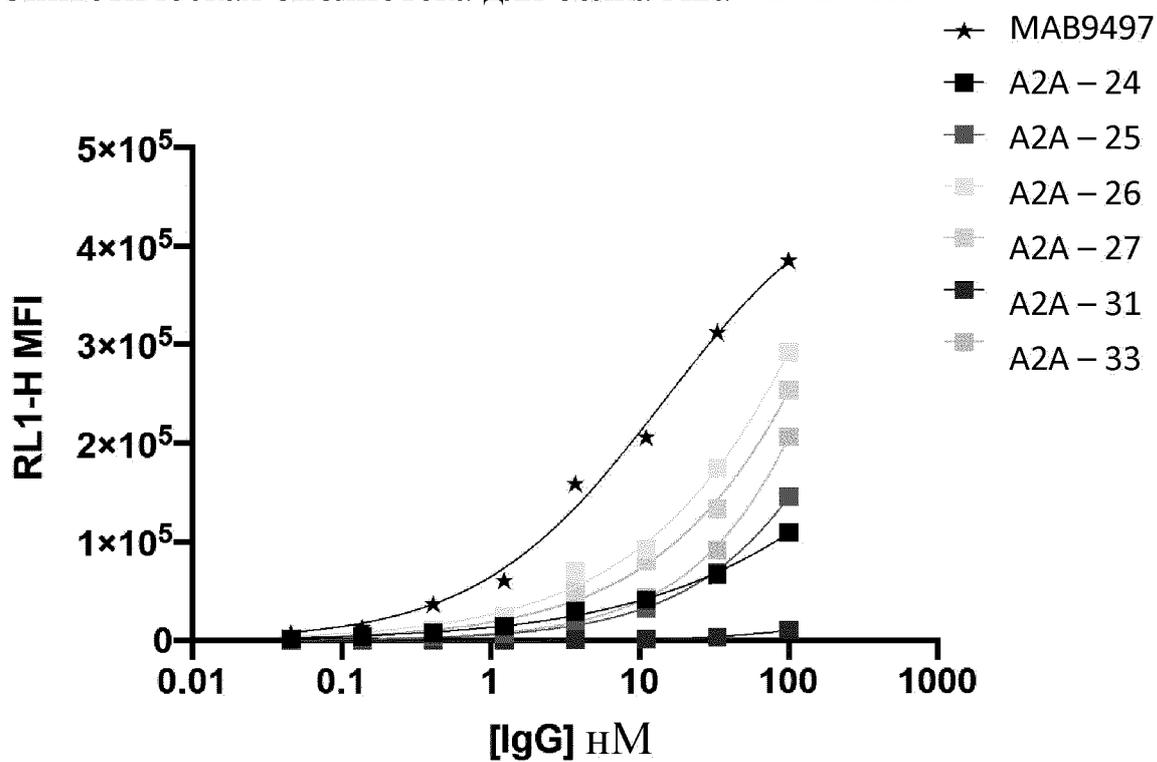
Фиг. 19G

Синтетическая библиотека для белка A2a



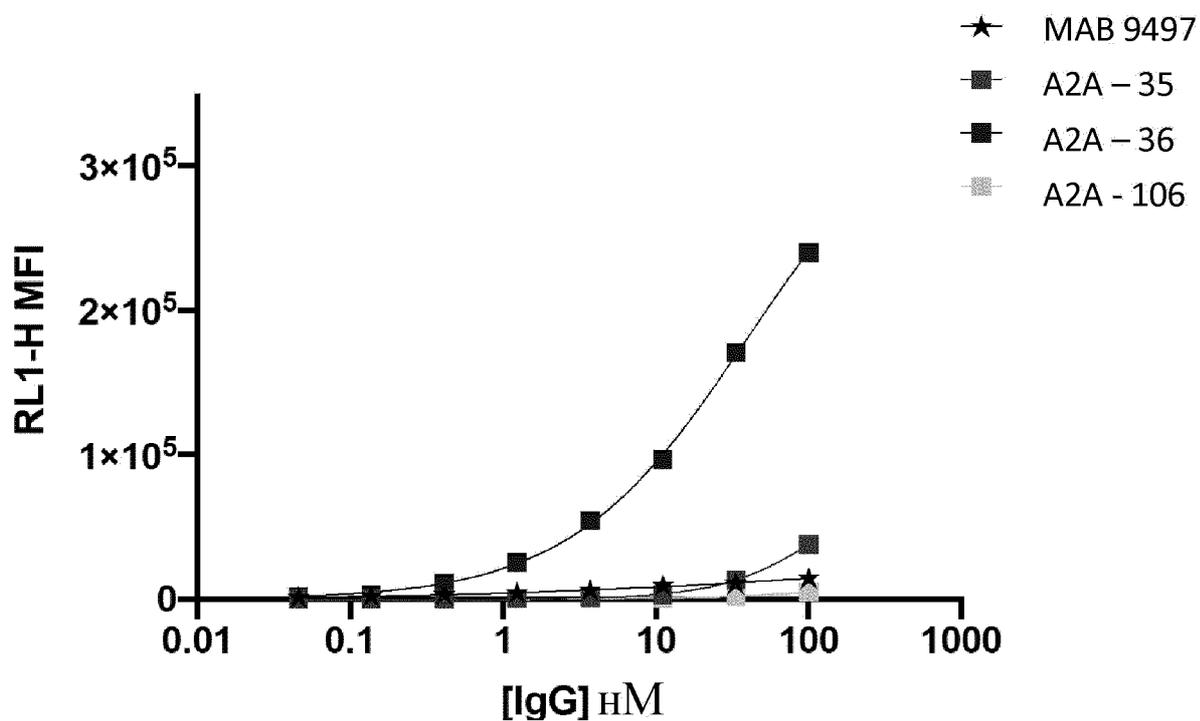
Фиг. 20А

Синтетическая библиотека для белка A2a + ZM241385



Фиг. 20В

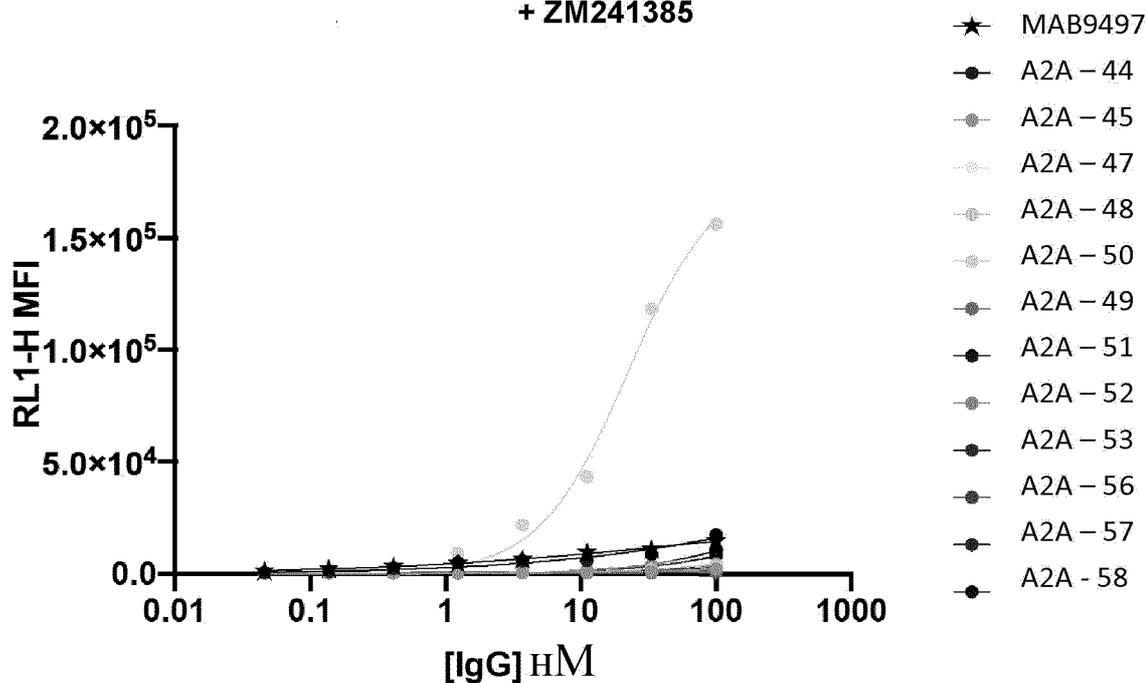
Гуманизированная синтетическая библиотека для белка A2a



Фиг. 20С

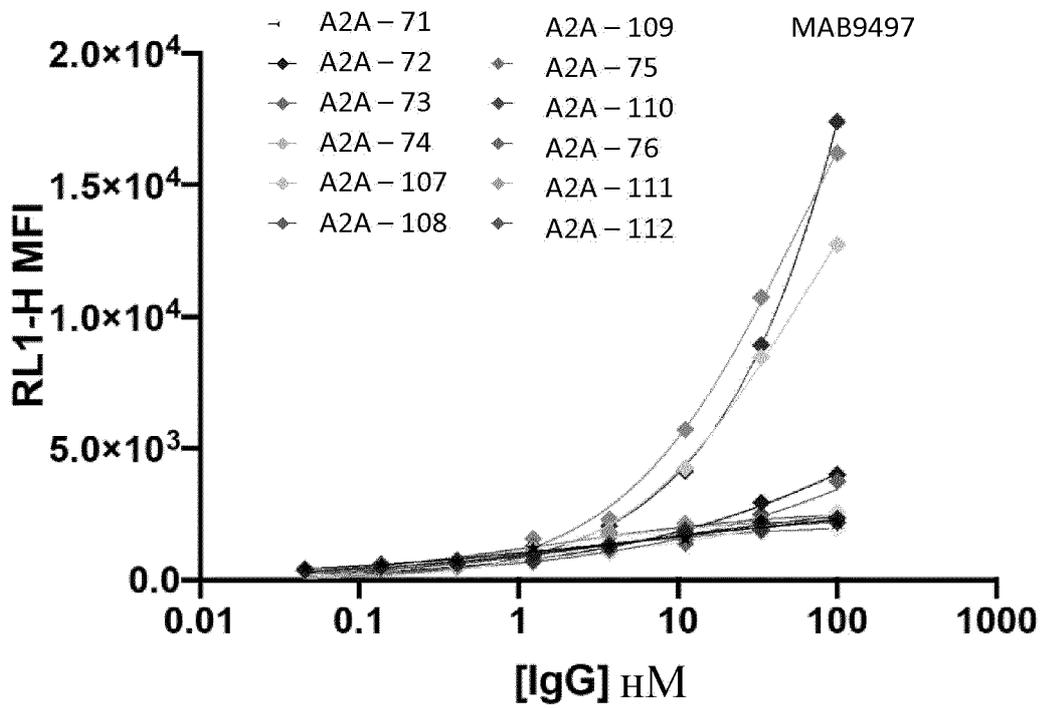
Гуманизированная синтетическая библиотека для белка A2a

+ ZM241385



Фиг. 20D

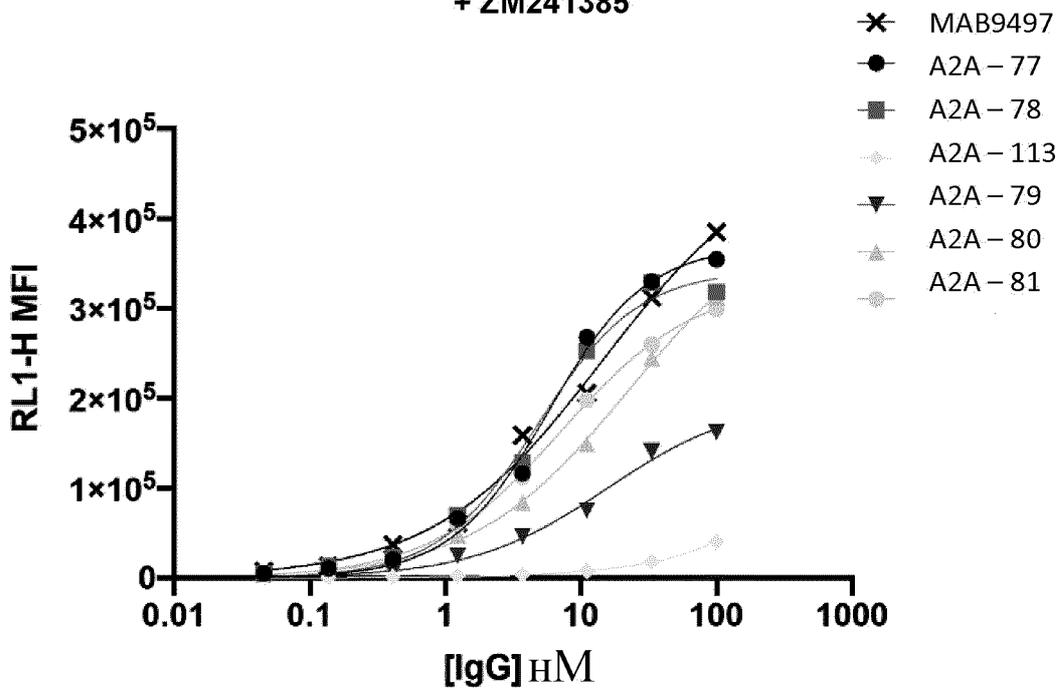
Иммунная библиотека для белка A2a



Фиг. 20Е

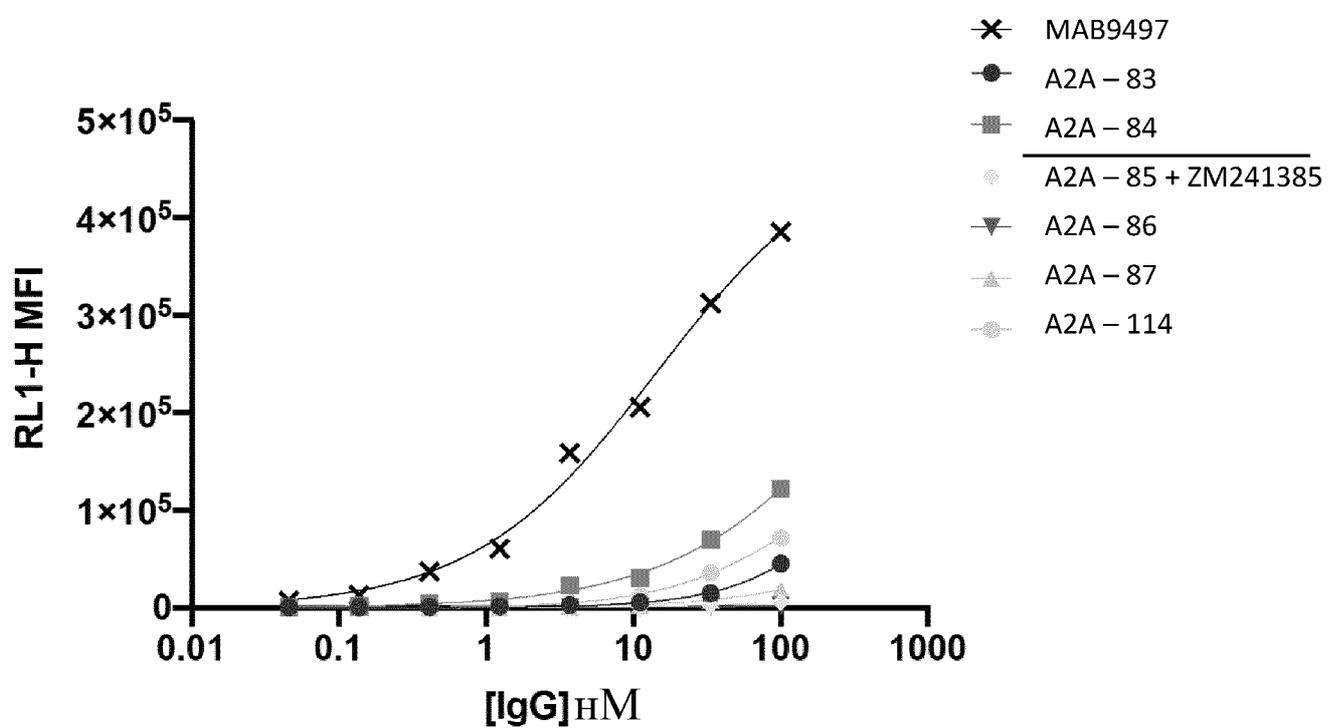
Иммунная библиотека для белка A2a

+ ZM241385

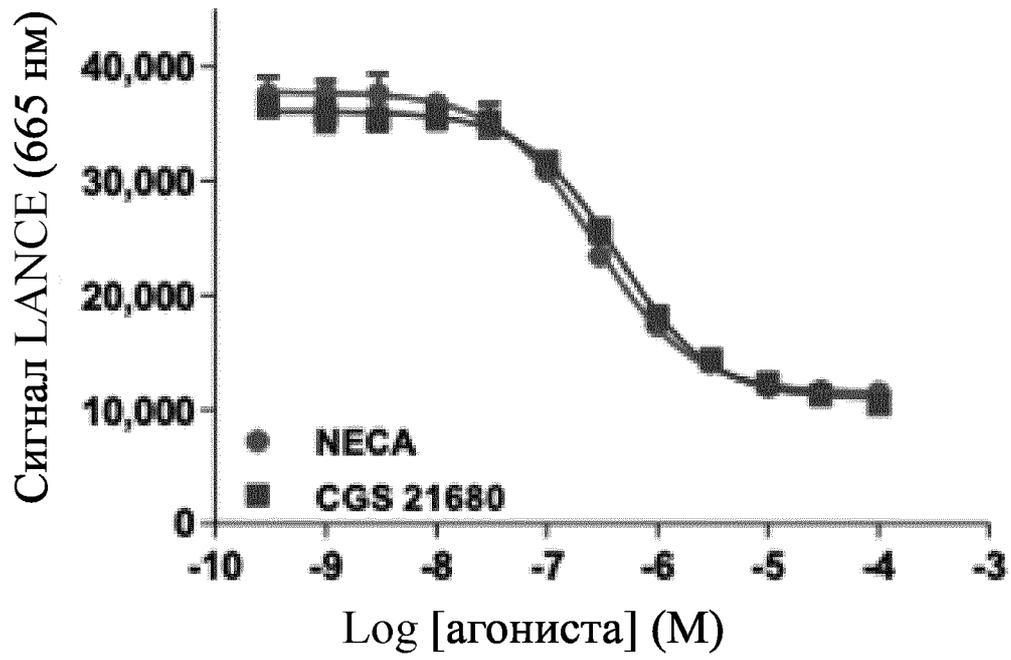


Фиг. 20F

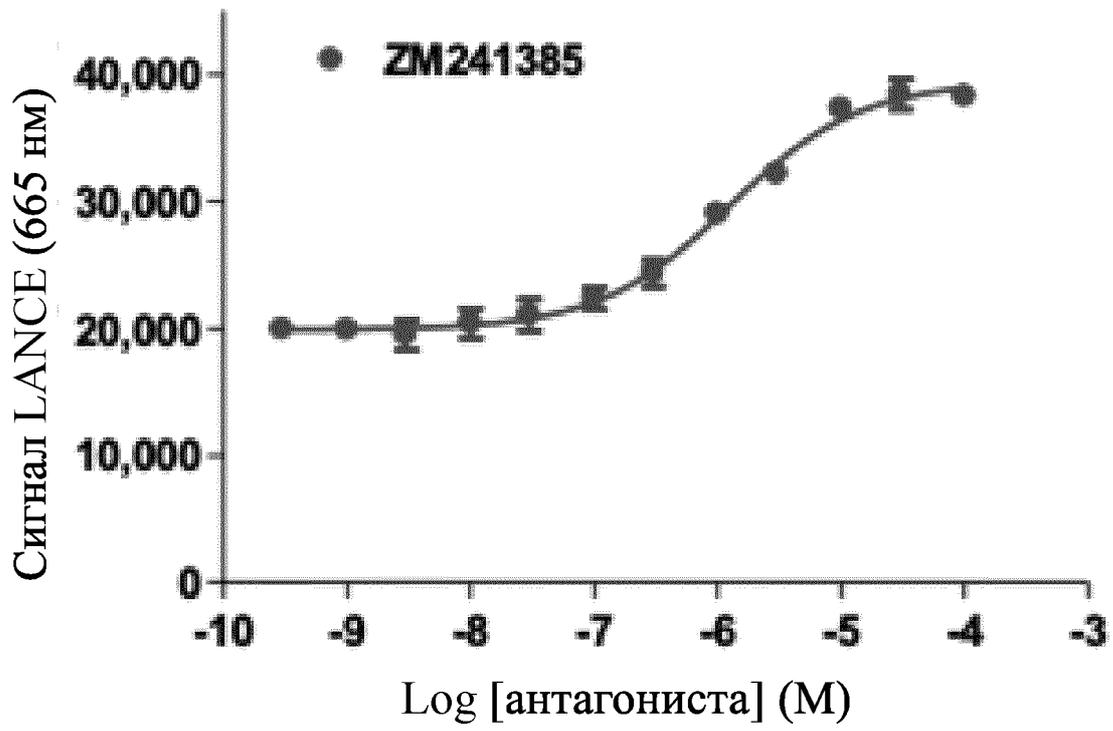
Мышиная иммунная библиотека для белка A2a



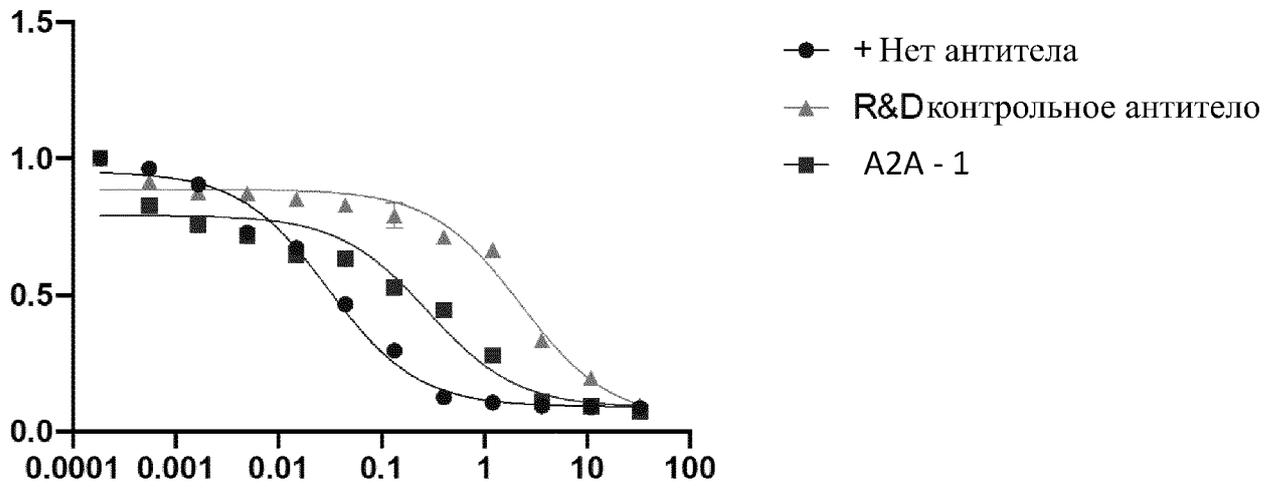
Фиг. 20G



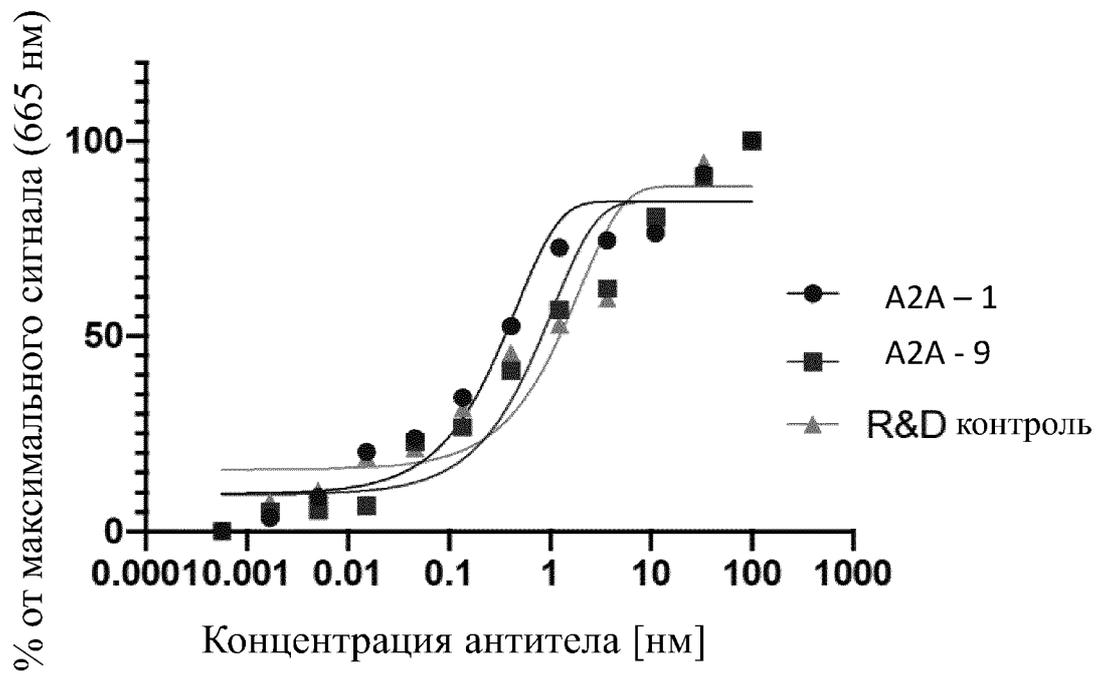
Фиг. 21



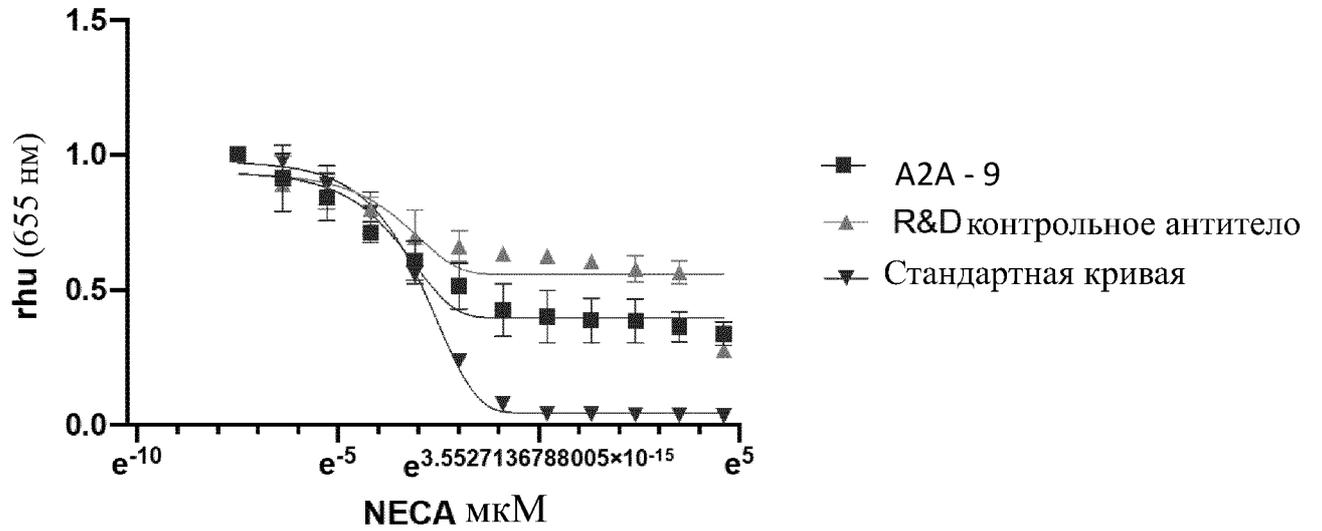
Фиг. 22



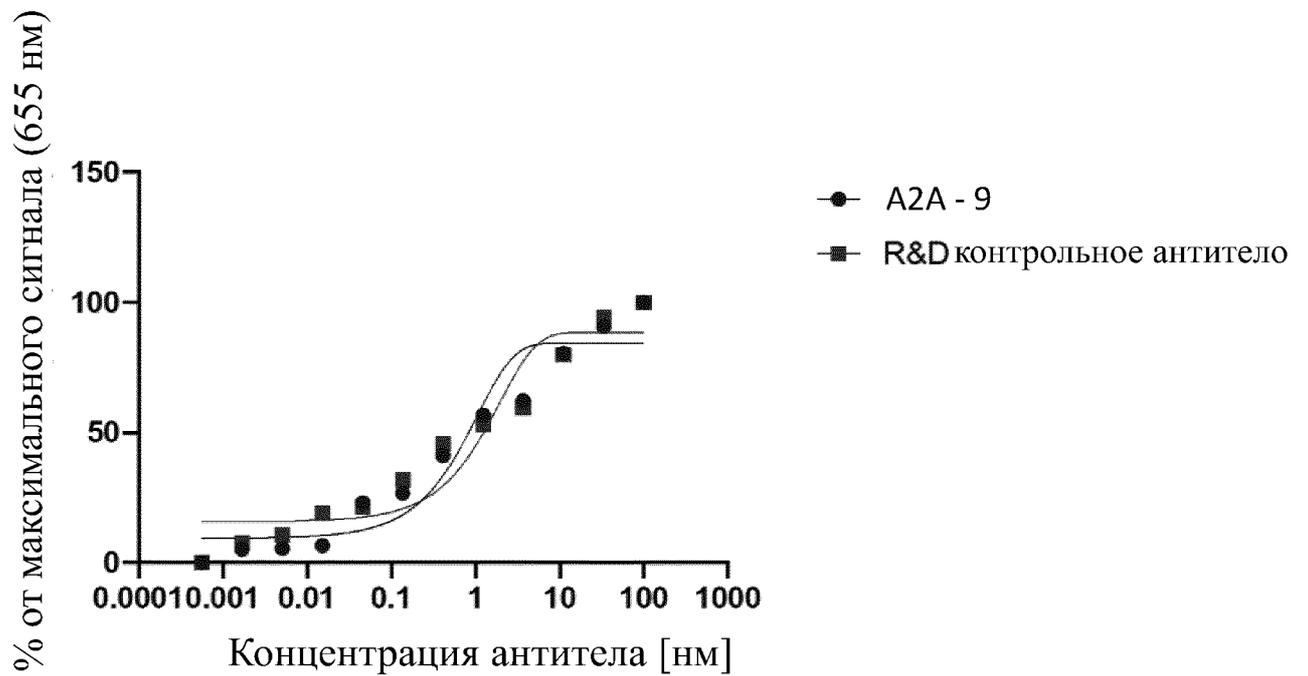
Фиг. 23



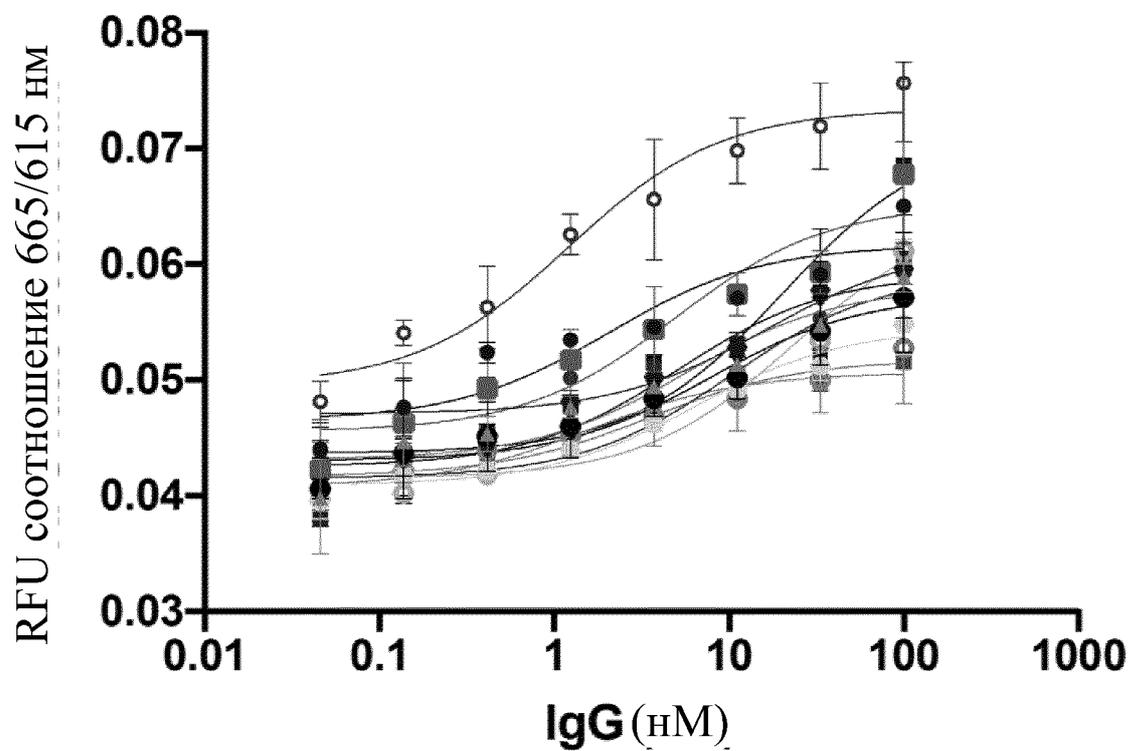
Фиг. 24



Фиг. 25

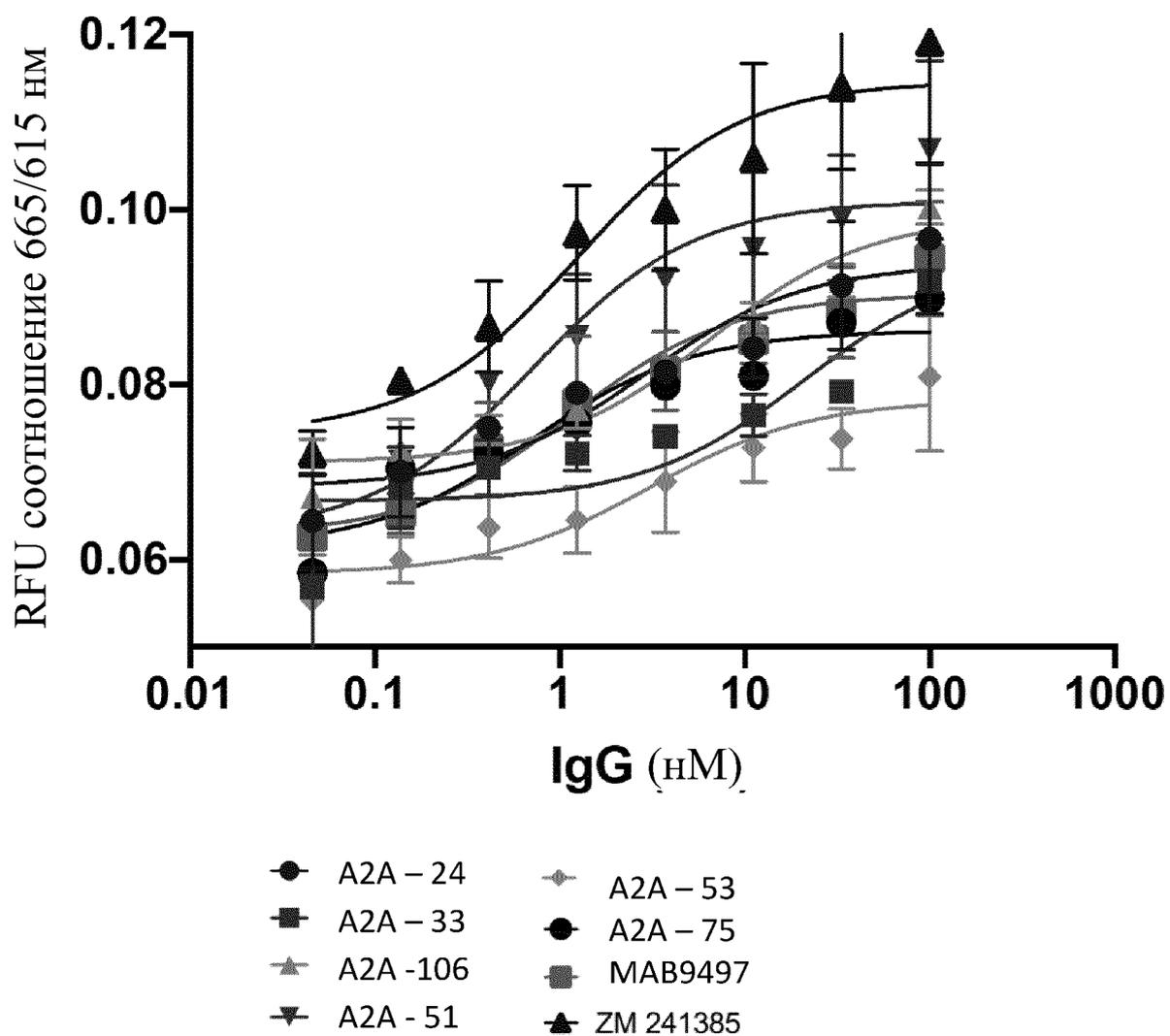


Фиг. 26

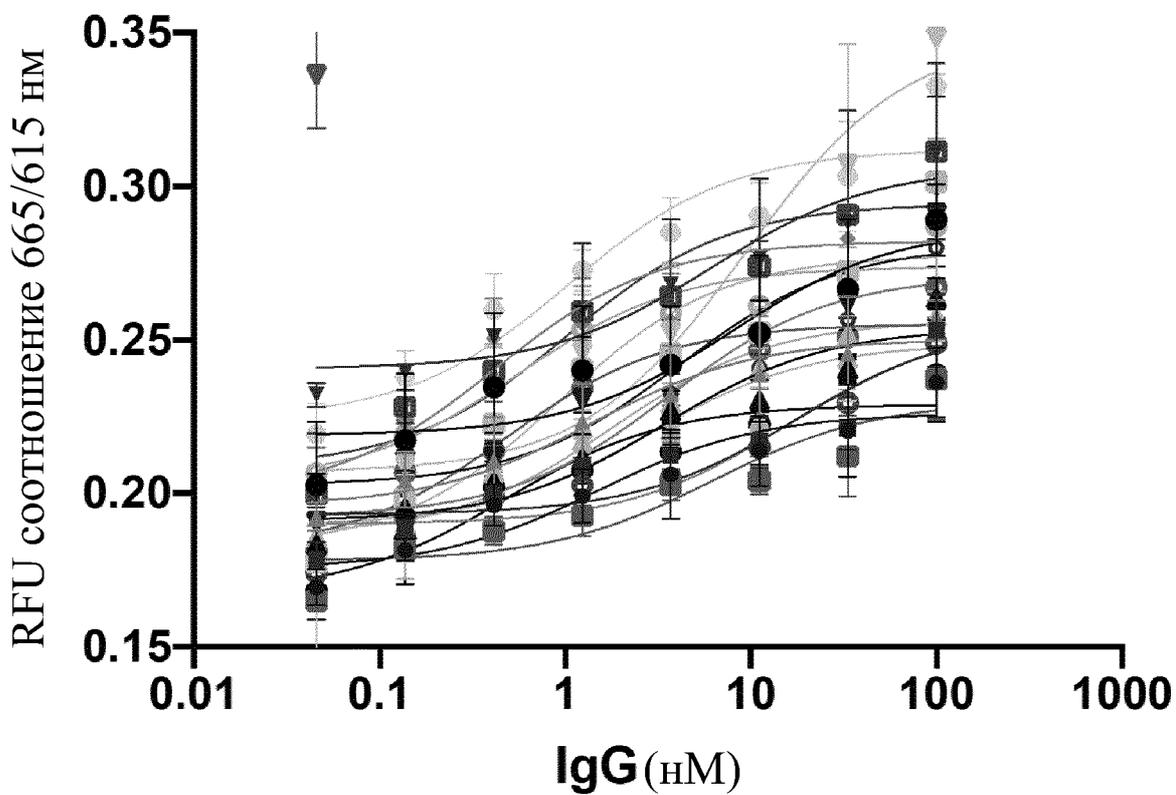


- | | |
|------------|-------------|
| ● A2A – 17 | ■ SC-29_001 |
| ● A2A – 31 | ▼ SC-29_002 |
| ▲ A2A – 35 | ● SC-29_004 |
| ■ A2A – 52 | ○ ZM 241385 |
| ■ A2A – 72 | ○ MAB9497 |
| ● A2A – 73 | |
| ■ A2A – 74 | |

Фиг. 27А



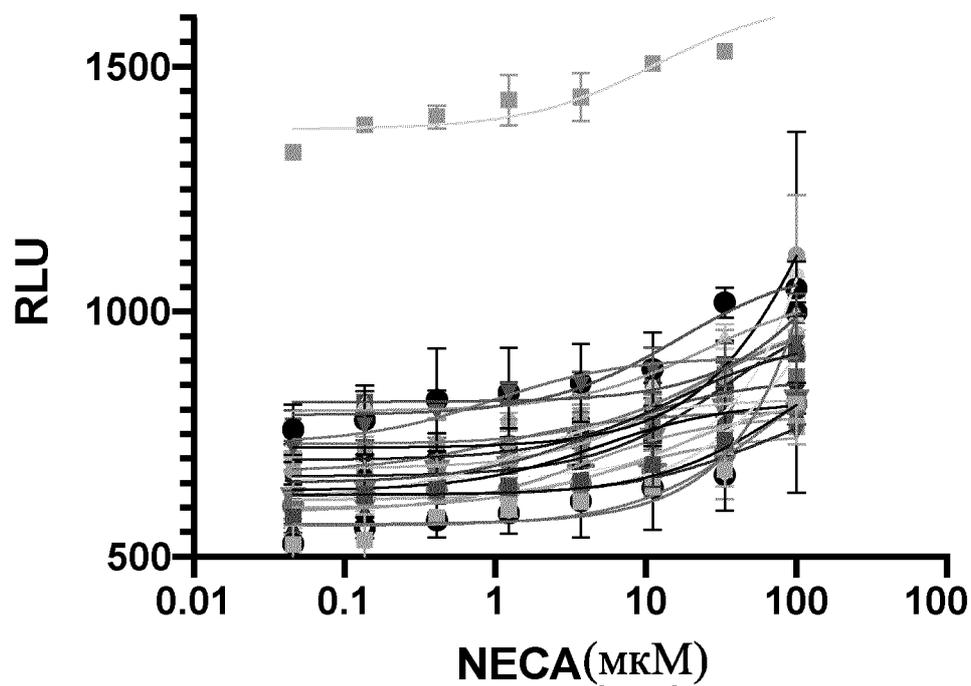
Фиг. 27В



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

Фиг. 27С

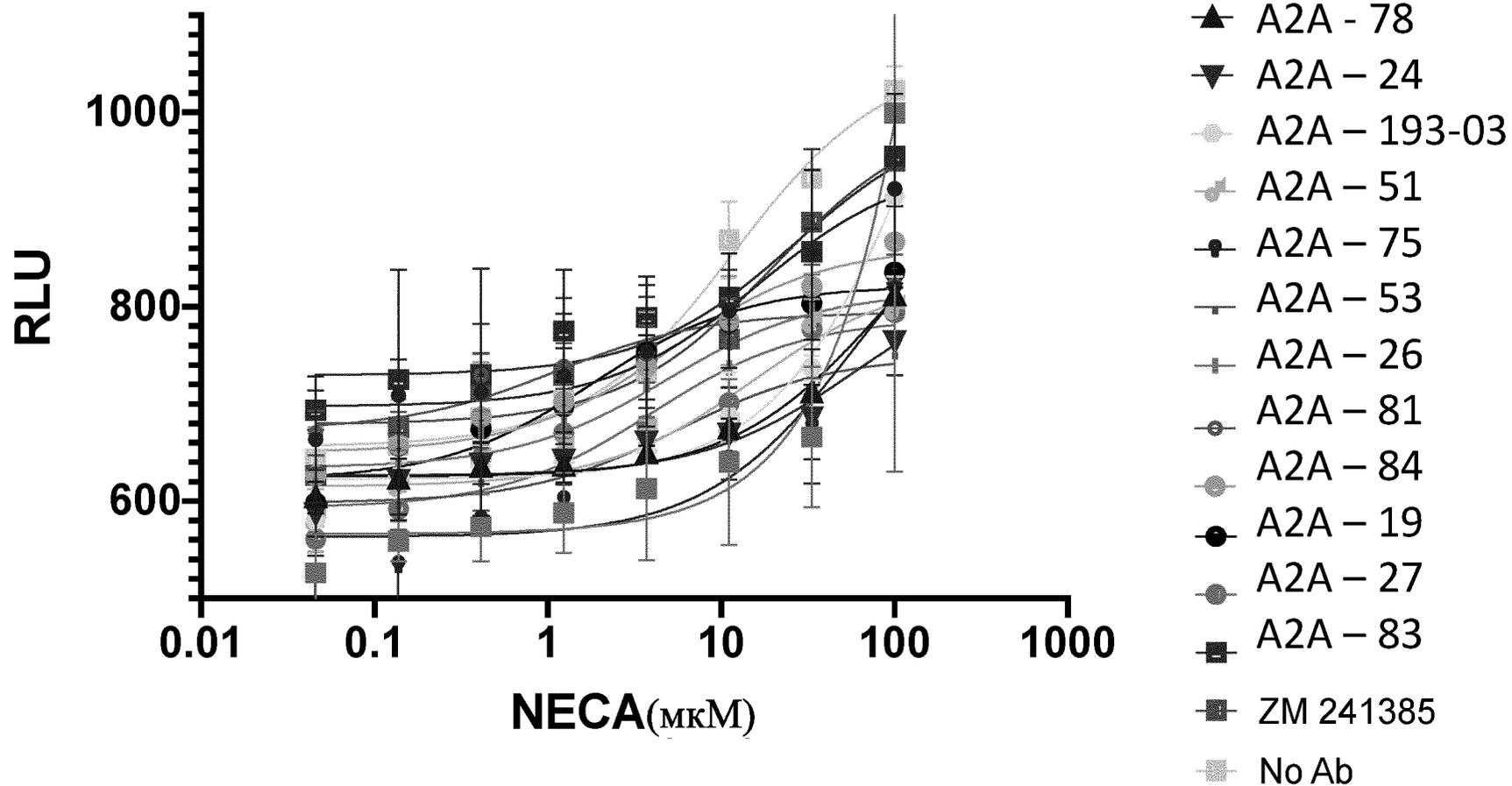
Антагонистический анализ сАМР А2а



- | | |
|-------------|-------------|
| ● A2A - 17 | ▼ A2A - 35 |
| ▼ A2A - 19 | ● A2A - 36 |
| ■ A2A - 24 | ■ A2A - 37 |
| ▼ A2A - 26 | ● A2A - 51 |
| ▲ A2A - 27 | ● A2A - 52 |
| ■ A2A - 31 | ▼ A2A - 53 |
| ★ A2A - 72 | ● A2A - 83 |
| ● A2A - 74 | ■ A2A - 84 |
| ■ A2A - 75 | |
| ⊙ A2A - 77 | |
| ● A2A - 78 | ■ A2A - 254 |
| ▲ A2A - 81 | |
| — ZM 241385 | |
| ● No Ab | |

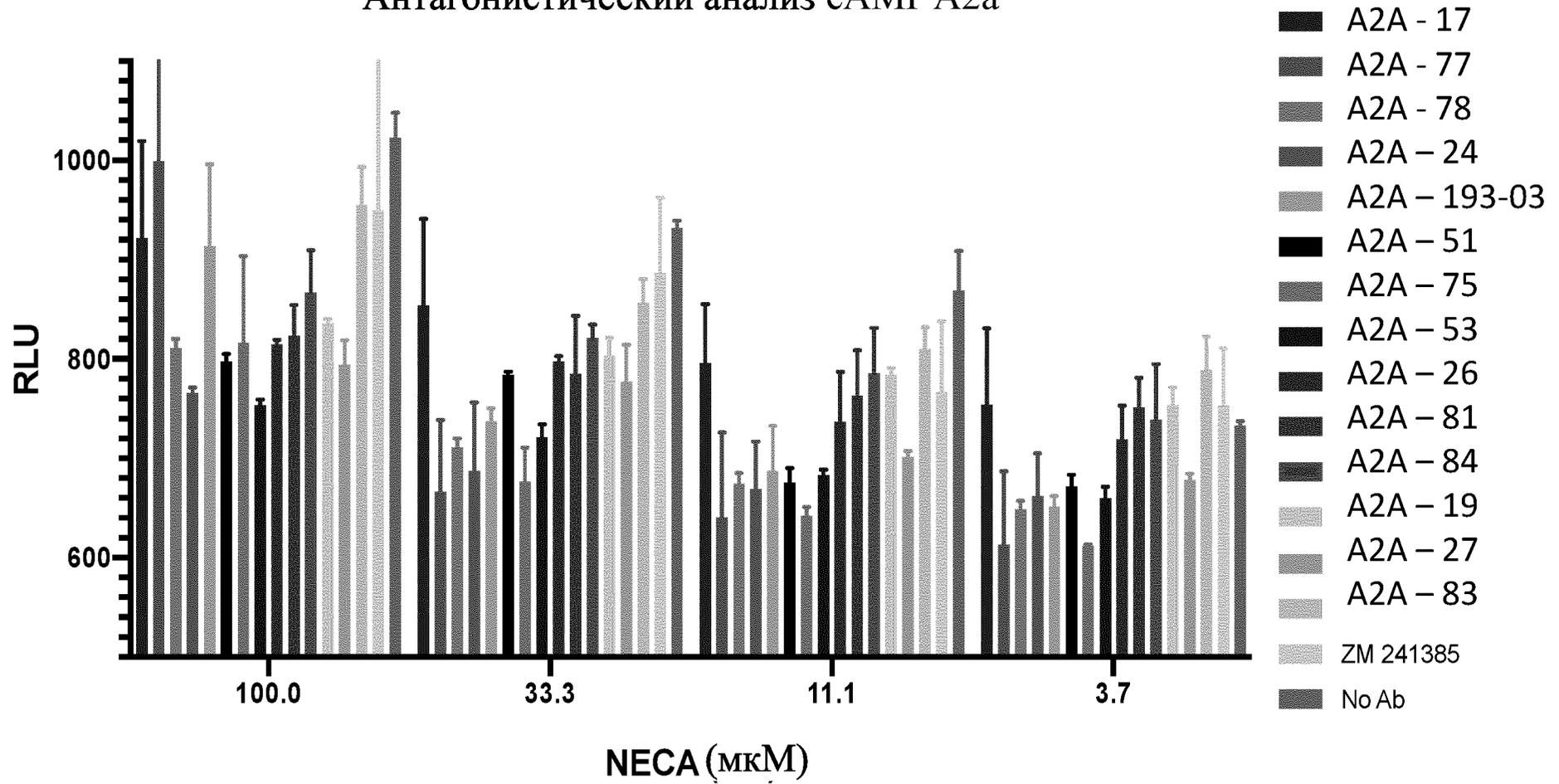
Фиг. 28А

Антагонистический анализ сАМР А2а
 Предварительное ингибирование IgG при 100 нМ



Фиг. 28В

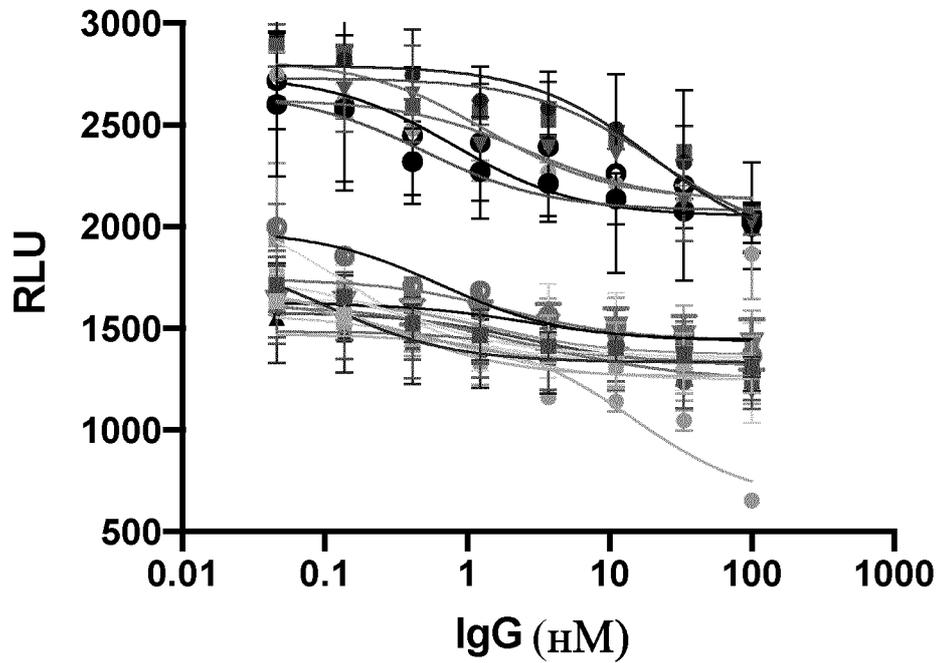
Антагонистический анализ сАМР А2а



56/62

Фиг. 28С

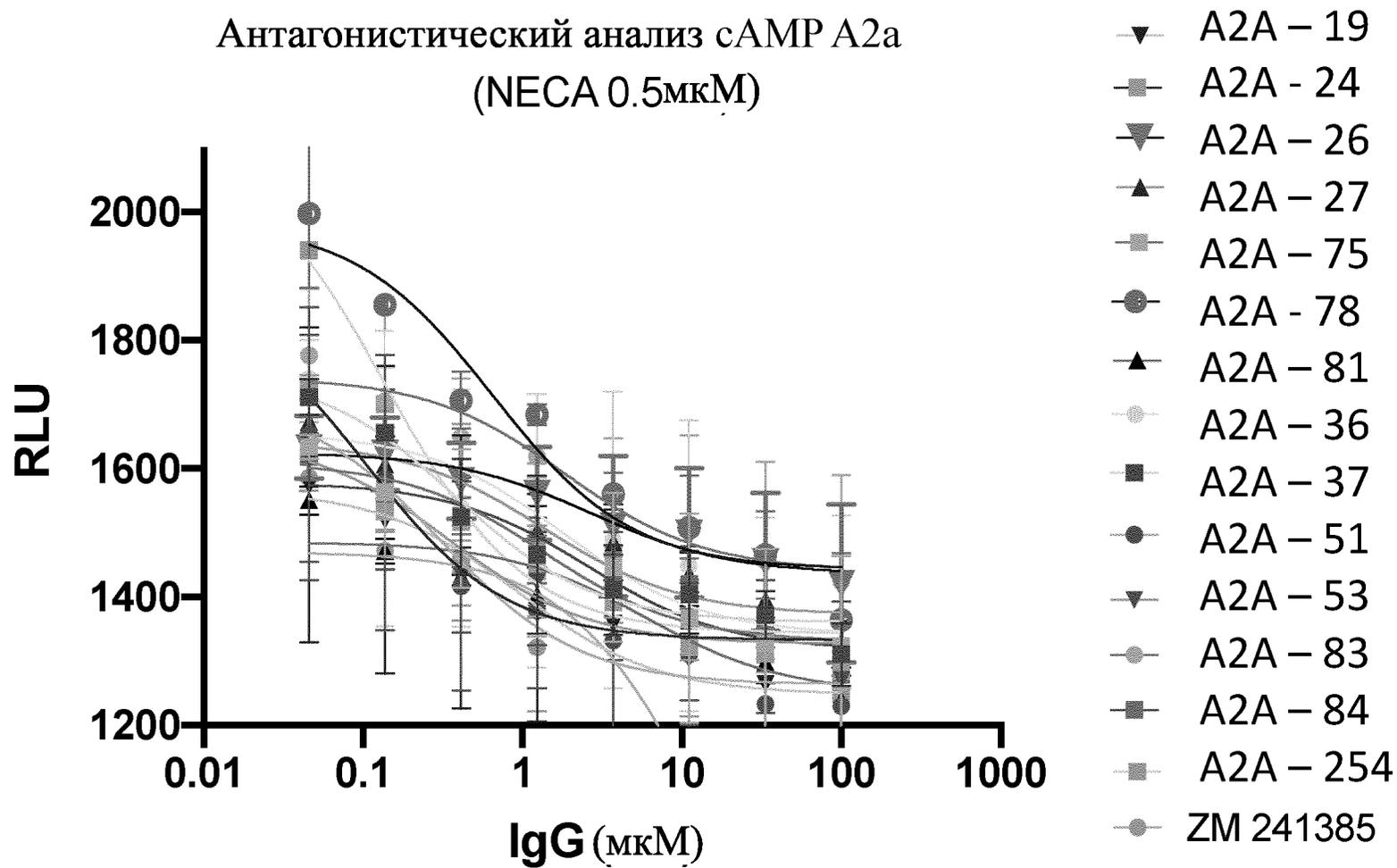
Антагонистический анализ сАМР А2а
NECA 0,5 мкМ



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

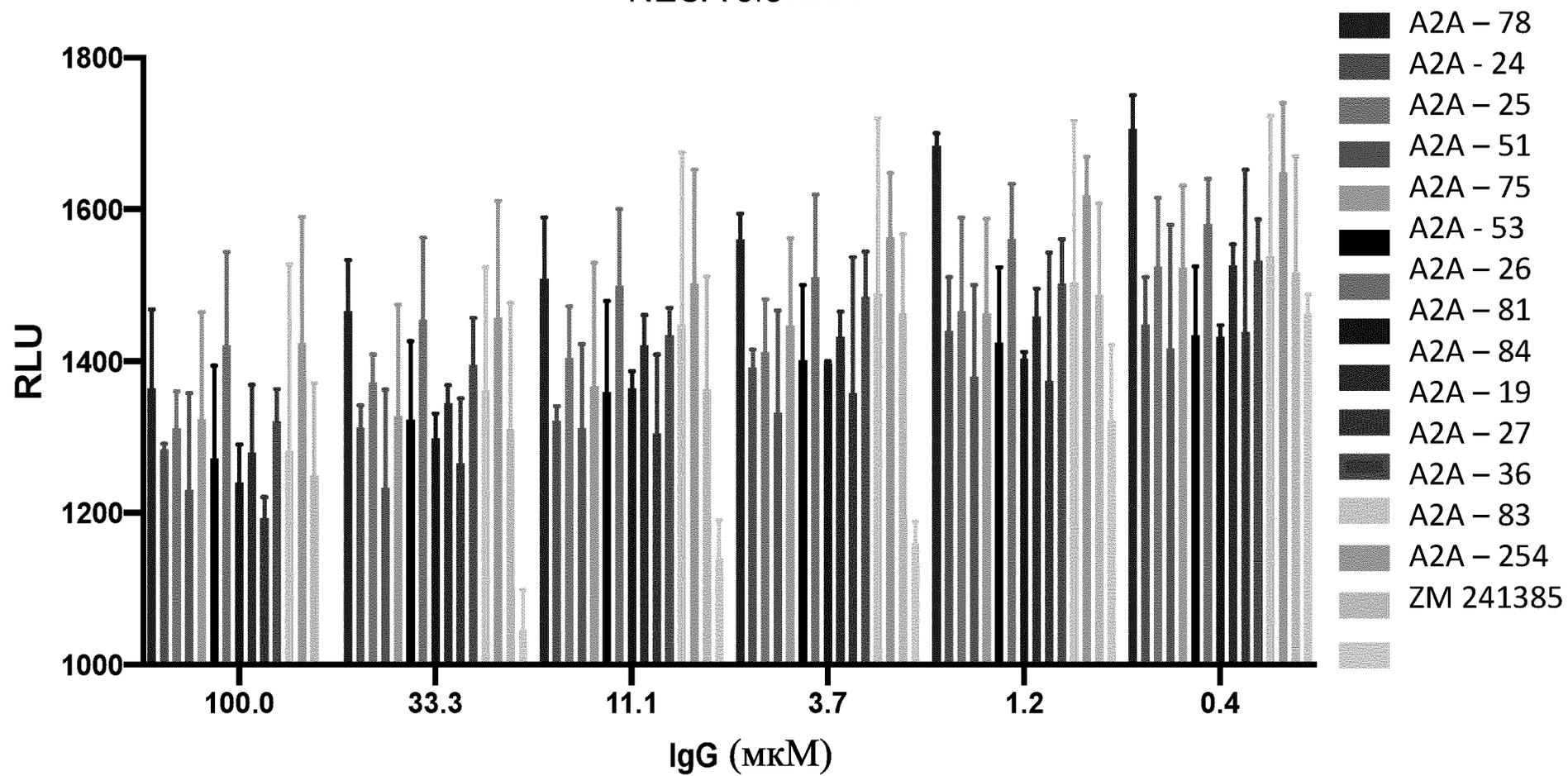
Фиг. 29А

Антагонистический анализ сАМР А2а
(NECA 0.5мкМ)



Фиг. 29В

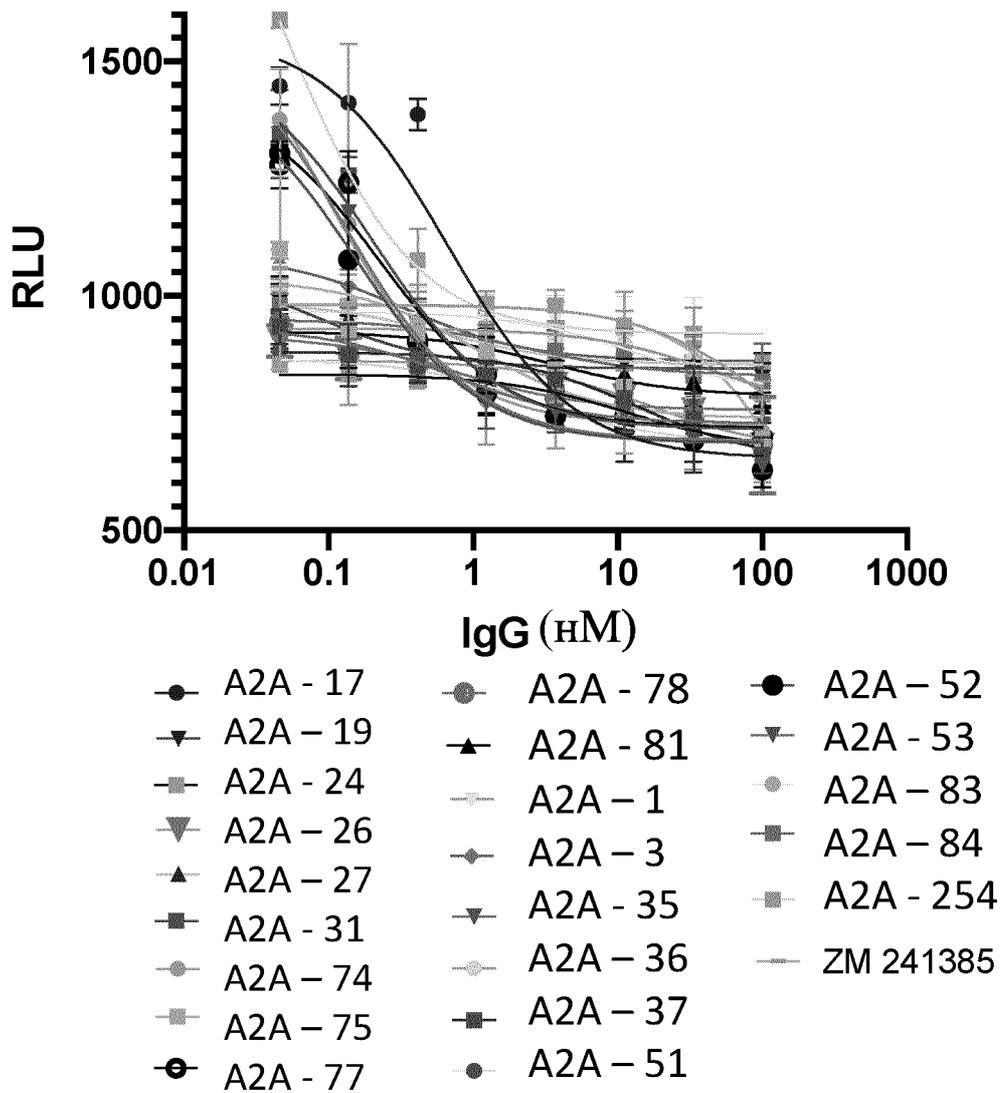
Антагонистический анализ сАМР А2а
NECA 0.5мкМ



59/62

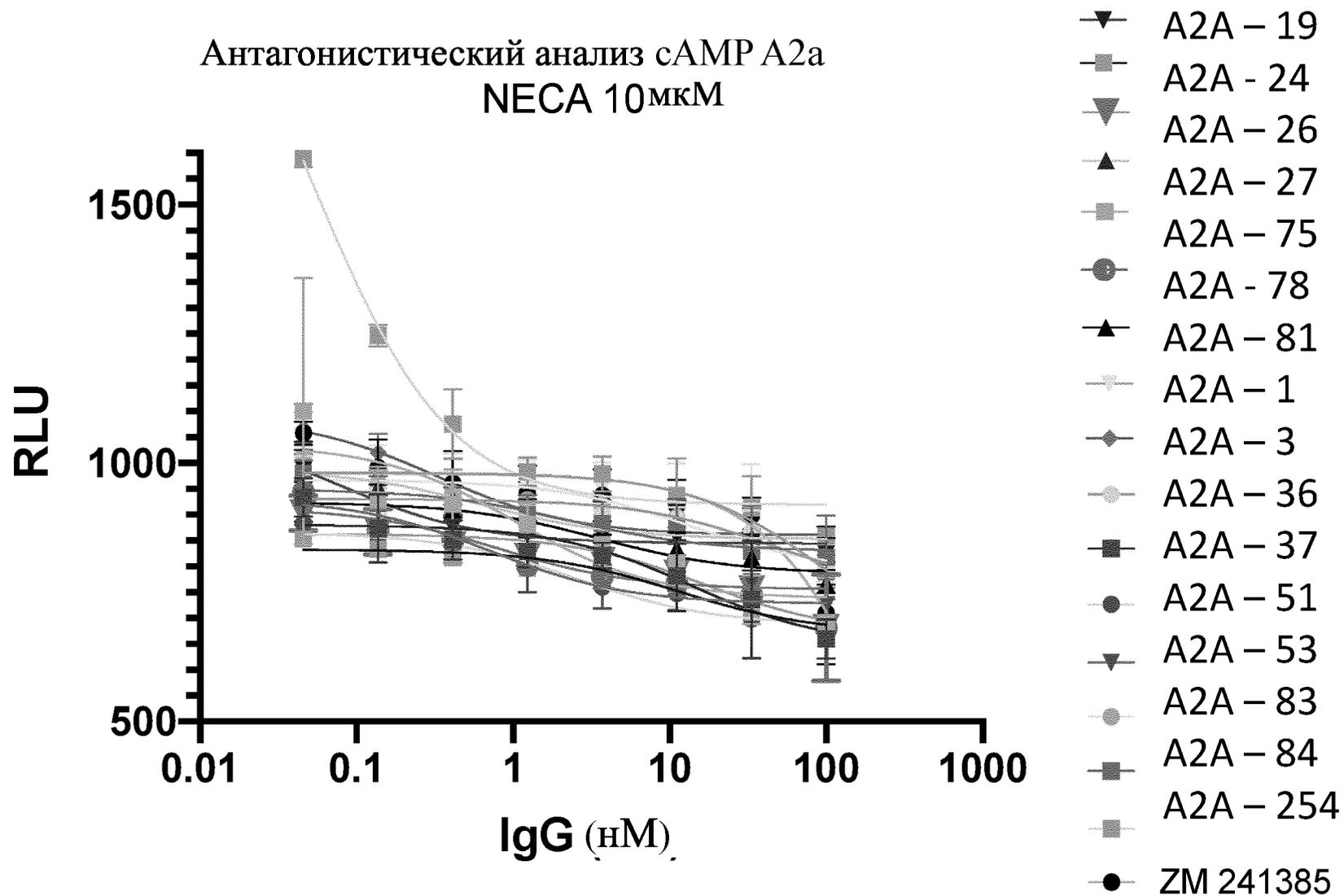
Фиг. 29С

Антагонистический анализ сАМР А2а
NECA 10 мкМ



Фиг. 30А

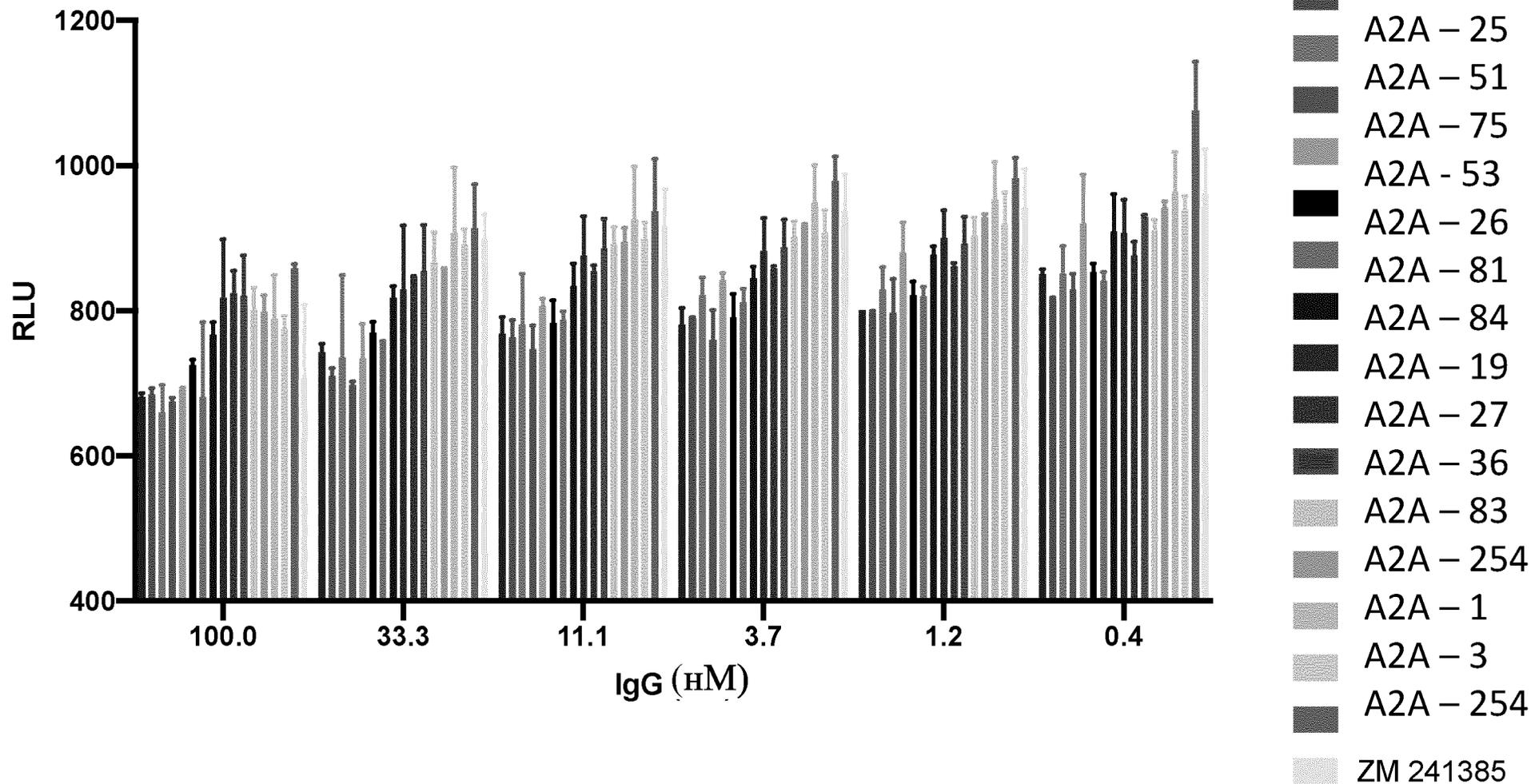
Антагонистический анализ сАМР А2а
NECA 10мкМ



61/62

Фиг. 30В

Антагонистический анализ сАМР А2а
NECA 10μM



Фиг. 30С