

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-500882

(P2018-500882A)

(43) 公表日 平成30年1月18日 (2018.1.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027 (2006.01)</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-525041 (P2017-525041)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成27年11月10日 (2015.11.10)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年7月6日 (2017.7.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/059987		
(87) 国際公開番号	W02016/077369	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開日	平成28年5月19日 (2016.5.19)		園田・小林特許業務法人
(31) 優先権主張番号	62/077, 774	(72) 発明者	ウィルソン, ディアナ グラント
(32) 優先日	平成26年11月10日 (2014.11.10)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ジェネンテック インコーポレイテッド
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腎症の動物モデルおよびそれを治療するための薬剤

## (57) 【要約】

A p o L 1 を発現する非ヒトトランスジェニック動物およびその生成方法が提供される。  
A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させることができる薬剤を同定する方法も提供される。  
さらに、A p o L 1 のヒト変異体に結合する単離抗体が提供される。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

A p o L 1 を発現する、非ヒトトランスジェニック動物。

**【請求項 2】**

前記非ヒトトランスジェニック動物は、i) A p o L 1 の G 0 変異体 ( 配列番号 0 1 ) 、 i i ) A p o L 1 の G 1 変異体 ( 配列番号 0 2 ) 、 i i i ) A p o L 1 の G 2 変異体 ( 配列番号 0 3 ) 、 i v ) A p o L 1 の G 0 変異体および A p o L 1 の G 1 変異体、 v ) A p o L 1 の G 0 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体、 v i ) A p o L 1 の G 1 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体、または v i i ) A p o L 1 の G 0 変異体、 A p o L 1 の G 1 変異体、および A p o L 1 の G 2 変異体を発現する、請求項 1 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

10

**【請求項 3】**

前記動物が齧歯動物である、請求項 1 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

**【請求項 4】**

前記齧歯動物がマウスである、請求項 3 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

**【請求項 5】**

前記非ヒトトランスジェニック動物が腎症を有する、請求項 1 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

**【請求項 6】**

前記腎症は H I V 関連腎症である、請求項 5 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

20

**【請求項 7】**

前記腎症はドキソルビシン誘発性腎症である、請求項 5 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

**【請求項 8】**

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒトトランスジェニック動物に由来する細胞または組織。

**【請求項 9】**

薬剤がヒト A p o L 1 の血清濃度を低下させることができるかどうかを決定する方法であって：

- a) 請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒトトランスジェニック動物におけるヒト A p o L 1 の血清濃度を測定すること；
- b) 前記非ヒトトランスジェニック動物に薬剤を投与すること；および
- c) 前記非ヒトトランスジェニック動物におけるヒト A p o L 1 の血清濃度を測定することを含み；

30

ここで、前記非ヒトトランスジェニック動物におけるヒト A p o L 1 の血清濃度の低下は、該薬剤がヒト A p o L 1 の血清濃度を低下させることができることを示す、方法。

**【請求項 10】**

腎症の進行を減少させることができる薬剤を同定する方法であって：

- a) 請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒトトランスジェニック動物における腎症を誘発すること；
- b) 前記非ヒトトランスジェニック動物に薬剤を投与すること；及び
- c) 非ヒトトランスジェニック動物の腎臓の病理学的表現型に基づき腎症の進行を評価することを含み；

40

該薬剤を投与されていない非ヒトトランスジェニック動物と比較して進行性が低い腎症は、該薬剤が腎症の進行を減少させることができることを同定する、方法。

**【請求項 11】**

前記腎症はドキソルビシンの投与によって誘導される、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記腎症が、ヒト免疫不全ウイルスの一部を含む導入遺伝子を前記非ヒトトランスジェニック動物において発現させることによって誘発される、請求項 10 に記載の方法。

50

## 【請求項 13】

前記薬剤は、i) A p o L 1 のヒト G 0 変異体 (配列番号 0 1)、ii) A p o L 1 のヒト G 0 変異体および A p o L 1 のヒト G 1 変異体 (配列番号 0 2)、iii) A p o L 1 のヒト G 0 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体 (配列番号 0 3)、または iv) A p o L 1 の G 0 変異体、A p o L 1 のヒト G 1 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体に結合する、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記薬剤は、抗体である、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

ヒト A p o L 1 を発現する非ヒトトランスジェニック動物において腎症を誘発することを含む、腎症の動物モデルを生成する方法。

10

## 【請求項 16】

非ヒト動物が、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の非ヒトトランスジェニック動物である、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 17】

腎症が、ヒト免疫不全ウイルスの一部を含む導入遺伝子を前記非ヒト動物において発現させることによって誘発される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記腎症はドキシソルピシンの投与によって誘導される、請求項 15 に記載の方法。

## 【請求項 19】

ドキシソルピシンは、15 mg / kg ~ 40 mg / kg の濃度で投与される、請求項 18 に記載の方法。

20

## 【請求項 20】

ドキシソルピシンは、20 mg / kg ~ 30 mg / kg の濃度で投与される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 21】

ドキシソルピシンは、24 mg / kg ~ 26 mg / kg の濃度で投与される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 22】

ドキシソルピシンは、25 mg / kg の濃度で投与される、請求項 18 に記載の方法。

30

## 【請求項 23】

ドキシソルピシンは単回投与で投与される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 24】

ドキシソルピシンは尾静脈内に投与される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 25】

脱水を防ぐために非ヒト動物を皮下の液体で毎日処置する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 26】

A p o L 1 のヒト G 0 変異体 (配列番号 0 1) 及び A p o L 1 のヒト G 1 変異体 (配列番号 0 2) ならびに A p o L 1 の G 2 変異体 (配列番号 0 3) の一方または両方に結合する、単離抗体。

40

## 【請求項 27】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 26 に記載の前記抗体。

## 【請求項 28】

前記抗体がヒト、ヒト化またはキメラ抗体である、請求項 26 に記載の抗体。

## 【請求項 29】

前記抗体が完全長の I g G 1 抗体である、請求項 26 に記載の抗体。

## 【請求項 30】

前記抗体が A p o L 1 変異体の多量体化を阻止することができる、請求項 26 に記載の抗体。

## 【請求項 31】

50

前記抗体がヒト A p o L 1 の血清濃度を低下させることができる、請求項 2 6 に記載の抗体。

【請求項 3 2】

前記抗体が腎症の進行を減少させることができる、請求項 2 6 に記載の抗体。

【請求項 3 3】

前記腎症が A p o L 1 媒介性腎症である、請求項 3 2 に記載の抗体。

【請求項 3 4】

前記 A p o L 1 媒介性腎症が、H I V 関連腎症、巣状分節性糸球体硬化症関連腎症、鎌状赤血球腎症、移植後の同種移植片喪失に関連する腎症、およびループス腎炎関連腎症からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の抗体。

10

【請求項 3 5】

前記 A p o L 1 媒介性腎症が高血圧関連腎症である、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 6】

前記 A p o L 1 媒介性腎症が糖尿病性腎症である、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 7】

請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の核酸を含む、宿主細胞。

【請求項 3 9】

抗体が産生されるように、請求項 3 8 に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体の産生方法。

20

【請求項 4 0】

請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬製剤。

【請求項 4 1】

薬として使用するための、請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 4 2】

薬の製造における、請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【請求項 4 3】

請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を個体に投与することにより、腎症を有する個体を治療するための方法。

30

【請求項 4 4】

対象における腎症の進行を減少させる方法であって、有効量の請求項 2 6 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の抗体を対象に投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年11月10日に出願された米国仮特許出願第62/077,774号に対する優先権の利益を主張し、その全体を参照により本明細書に組み込む。

40

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。2015年11月10日に作成された該アスキーコピーは、「P32407WO\_PCTSequenceListing.txt」という名前で52,874バイトサイズである。

【0 0 0 3】

本発明は、腎症の非ヒトトランスジェニック動物モデルおよび治療剤を同定するための方法に関する。

【背景技術】

50

## 【0004】

アポリポタンパク質L1 (ApoL1) は、シグナルペプチドを含む、アポリポタンパク質A1を有する6遺伝子ファミリーの唯一のメンバーであり、高密度リポタンパク質 (HDL) 粒子の特に高密度亜種 (HDL<sub>3</sub>) に分泌される (Duchateau et al., 1997)。ApoL1は、アフリカのトリパノソーマ (Trypanosoma brucei brucei) に対するヒトの先天性免疫応答の主要な成分であり、アフリカの睡眠病を引き起こす。トリパノソーマの亜種、T. b. rhodesienseは、野生型ApoL1 (G0とも呼ばれる) に耐性である。しかしながら、アフリカの染色体では共通であるがヨーロッパの染色体には存在しないApoL1の2つの異なる対立遺伝子 (G1およびG2と呼ばれる) は、T. b. Rhodensienseによる感染から保護する (米国特許第7, 585, 511号、同第2012/0128682号を参照されたい)。G1およびG2対立遺伝子はまた、腎症の発症の危険性を増加させ、変異体は、例えば、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS)、高血圧関連腎症 (HTN) およびHIV関連腎症 (HIVAN) に関連する (米国特許第2012/0195902号、同第2012/0003644号を参照されたい)。アフリカ系アメリカ人では、FSGSは早期に発生し、白人と比較して末期腎疾患 (ESRD) へ4~5倍速く進行する (Hsu et al., 2003; Kopp et al., 2011; Parsa et al., 2013)。ApoL1変異体は、糖尿病の状態に関わらず、「高血圧起因の」ESRDの7倍高い確率 (Freedman et al., 2010; Freedman et al., 2011; Parsa et al., 2013)、特発性FSGSの17倍高い確率 (Kopp et al., 2011)、およびHIV関連腎症の29倍高い確率 (Kopp et al., 2011) と関連する。遺伝的関連は、これまでに共通の疾患について報告された中で最も強力なものの1つであり、アフリカ系アメリカ人における白人に対するより高い腎症率についての説明を提供する。これらの疾患は多くの苦しみとなり、米国では何十億ドルもの支出に繋がる。フィルタバリア機能を保護し、腎症を予防するための標的療法は現在利用できない。

10

20

## 【0005】

したがって、かかる疾患の治療のための治療剤を有することが非常に有利であり、望ましいであろう。さらに、薬剤を潜在的な治療薬として同定する方法での使用に適した腎症の動物モデルは有益であろう。

30

## 【発明の概要】

## 【0006】

本発明は、ApoL1を発現する非ヒトトランスジェニック動物およびその生成方法を提供する。ApoL1媒介性腎症の進行を減少させることができる薬剤を同定する方法も提供される。さらに、ApoL1のヒト変異体に結合する単離抗体が提供される。

## 【0007】

一態様において、本発明はヒトApoL1を発現する非ヒトトランスジェニック動物を提供する。いくつかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、i) ApoL1のG0変異体 (配列番号01)、ii) ApoL1のG1変異体 (配列番号02)、iii) ApoL1のG2変異体 (配列番号03)、iv) ApoL1のG0変異体およびApoL1のG1変異体、v) ApoL1のG0変異体およびApoL1のG2変異体、vi) ApoL1のG1変異体およびApoL1のG2変異体、またはvii) ApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体、およびApoL1のG2変異体を発現する。いくつかの実施形態において、動物は、齧歯動物である。幾つかの実施形態では、齧歯動物は、マウスである。幾つかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、腎症を有する。いくつかの実施形態において、腎症はHIV関連腎症である。いくつかの実施形態において、腎症はドキシソルピシン誘発性腎症である。

40

## 【0008】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載の非ヒトトランスジェニック動物に由来する細胞または組織を提供する。

50

## 【0009】

さらに別の態様において、本発明は薬剤がヒトApoL1の血清濃度を低下させることができるかどうかを判定する方法を提供し、該方法は、非ヒトトランスジェニック動物におけるヒトApoL1の血清濃度を測定する、非ヒトトランスジェニック動物に薬剤を投与する、および非ヒトトランスジェニック動物におけるヒトApoL1の血清濃度を測定する工程を含み、ここで非ヒトトランスジェニック動物におけるヒトApoL1の血清濃度の低下は、該薬剤がヒトApoL1の血清濃度を低下させることができることを示す。いくつかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、ヒトApoL1を発現する非ヒトトランスジェニック動物である。いくつかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、i) ApoL1のG0変異体(配列番号01)、ii) ApoL1のG1変異体(配列番号02)、iii) ApoL1のG2変異体(配列番号03)、iv) ApoL1のG0変異体およびApoL1のG1変異体、v) ApoL1のG0変異体およびApoL1のG2変異体、vi) ApoL1のG1変異体およびApoL1のG2変異体、またはvii) ApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体、およびApoL1のG2変異体を発現する。いくつかの実施形態において、動物は、齧歯動物である。幾つかの実施形態では、齧歯動物は、マウスである。幾つかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、腎症を有する。いくつかの実施形態において、腎症はHIV関連腎症である。いくつかの実施形態において、腎症はドキソルビン誘発性腎症である。

10

## 【0010】

20

さらに別の態様において、本発明は腎症の進行を減少させることができる薬剤を同定する方法を提供し、該方法は非ヒトトランスジェニック動物において腎症を誘発する、非ヒトトランスジェニック動物に薬剤を投与する、および非ヒトトランスジェニック動物の腎臓の病理学的表現型に基づき腎症の進行を評価する工程を含み(実施例に記載の通り)、ここで該薬剤と共投与されていない非ヒトトランスジェニック動物と比較して進行性が低い腎症は、該薬剤が腎症の進行を減少させることができることを同定する。いくつかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、ヒトApoL1を発現する非ヒトトランスジェニック動物である。いくつかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、i) ApoL1のG0変異体(配列番号01)、ii) ApoL1のG1変異体(配列番号02)、iii) ApoL1のG2変異体(配列番号03)、iv) ApoL1のG0変異体およびApoL1のG1変異体、v) ApoL1のG0変異体およびApoL1のG2変異体、vi) ApoL1のG1変異体およびApoL1のG2変異体、またはvii) ApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体、およびApoL1のG2変異体を発現する。いくつかの実施形態において、動物は、齧歯動物である。幾つかの実施形態では、齧歯動物は、マウスである。いくつかの実施形態において、腎症はドキソルビシンの投与によって誘発される。いくつかの実施形態において、腎症が、ヒト免疫不全ウイルスの一部を含む導入遺伝子を非ヒトトランスジェニック動物において発現させることによって誘発される。いくつかの実施形態において、薬剤は、i) ApoL1のヒトG0変異体(配列番号01)、ii) ApoL1のヒトG0変異体およびApoL1のヒトG1変異体(配列番号02)、iii) ApoL1のヒトG0変異体およびApoL1のG2変異体(配列番号03)、またはiv) ApoL1のG0変異体、ApoL1のヒトG1変異体およびApoL1のG2変異体に結合する。いくつかの実施形態において、薬剤は、抗体である。

30

40

## 【0011】

さらに別の態様において、本発明はヒトApoL1を発現する非ヒトトランスジェニック動物において腎症を誘発することを含む、腎症の動物モデルを生成する方法が提供する。いくつかの実施形態において、腎症が、ヒト免疫不全ウイルスの一部を含む導入遺伝子を非ヒト動物において発現させることによって誘発される。いくつかの実施形態において、腎症はドキソルビシンの投与によって誘発される。いくつかの実施形態において、ドキソルビシンは、15mg/kg~40mg/kgの濃度で投与される。いくつかの実施形

50

態において、ドキソルピシンは、 $20\text{ mg/kg} \sim 30\text{ mg/kg}$ の濃度で投与される。いくつかの実施形態において、ドキソルピシンは、 $24\text{ mg/kg} \sim 26\text{ mg/kg}$ の濃度で投与される。いくつかの特定の実施形態において、ドキソルピシンは、 $25\text{ mg/kg}$ の濃度で投与される。いくつかの実施形態において、ドキソルピシンは単回投与で投与される。いくつかの実施形態において、ドキソルピシンは尾静脈内に投与される。いくつかの実施形態において、脱水を防ぐために非ヒト動物を皮下の液体で毎日処置する。いくつかの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、i) A p o L 1のG 0変異体(配列番号01)、ii) A p o L 1のG 1変異体(配列番号02)、iii) A p o L 1のG 2変異体(配列番号03)、iv) A p o L 1のG 0変異体およびA p o L 1のG 1変異体、v) A p o L 1のG 0変異体およびA p o L 1のG 2変異体、vi) A p o L 1のG 1変異体およびA p o L 1のG 2変異体、またはvii) A p o L 1のG 0変異体、A p o L 1のG 1変異体、およびA p o L 1のG 2変異体を発現する。いくつかの実施形態において、動物は、齧歯動物である。幾つかの実施形態では、齧歯動物は、マウスである。

#### 【0012】

別の態様において、本発明はA p o L 1のヒトG 0変異体(配列番号01)およびA p o L 1のヒトG 1変異体(配列番号02)ならびにA p o L 1のG 2変異体(配列番号03)の一方または両方に結合する、単離抗体を提供する。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、完全長のI g G 1抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はA p o L 1変異体の多量体化を阻止することができる。いくつかの実施形態において、抗体はヒトA p o L 1の血清濃度を低下させることができる。いくつかのある特定の実施形態において、抗体は腎症の進行を減少させることができる。いくつかの実施形態において、腎症はA p o L 1媒介性腎症である。いくつかの実施形態において、A p o L 1媒介性腎症が、H I V関連腎症、巣状分節性糸球体硬化症関連腎症、鎌状赤血球腎症、移植後の同種移植片喪失に関連する腎症、およびループス腎炎関連腎症からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、A p o L 1媒介性腎症は高血圧関連腎症である。いくつかの実施形態において、A p o L 1媒介性腎症は糖尿病性腎症である。

#### 【0013】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載の抗体をコードする単離核酸を提供する。さらに別の態様において、本発明は上述のような核酸を含む宿主細胞を提供する。さらに別の態様において、本発明は前記抗体が産生されるように、上述の宿主細胞を培養することを含む、抗体の産生方法を提供する。さらに別の態様において、本発明は本明細書に説明される抗体と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤を提供する。さらに別の態様において、本発明は、薬として使用するための、本明細書に記載の抗体を提供する。さらに別の態様において、本発明は、薬の製造における本発明に記載の抗体の使用を提供する。さらに別の態様において、本発明は記載の抗体を個体に投与することにより腎症を有する個体を治療する方法が提供する。さらに、一態様において、本発明は対象における腎症の進行を減少させる方法であって、有効量の

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図1A】A p o L 1のG 0変異体(図1A)、A p o L 1のG 1変異体(図1B)及びA p o L 1のG 2変異体(図1C)のためのトランスジーンの概略図を示す。

【図1B】A p o L 1のG 0変異体(図1A)、A p o L 1のG 1変異体(図1B)及びA p o L 1のG 2変異体(図1C)のためのトランスジーンの概略図を示す。

【図1C】A p o L 1のG 0変異体(図1A)、A p o L 1のG 1変異体(図1B)及びA p o L 1のG 2変異体(図1C)のためのトランスジーンの概略図を示す。

【図2A】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的A p o L 1の検出を密度

勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2B】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2C】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2D】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2E】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2F】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2G】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図2H】図2A～Hは、トランスジェニックマウスの血清学的ApoL1の検出を密度勾配遠心分離法を用いて主要リポタンパク質分類のHDL 3及びVHDLフラクション中で検出できることを示す。略語：VLDLは超低密度リポタンパク質であり、IFは中間フラクションであり、HDLは高密度リポタンパク質であり、VHDLは超高密度リポタンパク質である。

【図3A】基準曲線に対するApoL1(wt)のG0変異体(図3A)かApoL1のG2変異体(図3B)のどちらかの血清を用いてELISAにより決定したトランスジェニックマウス及びヒトドナーの血清学的ApoL1濃度を示す。

【図3B】基準曲線に対するApoL1(wt)のG0変異体(図3A)かApoL1のG2変異体(図3B)のどちらかの血清を用いてELISAにより決定したトランスジェニックマウス及びヒトドナーの血清学的ApoL1濃度を示す。

【図4A-1】定量PCRにより決定した腎臓、肝臓、及び肺内のApoL1の発現を示す(図4A-1、図4A-2)。PBSかん流マウスの肝臓及び肺のホモジネート上で、ApoL1に対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した(図4B)。CHO-1K細胞内のApoL1、ApoL2またはコントロール一過性トランスフェクションのライセートを用いたウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッ

10

20

30

40

50



ト法を実施した（図４Ｃ）。

【図４Ａ－２】定量ＰＣＲにより決定した腎臓、肝臓、及び肺内のＡｐｏＬ１の発現を示す（図４Ａ－１、図４Ａ－２）。ＰＢＳかん流マウスの肝臓及び肺のホモジネート上で、ＡｐｏＬ１に対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した（図４Ｂ）。ＣＨＯ－１Ｋ細胞内のＡｐｏＬ１、ＡｐｏＬ２またはコントロール過性トランスフェクションのライセートを用いたウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した（図４Ｃ）。

【図４Ｂ】定量ＰＣＲにより決定した腎臓、肝臓、及び肺内のＡｐｏＬ１の発現を示す（図４Ａ－１、図４Ａ－２）。ＰＢＳかん流マウスの肝臓及び肺のホモジネート上で、ＡｐｏＬ１に対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した（図４Ｂ）。ＣＨＯ－１Ｋ細胞内のＡｐｏＬ１、ＡｐｏＬ２またはコントロール過性トランスフェクションのライセートを用いたウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した（図４Ｃ）。

【図４Ｃ】定量ＰＣＲにより決定した腎臓、肝臓、及び肺内のＡｐｏＬ１の発現を示す（図４Ａ－１、図４Ａ－２）。ＰＢＳかん流マウスの肝臓及び肺のホモジネート上で、ＡｐｏＬ１に対するポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した（図４Ｂ）。ＣＨＯ－１Ｋ細胞内のＡｐｏＬ１、ＡｐｏＬ２またはコントロール過性トランスフェクションのライセートを用いたウサギポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した（図４Ｃ）。

【図５】未治療トランスジェニックネガティブマウス及びＡｐｏＬ１（ｗｔ）のＧ０変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体を発現するマウス内の尿タンパク値を示す。

【図６】それぞれ、５～７日目及び９～１１日目までの尿タンパクに対する種々のドキソルビシン投与の効果を示す（遺伝子型当たり $n = 3 \sim 5$ 、平均は $\pm S E M$ である）。

【図７Ａ】ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ までで７日目までの短い暴露の効果を示す（図７Ａ、ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ で治療した遺伝子型当たり $n = 3 \sim 6$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、Ｐ値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。ドキソルビシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｂ）、ＰＢＳで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｃ）、ＡｐｏＬ１（ｗｔ）のＧ０変異体（図７Ｄ、図７Ｅ）またはＡｐｏＬ１のＧ２変異体（図７Ｆ、図７Ｇ）を発現するトランスジェニックマウスのＨ＆Ｅ染色腎組織。

【図７Ｂ】ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ までで７日目までの短い暴露の効果を示す（図７Ａ、ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ で治療した遺伝子型当たり $n = 3 \sim 6$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、Ｐ値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。ドキソルビシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｂ）、ＰＢＳで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｃ）、ＡｐｏＬ１（ｗｔ）のＧ０変異体（図７Ｄ、図７Ｅ）またはＡｐｏＬ１のＧ２変異体（図７Ｆ、図７Ｇ）を発現するトランスジェニックマウスのＨ＆Ｅ染色腎組織。

【図７Ｃ】ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ までで７日目までの短い暴露の効果を示す（図７Ａ、ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ で治療した遺伝子型当たり $n = 3 \sim 6$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、Ｐ値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。ドキソルビシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｂ）、ＰＢＳで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｃ）、ＡｐｏＬ１（ｗｔ）のＧ０変異体（図７Ｄ、図７Ｅ）またはＡｐｏＬ１のＧ２変異体（図７Ｆ、図７Ｇ）を発現するトランスジェニックマウスのＨ＆Ｅ染色腎組織。

【図７Ｄ】ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ までで７日目までの短い暴露の効果を示す（図７Ａ、ドキソルビシン $25 \text{ mg / kg}$ で治療した遺伝子型当たり $n = 3 \sim 6$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、Ｐ値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。ドキソルビシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｂ）、ＰＢＳで治療したトランスジェニックネガティブ動物（図７Ｃ）、ＡｐｏＬ１（ｗｔ）のＧ０変異体（図７Ｄ、図７Ｅ）またはＡｐｏＬ１のＧ２変異体（図７Ｆ、図７Ｇ）を発現するトランスジェニックマウスのＨ＆Ｅ染色腎

10

20

30

40

50

組織。

【図 7 E】ドキシソルピシン 25 mg / kg までで 7 日目までの短い暴露の効果を示す ( 図 7 A、ドキシソルピシン 25 mg / kg で治療した遺伝子型当たり  $n = 3 \sim 6$  であり、平均は  $\pm S E M$  であり、P 値は等分散両側 t 検定を表す)。ドキシソルピシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物 ( 図 7 B )、P B S で治療したトランスジェニックネガティブ動物 ( 図 7 C )、A p o L 1 ( w t ) の G 0 変異体 ( 図 7 D、図 7 E ) または A p o L 1 の G 2 変異体 ( 図 7 F、図 7 G ) を発現するトランスジェニックマウスの H & E 染色腎組織。

【図 7 F】ドキシソルピシン 25 mg / kg までで 7 日目までの短い暴露の効果を示す ( 図 7 A、ドキシソルピシン 25 mg / kg で治療した遺伝子型当たり  $n = 3 \sim 6$  であり、平均は  $\pm S E M$  であり、P 値は等分散両側 t 検定を表す)。ドキシソルピシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物 ( 図 7 B )、P B S で治療したトランスジェニックネガティブ動物 ( 図 7 C )、A p o L 1 ( w t ) の G 0 変異体 ( 図 7 D、図 7 E ) または A p o L 1 の G 2 変異体 ( 図 7 F、図 7 G ) を発現するトランスジェニックマウスの H & E 染色腎組織。

【図 7 G】ドキシソルピシン 25 mg / kg までで 7 日目までの短い暴露の効果を示す ( 図 7 A、ドキシソルピシン 25 mg / kg で治療した遺伝子型当たり  $n = 3 \sim 6$  であり、平均は  $\pm S E M$  であり、P 値は等分散両側 t 検定を表す)。ドキシソルピシンで治療したトランスジェニックネガティブ動物 ( 図 7 B )、P B S で治療したトランスジェニックネガティブ動物 ( 図 7 C )、A p o L 1 ( w t ) の G 0 変異体 ( 図 7 D、図 7 E ) または A p o L 1 の G 2 変異体 ( 図 7 F、図 7 G ) を発現するトランスジェニックマウスの H & E 染色腎組織。

【図 8】21 日後の A p o L 1 G 2 変異体を発現するドキシソルピシンで治療したトランスジェニックマウスの体重減少を示す ( 遺伝子型当たり  $n = 5$ 、平均は  $\pm S E M$  であり、P 値は等分散両側 t 検定を表す)。

【図 9】ドキシソルピシンで治療した A p o L 1 の G 2 変異体を発現するマウスのタンパク尿を示す。アルブミン濃度をクレアチニン値に正規化し ( ドキシソルピシン ( アドリアマイシン ( 登録商標 ) ) 25 mg / kg で治療した遺伝子型当たり  $n = 3 \sim 5$  であり、平均は  $\pm S E M$  であり、P 値は等分散両側 t 検定を表す)。

【図 10 A】P B S 治療マウスの有足細胞 ( 図 10 A )、ドキシソルピシン治療トランスジェニックネガティブマウス ( 図 10 B )、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウス ( 図 10 C ) 及び A p o L 1 の G 2 変異体を発現するマウス ( 図 10 D ) の 5000 倍透過型電子顕微鏡画像を示す。複数の足突起 ( F P ) 及び介在性スリット隔膜 ( 矢印 ) をさらに図示する。

【図 10 B】P B S 治療マウスの有足細胞 ( 図 10 A )、ドキシソルピシン治療トランスジェニックネガティブマウス ( 図 10 B )、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウス ( 図 10 C ) 及び A p o L 1 の G 2 変異体を発現するマウス ( 図 10 D ) の 5000 倍透過型電子顕微鏡画像を示す。複数の足突起 ( F P ) 及び介在性スリット隔膜 ( 矢印 ) をさらに図示する。

【図 10 C】P B S 治療マウスの有足細胞 ( 図 10 A )、ドキシソルピシン治療トランスジェニックネガティブマウス ( 図 10 B )、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウス ( 図 10 C ) 及び A p o L 1 の G 2 変異体を発現するマウス ( 図 10 D ) の 5000 倍透過型電子顕微鏡画像を示す。複数の足突起 ( F P ) 及び介在性スリット隔膜 ( 矢印 ) をさらに図示する。

【図 10 D】P B S 治療マウスの有足細胞 ( 図 10 A )、ドキシソルピシン治療トランスジェニックネガティブマウス ( 図 10 B )、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウス ( 図 10 C ) 及び A p o L 1 の G 2 変異体を発現するマウス ( 図 10 D ) の 5000 倍透過型電子顕微鏡画像を示す。複数の足突起 ( F P ) 及び介在性スリット隔膜 ( 矢印 ) をさらに図示する。

【図 11 A - E】図 11 A ~ T は、それぞれ、ドキシソルピシンまたは P B S で治療したト

ランスジェニック動物内の異なる倍率（５倍、２０倍）と異なる染色（Ｈ＆Ｅ、ＰＡＳ、マッソントリクローム染色）における腎障害の進行を示す。

【図１１Ｆ－Ｉ】図１１Ａ～Ｔは、それぞれ、ドキシソルビンまたはＰＢＳで治療したトランスジェニック動物内の異なる倍率（５倍、２０倍）と異なる染色（Ｈ＆Ｅ、ＰＡＳ、マッソントリクローム染色）における腎障害の進行を示す。

【図１１Ｊ－Ｍ】図１１Ａ～Ｔは、それぞれ、ドキシソルビンまたはＰＢＳで治療したトランスジェニック動物内の異なる倍率（５倍、２０倍）と異なる染色（Ｈ＆Ｅ、ＰＡＳ、マッソントリクローム染色）における腎障害の進行を示す。

【図１１Ｎ－Ｑ】図１１Ａ～Ｔは、それぞれ、ドキシソルビンまたはＰＢＳで治療したトランスジェニック動物内の異なる倍率（５倍、２０倍）と異なる染色（Ｈ＆Ｅ、ＰＡＳ、マッソントリクローム染色）における腎障害の進行を示す。

【図１１Ｒ－Ｔ】図１１Ａ～Ｔは、それぞれ、ドキシソルビンまたはＰＢＳで治療したトランスジェニック動物内の異なる倍率（５倍、２０倍）と異なる染色（Ｈ＆Ｅ、ＰＡＳ、マッソントリクローム染色）における腎障害の進行を示す。

【図１２Ａ】図１２Ａ～Ｃは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対するトランスジェニック動物内で発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す（遺伝子型当たり $n = 9 \sim 10$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。

【図１２Ｂ】図１２Ａ～Ｃは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対するトランスジェニック動物内で発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す（遺伝子型当たり $n = 9 \sim 10$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。

【図１２Ｃ】図１２Ａ～Ｃは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対するトランスジェニック動物内で発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す（遺伝子型当たり $n = 9 \sim 10$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表す）。

【図１３Ａ】図１３Ａ～Ｄは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対する非トランスジェニック動物内のアデノウイルス送達により発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体、ＡｐｏＬ１のＧ１変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す。効果をコントロール（ハプトグロビン関連タンパク質（ＨＰＲ）を発現するマウス）に対して相対的に示す；（遺伝子型当たり $n = 6 \sim 8$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表し、どくろのシンボルは試験終了前に死んだ動物を示す）。

【図１３Ｂ】図１３Ａ～Ｄは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対する非トランスジェニック動物内のアデノウイルス送達により発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体、ＡｐｏＬ１のＧ１変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す。効果をコントロール（ハプトグロビン関連タンパク質（ＨＰＲ）を発現するマウス）に対して相対的に示す；（遺伝子型当たり $n = 6 \sim 8$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表し、どくろのシンボルは試験終了前に死んだ動物を示す）。

【図１３Ｃ】図１３Ａ～Ｄは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対する非トランスジェニック動物内のアデノウイルス送達により発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体、ＡｐｏＬ１のＧ１変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す。効果をコントロール（ハプトグロビン関連タンパク質（ＨＰＲ）を発現するマウス）に対して相対的に示す；（遺伝子型当たり $n = 6 \sim 8$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表し、どくろのシンボルは試験終了前に死んだ動物を示す）。

【図１３Ｄ－１】図１３Ａ～Ｄは、腎症のドキシソルビン誘導モデルにおける腎疾患進行に対する非トランスジェニック動物内のアデノウイルス送達により発現されたＡｐｏＬ１のＧ０変異体、ＡｐｏＬ１のＧ１変異体及びＡｐｏＬ１のＧ２変異体の効果を示す。効果をコントロール（ハプトグロビン関連タンパク質（ＨＰＲ）を発現するマウス）に対して相対的に示す；（遺伝子型当たり $n = 6 \sim 8$ であり、平均は $\pm S E M$ であり、 $P$ 値は等分散両側 $t$ 検定を表し、どくろのシンボルは試験終了前に死んだ動物を示す）。

10

20

30

40

50

【図13D-2】図13A～Dは、腎症のドキシソルピシン誘導モデルにおける腎疾患進行に対する非トランスジェニック動物内のアデノウイルス送達により発現されたApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体及びApoL1のG2変異体の効果を示す。効果をコントロール（ハプトグロビン関連タンパク質（HPR）を発現するマウス）に対して相対的に示す；（遺伝子型当たり $n = 6 \sim 8$ であり、平均は $\pm SEM$ であり、P値は等分散両側t検定を表し、どくろのシンボルは試験終了前に死んだ動物を示す）。

【図14】APO L1コンストラクトの略図を示す。PFD：ポア形成ドメイン、MAD：膜アドレスドメイン、SRA-ID：血清耐性関連タンパク質相互作用ドメイン、GPI：グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー、gD：単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dアンカー。

【図15】APO L1のG0変異体（黒）、APO L1のG1変異体（グレイ）またはAPO L1のG2変異体（斜線）を発現するCHO細胞に対するFACSにより分析した抗ApoL1抗体の交差反応性を示す。抗体を濃度 $1 \mu g/ml$ で使用した。ポジティブコントロールとして、アポリポタンパク質Lファミリーの1つのメンバーより非特異的に結合する市販のポリクローナル抗体を使用した。平均蛍光強度（MFI）をy軸にプロットする。

【図16】トリパノソーマに対抗する活性のインビトロ遮断の結果を示す。マウス内で生成したモノクローナル抗APO L1抗体を1%正常ヒト血清（NHS）の存在下Trpanosoma brucei bruceiに20時間添加した。生存するトリパノソーマ数をレサズリン系染料（アラマブルー）の存在による蛍光作用によって測定した。遮断作用を非抗体コントロールに対して正規化し、生存するトリパノソーマ%をプロットする。

【発明を実施するための形態】

【0015】

別途定義されない限り、本明細書で使用される専門用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有するものとする。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), 及びMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)は、当業者に、本出願で使用される多くの用語の一般的な説明を提供する。

【0016】

1. 定義

この明細書を解釈する目的のために、以下の定義が適用され、適宜、単数形で使用される用語は複数形を含み、その逆もまた同様である。以下に述べる定義が、参照により本明細書に組み込まれるあらゆる文書と矛盾する場合には、以下に述べる定義が制御されるものとする。

【0017】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈により別様に明確に示されない限り、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「タンパク質」または「抗体」への言及はそれぞれ、複数のタンパク質または抗体を含み；「細胞への言及」は、細胞の純粋性などを含む。

【0018】

「ApoL1」または「ヒトApoL1」という用語は、シグナルペプチドを含む6遺伝子ファミリーの唯一のメンバーであるヒトアポリポタンパク質L1、ポリペプチドを指す。集団には3つの異なる変異体、すなわちApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体およびApoL1のG2変異体が存在する。ApoL1のG0変異体は、配列番号

10

20

30

40

50

01のアミノ酸配列を有する野生型ヒトApoL1タンパク質（本明細書では「wt」とも呼ばれる）を指す。ApoL1のG1変異体は、配列番号02のアミノ酸配列を有する2つのアミノ酸置換（S342GおよびI384M）を有するヒトApoL1タンパク質の変異体を指す。ApoL1のG2変異体は、配列番号03のアミノ酸配列を有する2つのアミノ酸欠失（N388およびY389）を有するヒトApoL1タンパク質の変異体を指す。

#### 【0019】

本明細書における「検出する」という用語は、標的分子の定性的および/または定量的測定の間方を含む最も広い意味で使用され、すなわち、検出することは、試料中の標的分子の単なる存在を同定すること、ならびに試料中の標的分子のレベルを決定することを含む。

10

#### 【0020】

本明細書で使用される「ドキシソルピシン」という用語は、CAS番号23214-92-8を有する化合物を指す。ドキシソルピシンは、本明細書でアドリアマイシン（登録商標）またはADRとも呼ばれる。

#### 【0021】

本明細書で使用される「腎症」という用語は、血液および尿中の溶質濃度を適切に調節する能力を崩壊させる腎臓の損傷が生じる生理学的状态を指す。これは、血清クレアチニン濃度、尿タンパク質濃度、尿タンパク質対クレアチニン比、またはフタル酸エステルなどのトレーサー化合物の使用を介することを含む、多くの一般的な方法によって評価することができる。腎症は、明らかに異なる臨床状態に分類されることが多く、例えば、巣状糸球体硬化症関連腎症、HIV感染、鎌状赤血球症、移植後の同種移植片喪失、高血圧、ループス腎炎、糖尿病、および非糖尿病慢性腎臓疾患が挙げられる。腎症は、糸球体の大きさ、小葉または癒着、タフト線維症、ボーマン嚢線維症、拡張、毛細血管の狭窄、基底膜の肥厚、ボーマン隙のタンパク質、細胞性の増加（メサングウムまたは内皮）、白血球による浸潤、毛細血管血栓、尿細管萎縮症、壊死、液胞および硝子液滴の変化、基底膜肥厚、拡張、内腔の炎症性細胞およびキャスト、間質性線維症、浮腫、急性および慢性の白血球浸潤、細動脈線維症、血栓症、硝子体の変化および狭窄の1つ以上から選択される病理学的変化を特徴とする組織学的に分類することもできる。

20

#### 【0022】

本明細書で使用される「ApoL1媒介性腎症」という用語は上で定義した腎症を指し、ここで腎症の進行は、1つ以上のApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体およびApoL1のG2変異体により増加する。

30

#### 【0023】

「標識」または「検出可能な標識」という用語は、検出または定量すべき物質、例えば抗体に結合可能な任意の化学基または部分を指す。典型的には、標識は、物質の高感度検出または定量化に適した検出可能な標識である。検出可能な標識の例には、蛍光標識、リン光標識、化学発光標識、生物発光標識および電気化学発光標識、放射性標識、酵素、粒子、磁性物質、電気活性種などの発光標識が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、検出可能な標識は、特異的結合反応に関与することによって、その存在をシグナルすることができる。かかる標識の例には、ハプテン、抗体、ビオチン、ストレプトアビジン、hisタグ、ニトリロ三酢酸、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、グルタチオンなどが含まれる。

40

#### 【0024】

「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために同義に使用される。ポリマーは、直鎖であっても分枝鎖であってもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。本用語は、天然または介入によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する：例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識構成成分との接合のようなほかの任意の操作または修飾）が挙げられる。この定義には、例えば

50

、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸などを含む）の1つまたは複数の類似体、ならびに当該分野で公知の他の修飾を含むポリペプチドも含まれる。本明細書で使用される「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、特に抗体を包含する。

【0025】

「精製された」ポリペプチド（例えば、抗体またはイムノアドヘシン）は、その自然環境に存在するよりも純粋な形で存在するように、及び/または実験室条件下で最初に合成および/または増幅された場合に、ポリペプチドが純度において増加したことを意味する。純度は相対的な用語であり、必ずしも絶対的な純度を意味するものではない。

【0026】

目的の抗原「と結合する」抗体は、抗体が治療剤またはアッセイ試薬、例えば捕捉抗体または検出抗体として有用であるように十分な親和性で抗原に結合する抗体である。典型的には、そのような抗体は他の抗原と有意に交差反応しない。「Xに結合する抗体」および「抗X抗体」は、同じ意味を有するものとする（ここで、Xは目的の抗原の名前、例えば、タンパク質である）。結果として、「Apol1に結合する抗体」という用語は、本明細書では「抗Apol1抗体」と互換的に用いることができる。

10

【0027】

ポリペプチドの標的分子への結合に関して、特定のポリペプチド標的上の特定のポリペプチドまたはエピトープに対する「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的」という用語は、非特異的相互作用と測定可能な差異を有する結合を意味する。特異的結合は、例えば、標的分子の結合を、結合活性を有さない類似の構造の分子である対照分子の結合と比較して判定することにより測定することができる。

20

【0028】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の、総計の非共有性相互作用の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(Kd)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。

【0029】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

30

【0030】

抗体は、免疫グロブリンフォールドに基づき、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子である。例えば、IgG抗体は、ジスルフィド結合して機能的抗体を形成する2つの「重」鎖および2つの「軽」鎖を有する。各重鎖および軽鎖自体は、「定常」(C)および「可変」(V)領域を含む。V領域は抗体の抗原結合特異性を決定し、C領域は構造的サポートを提供し、免疫エフェクターとの非抗原特異的相互作用において機能する。抗体または抗体の抗原結合断片の抗原結合特異性は、特定の抗原に特異的に結合する抗体の能力である。

40

【0031】

抗体の抗原結合特異性は、可変領域またはV領域の構造的特徴によって決定される。「可変」という用語は、可変ドメインのある特定の部分が抗体によって配列が大幅に異なり、それらが、それぞれの特定の抗体の特定の抗原に対する結合及び特異性に用いられるという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均等に分布しているわけではない。それは、軽鎖及び重鎖のいずれの可変ドメインにおいても、超可変領域と称される3つのセグメントに集中している。可変ドメインのうちのより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域(FR)と称される。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメ

50

インは、それぞれが、主として シート構造を取る 4 つの F R を含み、これが 3 つの超可変領域によって結合され、それによって シート構造を結合するループ、またいくつかの場合にはその一部を形成するループが形成される。各鎖における超可変領域は、F R によって、他方の鎖の超可変領域と近接して保持されており、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) を参照されたい)。定常ドメインは、抗体と抗原との結合に直接関与しないが、その抗体の抗体依存性細胞毒性 (ADCC) への関与など、様々なエフェクター機能を呈する。

10

#### 【0032】

本明細書に使用されるとき、「超可変領域」という用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基 (例えば、V<sub>L</sub> では残基 24 ~ 34 (L1)、50 ~ 56 (L2)、及び 89 ~ 97 (L3)、ならびに V<sub>H</sub> では 31 ~ 35 B (H1)、50 ~ 65 (H2)、及び 95 ~ 102 (H3)、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))、ならびに / または「超可変ループ」からの残基 (例えば、V<sub>L</sub> では残基 26 ~ 32 (L1)、50 ~ 52 (L2)、及び 91 ~ 96 (L3) ならびに V<sub>H</sub> では 26 ~ 32 (H1)、52 A ~ 55 (H2)、及び 96 ~ 101 (H3)、(Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)) を含んでもよい。

20

#### 【0033】

「フレームワーク」または「F R」残基は、本明細書に定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

#### 【0034】

「抗体断片」は、正常な抗体の一部を含み、好ましくはその抗原結合領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、および Fv 断片；ダイアボディ；タンデムダイアボディ (tadb)、線状抗体 (例えば、米国特許第 5,641,870 号、実施例 2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057 - 1062 (1995))；片腕抗体、単一可変ドメイン抗体、ミニボディー、単鎖抗体分子；抗体断片から形成される多重特異性抗体 (例えば、Db-Fc、tadb-Fc、tadb-CH3、(scFv)<sub>4</sub>-Fc、di-scFv、bi-scFv、またはタンデム) (di, tri)-scFv が含まれるが、これらに限定されない)；および Bi-specific T-cell engagers (BiTEs) が含まれる。

30

#### 【0035】

抗体のパパイン分解により、「Fab」と呼ばれるそれぞれが単一の抗原結合部位を有する 2 つの同一な抗原結合断片と、残りの「Fc」断片とが得られ、その名前は容易に結晶化する能力を反映している。ペプシン処理により、2 つの抗原結合部位を有し、依然として抗原に架橋することができる F(ab')<sub>2</sub> 断片が得られる。

40

#### 【0036】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む、最小の抗体断片である。この領域は、1 つの重鎖及び 1 つの軽鎖可変ドメインが緊密な非共有結合で結合した二量体からなる。各可変ドメインの 3 つの超可変領域が相互作用して V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> 二量体の表面上に抗原結合部位を定めるのは、この構成においてである。集合的に、6 つの超可変領域が、抗原結合の特異性を抗体に付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン (または抗原に特異的な 3 つの超可変領域のみを含む Fv の半分) ですら、全結合部位よりは親和性は低いとはいえ、抗原を認識し、それに結合する能力を有する。

50

## 【0037】

F a b 断片はまた、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン ( C H 1 ) を含む。F a b ' 断片は、抗体のヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む、重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシ末端における数個の残基の付加が、F a b 断片と異なっている。F a b ' - S H は、定常ドメインのシステイン残基 ( 複数可 ) が少なくとも1つの遊離チオール基を有するF a b ' の本明細書における表記である。F ( a b ' ) <sub>2</sub> 抗体断片は、元々、間にヒンジシステインを有するF a b ' 断片の対として、産生されたものである。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

## 【0038】

任意の脊椎動物種に由来する抗体 ( 免疫グロブリン ) の「軽鎖」には、それらの定常領域のアミノ酸配列に基づいて、カッパ ( ) 及びラムダ ( ) と呼ばれる2つの明確に異なる型のうちの1つを割り当てることができる。

## 【0039】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体を異なる種類に割り当てることができる。5つの主要な正常抗体クラス I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M が存在し、これらのうちの数個は、サブクラス ( アイソタイプ )、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、および I g A 2 にさらに分割され得る。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、及び  $\mu$  と呼ばれている。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配置は、周知である。

## 【0040】

「一本鎖 F v」または「s c F v」抗体断片は、抗体の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖で存在している。いくつかの実施形態において、F v ポリペプチドは、更に、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン間にポリペプチドリンカーを含んでおり、このリンカーにより、s c F v が抗原結合に望ましい構造を成すことが可能となっている。s c F v 断片の総説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269 - 315 (1994) を参照されたい。

## 【0041】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する小抗体断片を指し、その断片は、同じポリペプチド鎖 ( V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> ) 内で軽鎖可変ドメイン ( V<sub>L</sub> ) に結びつく重鎖可変ドメイン ( V<sub>H</sub> ) を含む。同じ鎖上で2つのドメイン間の対を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対にされ、2つの抗原結合部位を創出する。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号；国際公開第93/11161号；および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) でより完全に説明される。

## 【0042】

「多重特異性抗体」という用語は最も広義に用いられ、特にポリエピトープ性特異性を有する抗体を包含する。このような多重特異性抗体は、限定するものではないが、重鎖可変ドメイン ( V<sub>H</sub> ) および軽鎖可変ドメイン ( V<sub>L</sub> ) を含む抗体であって、V<sub>H</sub> V<sub>L</sub> ユニットはポリエピトープ性特異性を有する抗体、二以上の V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> ドメインを有し各 V<sub>H</sub> V<sub>L</sub> ユニットは異なるエピトープに結合する抗体、2つ以上の単可変ドメインを有し各単可変ドメインは異なるエピトープに結合する抗体、完全長抗体、F a b、F v、d s F v、s c F v、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディおよびトリアボディ等の抗体断片、及び共有結合又は非共有結合された抗体断片を含む。「多重エピトープ特異性」は、同じ又は異なる抗原 ( 複数可 ) における2以上の異なるエピトープに特異的に結合する能力を指す。「単一特異性」は、1つのエピトープにのみ結合する能力を指す。一実施形態に

10

20

30

40

50



よると、多重特異性抗体は、 $5\text{ }\mu\text{M}$ から $0.001\text{ pM}$ 、 $3\text{ }\mu\text{M}$ から $0.001\text{ pM}$ 、 $1\text{ }\mu\text{M}$ から $0.001\text{ pM}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ から $0.001\text{ pM}$ 、又は $0.1\text{ }\mu\text{M}$ から $0.001\text{ pM}$ の親和性で各エピトープに結合するIgG抗体である。

#### 【0043】

「単ドメイン抗体」(sdAbs)又は「単可変ドメイン」(SVD)抗体」なる発現は一般に、単可変ドメイン(VH又はVL)が抗原結合を与えることが可能な抗体を指す。換言すると、単可変ドメインは、標的抗原を認識するために、別の可変ドメインを相互作用する必要がない。単ドメイン抗体の例は、ラクダ科(ラマ及びラクダ)及び軟骨魚類(例えば、テンジクザメ)から得られたもの、及びヒト及びマウス抗体から組換え法により得られたものを含む(Nature(1989)341:544-546; Dev Comp Immunol(2006)30:43-56; Trend Biochem Sci(2001)26:230-235; Trends Biotechnol(2003):21:484-490; WO2005/035572; WO03/035694; Febs Lett(1994)339:285-290; WO00/29004; WO02/051870)。

#### 【0044】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、及び/または同じエピトープに結合するが、例えば、モノクローナル抗体の産生中に発生する、可能性のある変異体抗体は例外であり、かかる変異体は一般に少量で存在する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体が有利であるのは、他の免疫グロブリンによって汚染されないという点である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示すものであり、いずれの特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本明細書で提供される方法に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495(1975)が初めて述べたハイブリドーマ法によって作製してもよく、または組み換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)によって作製してもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)に記載された技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することができる。

#### 【0045】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、特に、重鎖及び/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または同種であり、一方で鎖(複数可)の残りが別の種に由来するかまたは別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または同種である、「キメラ」抗体、ならびにそのような抗体の断片が含まれるが、これは、それらが所望される生物学的活性を呈する限りにおいてである(米国特許第4,816,567号及びMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。目的のキメラ抗体は、本明細書において、非ヒト霊長類(例えば、ヒヒ、アカゲザル、またはカニクイザルなどの旧世界サル)由来の可変ドメイン抗原結合配列、およびヒト定常領域配列を含む「霊長類化」抗体を含む(米国特許第5,693,780号)。

#### 【0046】

本明細書の目的のために、「インタクトな抗体」は、重鎖および軽鎖可変ドメインならびにFc領域を含むものである。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン(例えば、ヒトの天然配列の定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変異体であり得る。好ましくは、インタクト抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有する。

## 【 0 0 4 7 】

「天然抗体」は、通常、約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一な軽鎖(L)と2つの同一な重鎖(H)から構成される。各軽鎖は、1つのジスルフィド共有結合によって重鎖に結合されているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。各重鎖および軽鎖は、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン( $V_H$ )を有し、それに続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端( $V_L$ )に可変ドメインを有し、その他端に定常ドメインを有し、この軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列され、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖及び重鎖の可変ドメイン間に界面を形成すると考えられている。

10

## 【 0 0 4 8 】

「裸の抗体」は、異種分子、例えば、検出部分または標識に複合されていない抗体(本明細書中で定義される)を指す。

## 【 0 0 4 9 】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は、交換可能に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、初代形質転換細胞および継代の数に関わらずそれに由来する子孫を含む、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれる。子孫は、核酸含量において親細胞と完全に同一でない場合があるが、突然変異を含有し得る。元々形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

20

## 【 0 0 5 0 】

「単離」核酸は、その天然環境の構成成分から分離された核酸分子を指す。単離核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、その核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に、存在する。

## 【 0 0 5 1 】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関する、抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、 $V_H$ および $V_L$ )は一般に、同様の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)および3つの超可変領域(HVR)を含む。(例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6<sup>th</sup> ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい。)抗原結合特異性を付与するためには、単一の $V_H$ または $V_L$ ドメインで十分であり得る。さらに、抗原に結合する抗体からの $V_H$ または $V_L$ ドメインを使用して、それぞれ、相補的 $V_L$ または $V_H$ ドメインのライブラリをスクリーニングして、特定の抗原に結合する抗体を単離してもよい。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352: 624-628 (1991)を参照されたい。

30

## 【 0 0 5 2 】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、連結している別の核酸を増殖することが可能な核酸分子を指す。この用語には、自己複製核酸構造としてのベクター、ならびに導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターが含まれる。ある特定のベクターは、作動的に連結された核酸の発現を導くことが可能である。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

40

## 【 0 0 5 3 】

本明細書における「約」の値またはパラメータは、その値またはパラメータ自体に関する変形形態を含む(そして説明する)。例えば、「約X」に言及する説明は、「X」の説明を含む。

## 【 0 0 5 4 】

II. 動物モデル、組成物および方法 A. 腎症の動物モデル

50

本明細書において、腎症の動物モデルが提供される。A p o L 1 はヒト、アフリカミドリザルおよびゴリラにのみ存在するので、我々はトランスジェニック動物に基づいて動物モデルを確立した。世代に応じて、非ヒト動物は G 0、G 1 または G 2 のいずれかを発現するのみである。しかしながら、動物を交雑することにより、3つの変異体の組み合わせを発現するトランスジェニック動物を生成することが可能である。したがって、一態様において、ヒト A p o L 1 を発現する非ヒトトランスジェニック動物が本明細書に提供される。ある特定の実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、i) A p o L 1 の G 0 変異体 (配列番号 0 1)、ii) A p o L 1 の G 1 変異体 (配列番号 0 2)、iii) A p o L 1 の G 2 変異体 (配列番号 0 3)、iv) A p o L 1 の G 0 変異体および A p o L 1 の G 1 変異体、v) A p o L 1 の G 0 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体、vi) A p o L 1 の G 1 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体、または vii) A p o L 1 の G 0 変異体、A p o L 1 の G 1 変異体、および A p o L 1 の G 2 変異体を発現する。ある特定の実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、齧歯動物である。ある特定の実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシおよびヤギからなる群より選択される。ある特定の実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、マウスである。腎症のモデルを提供するために、動物は A p o L 1 を発現し、腎症は非ヒトトランスジェニック動物において誘発される。したがって、ある特定の実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、腎症を有する。非ヒトトランスジェニック動物において腎症を誘発する様々な方法がある。1つの可能性は、ヒト免疫不全ウイルス (H I V) の一部を含有する導入遺伝子を A p o L 1 に加えて非ヒトトランスジェニック動物で発現させることである。H I V 導入遺伝子を発現させることにより、急性腎症が発症する。したがって、ある特定の実施形態において、腎症は H I V 関連腎症である。非ヒトトランスジェニック動物において腎症を誘発する別の可能性は、化学的曝露による。ドキシソルピシンは、化学療法で薬物としてヒトにおいて通常使用される。しかしながら、この物質は動物において腎症を誘発することも知られている。したがって、ある特定の実施形態において、本明細書に記載の腎症はドキシソルピシン誘発性腎症である。

#### 【0055】

別の態様において、本明細書は、上記の非ヒトトランスジェニック動物に由来する細胞または組織に関する。

#### 【0056】

本明細書に示すように、A p o L 1 の G 0 変異体、A p o L 1 の G 1 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体を含む循環 A p o L 1 は、腎症の進行を媒介することができる。したがって、A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させる1つの可能性は、循環する A p o L 1 を除去することである。抗体を A p o L 1 に結合させることにより、A p o L 1 のクリアランスを増加させることができ、A p o L 1 の血清濃度が低下し、A p o L 1 媒介性腎症の進行に対する減弱効果をもたらされる。したがって、一態様において、薬剤がヒト A p o L 1 の血清濃度を低下させることができるかどうかを判定する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載の非ヒトトランスジェニック動物におけるヒト A p o L 1 の血清濃度を測定する、非ヒトトランスジェニック動物に薬剤を投与する、および非ヒトトランスジェニック動物におけるヒト A p o L 1 の血清濃度を測定する工程を含み、ここで非ヒトトランスジェニック動物におけるヒト A p o L 1 の血清濃度の低下は、該薬剤がヒト A p o L 1 の血清濃度を低下させることができることを示す。

#### 【0057】

あるいは、抗体などの薬剤の A p o L 1 への結合は、A p o L 1 の不活性化を導くことができ、すなわち、抗体 - A p o L 1 - 複合体は、A p o L 1 単独と比較して同じ生理学的効果を有することができず、それにより、A p o L 1 媒介性腎症の進行に対する効果が減弱する。さらに別の可能性は、結合した抗体が A p o L 1 の多量体化を防止し、A p o L 1 媒介性腎症の進行に対する減弱効果をもたらすことが可能なことである。

#### 【0058】

したがって、非ヒトトランスジェニック動物の腎臓の病理学的表現型に基づき A p o L 1 媒介性腎症の進行に対する薬剤の効果を評価することにより、A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させることができる薬剤を同定することは有益であろう。したがって、別の態様において、A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させることができる薬剤を同定する方法が提供され、該方法は本明細書中に開示されるような非ヒトトランスジェニック動物において A p o L 1 媒介性腎症を誘発する、非ヒトトランスジェニック動物に薬剤を投与する、および非ヒトトランスジェニック動物の腎臓の病理学的表現型に基づき A p o L 1 媒介性腎症の進行を評価する工程を含み、ここで該薬剤と共投与されていない非ヒトトランスジェニック動物と比較して進行性が低い A p o L 1 媒介性腎症は、該薬剤が A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させることができることを同定する。既に言及したように、非ヒトトランスジェニック動物において腎症を確立する様々な方法がある。一実施形態において、腎症はドキソルビシンの投与によって誘発される。別の実施形態において、腎症が、ヒト免疫不全ウイルスの一部を含む導入遺伝子を非ヒトトランスジェニック動物において発現させることによって誘発される。A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させる薬剤の能力は、ヒト A p o L 1 の 1 つ以上の変異体へのその結合に基づいてもよい。ある特定の実施形態において、薬剤は、i ) A p o L 1 のヒト G 0 変異体 ( 配列番号 0 1 )、i i ) A p o L 1 のヒト G 0 変異体および A p o L 1 のヒト G 1 変異体 ( 配列番号 0 2 )、i i i ) A p o L 1 のヒト G 0 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体 ( 配列番号 0 3 )、または i v ) A p o L 1 の G 0 変異体、A p o L 1 のヒト G 1 変異体および A p o L 1 の G 2 変異体に結合する。ある特定の実施形態において、薬剤は、抗体である。ある特定の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、抗体は、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体である。ある特定の実施形態において、抗体は、完全長の I g G 1 抗体である。

10

20

30

40

#### 【 0 0 5 9 】

本明細書において、さらに、腎症の動物モデルを生成するための方法が提供される。したがって、一態様において、ヒト A p o L 1 を発現する非ヒトトランスジェニック動物において腎症を誘発することを含む、腎症の動物モデルを生成する方法が提供される。ある特定の実施形態において、非ヒト動物は、上記の非ヒトトランスジェニック動物である。ある特定の実施形態において、腎症が、ヒト免疫不全ウイルスの一部を含む導入遺伝子を非ヒト動物において発現させることによって誘発される。ある特定の実施形態において、腎症はドキソルビシンの投与によって誘発される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは、 $10\text{ mg / kg} \sim 50\text{ mg / kg}$  の濃度で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは、 $15\text{ mg / kg} \sim 40\text{ mg / kg}$  の濃度で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは、 $20\text{ mg / kg} \sim 30\text{ mg / kg}$  の濃度で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは、 $24\text{ mg / kg} \sim 26\text{ mg / kg}$  の濃度で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは、少なくとも  $25\text{ mg / kg}$  の濃度で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは、 $25\text{ mg / kg}$  の濃度で投与される。測定  $\text{mg / kg}$  は、動物の体重  $1\text{ kg}$  あたり  $\text{mg}$  で表した投与ドキソルビシンの質量を指す。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは複数回投与で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは単回投与で投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは静脈内投与される。ある特定の実施形態において、ドキソルビシンは尾静脈内に投与される。

#### 【 0 0 6 0 】

ドキソルビシンによる動物の処置は、脱水症状に繋がる。ある特定の実施形態において、脱水を防ぐために非ヒト動物を皮下の液体で毎日処置する。ある特定の実施形態において、皮下液体は  $0.5 \sim 5\text{ ml}$  の容量で投与される。ある特定の実施形態において、皮下液体は  $1 \sim 4\text{ ml}$  の容量で投与される。ある特定の実施形態において、皮下液体は  $1.5 \sim 3\text{ ml}$  の容量で投与される。ある特定の実施形態において、皮下液体は  $2\text{ ml}$  の容量で投与される。ある特定の実施形態において、皮下液体は乳酸リンゲル液である。

#### 【 0 0 6 1 】

50

## B. 例となる抗 A p o L 1 抗体

A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させるために、A p o L 1 に結合する抗体が生成される。したがって、一態様において、本発明は A p o L 1 のヒト G 0 変異体（配列番号 0 1）および A p o L 1 のヒト G 1 変異体（配列番号 0 2）ならびに A p o L 1 の G 2 変異体（配列番号 0 3）の一方または両方に結合する、単離抗体が提供される。ある特定の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。ある特定の実施形態において、抗体は、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体である。ある特定の実施形態において、抗体は、完全長の I g G 1 抗体である。ある特定の実施形態において、抗体は A p o L 1 変異体の多量体化を阻止することができる。ある特定の実施形態において、抗体はヒト A p o L 1 の血清濃度を低下させることができる。ある特定の実施形態において、抗体は腎症の進行を減少させることができる。ある特定の実施形態において、腎症は A p o L 1 媒介性腎症である。ある特定の実施形態において、A p o L 1 媒介性腎症が、H I V 関連腎症、巣状糸球体硬化症関連腎症、鎌状赤血球腎症、移植後の同種移植片喪失に関連する腎症、およびループス腎炎関連腎症からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、A p o L 1 媒介性腎症は高血圧関連腎症である。いくつかの実施形態において、A p o L 1 媒介性腎症は糖尿病性腎症である。

10

### 【0062】

さらに、一態様において、本明細書に記載の抗体をコードする単離核酸が提供される。別の態様において、上述のような核酸を含む宿主細胞が提供される。別の態様において、前記抗体が産生されるように、上述の宿主細胞を培養することを含む、抗体の産生方法が提供される。さらに、一態様において、本明細書に説明される抗体と薬学的に許容される担体とを含む医薬製剤を提供される。さらに、一態様において、薬として使用するための、本発明に記載の抗体が提供される。さらに、一態様において、薬の製造における、本発明に記載の抗体の使用が提供される。さらに、一態様において、本明細書に記載の抗体を個体に投与することにより腎症を有する個体を治療する方法が提供される。さらに、一態様において、対象における腎症の進行を減少させる方法であって、有効量の本明細書に記載の抗体を対象に投与することを含む方法が提供される。

20

### 【0063】

本発明のさらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 A p o L 1 抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗 A p o L 1 抗体は、抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、または F ( a b' )<sub>2</sub> 断片である。別の実施形態において、本抗体は、完全長の抗体、例えば、本明細書に定義される正常な I g G 1 抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

30

### 【0064】

さらなる態様において、上の実施形態のいずれかによる抗 A p o L 1 抗体は、下の第 1 ~ 7 節に記載される特長のうちのいずれをも、単独でまたは組み合わせて、組み込んでよい。

### 【0065】

#### 1. 抗体親和性

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、1 μ M 以下、1 0 0 n M 以下、1 0 n M 以下、1 n M 以下、0 . 1 n M 以下、0 . 0 1 n M 以下、または 0 . 0 0 1 n M 以下（例えば、1 0<sup>-8</sup> M 以下、例えば、1 0<sup>-8</sup> M から 1 0<sup>-13</sup> M、例えば、1 0<sup>-9</sup> M から 1 0<sup>-13</sup> M）の、解離定数（K d）を有する。

40

### 【0066】

一実施形態において、K d は、放射標識抗原結合アッセイ（R I A）によって測定される。一実施形態において、R I A は目的の抗体の F a b バージョンおよびその抗原を用いて行われる。抗原に対する F a b の溶液結合親和性は、標識化されていない抗原の滴定シリーズの存在下で、（<sup>125</sup>I）標識化抗原の最小濃度で F a b を平衡化することにより測定され、次いで、抗 F a b 抗体コート板と結合した抗原を捕捉する（例えば、C h e n

50

et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい)。アッセイのための条件を確立するために、MICROTITER (登録商標) マルチウェルプレート (Thermo Scientific) を、50 mM の炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中  $5 \mu\text{g/mL}$  の捕捉抗 Fab 抗体 (Cappel Labs) で一晚コーティングし、その後、PBS 中 2% (w/v) ウシ血清アルブミンにより、室温 (およそ 23 °C) で 2 ~ 5 時間ブロックする。非吸着性の板 (Nunc # 269620) において、100 pM または 26 pM [ $^{125}\text{I}$ ] 抗原は、目的の Fab の連続希釈液と混合される (例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593 - 4599 (1997) における、抗 VEGF 抗体 Fab - 12 の評価と一致)。目的の Fab を次いで一晚インキュベートするが、インキュベーションは、平衡に到達することを確実にするために、より長い期間 (例えば、約 65 時間) 継続してもよい。その後、混合物を、室温での (例えば、1 時間) インキュベーションのために、捕捉プレートに移す。次いでこの溶液を除去し、プレートを、PBS 中 0.1% のポリソルベート 20 (TWEEN - 20 (登録商標)) で 8 回洗浄する。プレートが乾燥したとき、150  $\mu\text{L}$  / ウェルのシンチラント (scintillant) (MICROSCINT - 20 (商標); Packard) を添加し、プレートを TOPCOUNT (商標) 計数器 (Packard) により 10 分間計数する。最大結合の 20% 以下をもたらす各 Fab の濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選定する。

10

#### 【0067】

別の実施形態によれば、 $K_d$  は、BIACORE (登録商標) 表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、BIACORE (登録商標) - 2000 または BIACORE (登録商標) - 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用したアッセイを使用して、25 °C で、約 10 応答単位 (RU) で固定化された抗原 CM5 チップを用いて行われる。一実施形態において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ (CM5、BIACORE, Inc.) を、N - エチル - N' - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 (EDC) および N - ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) により、供給業者の指示に従って活性化する。抗原を 10 mM の酢酸ナトリウム (pH 4.8) で  $5 \mu\text{g/mL}$  (約 0.2  $\mu\text{M}$ ) まで希釈した後、5  $\mu\text{L}$  / 分の流速で注射して、カップリングされたタンパク質のおよそ 10 応答単位 (RU) を達成する。抗原の注射後、1 M のエタノールアミンを注射して、未反応の基をブロックする。動態測定については、Fab の 2 倍段階希釈液 (0.78 nM ~ 500 nM) を、0.05% ポリソルベート 20 (TWEEN - 20 (商標)) 界面活性剤を含む PBS (PBST) に、25 °C で、およそ 25  $\mu\text{L}$  / 分の流速で注射する。会合速度 ( $k_{on}$ ) と解離速度 ( $k_{off}$ ) は、会合及び解離のセンサーグラムを同時に適合させることにより、単純一対一ラングミュア結合モデル (BIACORE (登録商標) 評価ソフトウェアバージョン 3.2) を使用して計算される。平衡状態解離定数 ( $K_d$ ) は、 $k_{off} / k_{on}$  比として計算される。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999) を参照されたい。オン速度が、上の表面プラズモン共鳴アッセイによって、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  を超える場合、オン速度は、攪拌されたキュベットを備えるストップフロー装着分光光度計 (Aviv Instrument 40) または 8000 - シリーズ SLM - AMINCO (商標) 分光光度計 (Thermo Spectronic) 等の分光計において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、25 °C で、PBS (pH 7.2) 中 20 nM 抗 - 抗原抗体 (Fab 型) の蛍光発光強度 (励起 = 295 nm、発光 = 340 nm、16 nm 帯域通過) の増加または減少を測定する、蛍光消光技法を使用することによって、決定することができる。

20

30

40

#### 【0068】

##### 2. 抗体断片

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab' - SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、および scFv 断片、ならびに下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の

50

抗体断片の概説については、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) を参照されたい。scFv断片の総説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994) を参照されたく、また、WO93/16185、ならびに米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期を増加させたFabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

#### 【0069】

ダイアボディは、二価性または二重特異性であり得る、2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号、国際公開第1993/01161号、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディはまた、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) に記載されている。

#### 【0070】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部分または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部分を含む、抗体断片である。特定の実施形態において、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA、例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照されたい)。

#### 【0071】

抗体断片は、本明細書に記載される、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、ならびに組み換え宿主細胞(例えば、大腸菌またはファージ)による産生を含むが、これらに限定されない、種々の技法によって作製することができる。

#### 【0072】

### 3. キメラおよびヒト化抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許4,816,567号;およびMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載される。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサル等の非ヒト霊長類に由来する可変領域)およびヒト定常領域を含む。さらなる実施例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のそれから変更された、「クラススイッチされた」抗体である。キメラ抗体には、それらの抗原結合断片が含まれる。

#### 【0073】

特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的に、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低減するために、ヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはそれらの部分)が非ヒト抗体に由来し、FR(またはそれらの部分)がヒト抗体配列に由来する、1つ以上の可変ドメインを含む。任意にヒト化抗体はまた、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元するまたは改善するために、非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換される。

#### 【0074】

ヒト化抗体およびそれらの作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に総説され、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci.

10

20

30

40

50

USA 86:10029-10033(1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、および同第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34(2005)(SDR)グラフィングを記述)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498(1991)(「リサーフェシング」を記述)、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60(2005)(「FRシャッフリング」を記述)、ならびにOsourn et al., Methods 36:61-68(2005)およびKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260(2000)(FRシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述)にさらに記載されている。

10

#### 【0075】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域としては、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims et al., J. Immunol. 151:2296(1993))を参照されたい、軽鎖または重鎖の可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域(例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992)、およびPresta et al., J. Immunol., 151:2623(1993))、ヒト成熟(体細胞変異)フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008))、およびスクリーニングFRライブラリー由来のフレームワーク領域(例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684(1997)およびRosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618(1996))が含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0076】

##### 4. ヒト抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技法を使用して産生することができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74(2001)およびLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459(2008)に記載されている。

30

#### 【0077】

ヒト抗体は、免疫原を、抗原投与に応答してインタクトなヒト抗体またはヒト可変領域を含むインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に投与することによって、調製されてもよい。かかる動物は典型的に、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換える、または染色体外に存在するか、もしくは動物の染色体中に無作為に組み込まれる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部分を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125(2005)を参照されたい。また、例えば、XENOMOUSE(商標)技術を記載している米国特許第6,075,181号および第6,150,584号、HuMab(登録商標)技術を記載している米国特許第5,770,429号、K-M MOUSE(登録商標)技術を記載している米国特許第7,041,870号、ならびにVelociMouse(登録商標)技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号)を参照されたい。かかる動物によって生成されるインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾されてもよい。

40

#### 【0078】

ヒト抗体はまた、ハイブリドーマベースの方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞

50



株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、および Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991))を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載される。さらなる方法は、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記述)およびNi, Xiandai Mianyixue, 26(4): 265-268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記述)に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術(Trioma technology)はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005)およびVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)にも記載される。

10

#### 【0079】

ヒト抗体はまた、Fvクローン可変ドメイン配列をヒト由来ファージディスプレイライブラリから単離することによって、生成されてもよい。かかる可変ドメイン配列は次いで、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられてもよい。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が、下に記載される。

20

#### 【0080】

##### 5. ライブラリ由来抗体

本発明の抗体は、コンビナトリアルライブラリを、所望の活性(単数または複数)を有する抗体についてスクリーニングすることによって、単離されてもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、かかるライブラリを、所望の結合特性を保有する抗体についてスクリーニングするための、多様な方法が当該技術分野で知られている。そのような方法は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に総説され、例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)、Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)、Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)、Fellous et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)、およびLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)にさらに記載されている。

30

40

#### 【0081】

ある特定のファージディスプレイ法において、VHおよびVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ中で無作為に組み換えられ、それを次いで、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)に記載の通り、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは典型的に、1本鎖Fv(scFv)断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫された源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対する高親

50

和性抗体を提供する。代替的に、Griffiths et al., EMBO J, 12:725-734 (1993)によって記載されるように、ナイーブレパートリーをクローニングして(例えば、ヒトから)、いかなる免疫化も伴わずに、広範な非自己抗原およびまた自己抗原に対する抗体の単一の源を提供することができる。最後に、ナイーブライブラリは、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)に記載されるように、再配列されていないV遺伝子セグメントを幹細胞からクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロで再配列を遂行することによって、合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公報には、例えば、米国特許第5,750,373号、米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、および同第2009/0002360号が含まれる。

10

#### 【0082】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書でヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

#### 【0083】

#### 6. 多重特異性抗体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、Apol1に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態において、結合特異性のうちの一方は、Apol1に対するものであり、第2の結合特異性は、Apol1含有HDL粒子のエンドサイトーシスを誘発する。特定の実施形態において、二重特異性抗体は、Apol1の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

20

#### 【0084】

多重特異性抗体を作製するための技術としては、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え共発現(Milstein and Cuelllo, Nature 305:537 (1983)を参照されたい)、国際公開第93/08829号、およびTraunecker et al., EMBO J, 10:3655 (1991))、ならびに「ノブインホール(knob-in-hole)」エンジニアリング(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)が含まれるが、これらに限定されない。多重特異性抗体はまた、抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング効果を操作すること(国際公開第2009/089004A1号)、2つ以上の抗体もしくは断片を架橋すること(例えば、米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照されたい)、二重特異性抗体を産生するためにロイシンジッパーを使用すること(例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)を参照されたい)、二重特異性抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用すること(例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照されたい)、一本鎖Fv(sFv)ダイマーを使用すること(例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい)、および、例えば、Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991)に記載されるように、三重特異性抗体を調製することによって作製することができる。

30

40

#### 【0085】

「オクトパス(Octopus)抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を有す

50

る操作された抗体もまた、本明細書に含まれる（例えば、米国公開特許第2006/0025576A1号を参照されたい）。

【0086】

本明細書における抗体または断片にはまた、ApoL1及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む、「二重作用(Dual Acting) Fab」または「DAF」が含まれる（例えば、US2008/0069820を参照されたい）。

【0087】

7. 抗体変異体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善することが望ましいことがある。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列中に導入することによって、またはペプチド合成によって、調製されてもよい。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、および/またはそこへ残基の挿入、および/またはその内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを作製して、最終構築物に到達することができるが、但し、その最終構築物が、所望の特性、例えば、抗原結合性を保有することを条件とする。

10

【0088】

a) 置換、挿入、および欠失変異体

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換型突然変異生成に対する目的の部位には、HVRおよびFRが含まれる。保存的置換は、表1において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表1において、「例となる置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して下にさらに記載される。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、産物が、所望の活性、例えば、保持/改善された抗原結合、減少した免疫原性、または改善されたADCCもしくはCDCについて、スクリーニングされてもよい。

20

【0089】

【表 1】

元の 残基	例となる 置換	好ましい 置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン	L e u

## 【0090】

アミノ酸は、次の一般的な側鎖特性に従って分類されてもよい：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、
- (3) 酸性：A s p、G l u、
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、
- (6) 芳香性：T r p、T y r、P h e。

## 【0091】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うであろう。

## 【0092】

置換型変異体の1つの種類は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1個以上の

超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる研究のために選択される、結果として生じる変異体（複数可）は、親抗体と比べて、ある特定の生物学的特性における修飾（例えば、改善）（例えば、増加した親和性、低減された免疫原性）を有することになり、および／または親抗体の、実質的に保持されたある特定の生物学的特性を有することになる。例となる置換型変異体は、例えば、本明細書に記載されるもの等のファージディスプレイベースの親和性成熟技法を使用して、好都合に生成され得る、親和性成熟抗体である。簡潔に述べると、1個以上のHVR残基が突然変異させられ、変異体抗体がファージ上で提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

#### 【0093】

変化（例えば、置換）をHVRにおいて行って、例えば、抗体親和性を改善してもよい。そのような変化は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程中に高頻度で突然変異を受けるコドンによりコードされた残基で（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 179 - 196 (2008)を参照されたい）、及び／または抗原と接触する残基で行うことができ、得られた変異体VHまたはVLが結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築し、そこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178: 1 - 37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性が、多様な方法（例えば、エラープライムPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性突然変異生成）のうちのいずれかによって、成熟のために選定された可変遺伝子中に導入される。二次ライブラリが次いで作り出される。ライブラリは次いで、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を特定するために、スクリーニングされる。多様性を導入するための別の方法は、数個のHVR残基（例えば、1回に4～6個の残基）が無作為化される、HVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキニング突然変異生成またはモデリングを使用して、具体的に特定されてもよい。特にCDR-H3およびCDR-L3が、しばしば標的とされる。

#### 【0094】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる変化が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減しない限り、1つ以上のHVR内で生じてもよい。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的变化（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVRにおいて行われてもよい。かかる変化は、例えば、HVRの抗原接触残基の外側であり得る。上に提供される変異体VHおよびVL配列のある特定の実施形態において、各HVRは、変化させられないか、またはわずか1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換を含有するにすぎないかのいずれかである。

#### 【0095】

突然変異生成のための標的とされ得る、抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081 - 1085によって記載される、「アラニンスキニング変異生成」と呼ばれるものである。この方法において、標的残基（例えば、arg、asp、his、lys、およびglu等の荷電残基）のうちのある残基または基が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体の抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の場所に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗体と抗原との間の接触点を識別するための抗原-抗体複合体の結晶構造。かかる接触残基および隣接する残基は、置換の候補として標的とされるか、または排除されてもよい。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを決定してもよい。

#### 【0096】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個以上の残基を含有するポリペプチドの

10

20

30

40

50

範囲の長さである、アミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一のまたは多数のアミノ酸残基の配列内 ( i n t r a s e q u e n c e ) 挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入型変異体には、抗体の血清半減期を増加させる酵素 (例えば、A D E P Tのための) またはポリペプチドに対する抗体のN末端もしくはC末端への融合が含まれる。

#### 【0097】

##### b) グリコシル化変異体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変化させられる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作り出されるか、または除去されるように、アミノ酸配列を変化させることによって、好都合に遂行されてもよい。

10

#### 【0098】

抗体がF c領域を含む場合、そこに結合した炭水化物が変化してもよい。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的に、一般にN-結合によって、F c領域のC H 2ドメインのA s n 2 9 7に結合される、分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、W r i g h t e t a l . T I B T E C H 1 5 : 2 6 - 3 2 ( 1 9 9 7 ) を参照されたい。オリゴ糖類には、種々の炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン ( G l c N A c )、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖類構造の「ステム」においてG l c N A cに結合したフコースが含まれる。いくつかの実施形態において、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、ある特定の向上した特性を有する抗体変異体を作り出すために行われても良い。

20

#### 【0099】

一実施形態において、F c領域に (直接的にまたは間接的に) 結合されるフコースを欠いた炭水化物構造を有する、抗体変異体が提供される。例えば、かかる抗体におけるフコースの量は、1% ~ 80%、1% ~ 65%、5% ~ 65%、または20% ~ 40%であってもよい。フコースの量は、例えば、国際公開第2008/077546号に記載されるように、M A L D I - T O F質量分析法によって測定するとき、A s n 2 9 7に結合した全ての糖鎖構造 (例えば、複合体、ハイブリッド、および高マンノース構造) の合計と比べた、A s n 2 9 7における糖鎖内のフコースの平均量を算出することによって決定される。A s n 2 9 7は、F c領域における約297位 (F c領域残基のE u付番) に位置するアスパラギン残基を指すが、A s n 2 9 7はまた、抗体における小規模な配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位 ~ 300位の間にも位置する。かかるフコシル化変異体は、改善されたA D C C機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号 (P r e s t a , L . )、同第2004/0093621号 (K y o w a H a k k o K o g y o C o . , L t d ) を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関連する刊行物の例としては、U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8、W O 2 0 0 0 / 6 1 7 3 9、W O 2 0 0 1 / 2 9 2 4 6、U S 2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4、U S 2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8、U S 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1、U S 2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0、U S 2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4、U S 2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2、U S 2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5、W O 2 0 0 3 / 0 8 5 1 1 9、W O 2 0 0 3 / 0 8 4 5 7 0、W O 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6、W O 2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8、W O 2 0 0 5 / 0 5 3 7 4 2、W O 2 0 0 2 / 0 3 1 1 4 0、O k a z a k i e t a l . J . M o l . B i o l . 3 3 6 : 1 2 3 9 - 1 2 4 9 ( 2 0 0 4 ) ; Y a m a n e - O h n u k i e t a l . B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 ( 2 0 0 4 ) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生する細胞株の例には、タンパク質フコシル化を欠損しているL e c 1 3 C H O細胞 (R i p k a e t a l . A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 4 9 : 5 3 3 - 5 4 5 ( 1 9 8 6 )、米国特許出願公開第2003/0157108 A1号、P r e s t a , L、および国際公開第2004/056312 A1号、A d a m s e t a l .、特に実施例11)、およびノックアウト細胞株、例えば、アルファ - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F U

30

40

50

T 8、ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane - Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94 (4): 680 - 688 (2006)、および国際公開第2003/085107号）が含まれる。

#### 【0100】

二分されたオリゴ糖類を有する、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖類がGlcNAcによって二分される、抗体変異体がさらに提供される。かかる抗体変異体は、低減されたフコシル化および/または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO2003/011878 (Jean - Mairet et al.)、米国特許第6,602,684号 (Umana et al.)、および米国特許出願公開第2005/0123546号 (Umana et al.)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖類において少なくとも1個のガラクトース残基を有する、抗体変異体もまた提供される。かかる抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。かかる抗体変異体は、例えば、WO1997/30087 (Patel et al.)、WO1998/58964 (Raju, S.)、およびWO1999/22764号 (Raju, S.)に記載されている。

10

#### 【0101】

##### c) Fc領域変異体

ある特定の実施形態において、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによってFc領域変異体を生成してもよい。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域）を含んでもよい。

20

#### 【0102】

ある特定の実施形態において、本発明は、いくつかのエフェクター機能を保有するが、全てのエフェクター機能は保有せず、それにより、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、なおもある特定のエフェクター機能（補体およびADCC等）が不必要または有害である場合の適用に対する望ましい候補となる、抗体変異体を企図する。インビトロ及び/またはインビボ細胞傷害性アッセイを実行して、CDCおよび/またはADCC活性の低減/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを実行して、抗体がFcR結合を欠いている（よって、ADCC活性を欠いている可能性が高い）が、FcRn結合能力を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞はFcRIIIのみを発現するが、一方で単球はFcRI、FcRII、及びFcRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 492 (1991)の464ページ、表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83: 7059 - 7063 (1986)を参照されたい）およびHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82: 1499 - 1502 (1985)、第5,821,337号 (Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166: 1351 - 1361 (1987)を参照されたい）に記載されている。代替的に、非放射アッセイ法が用いられてもよい（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、およびCytoTox 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ (Promega, Madison, WI)を参照されたい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652

30

40

50

- 656 (1998) に開示されるもの等の動物モデルにおいて、評価されてもよい。C1q 結合アッセイをまた行って、抗体が C1q に結合不可能であり、よって CDC 活性を欠いていることを確認してもよい。例えば、国際公開第 2006/029879 号および国際公開第 2005/100402 号における C1q および C3c 結合 ELISA を参照されたい。補体活性化を査定するために、CDC アッセイを行っても良い (例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)、及び Cragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) を参照されたい)。FcRn 結合及びインビボクリアランス/半減期の判定も、当該技術分野で既知の方法を使用して行うことができる (例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol., 18(12):1759-1769 (2006) に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。

#### 【0103】

エフェクター機能が減少した抗体には、Fc 領域の残基 238、265、269、270、297、327、および 329 のうちの 1 つ以上の置換を有するものが含まれる (米国特許第 6,737,056 号)。かかる Fc 突然変異体には、アラニンへの残基 265 および 297 の置換を有するいわゆる「DANA」Fc 突然変異体を含む (米国特許第 7,332,581 号)、アミノ酸 265、269、270、297、および 327 位のうちの 2 つ以上において置換を有する Fc 突然変異体が含まれる。

#### 【0104】

FcR への改善されたまたは減少した結合を有する、ある特定の抗体変異体が記載される。(例えば、米国特許第 6,737,056 号、国際公開第 2004/056312 号、および Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001) を参照されたい。)

#### 【0105】

ある特定の実施形態において、抗体変異体は、ADCC を改善する 1 つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc 領域の 298、333、及び/または 334 位 (残基の EU 付番) における置換を有する、Fc 領域を含む。

#### 【0106】

いくつかの実施形態において、例えば、米国特許第 6,194,551 号、国際公開第 99/51642 号、および Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) に記載されているように、Fc 領域に、C1q 結合および/または補体依存性細胞毒性 (CDC) に変化 (すなわち、改善または減少のいずれか) をもたらず、変化がなされる。

#### 【0107】

増加した半減期を持ち、胎児への母体 IgG の移動を担う、新生児 Fc 受容体 (FcRn) への結合が改善された抗体 (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) および Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) が、米国特許出願公開第 2005/0014934 A1 号 (Hinton et al.) に記載されている。これらの抗体は、FcRn に対する Fc 領域の結合性を向上させる 1 つ以上の置換を中に有する Fc 領域を含む。かかる Fc 変異体には、Fc 領域残基 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または 434 のうちの 1 つ以上における置換、例えば、Fc 領域残基 434 の置換 (米国特許第 7,371,826 号) を有するものが含まれる。

#### 【0108】

また、Fc 領域変異体の他の例に関して、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)、米国特許第 5,648,260 号、米国特許第 5,624,821 号、および国際公開第 94/29351 号も参照されたい。



## 【 0 1 0 9 】

## d) システイン操作された抗体変異体

ある特定の実施形態において、抗体の 1 個以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「チオ M a b」を作り出すことが望ましい場合がある。特定の実施形態において、置換残基は、抗体の利用しやすい部位において生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基はそれによって、抗体の利用しやすい部位に位置付けられ、それを使用して、抗体を、薬物部分またはリンカー - 薬物部分等の他の部分に複合して、本明細書にさらに記載される、免疫複合体を作り出してもよい。ある特定の実施形態において、次の残基のうちの任意の 1 個以上が、システインで置換されてもよい：軽鎖の V 2 0 5 ( K a b a t 付番)、重鎖の A 1 1 8 ( E U 付番)、および重鎖 F c 領域の S 4 0 0 ( E U 付番)。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第 7 , 5 2 1 , 5 4 1 号に記載されるように生成され得る。

10

## 【 0 1 1 0 】

## e) 抗体誘導体

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、容易に入手可能な、追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール ( P E G )、エチレングリコール / プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1 , 3 - ジオキソラン、ポリ - 1 , 3 , 6 - トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 ( ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか )、およびデキストランまたはポリ ( n - ビニルピロリドン ) ポリエチレングリコール、プロプロピレン ( p r o p r o p y l e n e ) グリコールホモポリマー、プロリプロピレン ( p r o l y p r o p y l e n e ) オキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール ( 例えば、グリセロール )、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってもよく、分岐していても非分岐であってもよい。抗体に結合したポリマーの数は、様々であってもよく、1 つを超えるポリマーが結合される場合、それらは、同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数および / または種類は、改善対象の抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下で療法において使用されるかどうか等を含むが、これらに限定されない考慮に基づいて、決定することができる。

20

30

## 【 0 1 1 1 】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、抗体および非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態において、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである ( K a m e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 1 0 2 : 1 1 6 0 0 - 1 1 6 0 5 ( 2 0 0 5 ) )。放射線は、任意の波長のものであってもよく、一般の細胞を害さないが、非タンパク質性部分を、抗体 - 非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅させられる温度まで加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【 0 1 1 2 】

## A. 組み換え法および組成物

抗体は、例えば、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号に記載されるように、組換え方法および組成物を用いて産生することができる。一実施形態において、本明細書に記載される抗 A p o L 1 抗体をコードする単離核酸が提供される。かかる核酸は、抗体の V L を含むアミノ酸配列および / または V H を含むアミノ酸配列 ( 例えば、抗体の軽鎖および / または重鎖 ) をコードし得る。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む 1 つ以上のベクター ( 例えば、発現ベクター ) が提供される。さらなる実施形態において、かかる核酸を

50

含む宿主細胞が提供される。1つのかかる実施形態において、宿主細胞は、(1)抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列および抗体のV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または(2)抗体のV<sub>L</sub>を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、および抗体のV<sub>H</sub>を含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む(例えば、それらで形質転換されている)。一実施形態において、宿主細胞は、真核性、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはリンパ系細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20細胞)である。一実施形態において、抗ApoL1抗体を作製する方法が提供され、本方法は、該抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に好適な条件下で培養することと、任意で、抗体を宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から回収することを含む。

10

#### 【0113】

抗ApoL1抗体の組み換え産生のために、例えば、上述のものなどの、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び/または発現のために、1つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、慣例の手順を使用して(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、容易に単離され、配列決定され得る。

#### 【0114】

抗体コードベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌において産生されてもよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号、および第5,840,523号を参照されたい。(また、大腸菌における抗体断片の発現を説明している、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい。)発現後、抗体は、可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離されてもよく、またさらに精製することができる。

20

#### 【0115】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体コードベクターに好適なクローニングまたは発現宿主であり、それには、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全ヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、真菌および酵母株が含まれる。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414(2004)およびLiet al., Nat. Biotech. 24:210-215(2006)を参照されたい。

30

#### 【0116】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物および脊椎動物)にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物および昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、使用され得る、多数のバキュロウイルス株が同定されている。

#### 【0117】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号を参照されたい(遺伝子組換え植物内で抗体を作製するためのPLANTIBODIES(商標)技術を記載する)。

40

#### 【0118】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40(COS-7)で形質転換されたサル腎臓CV1株;ヒト胚腎臓株(例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59(1977)に記載される293もしくは293細胞);ベビーハムスター腎臓細胞(BHK);マウスのセルトリ

50

細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）に記載されるTM4細胞；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸がん細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK；パッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳房腫瘍（MMT 060562）；例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）に記載されるTRI細胞；MRC 5細胞；及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR<sup>+</sup>CHO細胞（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ならびにY0、NS0、およびSp2/0等の骨髓腫細胞株を含む。抗体産生に適したある種の哺乳動物宿主細胞株の総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照されたい。

【0119】

#### C. アッセイ

本明細書に提供される抗Ap o L 1抗体は、それらの物理／化学特性及び／または生物活性について、当該技術分野で既知の種々のアッセイによって、同定され、スクリーニングされ、または特徴付けられてもよい。

【0120】

#### 1. 結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様において、本発明の抗体は、例えば、ELISA、ウエスタンブロット等の公知の方法により、その抗原結合活性について試験される。別の態様において、競合アッセイを使用して、Ap o L 1への結合について本明細書に記載される抗体と競合する抗体を同定してもよい。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、本明細書に記載される抗体によって結合される、同じエピトープ（例えば、直線状または立体配座エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

【0121】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化されたAp o L 1は、Ap o L 1に結合する第1の標識抗体（例えば、本明細書に記載される抗体）、及びAp o L 1への結合について第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2の未標識抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化されたAp o L 1が、第1の標識抗体を含むが、第2の未標識抗体を含まない溶液中でインキュベートされる。Ap o L 1に第1の抗体が結合することを許容する条件下でのインキュベーション後、過剰な非結合抗体が除去され、固定化されたAp o L 1に関連する標識の量が測定される。固定化されたAp o L 1に関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がAp o L 1への結合について第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。

【0122】

#### 2. 活性アッセイ

一態様において、生物学的活性を有するその抗Ap o L 1抗体を同定するためのアッセイが提供される。生物学的活性は、例えば、Ap o L 1への結合、それによりAp o L 1の血清濃度を減少させること、及び／またはAp o L 1媒介性腎症の進行を減少させることを含み得る。インビボ及び／またはインビトロでそのような生物活性を有する抗体もま

た提供される。

【0123】

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、かかる生物活性に関して試験される。ある特定の実施形態において、ApoL1のトリパノソーム活性を低下させる抗体のスクリーニングが行われる。ある特定の実施形態において、有足細胞毒性のインビトロモデルにおいてApoL1の毒性を低下させる抗体のスクリーニングが行われる。ある特定の実施形態において、アッセイは、実施例に記載されるように使用される。

【0124】

D. 医薬製剤

本明細書に記載されるApoL1抗体または免疫複合体の医薬製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、所望の程度の純度を有するかかる抗体または免疫複合体を、1つ以上の任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と混合することにより調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投薬量および濃度で、受容者に対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム等；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール等）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA等のキレート薬剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール等の糖類；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ならびに/またはポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体には、例えば、介在性(instertitial)薬物分散剤、例えば可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrHuPH20(HYLENEX(登録商標)Baxter International, Inc.)が更に含まれる。rHuPH20を含むある特定の例示的なsHASEGP及び使用法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPは、1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと組み合わせられる。

【0125】

例となる凍結乾燥抗体は、米国特許第6,267,958号に記載される。水性抗体製剤には、米国特許第6,171,586号および国際公開第2006/044908号に記載されるものが含まれ、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0126】

本明細書における製剤はまた、治療されている特定の適応症に対する必要に応じて、1つを超える活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を含有してもよい。例えば、ケアの基準をさらに提供することが望ましい場合がある。このような活性成分は、意図する目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。

【0127】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製される、マイクロカプセル、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中またはマクロエマルジョン中の、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート(methyl methacrylate

10

20

30

40

50

e) ) マイクロカプセル中に、封入されてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示される。

【0128】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、そのマトリクスは、造形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【0129】

インピボ投与のために使用されるべき製剤は、一般に滅菌されている。滅菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通じた濾過によって、容易に遂行され得る。

【0130】

E. 治療方法および組成物

本明細書に提供される抗ApoL1抗体のいずれも、治療方法において使用され得る。

【0131】

一態様において、薬として使用するための抗ApoL1抗体が提供される。さらなる態様において、腎症の治療に使用するための抗ApoL1抗体が提供される。ある特定の実施形態において、治療方法において使用するための抗ApoL1抗体が提供される。ある特定の態様において、本発明は、個体に、有効量の抗ApoL1抗体を投与することを含む、腎症を有する個体を治療する方法において使用するための抗ApoL1抗体を提供する。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、下に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。さらなる実施形態において、本発明はApoL1の血清濃度を低下させる及び/またはApoL1媒介性腎症の進行を減少させるのに使用するための抗ApoL1抗体を提供する。ある特定の態様において、本発明は、ApoL1の血清濃度を低下させるおよび/またはApoL1介在性腎症の進行を減少させるために有効量の抗ApoL1抗体を個体に投与することを含む、個体におけるApoL1の血清濃度を低下させる方法および/またはApoL1媒介性腎症の進行を減少させる方法における使用のための抗ApoL1抗体を提供する。上の実施形態のいずれかによる「個体」は、好ましくはヒトである。

【0132】

さらなる態様において、本発明は、薬の製造または調製における、抗ApoL1抗体の使用を提供する。一実施形態において、薬は、腎症を治療するためのものである。さらなる実施形態において、薬は、腎症を治療する方法において使用するためのものであり、本方法は、腎症を有する個体に、有効量の薬を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、例えば、下に記載される、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。さらなる実施形態において、薬はApoL1の血清濃度を低下させるため及び/またはApoL1媒介性腎症の進行を減少させるためのものである。さらなる実施形態において、薬は、ApoL1の血清濃度を低下させるおよび/またはApoL1介在性腎症の進行を減少させるために有効量の薬を個体に投与することを含む、個体におけるApoL1の血清濃度を低下させる方法および/またはApoL1媒介性腎症の進行を減少させる方法における使用のためである。上の実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0133】

さらなる態様において、本発明は、腎症を治療するための方法を提供する。一実施形態において、本方法は、かかる腎症を有する個体に、有効量の抗ApoL1抗体を投与することを含む。1つのかかる実施形態において、本方法は、個体に、下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。上の実施形態のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0134】

さらなる態様において、本発明は個体におけるApoL1の血清濃度を低下させる及び/またはApoL1媒介性腎症の進行を減少させる方法を提供する。一実施形態において

、方法は、個体に有効量の抗 A p o L 1 抗体を投与し A p o L 1 の血清濃度を低下させ、及び / または A p o L 1 媒介性腎症の進行を減少させることを含む。一実施形態において、「個体」は、ヒトである。

#### 【 0 1 3 5 】

さらなる態様において、本発明は、例えば、上記治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に提供される抗 A p o L 1 抗体のいずれかを含む医薬製剤を提供する。一実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗 A p o L 1 抗体のいずれかと、薬学的に許容される担体と、を含む。別の実施形態において、医薬製剤は、本明細書に提供される抗 A p o L 1 抗体のいずれかと、例えば、以下に記載される少なくとも 1 つの追加の治療剤と、を含む。

10

#### 【 0 1 3 6 】

本発明の抗体は、治療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせてのいずれかで使用することができる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも 1 つの追加の治療剤と同時に投与されてもよい。

#### 【 0 1 3 7 】

上述のかかる併用療法は、組み合わせた投与（2 つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる）、および別個の投与を包含し、別個の投与の場合、本発明の抗体の投与は、追加の治療剤（複数可）の投与の前、それと同時に、及び / またはその後に生じ得る。一実施形態において、抗 A p o L 1 抗体の投与及び追加の治療剤の投与は、互いに約 1 か月以内、または約 1 週間、2 週間、若しくは 3 週間以内、または約 1 日、2 日、3 日、4

20

#### 【 0 1 3 8 】

本発明の抗体（および任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内および鼻腔内を含む任意の適切な手段によって、および必要に応じて局所治療のために病巣内投与によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路による、例えば、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、静脈内または皮下注射等の、注射によるものであり得る。単回または種々の時点にわたる複数回投与、ポラス投与、およびパルス注入を含むが、これらに限定されない、種々の投薬スケジュールが本明細書で企図される。

#### 【 0 1 3 9 】

本発明の抗体は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬され、投与されるであろう。この文脈における考慮の要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュールリング、および医療従事者に既知の他の要因が含まれる。抗体は、必要ではないが、任意で、問題の障害を予防または治療するために現在使用される 1 つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または治療の種類、および上に考察された他の要因に依存する。これらは、一般に、本明細書に記載されるのと同じ投薬量で、本明細書に記載される投与経路により、または本明細書に記載される投薬量の約 1 ~ 99 %、または適切であると経験的 / 臨床的に決定される任意の投薬量で、任意の経路によって、使用される。

30

40

#### 【 0 1 4 0 】

疾患の予防または治療のために、本発明の抗体の適切な投薬量（単独でまたは 1 つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用されるとき）は、治療対象の疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度および経過、抗体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴および抗体への反応、ならびに主治医の裁量に依存するであろう。抗体は、患者に、1 回で、または一連の治療にわたって、好適に投与される。疾患の種類および重症度に応じて、例えば、1 回以上の別個の投与によってであれ、連続注入によってであれ、約 1  $\mu$  g / k g ~ 15 m g / k g（例えば、0 . 1 m g / k g ~ 10 m g / k g）の抗体が、患者への投与のための初回の候補投薬量であり得る。1 つの典型的な 1 日投薬量は、上述の要因に応じて、約 1  $\mu$  g / k g ~ 100 m g / k g 以上の範囲であ

50

り得る。病態に応じて数日間またはより長い日数にわたる反復投与について、治療は、一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されるであろう。抗体の1つの例示的な投薬量は、約0.05 mg/kg ~ 約10 mg/kg の範囲内となる。したがって、約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg、または10 mg/kg（若しくはこれらの任意の組み合わせ）の1回以上の用量が患者に投与され得る。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間毎に（例えば、患者が抗体の約2 ~ 約20回、または例えば、約6回用量を受容するように）投与されてもよい。初回よりも高い負荷用量、続いて1回以上のより低い用量が投与されてもよい。この治療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって容易に監視される。

#### 【0141】

上記製剤または治療方法のうちのいずれも、抗ApoL1抗体の代わりに、またはそれに加えて、本発明の免疫複合体を使用して行われ得ることが理解される。

#### 【0142】

##### F. 製品

本発明の別の態様において、上述の障害の治療、予防、及び/または診断に有用な物質を含有する製品が提供される。製品は、容器、および容器上のまたは容器に関連したラベルまたは添付文書を含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、静脈注射用溶液バッグなどが挙げられる。容器は、組成物を、それ自体で、または病態を治療する、予防する、及び/もしくは診断するのに有効な別の組成物と組み合わせで保有し、また滅菌アクセスポートを有し得る（例えば容器は、静脈注射用溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性な薬剤は、本発明の抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が選定した病態を治療するために使用されることを表示する。さらに、製品は、（a）組成物がその中に含有された第1の容器を含み、この組成物は本発明の抗体を含み、及び（b）組成物がその中に含有された第2の容器を含み、この組成物はさらなる細胞傷害性薬剤または治療剤を含んでもよい。本発明のこの実施形態の製品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを表示する、添付文書をさらに含んでもよい。代替または追加として、製品は、注射用静菌水（BWF I）、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、及びデキストロース溶液といった、薬学的に許容される緩衝液を含む第2（または第3）の容器を更

#### 【0143】

上記の製品のうちのいずれも、抗ApoL1抗体の代わりに、またはそれに加えて本発明の免疫複合体を含んで良いことが理解される。

#### 【実施例】

#### 【0144】

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上に提供される一般的説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施され得ることが理解される。

#### 【0145】

##### 倫理

全動物をジェネンテック社実験動物飼育使用委員会により認可されたプロトコールに従って取り扱った。カリフォルニア州法及び動物ケア倫理基準に従ってジェネンテック社隔離施設においてマウスコロニーを飼育した。

#### 【0146】

##### 実施例1：APO L1トランスジェニックマウスの生成及び遺伝子型

腎疾患進行におけるアポリポタンパク質L1（ApoL1）の役割を確認するため、発明者らは、ヒトApoL1遺伝子を含むバクテリア人工染色体（BAC）の44 kb部分を使用して、3系統のApoL1のG0変異体、ならびにトリパノソーマ感染症耐性を提供し、アフリカ人口における腎疾患リスクを増大する2種の共通配列変異体（G1、G2）を発現するトランスジェニックマウスを生成した（Kao et al., 2008；

10

20

30

40

50

Kopp et al., 2008)。

【0147】

トランスジーンの生成

ヒトAPO L1遺伝子(RP11-826P13)を含むBAC(バクテリア人工染色体)を確立されたリコンビニアリング法及びWarming et al, Nucleic Acids Res 2005, v33, e36に殆ど記載されているgal k ポジティブと対抗選択を用いて修飾した。SW102 E. coli中に形質転換後及び各修飾工程後に、BAC DNAをSpe I切断BACミニプレップDNAを用いてフィンガープリント法により特徴付けた。ポジティブとネガティブ選択の両方のためのデュアルステップカセットをブルーヘロンバイオテック/オリジーン社にて合成した。各カセットは修飾のいずれかの側に約200bpのホモロジーを有する。EcoRI及びSpe I/BamHI部位を用いてgal K選択の挿入を可能にするように設計して、BAC修飾及びBfuAI IIs型制限酵素を用いた続く継ぎ目のないgal K除去のためのポジティブ選択カセットを生成し、次いでセルフライゲーションしてBAC修飾のための対抗選択カセットを生成した。ターゲティングカセットをNot I切断によりpUCベクターバックボーンから遊離した。この試験で使用した2つのカセットの配列を表2に示す(AscI、Not I、EcoRI、BamHI、Spe I、及びBfuAIの認識配列(IIs型酵素の上鎖または下鎖)に下線を引いている; G1カセットでは、2つのG1変異(S342G及びI384M)をコードするDNA変化を太字にしている)。

10

【0148】

G2変異はアミノ酸N388及びY389(塩基対AATTAT)の欠失である。G1変異は2つの置換、S342G及びI384M(それぞれ、AGCからGGCへ、及びATTからATGへ)から成る。BACからgal Kカセット除去後、APO L1 BACの修飾ゲノム領域を、リコンビニアリング法を用いてpBR322中にリトリーブ(サブクローニング)して44kbトランスジーンを生成した。加えて、コントロールトランスジーン(wt)を未修飾APO L1 BACからリトリーブして生成した。トランスジーンをNot I切断により線状化し、精製し、C57BL/6Nマウス株の接合体中にマイクロインジェクトして、確立された方法を用いてトランスジェニックマウスを生成した。それぞれ、Ap o L1 wt、G1及びG2のトランスジーンの概略図を図1A~Cに示す。マウスをC57BL/6バックグラウンドで飼育した。

20

30

【0149】



【表 2】

名称	配列
ApoL1G0 変異体 (配列番号 01)	meg a a l l r v s v l c i w m s a l f l g v g v r a e e a g a r v q q n v p s g t d t g d p q s k p l g d w a a g t m d p e s s i f i e d a i k y f k e k v s t q n l l l l l t d n e a w n g f v a a a e l p r n e a d e l r k a l d n l a r q m i m k d k n w h d k g q q y r n w f l k e f p r l k s e l e d n i r r l r a l a d g v q k v h k g t t i a n v v s g s l s i s s g i l t l v g m g l a p f t e g g s l v l l e p g m e l g i t a a l t g i t s s t m d y g k k w w t q a q a h d l v i k s l d k l k e v r e f l g e n i s n f l s l a g n t y q l t r g i g k d i r a l r r a r a n l q s v p h a s a s r p r v t e p i s a e s g e q v e r v n e p s i l e m s r g v k l t d v a p v s f f l v l d v v y l v y e s k h l h e g a k s e t a e e l k k v a q e l e e k l n i l n n n y k i l q a d q e l
ApoL1G1 変異体 (配列番号 02)	meg a a l l r v s v l c i w m s a l f l g v g v r a e e a g a r v q q n v p s g t d t g d p q s k p l g d w a a g t m d p e s s i f i e d a i k y f k e k v s t q n l l l l l t d n e a w n g f v a a a e l p r n e a d e l r k a l d n l a r q m i m k d k n w h d k g q q y r n w f l k e f p r l k s e l e d n i r r l r a l a d g v q k v h k g t t i a n v v s g s l s i s s g i l t l v g m g l a p f t e g g s l v l l e p g m e l g i t a a l t g i t s s t m d y g k k w w t q a q a h d l v i k s l d k l k e v r e f l g e n i s n f l s l a g n t y q l t r g i g k d i r a l r r a r a n l q s v p h a s a s r p r v t e p i s a e s g e q v e r v n e p s i l e m s r g v k l t d v a p v g f f l v l d v v y l v y e s k h l h e g a k s e t a e e l k k v a q e l e e k l n m l n n n y k i l q a d q e l
ApoL1G2 変異体 (配列番号 03)	meg a a l l r v s v l c i w m s a l f l g v g v r a e e a g a r v q q n v p s g t d t g d p q s k p l g d w a a g t m d p e s s i f i e d a i k y f k e k v s t q n l l l l l t d n e a w n g f v a a a e l p r n e a d e l r k a l d n l a r q m i m k d k n w h d k g q q y r n w f l k e f p r l k s e l e d n i r r l r a l a d g v q k v h k g t t i a n v v s g s l s i s s g i l t l v g m g l a p f t e g g s l v l l e p g m e l g i t a a l t g i t s s t m d y g k k w w t q a q a h d l v i k s l d k l k e v r e f l g e n i s n f l s l a g n t y q l t r g i g k d i r a l r r a r a n l q s v p h a s a s r p r v t e p i s a e s g e q v e r v n e p s i l e m s r g v k l t d v a p v s f f l v l d v v y l v y e s k h l h e g a k s e t a e e l k k v a q e l e e k l n i l n n k i l q a d q e l
ApoL1G1 カセット (配列番号 04)	<u>g c g g c c g c t c a c a c g a g g c a t t t g g g a a g g a c a</u> t c c g t g c c c t c a g a c g a g c c a g a g c c a a t c t t c a g t c a g t a c c g c a t g c c t c a g c c t c a c g c c c c c g g g t c a c t g a g c c a a t c t c a g c t g a a a g c g g t g a a c a g g t g g a g a g g g t t a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a <b>g g c</b> t t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a g a a t g c a g g t g a

10

20

30

40

	<u>a t t c a a t a a a c t c g g c g g a t c c a c c t g c a t t c</u> <u>c a a a g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g</u> g t g g c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t g c t c a a c a a t a a t t a t a a g a t t c t g c a g g c g g a c c a a g a a c t g t g a c c a c a g g g c a g g g c a g c c a c c a g g a g a g a t a t g c c t g g c a g g g g c c a g g a c a a a a t g c a a a c t t t t t t t t t t t t c t g a g a c a g a g t c t t g c t c t g t c g c c a a g t t g g a g t g c a a t g g t g c g a t c t c a g c t c a c t g c a a g c t c t g c c t c c c g t g t <u>t g c g g c c g c</u>	10
ApoL1G2 カセット (配列番号05)	<u>g c g g c c g c</u> t t a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a a g c t t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g t g g c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t t c t c a a c a a t <u>a a g a c t g t g c a g g t g a</u> <u>a t t c g g a t c c a t t a a a a c t a g t a c c t g c a t t c</u> <u>a a g a</u> t t c t g c a g g c g g a c c a a g a a c t g t g a c c a c a g g g c a g g g c a g c c a c c a g g a g a g a t a t g c c t g g c a g g g g c c a g g a c a a a a t g c a a a c t t t t t t t t t t t t c t g a g a c a g a g t c t t g c t c t g t c g c c a a g t t g g a g t g c a a t g g t g c g a t c t c a g c t c a c t g c a a g c t c t g c c t c c c g t g t t c a a g c g a t t c t c c t g <u>g c g g c c g c</u>	20
リトリーブオリ ゴ1 (配列番号06)	t a g t c c t g t c c a g g g c c c c c t g g c c g c a g a c a a a t g c t a c a g a c a c g g c t <u>g g c g c g c c</u> g a t a c g c g a g c g a a c g t g a a	30
リトリーブオリ ゴ2 (配列番号07)	g t c a g t g g c a g g t c t t t c t t g a g c t c a g a a a g g t t a g g t a a c t a g t t c a g <u>g c g g c c g c</u> c t t a g a c g t c a g g t g g c a c t	

## 【0150】

## マウスの遺伝子型解析

標準的PCRまたはタクマン(Taqman)解析によりApoL1トランスジェニックマウスの遺伝子型解析を行った。ApoL1のG0変異体及びApoL1のG2変異体の遺伝子型解析は、標準PCR及びApoL1(フォワード5'-TTTCTTGTGCTGGATGTAG-3'(配列番号08)及びリバー5'-ATATCTCTCCTGGTGGCT-3'(配列番号09))に対するプライマーならびにTaci(フォワード5'-TGGGTGTCTAGGTTCCTTGCTTCTAGC-3'(配列番号10)及びリバー5'-CAGTGGATGCGCGCAGGAC-3'(配列番号11))に対するインターナルコントロールを使用する。反応条件は94℃、4分、次いで94℃、60秒(変性)、55℃、30秒(アニーリング)及び72℃、1分(伸長)で30サイクルである。Type-it Fast SNP PCR master mix(キアゲン社、PN206042)、各プライマー0.5μM及びプローブ(アプライドバイオシステムズ社)0.15μMを用いてApoL1のG1変異体のため、タグマン(tagman)アッセイを使用する。ApoL1は、フォワードプライマー5'-TGAGCAAGAGGAGTCAAG-3'(配列番号:12)、リバープライマー5'-TGTG

40

30

50

G T C A C A G T T C T T G - 3' (配列番号: 13))、及びプローブ5' - 6 F A M - A G C T A A A C A T G C T C A A C - N F Q - M G B - 3' (配列番号14)を使用する。A p oに対するポジティブコントロールは、フォワードプライマー - 5' - C A C G T G G G C T C C A G C A T T - 3' (配列番号15)、リバープライマー5' T C A C C A G T C A T T T C T G C C T T T G - 3' (配列番号16)、及びプローブ5' - V I C - C C A A T G G T C G G G C A C T G C T C A A - 3' (配列番号17)を使用する。反応条件は94℃、4分、次いで94℃、60秒(変性)、55℃、30秒(アニーリング)及び72℃、1分(伸長)で35サイクルである。F A M及びV I Cプローブを用いたエンドポイントPCRをA B 7 9 0 0 (アプライドバイオシステムズ社)で読み、クラスタープロットから アレルを識別する。

10

#### 【0151】

実施例2: トランスジェニックマウス及びヒトの血清学的A p o L 1の分析

血清の主要リポタンパク質分類を分別する密度勾配遠心分離法

1.006、1.019、1.063及び1.24 g / mlの密度を有するK B r / N a C l 溶液をM c P h e r s o n ら (M c P h e r s o n e t a l . , 2007) に従って製造した。全塩溶液はN a N <sub>3</sub> 0.1%及びE D T A 0.04%を含有した。D e n s i t o 30 P X 密度計 (メトラ・トレド社) を用いて25℃で密度を確認した。1.21 g / mlの密度を有する希釈血清溶液を、血清0.284 ml 及びH<sub>2</sub>O 2.556 ml にK B r 0.923 g を添加して最終体積3 ml にすることにより製造した。密度勾配管を蠕動ポンプを用いてC h a p m a n M J らに従って調製し充填した (C h a p m a n e t a l . , 1981)。B e c k m a n S W 4 1 T i ローター、40,000 rpm、>48時間、15℃で遠心分離を行った。蠕動ポンプを用いて1 ml 体積中にフラクションを集めてから、一夜4℃でトリス緩衝液 (E D T A 0.04%、トリス5 mM 及びN a C l 50 mM、pH 7.4) に対して透析した。ウエスタンブロット法については、A p o L 1 (プロテインテック社、11486-2-AP)、A p o A 1 (ロックランド社、600-101-196)、及びI g G (G E 社、N A 931V) に対して特異的な抗体を用いた4~20%トリス-グリシンゲルプローブ上にロードした。E C L プライム (G E ヘルスケア社) を用いて免疫反応性を検出した。

20

#### 【0152】

A p o L 1 E L I S A

30

A p o L 1 サンドイッチE L I S A を次のように展開した: 抗A p o L 1 ポリクローナル抗体 (プロテインテック社、11486-2-AP) 0.5 µg / ml を炭酸 / 重炭酸緩衝液 (N a<sub>2</sub> C O<sub>3</sub> 1.59 g、N a H C O<sub>3</sub> 2.93 g、水適量で1 L に調製) 中、一夜4℃でマキシソープ (登録商標) プレート (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、464718) 上に塗布した。ツイーン20を0.05%含有するトリス緩衝生理食塩水中、塗布プレートを5%牛乳で遮断した。アッセイ標準曲線を作成するため、O D<sub>280</sub> においてその濃度を測定した精製A p o L 1 タンパク質を、マジック緩衝液 (B S A 0.5%、ツイーン20 0.05%、E D T A 5 mM、pH 8、C H A P S 0.25%、B g G 0.2%、P B S 中のプロクリン 15 ppm) で希釈し、10%マウス血清 (インビトロジェン社、10410) を添加した。その後、4×段階希釈法を行って、10 µg / ml ~ 0.153 ng / ml の範囲の標準曲線を得た。実験血清試料をマジック緩衝液中1:10に希釈した。その後、プレ塗布及びプレ遮断したプレートを、標準曲線か実験試料のいずれか、ヒトA P O L 1 アイソフォーム1 (ジェネンテック社において生成及び精製) のアミノ酸61~398含有組換え融合タンパク質を用いてウサギ内で生じたA p o L 1 のG 0 変異体に対するビオチン化抗体0.5 µg / ml、及び1:10,000の過酸化物結合ストレプトアビジン (G E 社、R P N 4401V) と一緒にインキュベートした。ツイーン20 0.05%含有リン酸緩衝生理食塩水を用いて405 (商標) マイクロプレートウォッシャー (バイオテック社) で各インキュベーション工程間に、プレートを洗浄した。比色分析B i o F X (登録商標) T M B 基質 (サーモディクス社、T M B S 1000-01) を用いて検出し、1 M リン酸で停止して、S p e

40

50

c t r a M a x 2 5 0 分光計（モレキュラーデバイス社）で読み取った。

#### 【0153】

分別試験及びE L I S Aにおけるトランスジェニックマウス及びヒトの血清学的A p o L 1の比較

トランスジェニックマウスの血清学的A p o L 1がヒトA p o L 1と同様にH D L 粒子と会合するか確認するために、ヒト血清（図2 A）から主要リポタンパク質分類を分別し、上記密度勾配遠心分離法を用いてトランスジェニック血清（図2 E）と比較した。本発明者らは、A p o A 1がヒト血清（C h a p m a n e t a l . , 1 9 8 1 ; D a v i d s o n e t a l . , 2 0 0 9）から期待された通り正確に分別して、この方法が上手くいことを示していることを見出した。バンドI V及びI F - c（フラクション7、8及び9）中、H D L 3として主に存在し；少量はバンドI I I（フラクション6）中、H D L 2として存在し；有意量はV H D L（フラクション9及び10）としてI F - d中に見られ；A p o A 1はI g G（フラクション11及び12）などの遊離タンパク質と一緒にペレット状である（図2 C、D）。ヒト血清中のA p o L 1はA p o A 1が存在するフラクションのサブセット中に存在する。少量はバンドI V及びI F - c（フラクション8及び9）中H D L 3として存在するが、大部分はI F - d及びバンドV（フラクション9及び10）中V H D Lとして、ならびにバンドV及びペレット（フラクション11、12）中遊離タンパク質として存在する（図2 B、D）。ヒトアポリポタンパク質と一致して、トランスジェニックマウスの血清のA p o A 1はバンドI I I及びI V（フラクション6、7、8及び9）中H D L 2及びH D L 3として存在するが、比較的少量のものはI F - d（フラクション10）中V H D Lとして、及びI g G（フラクション12）などの非結合性タンパク質と一緒に存在する（図2 G、H）。トランスジェニックマウスのA p o L 1はバンドI V（フラクション8及び9）及びV H D L（I F - d、フラクション10）中H D L 3として主に存在するが、比較的少量のものは同様にA p o L 1のG 0変異体とA p o L 1のG 2変異体の両方に脂質付加していないタンパク質（フラクション11）と一緒にバンドV中に存在する（図2 F）。トランスジェニック系統の両方からのA p o L 1及びA p o A 1は同様に分別する。

#### 【0154】

本発明者らのトランスジェニックマウス系統がヒトと同様にA p o L 1の濃縮物を発現するかどうかを決定するために、トランスジェニックマウス内の循環A p o L 1値を定量化して、上記のように社内で開発した特定のサンドイッチE L I S Aを用いてヒト血清学的A p o L 1と比較した。本発明者らは、アフリカ系アメリカ人ドナーのヒト血清をA p o L 1のG 0変異体またはA p o L 1のG 2変異体を発現するマウス及びトランスジェニックネガティブ同腹仔コントロールと比較した。他者が循環A p o L 1濃度が3 8 6 ~ 1 5 , 7 4 3 n g / m lの範囲であることを報告している（D u c h a t e a u e t a l . , 2 0 0 0 ; P a g e e t a l . , 2 0 0 6）が、本発明者らはA p o L 1のG 0変異体を発現する動物の血清中のA p o L 1が5 3 ~ 7 0 n g / m l（± 1 0）であり、G 2変異体を発現する動物中の濃度は9 3 ~ 1 1 7（± 1 4）であり、ヒト血清中のA p o L 1は9 9 ~ 1 2 5（± 3 2）であることを見出している。各血清の範囲は図3に示しており、A p o L 1のG 0変異体（図3 A）かA p o L 1のG 2変異体（図3 B）のいずれかと標準曲線の使用を反映している。結論として、本発明者らは、分別試験及びE L I S Aにおいて、トランスジェニックマウス内の血清学的A p o L 1がヒトA p o L 1と同様に挙動することを見出した。

#### 【0155】

実施例3：トランスジェニックマウスにおけるA p o L 1の発現

定量的P C R

成体マウス（R N e a s yキット、キアゲン社）の臓器から全R N Aを抽出し、D N a s e処理（キアゲン社）を含めた。R T - P C Rキット（H i g h C a p a c i t y c D N A R e v e r s e T r a n s c r i p t i o n ; アブライドバイオシステムズ社）を用いてR T - P C Rを行い、アブライドバイオシステムズ社から購入したプライマ

ー / プローブセットを用いて A p o L 1 及び m G a p d H について定量 P C R を行った。

【 0 1 5 6 】

ウエスタンブロット法

F u G e n e 6 ( ロシュ社 ) 及び c D N A を用いて製造者説明書に従って C H O . K 1 細胞を A p o L 1 ( D N A 3 7 0 0 8 1 、 N M \_ 0 0 3 6 6 1 ) 及び A p o L 2 ( D N A 3 6 9 8 4 3 、 N M \_ 1 4 5 6 3 7 ) ( オリジーン社 ) に一過性トランスフェクトを行った。細胞を迅速に P B S で洗浄し、R I P A 緩衝液プラスプロテアーゼインヒビターカクテル中に直ちに溶解した。分散組織ライセートについては、キシラジン ( 1 m g / m l ) とケタミン ( 1 0 0 m g / m l ) とのカクテルを体重 2 0 ~ 3 0 g 当たり 0 . 1 ~ 0 . 2 m l 腹腔内投与して麻酔し、心臓を通してリン酸緩衝生理食塩水 4 0 m l をかん流した。肝臓及び肺を取り出し、1 m m 3 片に細かく刻み、H B S S 中にホモジナイズし、ペレット化して R I P A 緩衝液プラスプロテアーゼインヒビターカクテル中に溶解した。ピシンコニン酸 ( B C A ) 試薬 ( ピアス社 ) を用いて、タンパク質濃度を決定した。有足細胞または組織ホモジネート 3 0 μ g 、過剰発現ライセート 1 5 μ g 、及び A p o L 1 トランスジェニックマウス血清またはヒト血清 0 . 1 μ l を、各レーンにロードし、4 ~ 2 0 % トリス - グリシンまたは 4 ~ 1 2 % ビス - トリスドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動法により分離した。タンパク質をニトロセルロース膜 ( インビトロジェン社 ) に移動した。ブロットを、P B S 中の 5 % 牛乳中、0 . 0 5 % ツイーン 2 0 で停止してから、A p o L 1 抗体 ( シグマアルドリッチ社、H P A 0 1 8 8 8 5 、1 : 5 0 0 、またはプロテインテック社、1 1 4 8 6 - 2 A P 、1 μ g / m l ) でプローブした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識二次抗体で一次抗体を化学発光検出し、次いで E C L - p r i m e 試薬 ( G E 社 ) で可視化することによりシグナルを検出した。

10

20

【 0 1 5 7 】

有足細胞培養及び分化

条件的不死化ヒト S V 4 0 t s A 5 8 T / h T E R T 有足細胞セルラインをブリストル大学 ( 英国、ブリストル ) から得た。未分化有足細胞を、1 0 % F B S ( シグマ社 ) 及びインスリン - トランスフェリン - セレニウム ( インビトロジェン社 ) を添加した R P M I - 1 6 4 0 培地中、増殖のために 3 3 °C で保持した。S a l e e m e t a l ( S a l e e m e t a l . , 2 0 0 2 ) に記載されている通り、要するに、未分化有足細胞を 4 0 ~ 6 0 % コンフルエントで 3 7 °C まで温度スイッチし、さらに 1 4 日間それを維持し、週に 3 回培地を変えることにより、有足細胞の分化を行った。

30

【 0 1 5 8 】

定量 P C R 及びウエスタンブロット解析を用いた A p o L 1 発現の決定

A p o L 1 を発現するトランスジェニックマウスがヒトと同様なパターンの遺伝子発現を有するののか否かを決定するために、本発明者らは、A p o L 1 を高発現すると報告されているいくつかの臓器、すなわち、腎臓、肺及び肝臓に対して上記のように定量 P C R を行った ( G e n e c a r d s , w w w . g e n e c a r d s . o r g ) 。本発明者らのデータは、トランスジェニックマウス内の発現がヒト発現パターンと一致することを示している。全腎臓内で比較的少ない発現であるが、肝臓内で最大の発現 ( 腎臓の 8 8 倍 ) 及び肺 ( 腎臓の 1 0 倍 ) である ( 図 4 A - 1 、 A - 2 ) 。循環 A p o L 1 を除去するため P B S でかん流したマウスからの肺及び肝臓ライセートのウエスタン解析 ( 上記の通り ) は、発現されたタンパク質が遺伝子発現データと相関があることを示している。ヒト A P O L 1 アイソフォーム 1 の N 末端 2 3 8 アミノ酸含有組換え融合タンパク質を用いてウサギに免疫して得たポリクローナル抗体 ( プロテインテック社、1 1 4 8 6 - 2 A P ) を用いて A p o L 1 を検出した ( 図 4 B ) 。ウサギポリクローナル抗体 ( シグマ社、H P A 0 1 8 8 8 5 ) を用いて、未分化または分化ヒト培養有足細胞中、及び A p o L 1 の G 0 変異体を発現するトランスジェニックマウスの血清中で A p o L 1 を検出した。C H O - 1 K 細胞内の A p o L 1 、A p o L 2 、またはコントロール一過性トランスフェクションのライセートは、A p o L 1 及び A p o L 2 の両方がシグマ抗体で検出されることを示している ( 図 4 C ) 。

40

50

## 【0159】

## 実施例4：

## 薬剤性腎症

20～25gの体重で8～12週齢の雄マウスを得た。ドキソルビン（温PBS中0.5mg/mlに再懸濁；シグマ社D1515）を各非麻酔マウスの尾静脈から1回注射した。同齢雄マウスに同体積のリン酸緩衝生理食塩水を注射した。全コントロール及び実験マウスを個別に収容し、毎日2mlの乳酸加リンゲル液（バクスター社）を水分補給させた。各動物の自然に排泄された尿から週毎にタンパク尿を評価した。標準品としてマウスアルブミン（Innovative Research社）を用いて酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）により尿中アルブミンを測定し、比色アッセイ（エンゾライフサイエンス社）により測定したクレアチニンに対して正規化した。21日目で、動物の体重を量り、安楽死させて組織診断のために腎臓を得た。

10

## 【0160】

## 免疫組織化学解析

全ての組織学的解析のため、マウスを、結果をもたらすCO<sub>2</sub>吸入により殺処分し、腎臓を直ちに解剖して取り出し、PBS中4%パラホルムアルデヒドに浸漬することにより固定し、矢状に切断してパラフィン切片処理した。3μmの切片に対して標準プロトコルに従って退行性ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色を行った。

## 【0161】

## 透過型電子顕微鏡法（TEM）

組織を、1/2強度のカルノフスキー固定液（2%パラホルムアルデヒド及び0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液中の2.5%グルタルアルデヒド、pH 7.2）中で固定し、同緩衝液で洗浄し、1%四酸化オスミウム水溶液中で1時間、後固定した。それから、試料を一連のエタノール、次いで、酸化プロピレンにより脱水し、Eponate 12（テッドペラ社）中に包埋した。ミクロトーム（Ultracut E；ライヘルト社）で薄切片を切り出し、酢酸ウラニル及びクエン酸鉛で染色し、顕微鏡（CM12；フィリップス社）で検査した。レトラクタブルデジタルカメラ（マルチスキャン；ガタン社）を用いて画像をキャプチャーした。

20

## 【0162】

Apol1は、マウスモデルの腎疾患の進行を促進する。

30

Apol1発現単独で末期腎疾患（ESRD）に対して進行を誘導しない。25週齢まで、Apol1のG0変異体またはApol1のG2変異体を発現するトランスジェニックマウスで尿タンパク値は正常であり、クレアチニンに対するアルブミンの比は5の値より低くなる（アルブミン濃度をクレアチニン値に対して正規化する；遺伝子型当たりn=3～9及び平均は±SEM；図5）。ドキソルビン誘導腎症は有足細胞傷害、次いで、糸球体硬化症、尿細管間質炎及び線維症により特徴付けられる慢性腎疾患の確立したげっ歯類モデルである（Lee and Harris, 2011）。したがって、本発明者らは、本発明者らの上記トランスジェニックモデルにおいて薬剤的に腎症を誘導した。一連の先行実験では、本発明者らは、8～12週齢のC57BL/6マウスに1回の尾静脈注射によりドキソルビンを投与した。体重当たり12、または15mg/kgの投与では、尿タンパク（クレアチニンに対するアルブミンの比は5以上15以下の範囲である）に対する効果はなく（図6）、腎臓の組織学的検査はドキソルビン治療マウス及びPBSで治療した同腹仔コントロールで識別不能である（データ示さず）。20mg/kgの中位の投与は11日目までタンパク尿を引き起こすが、Apol1の存在は効果がない（図6）。

40

## 【0163】

25mg/kgドキソルビンの単回注射後、ドキソルビンで治療した全てのマウスにおいて2日目まで尿タンパクは急激に上昇したが、遺伝子型間に有意差はなかった（図7A）。H&E染色腎組織はいろいろな腎症の表現型を示している。ドキソルビン（図7B）またはPBS（図7C）で治療したトランスジェニックネガティブ動物は識別不可

50

能であり、腎症を示さない。しかしながら、A p o L 1 の G 0 変異体（図 7 D）または A p o L 1 の G 2 変異体（図 7 F、G）を発現するトランスジェニックマウスは、尿細管拡張症、尿細管壊死、タンパク性円柱形成（*proteinaceous casts*）及び尿細管細胞萎縮症を示す。しかしながら、全てのトランスジェニックポジティブマウスが腎症を示すわけではなく（図 7 E）、観察された糸球体に対する明白な損傷もない。これらの試験では、本発明者らは、有意な体重減少及び治療群、特に、A p o L 1 発現に対してポジティブであるものにおける死亡率を観察した。

#### 【0164】

水分補給と血流の減少は腎臓のより急速な増悪と早期死亡率をもたらし得るので、本発明者らは、毎日、付加的に皮下液体を投与しながらドキシソルビシンのより高用量を繰り返した。これは、全てのマウスが 21 日目の試験終了まで生存することを可能とした。試験終了時、ドキシソルビシンで治療したマウスは A p o L 1 の G 0 変異体、A p o L 1 トランスジェニックマウス（10%）またはトランスジェニックネガティブ動物（11%）と比較して、17%の有意な体重減少である（図 8）。G 2 変異体を発現するトランスジェニックマウスにおいて、尿中アルブミンも 11 日目で有意に上昇し、クレアチニンに対するアルブミンの平均比は 6609 であり、トランスジェニックネガティブマウスより 5.2 倍高い（ $p = 0.002$ ）。これらのマウスにおいて、タンパク尿は 18 日目で高いままであり、クレアチニンに対するアルブミンの平均比は 6146 であり、治療トランスジェニックネガティブマウスより 3.9 倍高い（ $p = 0.02$ ）。A p o L 1 の G 0 変異体を発現するドキシソルビシン治療トランスジェニックマウスにおいて、尿中アルブミンは有意に高くないが、値はドキシソルビシン治療トランスジェニックネガティブ動物と G 2 変異体を発現するマウスとの中間である（A p o L 1 の G 0 変異体を発現するトランスジェニックにおけるクレアチニンに対するアルブミンの平均比は 11 日目で 2768 であり、18 日目で 2880 である）。P B S 治療コントロールは正常なままである（図 9）。さらに、T E M 分析は、P B S 治療マウスにおける規則的間隔の足突起中への有足細胞の同化作用を示しているが、ドキシソルビシンで治療した動物は有足細胞足突起の展退を示し、これはタンパク尿の糸球体疾患の不変の特徴である（図 10）。上記の通り、T E M 分析を行った。

#### 【0165】

尿中アルブミン値上昇がドキシソルビシン治療腎臓内の組織病理と相関するか否かを評価するため、ドキシソルビシン治療後 21 日目にマウスを取り出し、ヘマトキシリン・エオジン（H & E）、過ヨウ素酸シッフ（P A S）及びマッソン三色染色で染色した。定性的に、H & E はタンパク質及び核を染色し、P A S は基底膜を染色するが、三色染色は間質性線維症及び基底膜の両方を染色する。全ドキシソルビシン治療動物がいくつかの病変を示すが、遺伝子型間の差は、重症度及び病変分布の差であるが、病変自体ではなく、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するドキシソルビシン治療トランスジェニックマウスはトランスジェニックネガティブ及び A p o L 1 G 2 トランスジェニックマウスへの中間的病理表現型を示す。H & E 染色腎臓の低倍率画像は、ドキシソルビシンの単回投与を 0 日目で静脈内に送達し、21 日目で取り出し、脱水予防のため皮下液体を毎日投与するプロトコールにおいて、非トランスジェニックマウス（図 11 B）の最軽度な損傷、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するトランスジェニックマウスの中度な損傷（図 11 C）、及び A p o L 1 の G 2 変異体を発現するトランスジェニックマウスの最重度な損傷（図 11 D）を有する P B S 治療マウス（図 11 A）と比較して損傷の段階的進行を示す（図 11 E）。H & E（図 11 F ~ J）、過ヨウ素酸シッフ染色（図 11 K ~ O）、及びマッソン三色染色（図 11 P ~ S）で染色したドキシソルビシン治療腎臓のより高倍率は、正常な糸球体（図 11 F、K、P）と比較して、ドキシソルビシン治療動物が F S G S と存在することを示す（図 11 G ~ J、L ~ O、Q ~ S）。ポーマン隙は拡張し、タンパク性液体で満たされており（図 11 H、星）；主にリンパ球から成る軽度尿細管間質性浸潤物があり（図 11 I、白色アスタリスク（*asterix*））；拡張した近位尿細管内にタンパク質が蓄積しており（図 11 O、十字）；近位上皮細胞の細胞質内に硝子（タンパク質）滴の蓄積がある（

図 1 1 O、黒矢印)。病理学スコアは、トランスジェニックネガティブコントロールまたは A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウス ( $p = 0.03$ ) と比較して、A p o L 1 G 2 を発現するドキソルビシン治療マウス ( $p = 0.00034$ ) において有意により大きな損傷があることを示す (図 1 1 T)。

#### 【0166】

全ドキソルビシン治療マウスにおいて、タンパク性液体が存在し、ボーマン隙は拡張している。巣状分節性糸球体硬化症があり、これが、全腎臓内の糸球体糸脚に可变的に影響を及ぼす。近位尿細管は拡張し、タンパク性液体で満たされており、タンパク円柱及び近位上皮細胞の細胞質は球状タンパク質で満たされている。腎臓全体を通して多発的に、主にリンパ球から成る軽度尿細管間質性浸潤物がある。以下の類別システムを適用して、A p o L 1 介在腎症の進行を評価するために腎臓の病理学的表現型を決定した。腎臓の 4 つの主要な構造をスケール 0 ~ 4 で類別した。0 は正常を示し、4 は重度な変化を示す。少なくとも 10 例の糸球体を各動物について検査した。類別全体は全変化の総合印象に基づき、大部分で影響された適切な構造の割合を考慮する。以下のように各成分について変化を類別した：

#### 【0167】

- 1．糸球体の大きさ、分葉、癒着、房の線維症、ボーマン嚢の線維症、拡張、毛細管狭窄、基底膜肥厚、ボーマン隙内のタンパク質、細胞性増大 (糸球体間質または内皮)、白血球による浸潤、毛細管血栓
- 2．尿細管萎縮症、壊死、液胞及び硝子滴変化、基底膜肥厚、拡張、管腔内の炎症細胞及び円柱
- 3．間質線維症、浮腫、急性及び慢性白血球浸潤
- 4．細動脈線維症、血栓症、硝子変化と狭窄

#### 【0168】

動物のより大きなコホートで個別の試験を行った。ドキソルビシンの単回投与を 0 日目で静脈内 (I V) に送達し、28 日目で取り出し、皮下液体を脱水予防のために毎日投与した (図 1 2 A)。クレアチニン値に対して正規化した尿中アルブミンは、トランスジェニックネガティブコントロールと比較して ( $p = 0.05$ 、図 1 2 B)、A p o L 1 G 2 において上昇した。尿中アルブミン値上昇及び A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウスの疾患進行と関連した病理組織診断はトランスジェニックネガティブコントロールと比較して、A p o L 1 の G 2 変異体を発現するマウスに対して中間であった。病理学的スコアは、トランスジェニックネガティブコントロールと比較して、A p o L 1 の G 0 変異体 ( $p = 0.003$ ) か A p o L 1 の G 2 変異体 ( $p = 0.0005$ ) のいずれかを発現するドキソルビシン治療マウスにおいて有意により大きな損傷があったことを示した (図 1 2 C)。前の試験と一致して、トランスジェニックネガティブマウス ( $p = 0.05$ ) より 2 倍高い、5964 のクレアチニンに対するアルブミンの平均比を有する A p o L 1 の G 2 変異体を発現するトランスジェニックマウスにおいて 18 日目に尿中アルブミンは有意に上昇した。尿中タンパク尿の上昇は、非トランスジェニック動物と比較して、A p o L 1 の G 0 変異体を発現するマウスにおいて有意でなかったが、28 日の試験の終了時の病理学的スコアは、トランスジェニックネガティブと A p o L 1 の G 2 変異体を発現するトランスジェニックマウスに対して中間であるトランスジェニックネガティブと比較して、有意な疾患進行を示した。

#### 【0169】

##### 実施例 5：A p o L 1 アデノウイルス送達

A p o L 1 の G 0 変異体、A p o L 1 の G 1 変異体及び A p o L 1 の G 2 変異体をアデノウイルスを用いて発現した。V e c t o r B i o L a b s 社により、A p o L 1 変異体をアデノウイルスベクター中にクローンし、製造し、タイター (t i t e r d) した。滅菌 P B S 中  $100 \mu l$  にした  $1 \times 10^8$  P f u と一緒に各マウスの (-) 2 日目及び 14 日目に尾静脈注射によりアデノウイルス送達を行った。ドキソルビシン誘導腎症を 0 日目に上記のように行った (実施例 4 参照)。脱水予防のために皮下液体を投与し、11 日



目及び18日目に尿を集め、28日目に取り出した(図13A)。クレアチニン値に対して正規化した尿中アルブミンは、ApoL1のG0変異体( $p = 0.05$ )及びG1変異体( $p = 0.03$ )において有意に上昇し、トランスジェニックネガティブコントロールと比較した(図13B)。尿中アルブミン値上昇及び病理学的スコアと相関がある病理組織診断は、トランスジェニックネガティブコントロールと比較して、ApoL1のG0変異体( $p = 0.004$ )、ApoL1のG1変異体( $p = 0.000085$ )、及びApoL1のG2変異体( $p = 0.03$ )において観察される有意に大きな損傷を明らかにした(図13C)。アデノウイルスコンストラクトを注射されたマウスの大部分においてApoL1値は高かった。第一回目の注射後にApoL1を発現する動物のみ、尿分析及び病理学的スコアに含めた(図13D)。コントロールとしてハプトグロビン関連タンパク質(HRP)を発現するマウスと比較してApoL1変異体の効果を示した。HRPはヒト特異的な血清分泌タンパク質であり、通常、マウスでは発現されない。結論として、肝臓にApoL1を送達したApoL1のG0変異体、ApoL1のG1変異体及びApoL1のG2変異体のアデノウイルス発現は、血清のApoL1発現が腎疾患の進行を促進することを確認した。

#### 【0170】

実施例6：ApoL1を認識する抗体の製造

これに限定されないが、組換えApoL1タンパク質(G0、G1及びG2)をマウスまたはハムスターに注射することを含むいずれかの標準的ハイブリドーマの方法により、G0、G1及びG2に対するモノクローナル抗体を作成する。加えて、マウスに対して、適切な送達ベクター(pCAGGS)中ApoL1またはそのG1及びG2をコードするDNA配列の水力学的送達を行う。

#### 【0171】

抗体スクリーニングを下記のように行う。標準ELISAを、ポジティブハイブリドーマを選択するために原抗原に対して使用する。したがって、ApoL1 G0、G1またはG2(N末端hisまたはFLAGエピトープタグを有するアミノ酸D61-L398)をコートしたMaxisorp(登録商標)プレートを遮断し、ハイブリドーマ上澄みと結合し、HRP結合抗マウスで検出する。それから、このロイシンジッパー領域は他のまだ確認されていないタンパク質との結合も介在して腎機能不全を介在するので、SRA(血清耐性関連タンパク質)遮断ELISAを行い、ApoL1のSRA相互作用ドメインがSRAと結合するのを抑制する抗体を確認する。遮断ELISAのため、ApoL1-FLAGコートプレートを遮断し、抗体上澄みとプレ結合したSRA-hisとインキュベートする。SRA-his(すなわち、非SRA-ID遮断抗体)の存在下、抗体結合をHRP結合抗hisタグ抗体及びTMB基質を用いて検出する。

#### 【0172】

その後、ヒト血清のApoA1-ApoL1サンドイッチELISAを使用して、血清中のHDL粒子内のApoL1を認識可能な抗体を同定する。この目的のため、Maxisorp(登録商標)プレートをポリクローナルヤギ抗ApoL1抗体でコートし、遮断し、界面活性剤フリー緩衝液(HDL粒子完全性を維持するため)中ヒト血清とインキュベートしてHDL粒子を捕捉する。それから、抗ApoL1モノクローナルをインキュベートし、いずれもの結合した抗体をHRP抗マウスで検出する。必要ならば、ヒトApoL1 G1及び/またはG2血清に対して、ポジティブ抗体をさらに試験できる。

#### 【0173】

次に、標準クロスブロッキングELISAによるエピトープマッピングを行う。この目的のため、いずれもの標準的方法を使用でき、例えば、一次抗体を組換えApoL1と結合し、次いで、ビオチン化二次抗体とインキュベートし、ストレプトアビジンHRPを用いて検出してどの抗体が同じApoL1エピトープのために競合するのかを決定する。

#### 【0174】

エピトープマッピングのため、C末端人工グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーによりその表面上に誘導可能なApoL1またはそのフラグメントを安定に発現する

C H O細胞をハイブリドーマ上澄みとインキュベートし、次いで、A l e x a 6 4 7 抗マウスによりそれらがどのドメインと結合するかを同定する。A p o L 1 ( そのシグナル及び細胞表面にアンカーするC末端グリコシルホスファチジルイノシトールアンカーを含むN末端単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D ( g D ) エピトープタグを有する ) レンチウイルスを使用して、毒性の問題を克服するためにドキシサイクリン誘導可能な方法で、A p o L 1 G 0、G 1またはG 2全長またはドメインフラグメントを安定に発現するC H O細胞を製造する。以下のコンストラクトを使用する：全長 = D 6 1 0 ~ L 3 9 8 ; ポア形成ドメイン + メンブレンアドレッシングドメイン = a a D 6 1 ~ E 3 0 8 ; メンブレンアドレッシングドメイン + S R A相互作用ドメイン = G 2 3 1 ~ L 3 9 8 ; S R A - I Dのみ = R 3 0 5 ~ L 3 9 8。

10

#### 【 0 1 7 5 】

A p o L 1 活性のための細胞ベースアッセイとしては以下のものが挙げられる：

a ) カルバコールで刺激された安定293細胞を発現するドキシサイクリン誘導性T R P C 6を用いたメンブレンポテンシャルアッセイ。A p o L 1のいずれもの効果 ( ボドシンの発現があってもなくても ) を抗A p o L 1抗体の存在下で評価し、T R P C 6シグナル伝達に対するA p o L 1の効果を阻害するいずれかを同定する。

b ) ヒト不死化有足細胞のアクチン細胞骨格 ( アレクサファロイジン染色 ) に対する組換えA p o L 1の効果を抗A p o L 1抗体の存在下で評価し、いずれがA p o L 1の効果を阻害するかを決定する。

c ) アデノウイルス発現されたA p o L 1 ( 特にG 1変異体 ) は飲細胞作用染料 ( ルシファアーイエローC H ) 及び酸トレーサー、リソトラッカーレッドを用いて評価したとき、ヒト不死化有足細胞のリソソーム完全性を破壊する。感染した有足細胞の理想的な条件培地を抗A p o L 1抗体とプレインキュベートを可能とするために使用して、リソソームに対する効果を阻害するいずれかを同定する。

20

#### 【 0 1 7 6 】

様々なドメインに対する可能性のある候補をインビボ有効性モデル、すなわち、A p o L 1 ( G 0、G 1及びG 2 ) トランスジェニックマウスのA p o L 1促進ドキシソルビシン誘導タンパク尿を抑制する能力について試験する。様々なエピトープからの候補抗体、好ましくは、S R A結合を遮断するもの、または細胞ベースアッセイの1つをインビボで試験する。タンパク尿 ( 尿中のアルブミン：クレアチニン比の増加 ) により評価するとき、A p o L 1のG 0変異体、A p o L 1のG 1変異体及びA p o L 1のG 2変異体を発現するトランスジェニックマウスにドキシソルビシンを投与して上記のように腎症を誘導する。本明細書で示すように、A p o L 1のG 0変異体は非トランスジェニックマウスと比較してタンパク尿を増加させ、A p o L 1のG 2変異体はさらに大きな効果を有する。A p o L 1介在性タンパク尿増大を回復させるA p o L 1に対する抗体能力をモニターする。

30

#### 【 0 1 7 7 】

インビボ活性に対するP Dマーカーは血清A p o L 1値のモニターも含み、A p o L 1含有H D L粒子が欠乏するかどうかを決定する。従したがって、本明細書に記載のA p o L 1トランスジェニックマウスモデルを用いて、サンドイッチE L I S AによりA p o L 1値の評価のために抗体投与後の適切な間隔で血液を採取してA p o L 1が循環から欠乏していないかどうかを決定する。ウサギポリクローナルA p o L 1をプレート上にコートし、遮断し、界面活性剤の存在下マウス血清とインキュベートして、非競争的エピトープに対するビオチン化ウサギポリクローナルA p o L 1で検出する。結合をストレプトアビジンH R Pで検出し、組換えA p o L 1標準品と比較して相対血清値を決定する。

40

#### 【 0 1 7 8 】

上述の発明は、明確な理解のための例示説明及び例としてある程度詳細に記載されたが、これらの説明及び例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

#### 【 0 1 7 9 】

50

## 実施例 7 : A p o L 1 抗体の生成及び特徴付け

R i b i アジュバントはシグマ社 ( カタログ # S 6 3 2 2 )、完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバント ( C F A / I F A ) はベクトンディッキンソン社 ( B D、カタログ # 2 3 1 1 4 1 / 2 6 3 9 1 0 )、T o l l 様受容体 ( T L R ) カクテルで使用したアジュバントはインビボゲン社の C p G ( カタログ # t l r 1 - 1 8 2 6 - 1 )、インビボゲン社の R 8 4 8 ( カタログ # t l r 1 - r 8 4 8 )、インビボゲン社の P o l y I : C ( カタログ # v a c - p i c ) 及びシグマ社のモノホスホリル脂質 A ( M P L ) ( カタログ # L 6 8 9 5 )、C l o n a C e l l - H Y 培地 B ( カタログ # 0 3 8 0 2 )、培地 C ( カタログ # 0 3 8 0 3 )、培地 D ( カタログ # 0 3 8 0 4 ) 及び培地 E ( カタログ # 0 3 8 0 5 ) はステムセルテクノロジーズ社から入手した。電気融合用に使用した細胞融合用培地 C ( カタログ # L C M - C ) はサイト・パルス・サイエンス社から入手した。ヤギ抗マウス I g G F c ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体はシグマ社 ( カタログ # A 2 5 5 4 ) から入手した。3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B ) 伝導率一成分 H R P マイクロウェル基質 ( カタログ # T M B W - 1 0 0 0 - 0 1 ) 及び T M B 停止試薬 ( カタログ # B S T P - 1 0 0 0 - 0 1 ) はバイオ F x ラボラトリーズ社から入手した。

## 【 0 1 8 0 】

## インビボ免疫

水力学的尾静脈注射 ( H T V ) 免疫のため、1  $\mu$  g G M - C S F と混合した A p o L 1 G 1 または G 2 D N A コンストラクト ( 配列を下表 3 に示す ) の 5 0  $\mu$  g / マウスをリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) 中全体積 2 . 0 m l で尾静脈注射により B A L B / c マウスに免疫した。全部で 6 回の注射を 2 週間毎に注射した。

## 【 0 1 8 1 】

タンパク質免疫のため、B A L B / c マウスをアジュバントに依存して、組換えヒト A p o L 1 G 0 ( アミノ酸 D 6 1 ~ L 3 9 8 ) をマウス当たり 1 0 かまたは 5 0  $\mu$  g / 注射のいずれかで B A L B / c マウスに免疫した。R i b i アジュバント ( シグマ社 ) 及び T L R カクテルアジュバント ( 1 0  $\mu$  g の C p G + 1 0  $\mu$  g のポリ I : C + 2 0  $\mu$  g の R 8 4 8 + 5 0  $\mu$  g の M P L ) のため、全 1 6 回の注射のため、3 ~ 4 日の間隔で、1 0 0  $\mu$  l のアジュバント / マウス中の抗原 1 0  $\mu$  g 全部を腹腔内 ( I P ) か、皮下 ( S C ) か、あるいは尾の底 ( B O T ) かいずれかに注射した。C F A / I F A アジュバントのため、1 0 0  $\mu$  l のアジュバント / マウス中のアジュバント 5 0  $\mu$  g を全 7 回の追加免疫のため、2 週間毎に腹腔内 ( I P ) 注射した。最終プレ赤血球ゴースト融合後 3 日目、マウス脾臓のリンパ球及びリンパ節を採取した。

## 【 0 1 8 2 】

## 融合及び E L I S A スクリーニング

単離したマウスリンパ球を、C y t o P u l s e C E E F - 5 0 装置 ( サイトパルスサイエンス社 ) を用いて P U - 1 骨髄腫細胞 ( アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション ) と融合した。C y t o f u s i o n 培地 C で 2 回洗浄後、単離したリンパ球及び P U - 1 細胞を 1 : 1 の比で混合し、それから、C y t o f u s i o n 培地 C で 1 0 百万細胞 / m l に再懸濁した。電気融合を製造者の指示に従って用いて行った。融合細胞を 7 % C O <sub>2</sub> インキュベーター内で 3 7 、一夜、C l o n a C e l l - H Y 培地 C 中で培養した。翌日、融合細胞を遠心分離してから、1 0 m l の C l o n a C e l l - H Y 培地 C 中に再懸濁し、それから、9 0 m l のメチルセルロースベース C l o n a C e l l - H Y 培地 D と優しく混合した。細胞を O m n i ディッシュ ( カタログ # 1 0 0 2 6、ヌンク社 ) 中に蒔き、7 % C O <sub>2</sub> インキュベーター内で 3 7 で生育させた。インキュベート 6 ~ 7 日後、1 つのハイブリドーマクローンを C l o n e P i x F L ( ジェネティクス社、英国 ) により取り出し、2 0 0  $\mu$  l / ウェルの C l o n a C e l l - H Y 培地 E を含む 9 6 ウェル細胞培養プレート ( # 3 5 3 0 7 5、ベクトンディッキンソン社 ) 中に移動した。培養 6 ~ 7 日後、ハイブリドーマ上澄みを E L I S A によりスクリーニングした。A p o L 1 G 0 に対する全 E L I S A ポジティブクローンの上澄みもフローサイトメトリ

10

20

30

40

50

ーアッセイのために集めた。

【0183】

E L I S A アッセイを以下のように行った。96 ウェルマイクロタイター E L I S A プレート ( グライナー社、ドイツ ) を 4 、一夜、最終体積 100  $\mu$  l / ウェルで 0.05 M 炭酸緩衝液 ( p H 9.6 ) 中 1  $\mu$  g / m l で A p o L 1 G 0、G 1 または G 2 でコートした。洗浄用緩衝液 ( P B S 中の 0.05 % ツイーン 20、シグマ社 ) で 3 回洗浄後、B S A 含有 E L I S A アッセイ希釈液 200  $\mu$  l でプレートを遮断した。培養した上澄みまたは希釈精製 m A b s の 100  $\mu$  l を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、1 時間、H R P 結合ヤギ抗マウス I g G F c とインキュベートした。3 回洗浄後、結合した H R P を、5 分間、最終体積 100  $\mu$  l / ウェルで T M B 基質 ( バイオ F X ラボラトリーズ社、米国メリーランド州 ) の添加により検出した。100  $\mu$  l / ウェルの停止試薬 ( バイオ F X ラボラトリーズ社、米国メリーランド州 ) の添加により反応を停止した。O D 630 を S u n r i s e T e c a n プレートリーダーで検出した。

10

【0184】

m A b s 精製及びアイソタイプ判定

ハイブリドーマ上澄みを P r o t e i n A アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、それから、細菌ろ過 ( ポア径 0.2  $\mu$  m、ナルゲヌンクインターナショナル社、米国ニューヨーク州 ) し、P B S 中、4 で貯蔵した。精製 m A b s の A P O L 1 との結合をさらなる機能分析試験前に E L I S A により確認した。

20

【0185】

精製 m A b s のアイソタイプをマウスモノクローナル抗体アイソタイプ判定キット ( ロシュダイアグノスティックス社 ) により決定した。

【0186】

セルライン及びコンストラクト

全長 A P O L 1 タンパク質を 4 つのドメイン ( 図 14 ) : シグナル配列、1 ~ 27 アミノ酸 ( a a )、ポア形成ドメイン ( P F D )、60 ~ 235 a a、メンブレンアドレッシングドメイン ( M A D )、240 ~ 303 a a、及び S R A 相互作用ドメイン ( S R A - I D )、339 ~ 398 a a ( 図 14 A ) に分けることができる。A P O L 1 過剰発現はしばしば有害であるので、安定なドキシサイクリン誘導 A P O L 1 発現 C H O 細胞をウイルス感染により生成した。生理的に分泌される A P O L 1 を模倣するため、全長の A P O L 1 ( W T ) の G 0 変異体か A P O L 1 の G 1 変異体か A P O L 1 の G 2 変異体かのいずれかを発現及び分泌する C H O 細胞を生成した。

30

【0187】

これらの細胞が A P O L 1 分泌するはずであるフローサイトメトリー ( F A C S ) による抗体結合の評価に有用であるかどうかは不確かであるので、G P I アンカー A P O L 1 発現細胞も生成し ( 図 14 B )、おそらくナイーブ A P O L 1 と異なる立体配置であるが、タンパク質の細胞表面の発現を保証した。加えて、G P I アンカーコンストラクトは g D ( H S V 糖タンパク質 D ) エピトープタグ ( 及び H S V シグナル配列 ) で置換した A P O L 1 の第 60 a a ( 他の A p o L ファミリーメンバーに存在せず、A p o L 1 活性にとって必須でない ) を有し、発現を確認して抗体結合の正規化を可能とした。さらに、F A C S による 3 つの A P O L 1 ドメイン ( P F D、M A D または S R A - I D ) に抗体をマッピングするため、N 末端に g D を有し G P I アンカーにより細胞表面に結合した A P O L 1 ドメインの 1 つのみまたは 2 つを発現する C H O 細胞も生成した ( 図 14 C ~ E )。

40

【0188】

セルラインを以下のように生成した。A P O L 1 の G 0 変異体用 A P O L 1 コンストラクト ( W T、アイソフォーム a、N M \_ 003661.3 )、A P O L 1 の G 1 変異体 ( S 342 G、I 384 M ) 及び A P O L 1 の G 2 変異体 ( N 388、Y 389 ) を部位直接突然変異誘発により生成し ( 全長及び切断型 )、p E N T R D i r e c t i o n a

50

1 TOPOクローニングキット (K2400-20) を用いて Gateway entry ベクター中にサブクローニングした。非 GPI アンカーならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 D アンカー (gD) タグ及び GPI アンカーコンストラクトを生成し、Gateway LR II 組換えを用いて、ドキシサイクリン誘導レンチウイルス発現プラスミド pInducer 2.0 中にサブクローニングした。コンストラクトを DNA シークエンシングにより検証し、pInducer システムを用いて全長または切断型 Apol1 をコードするレンチウイルスを生成するために使用した。安定な誘導性 Apol1 発現 CHO 細胞を生成するため、レンチウイルスを CHO 細胞上に播種し、72 時間培養してから、G418 を用いて選択した。培養培地中のウイルス性 P24 タンパク質を検出できなくなるまで ELISA により定期的に測定した。Apol1 の発現を実験分析前、48 時間ドキシサイクリン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  で誘導した。

#### 【0189】

##### フローサイトメトリー

19 のモノクローナル抗 Apol1 抗体を、全長の Apol1 (WT) の G0 変異体、Apol1 の G1 変異体または Apol1 の G2 変異体との結合について FACS により分析して交差反応性を推定した。全抗体は、平均蛍光強度 (MFI) により示されるとき、Apol1 の G0 変異体ならびに Apol1 の G1 変異体及び Apol1 の G2 変異体の両方と結合した (図 15)。

#### 【0190】

抗体の各々の結合ドメインをマッピングするため、Apol1 の G0 変異体の切断型を発現する細胞に対して FACS 分析を行った。生成した 19 の抗 Apol1 抗体のうち、12 は PFD 特異的、1 つは MAD 特異的、5 つは SRA-ID 特異的、1 つは立体配置に敏感な結合体と見なされた、すなわち、非線形エピトープと結合する。

#### 【0191】

本明細書中下記のようにフローサイトメトリー分析を行った。ドキシサイクリン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  で 48 時間誘導した Apol1-CHO 細胞を PBS 中 5 mM の EDTA で採取し、CHO 培地で洗浄し (G6-SR 遠心分離機で 10 分間 1200 rpm にて回転)、PBS 中で再度洗浄した。試料当たり約  $0.5 \times 10^5$  細胞を氷上で 60 分間 PBS 中、抗体  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  とインキュベートした。それから、細胞を上記遠心分離により集め、FACS 緩衝液 (PBS + 3% ウシ胎仔血清) で 3 回洗浄し、それから、再懸濁し、氷上で 60 分間、PBS 中、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  の Alexa Fluor (登録商標) 488 結合ヤギ抗マウス/抗ウサギ (H+L) IgG とインキュベートした。それから、細胞を上記のように洗浄し、ヨウ化プロビジウム (PI) を含む PBS 中に再懸濁し、蛍光活性化細胞選別 (FACS) フローサイトメータ (FACSCalibur (商標)、BD バイオサイエンス社) を用いて分析した。平均蛍光強度 (MFI) を各試料について測定した。FlowJo ソフトウェア (v8.4.5) を用いて、データを解析した。それから、二次抗体単独のバックグラウンドシグナルを差引いた後、MFI を MS エクセルにエクスポートしてプロットした。

#### 【0192】

##### トリパノソーマアッセイ

腎疾患の Apol1 介在進行の機序が、Apol1 がトリパノソーマを溶解する能力と関連し得るという仮定に基づいてトリパノソーマベース機能分析を行った。Trypanosoma brucei brucei は Apol1 により溶解するトリパノソーマのヒト血清感受性種である。したがって、本明細書に記載のモノクローナル抗 Apol1 抗体を正常ヒト血清 (NHS) の Apol1 介在溶解を遮断するその能力についてスクリーニングした。1% NHS の存在下、細胞生存率について遮断活性を測定した。抗 Apol1 抗体は  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度におけるこのアッセイにおいて 28% ~ 49% の範囲の遮断活性を有する (図 16)。

#### 【0193】

下記のようにトリパノソーマアッセイを行った。Trypanosoma bruce

10

20

30

40

50

i b r u c e i ( L i s t e r 4 2 7 V S G 2 2 1 ) を A T C C から適切な認可の下得て、少なくとも週に3回継代して修飾HMI-9培地(A T C C # P R A - 3 8 3 ) 中で生育した。トリパノソーマは決して全コンフルエントまで生育できず、ずんぐり型(s t u m p y f o r m ) よりむしろ増殖性のままであることを保証した。遮断アッセイのため、約  $0.5 \times 10^5$  の T r y p a n o s o m a b r u c e i b r u c e i を、37、20時間、96ウェル透明プレート中、 $1.0 \mu\text{g/ml}$  の抗ApoL1抗体の存在または非存在下、1%正常ヒト血清(NHS)とインキュベートした。その後、 $10 \mu\text{l}$  の A l a m a r B l u e (登録商標)(インビトロジェン社、カタログ#DAL1025)を添加し、4~6時間後、細胞生存率を530励起/590発光において蛍光計で読み取った。S o f t m a x P r o を用いてデータを解析した。相対蛍光単位(RFU)値をグラフプロットのためにMSエクセルにエクスポートした。

10

【0194】

【表 3】

名称	配列
オープンリーディングフレームからのApoL1G0DNA配列 (配列番号18)	a t g g a g g g a g c t g c t t t g c t g a g a g t c t c t g t
	c c t c t g c a t c t g g a t g a g t g c a c t t t t c c t t g
	g t g t g g g a g t g a g g g c a g a g g a a g c t g g a g c g
	a g g g t g c a a c a a a a c g t t c c a a g t g g g a c a g a
	t a c t g g a g a t c c t c a a a g t a a g c c c c t c g g t g
	a c t g g g c t g c t g g c a c c a t g g a c c c a g a g a g c
	a g t a t c t t t a t t g a g g a t g c c a t t a a g t a t t t
	c a a g g a a a a a g t g a g c a c a c a g a a t c t g c t a c
	t c c t g c t g a c t g a t a a t g a g g c c t g g a a c g g a
	t t c g t g g c t g c t g c t g a a c t g c c c a g g a a t g a
	g g c a g a t g a g c t c c g t a a a g c t c t g g a c a a c c
	t t g c a a g a c a a a t g a t c a t g a a a g a c a a a a a c
	t g g c a c g a t a a a g g c c a g c a g t a c a g a a a c t g
	g t t t c t g a a a g a g t t t c c t c g g t t g a a a a g t a
	a g c t t g a g g a t a a c a t a a g a a g g c t c c g t g c c
	c t t g c a g a t g g g g t t c a g a a g g t c c a c a a a g g
	c a c c a c c a t c g c c a a t g t g g t g t c t g g c t c t c
	t c a g c a t t t c c t c t g g c a t c c t g a c c c t c g t c
	g g c a t g g g t c t g g c a c c c t t c a c a g a g g g a g g
	c a g c c t t g t a c t c t t g g a a c c t g g g a t g g a g t
	t g g g a a t c a c a g c a g c t t t g a c c g g g a t t a c c
	a g t a g t a c c a t a g a c t a c g g a a a g a a g t g g t g
	g a c a c a a g c c c a a g c c c a c g a c c t g g t c a t c a
	a a a g c c t t g a c a a a t t g a a g g a g g t g a a g g a g
	t t t t t g g g t g a g a a c a t a t c c a a c t t t c t t t c
	c t t a g c t g g c a a t a c t t a c c a a c t c a c a c g a g
	g c a t t g g g a a g g a c a t c c g t g c c c t c a g a c g a
	g c c a g a g c c a a t c t t c a g t c a g t a c c g c a t g c
	c t c a g c c t c a c g c c c c c g g g t c a c t g a g c c a a
	t c t c a g c t g a a a g c g g t g a a c a g g t g g a g a g a
	g t t a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g
	a g g a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a a
	g c t t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c
	g t g t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c
	a a a g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g
	t g g c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t t
	c t c a a c a a t a a t t a t a a g a t t c t g c a g g c g g a
	c c a a g a a c t g
ApoL1G0DNAコンストラクトの全配列 (配列番号19)	g t c g a c a t t g a t t a t t g a c t a g t t a t t a a t a g
	t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t c a t a g c c c
	a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c a t a a c t t a c g g
	t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a c c g c c c a a c g a c
	c c c c g c c c a t t g a c g t c a a t a a t g a c g t a t g t
	t c c c a t a g t a a c g c c a a t a g g g a c t t t c c a t t
	g a c g t c a a t g g g t g g a g t a t t t a c g g t a a a c t
	g c c c a c t t g g c a g t a c a t c a a g t g t a t c a t a t
	g c c a a g t a c g c c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g
	g t a a a t g g c c c g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c

10

20

30

40

	a t g a c c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a	
	c a t c t a c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g	
	t c g a g g t g a g c c c c a c g t t c t g c t t c a c t c t c	
	c c c a t c t c c c c c c c t c c c c a c c c c c a a t t t t	
	g t a t t t a t t t a t t t t t a a t t a t t t t g t g c a g	
	c g a t g g g g g c g g g g g g g g g g g g g g g c g c g c g	
	c c a g g c g g g g c g g g g c g g g g c g a g g g g c g g g g	
	c g g g g c g a g g c g g a g a g g t g c g g c g g c a g c c a	
	a t c a g a g c g g c g c g c t c c g a a a g t t t c c t t t t	
	a t g g c g a g g c g g c g g c g g c g g c g g c c c t a t a a	10
	a a a g c g a a g c g c g g c g g g c g g g a g t c g c t g	
	c g c g c t g c c t t c g c c c c g t g c c c c g c t c c g c c	
	g c c g c c t c g c g c c g c c c g c c c c g g c t c t g a c t	
	g a c c g c g t t a c t c c c a c a g g t g a g c g g g c g g g	
	a c g g c c c t t c t c c t c c g g g c t g t a a t t a g c g c	
	t t g g t t t a a t g a c g g c t t g t t t c t t t t c t g t g	
	g c t g c g t g a a a g c c t t g a g g g g c t c c g g g a g g	
	g c c c t t t g t g c g g g g g a g c g g c t c g g g g g g t	
	g c g t g c g t g t g t g t g t g c g t g g g g a g c g c c g c	
	g t g c g g c t c c g c g c t g c c c g g c g g c t g t g a g c	20
	g c t g c g g g c g c g g c g c g g g g c t t t g t g c g c t c	
	c g c a g t g t g c g c g a g g g g a g c g c g g c c g g g g g	
	c g g t g c c c c g c g g t g c g g g g g g g g c t g c g a g g	
	g g a a c a a a g g c t g c g t g c g g g g t g t g t g c g t g	
	g g g g g t g a g c a g g g g g t g t g g g c g c g t c g g t	
	c g g g c t g c a a c c c c c c t g c a c c c c c t c c c c	
	g a g t t g c t g a g c a c g g c c c g g c t t c g g g t g c g	
	g g g c t c c g t a c g g g g c g t g g c g c g g g g c t c g c	
	c g t g c c g g g c g g g g g t g g c g g c a g g t g g g g g	
	t g c c g g g c g g g g c g g g g c c g c c t c g g g c c g g g	30
	g a g g g c t c g g g g g a g g g g c g c g g c g g c c c c g	
	g a g c g c c g g c g g c t g t c g a g g c g c g g c g a g c c	
	g c a g c c a t t g c c t t t t a t g g t a a t c g t g c g a g	
	a g g g c g c a g g g a c t t c c t t t g t c c c a a a t c t g	
	t g c g g a g c c g a a a t c t g g g a g g c g c c g c c g c a	
	c c c c c t c t a g c g g g c g c g g g g c g a a g c g g t g c	
	g g c g c c g g c a g g a a g g a a a t g g g c g g g g a g g g	
	c c t t c g t g c g t c g c c g c g c c g c c g t c c c c t t c	
	t c c c t c t c a g c c t c g g g g c t g t c c g c g g g g g	
	g a c g g c t g c c t t c g g g g g g a c g g g g c a g g g c	40
	g g g g t t c g g c t t c t g g c g t g t g a c c g g c g g c t	
	c t a g a g c c t c t g c t a a c c a t g t t c a t g c c t t c	
	t t c t t t t c c t a c a g c t c c t g g g c a a c g t g c t	
	g g t t g t t g t g c t g t c t c a t c a t t t t g g c a a a g	
	a c t t c g g t a c c g c g g g c c c g g g a t c c a c c a t g	
	<u>g a g g g a g c t g c t t t g c t g a g a g t c t c t g t c c t</u>	
	<u>c t g c a t c t g g a t g a g t g c a c t t t t c c t t g g t g</u>	
	<u>t g g g a g t g a g g g c a g a g g a a g c t g g a g c g a g g</u>	
	<u>g t g c a a c a a a a c g t t c c a a g t g g g a c a g a t a c</u>	



	t g g a g a t c c t c a a a g t a a g c c c c t c g g t g a c t	
	g g g c t g c t g g c a c c a t g g a c c c a g a g a g c a g t	
	a t c t t t a t t g a g g a t g c c a t t a a g t a t t t c a a	
	g g a a a a a g t g a g c a c a c a g a a t c t g c t a c t c c	
	t g c t g a c t g a t a a t g a g g c c t g g a a c g g a t t c	
	g t g g c t g c t g c t g a a c t g c c c a g g a a t g a g g c	
	a g a t g a g c t c c g t a a a g c t c t g g a c a a c c t t g	
	c a a g a c a a a a t g a t c a t g a a a g a c a a a a a c t g g	
	c a c g a t a a a g g c c a g c a g t a c a g a a a c t g g t t	
	t c t g a a a g a g t t t c c t c g g t t g a a a a g t a a g c	10
	t t g a g g a t a a c a t a a g a a g g c t c c g t g c c c t t	
	g c a g a t g g g g t t c a g a a g g t c c a c a a a g g c a c	
	c a c c a t c g c c a a t g t g g t g t c t g g c t c t c t c a	
	g c a t t t c c t c t g g c a t c c t g a c c c t c g t c g g c	
	a t g g g t c t g g c a c c c t t c a c a g a g g g a g g c a g	
	c c t t g t a c t c t t g g a a c c t g g g a t g g a g t t g g	
	g a a t c a c a g c a g c t t t g a c c g g g a t t a c c a g t	
	a g t a c c a t a g a c t a c g g a a a g a a g t g g t g g a c	
	a c a a g c c c a a g c c c a c g a c c t g g t c a t c a a a a	
	g c c t t g a c a a a t t g a a g g a g g t g a a g g a g t t t	20
	t t g g g t g a g a a c a t a t c c a a c t t t c t t t c c t t	
	a g c t g g c a a t a c t t a c c a a c t c a c a c g a g g c a	
	t t g g g a a g g a c a t c c g t g c c c t c a g a c g a g c c	
	a g a g c c a a t c t t c a g t c a g t a c c g c a t g c c t c	
	a g c c t c a c g c c c c c g g g t c a c t g a g c c a a t c t	
	c a g c t g a a a g c g g t g a a c a g g t g g a g a g a g t t	
	a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g	
	a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a a g c t	
	t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g	
	t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a	30
	g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g t g g	
	c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t t t c t c	
	a a c a a t a a t t a t a a g a t t c t g c a g g c g g a c c a	
	a g a a c t g t g a g g g a a t t c g t g a g c g g c c g c a t	
	g a t c a g c t g g a t g c a t c g a t c a c g c g t a c c g g	
	t g c t c g a g g t a c c g a t g a a t a g c t a a g g t c g a	
	g g c c g c a g g t a a g t a t c a a g g t t a c a a g a c a g	
	g t t t a a g g a g a c c a a t a g a a a c t g g g c t t g t c	
	g a g a c a g a g a a g a c t c t t g c g t t t c t g a t a g g	
	c a c c t a t t g g t c t t a c t g a c a t c c a c t t t g c c	
	t t t c t c t c c a c a g g t g t c g a c a a t c a a c c t c t	40
	g g a t t a c a a a a t t t g t g a a a g a t t g a c t g g t a	
	t t c t t a a c t a t g t t g c t c c t t t t a c g c t a t g t	
	g g a t a c g c t g c t t t a a t g c c t t t g t a t c a t g c	
	t a t t g c t t c c c g t a t g g c t t t c a t t t t c t c c t	
	c c t t g t a t a a a t c c t g g t t g c t g t c t c t t t a t	
	g a g g a g t t g t g g c c c g t t g t c a g g c a a c g t g g	
	c g t g g t g t g c a c t g t g t t t g c t g a c g c a a c c c	
	c c a c t g g t t g g g g c a t t g c c a c c a c c t g t c a g	

	c t c c t t t c c g g g a c t t t c g c t t t c c c c c t c c c	
	t a t t g c c a c g g c g g a a c t c a t c g c c g c c t g c c	
	t t g c c c g c t g c t g g a c a g g g g c t c g g c t g t t g	
	g g c a c t g a c a a t t c c g t g g t g t t g t c g g g g a a	
	g c t g a c g t c c t t t c c a t g g c t g c t c g c c t g t g	
	t t g c c a c c t g g a t t c t g c g c g g g a c g t c c t t c	
	t g c t a c g t c c c t t c g g c c c t c a a t c c a g c g g a	
	c c t t c c t t c c c g c g g c c t g c t g c c g g c t c t g c	
	g g c c t c t t c c g c g t c t t c g c c t t c g c c c t c a g	
	a c g a g t c g g a t c t c c c t t t g g g c c g c c t c c c c	10
	g c c t g g a c t t c g a g c t c g g t a c g a t c a g c c t c	
	g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g	
	t t t g c c c c t c c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g	
	g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a	
	a a a t g a g g a a a t t g c a t c g c a t t g t c t g a g t a	
	g g t g t c a t t c t a t t c t g g g g g g t g g g g t g g g g	
	c a g g a c a g c a a g g g g g a g g a t t g g g a a g a c a a	
	t a g c c c a g c t t t t g t t c c c t t t a g t g a g g g t t	
	a a t t g c g c g c t t g g c g t a a t c a t g g t c a t a g c	
	t g t t t c c t g t g t g a a a t t g t t a t c c g c t a a t t	20
	c a c t c c t c a g g t g c a g g c t g c c t a t c a g a a g g	
	t g g t g g c t g g t g t g g c c a a t g c c c t g g c t c a c	
	a a a t a c c a c t g a g a t c t t t t t c c c t c t g c c a a	
	a a a t t a t g g g g a c a t c a t g a a g c c c c t t g a g c	
	a t c t g a c t t c t g g c t a a t a a a g g a a a t t t a t t	
	t t c a t t g c a a t a g t g t g t t g g a a t t t t t t g t g	
	t c t c t c a c t c g g a a g g a c a t a t g g g a g g g c a a	
	a t c a t t t a a a a c a t c a g a a t g a g t a t t t g g t t	
	t a g a g t t t g g c a a c a t a t g c c c a t a t g c t g g c	
	t g c c a t g a a c a a a g g t t g g c t a t a a a g a g g t c	30
	a t c a g t a t a t g a a a c a g c c c c c t g c t g t c c a t	
	t c c t t a t t c c a t a g a a a a g c c t t g a c t t g a g g	
	t t a g a t t t t t t t t a t a t t t t g t t t t g t g t t a t	
	t t t t t t c t t t a a c a t c c c t a a a a t t t t c c t t a	
	c a t g t t t t a c t a g c c a g a t t t t t c c t c c t c t c	
	c t g a c t a c t c c c a g t c a t a g c t g t c c c t c t t c	
	t c t t a t g g a g a t c c c t c g a c c t g c a g c c c a a g	
	c t t g g c g t a a t c a t g g t c a t a g c t g t t t c c t g	
	t g t g a a a t t g t t a t c c g c t c a c a a t t c c a c a c	
	a a c a t a c g a g c c g g a a g c a t a a a g t g t a a a g c	40
	c t g g g g t g c c t a a t g a g t g a g c t a a c t c a c a t	
	t a a t t g c g t t g c g c t c a c t g c c c g c t t t c c a g	
	t c g g g a a a c c t g t c g t g c c a g c g g a a c c g c a t	
	c t c a a t t a g t c a g c a a c c a t a g t c c c g c c c c t	
	a a c t c c g c c c a t c c c g c c c c t a a c t c c g c c c a	
	g t t c c g c c c a t t c t c c g c c c c a t g g c t g a c t a	
	a t t t t t t t t a t t t a t g c a g a g g c c g a g g c c g c	
	c t c g g c c t c t g a g c t a t t c c a g a a g t a g t g a g	
	g a g g c t t t t t t g g a g g c c t a g g c t t t t g c a a a	

	a a g c t a a c t t g t t t a t t g c a g c t t a t a a t g g t	
	t a c a a a t a a a g c a a a t a g c a t c a c a a a t t t c a c	
	a a a t a a a g c a t t t t t t t c a c t g c a t t c t a g t t	
	g t g g t t t g t c c a a a c t c a t c a a t g t a t c t t a t	
	c a t g t c t g g a a c c g c t g c a t t a a t g a a t c g g c	
	c a a c g c g c g g g g a g a g g c g g t t t g c g t a t t g g	
	g c g c t c t t c c g c t t c c t c g c t c a c t g a c t c g c	
	t g c g c t c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c g g t a	
	t c a g c t c a c t c a a a g g c g g t a a t a c g g t t a t c	
	c a c a g a a t c a g g g g a t a a c g c a g g a a a g a a c a	10
	t g t g a g c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g g a a c	
	c g t a a a a a g g c c g c g t t g c t g g c g t t t t t c c a	
	t a g g c t c c g c c c c c c t g a c g a g c a t c a c a a a a	
	a t c g a c g c t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c c g	
	a c a g g a c t a t a a a g a t a c c a g g c g t t t c c c c c	
	t g g a a g c t c c c t c g t g c g c t c t c c t g t t c c g a	
	c c c t g c c g c t t a c c g g a t a c c t g t c c g c c t t t	
	c t c c c t t c g g g a a a g c g t g g c g c t t t c t c a t a g	
	c t c a c g c t g t a g g t a t c t c a g t t c g g t g t a g g	20
	t c g t t c g c t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a	
	c c c c c c g t t c a g c c c g a c c g c t g c g c c t t a t c	
	c g g t a a c t a t c g t c t t g a g t c c a a c c c g g t a a	
	g a c a c g a c t t a t c g c c a c t g g c a g c a g c c a c t	
	g g t a a c a g g a t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g	
	c g g t g c t a c a g a g t t c t t g a a g t g g t g g c c t a	
	a c t a c g g c t a c a c t a g a a g a a c a g t a t t t g g t	
	a t c t g c g c t c t g c t g a a g c c a g t t a c c t t c g g	
	a a a a a g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c	
	a a a c c a c c g c t g g t a g c g g t g g t t t t t t t g t t	30
	t g c a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a a g g	
	a t c t c a a g a a g a t c c t t t g a t c t t t t c t a c g g	
	g g t c t g a c g c t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c g t	
	t a a g g g a t t t t g g t c a t g a g a t t a t c a a a a a g	
	g a t c t t c a c c t a g a t c c t t t t a a a t t a a a a a t	
	g a a g t t t t a a a t c a a t c t a a a g t a t a t a t g a g	
	t a a a c t t g g t c t g a c a g t t a c c a a t g c t t a a t	
	c a g t g a g g c a c c t a t c t c a g c g a t c t g t c t a t	
	t t c g t t c a t c c a t a g t t g c c t g a c t c c c c g t c	
	g t g t a g a t a a c t a c g a t a c g g g a g g g c t t a c c	
	a t c t g g c c c c a g t g c t g c a a t g a t a c c g c g a g	40
	a c c c a c g c t c a c c g g c t c c a g a t t t a t c a g c a	
	a t a a a c c a g c c a g c c g g a a g g g c c g a g c g c a g	
	a a g t g g t c c t g c a a c t t t a t c c g c c t c c a t c c	
	a g t c t a t t a a t t g t t g c c g g g a a g c t a g a g t a	
	a g t a g t t c g c c a g t t a a t a g t t t g c g c a a c g t	
	t g t t g c c a t t g c t a c a g g c a t c g t g g t g t c a c	
	g c t c g t c g t t t g g t a t g g c t t c a t t c a g c t c c	
	g g t t c c c a a c g a t c a a g g c g a g t t a c a t g a t c	
	c c c c a t g t t g t g c a a a a a a g c g g t t a g c t c c t	

[illegible]

	g t t a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a g g c t t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g t g g c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t g c t c a a c a a t a a t t a t a a g a t t c t g c a g g c g g a c c a a g a a c t g
A p o L 1 G 1 DNAコンスト ラクトの全配列 (配列番号 2 1)	g t c g a c a t t g a t t a t t g a c t a g t t a t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t c a t a g c c c a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a c c g c c c a a c g a c c c c c g c c c a t t g a c g t c a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a a t a g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g g t g g a g t a t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t g g c a g t a c a t c a a g t g t a t c a t a t g c c a a g t a c g c c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t c g a g g t g a g c c c c a c g t t c t g c t t c a c t c t c c c c a t c t c c c c c c c c t c c c c a c c c c c a a t t t t g t a t t t a t t t a t t t t t a a t t a t t t t g t g c a g c g a t g g g g g c g g g g g g g g g g g g g g g c g c g c g c c a g g c g g g g g c g g g g c g g g g c g a g g g g c g g g g c g g g g c g a g g c g g a g a g g t g c g g c g g c a g c c a a t c a g a g c g g c g c g c t c c g a a a g t t t c c t t t t a t g g c g a g g c g g c g g c g g c g g c g g c c c t a t a a a a a g c g a a g c g c g c g g c g g g c g g g a g t c g c t g c g c g c t g c c t t c g c c c c g t g c c c c g c t c c g c c g c c g c c t c g c g c c g c c c c g c c c c g g c t c t g a c t g a c c g c g t t a c t c c c a c a g g t g a g c g g g c g g g a c g g c c c t t c t c c t c c g g g c t g t a a t t a g c g c t t g g t t t a a t g a c g g c t t g t t t c t t t t c t g t g g c t g c g t g a a a g c c t t g a g g g g c t c c g g g a g g g c c c t t t g t g c g g g g g a g c g g c t c g g g g g g t g c g t g c g t g t g t g t g t g c g t g g g g a g c g c c g c g t g c g g c t c c g c g c t g c c c g g c g g c t g t g a g c g c t g c g g g c g c g g c g g g g g c t t t g t g c g c t c c g c a g t g t g c g c g a g g g g a g c g c g g c c g g g g c g g t g c c c c g c g g t g c g g g g g g g g c t g c g a g g g g a a c a a a g g c t g c g t g c g g g g t g t g t g c g t g g g g g g t g a g c a g g g g t g t g g g c g c g t c g g t c g g g c t g c a a c c c c c c t g c a c c c c c t c c c c g a g t t g c t g a g c a c g g c c c g g c t t c g g g t g c g g g g c t c c g t a c g g g c g t g g c g c g g g g c t c g c c g t g c c g g g c g g g g g t g g c g g c a g g t g g g g g t g c c g g g c g g g g c g g g g c c g c c t c g g g c c g g g g a g g g c t c g g g g g a g g g g c g c g g c g g c c c c g

10

20

30

40

	g a g c g c c g g c g g c t g t c g a g g c g c g g c g a g c c	
	g c a g c c a t t g c c t t t t a t g g t a a t c g t g c g a g	
	a g g g c g c a g g g a c t t c c t t t g t c c c a a a t c t g	
	t g c g g a g c c g a a a t c t g g g a g g c g c c g c c g c a	
	c c c c c t c t a g c g g g c g c g g g g c g a a g c g g t g c	
	g g c g c c g g c a g g a a g g a a a t g g g c g g g g a g g g	
	c c t t c g t g c g t c g c c g c g c c g c c g t c c c c t t c	
	t c c c t c t c c a g c c t c g g g g c t g t c c g c g g g g g	
	g a c g g c t g c c t t c g g g g g g g a c g g g g c a g g g c	
	g g g g t t c g g c t t c t g g c g t g t g a c c g g c g g c t	10
	c t a g a g c c t c t g c t a a c c a t g t t c a t g c c t t c	
	t t c t t t t t c c t a c a g c t c c t g g g c a a c g t g c t	
	g g t t g t t g t g c t g t c t c a t c a t t t t g g c a a a g	
	a c t t c g g t a c c g c g g g c c c g g g a t c c a c c a t g	
	g a g g g a g c t g c t t t g c t g a g a g t c t c t g t c c t	
	c t g c a t c t g g a t g a g t g c a c t t t t c c t t g g t g	
	t g g g a g t g a g g g c a g a g g a a g c t g g a g c g a g g	
	g t g c a a c a a a a c g t t c c a a g t g g g a c a g a t a c	
	t g g a g a t c c t c a a a g t a a g c c c c t c g g t g a c t	
	g g g c t g c t g g c a c c a t g g a c c c a g a g a g c a g t	20
	a t c t t t a t t g a g g a t g c c a t t a a g t a t t t c a a	
	g g a a a a a g t g a g c a c a c a g a a t c t g c t a c t c c	
	t g c t g a c t g a t a a t g a g g c c t g g a a c g g a t t c	
	g t g g c t g c t g c t g a a c t g c c c a g g a a t g a g g c	
	a g a t g a g c t c c g t a a a g c t c t g g a c a a c c t t g	
	c a a g a c a a a t g a t c a t g a a a g a c a a a a c t g g	
	c a c g a t a a a g g c c a g c a g t a c a g a a a c t g g t t	
	t c t g a a a g a g t t t c c t c g g t t g a a a a g t a a g c	
	t t g a g g a t a a c a t a a g a a g g c t c c g t g c c c t t	
	g c a g a t g g g g t t c a g a a g g t c c a c a a a g g c a c	30
	c a c c a t c g c c a a t g t g g t g t c t g g c t c t c t c a	
	g c a t t t c c t c t g g c a t c c t g a c c c t c g t c g g c	
	a t g g g t c t g g c a c c c t t c a c a g a g g g a g g c a g	
	c c t t g t a c t c t t g g a a c c t g g g a t g g a g t t g g	
	g a a t c a c a g c a g c t t t g a c c g g g a t t a c c a g t	
	a g t a c c a t a g a c t a c g g a a a g a a g t g g t g g a c	
	a c a a g c c c a a g c c c a c g a c c t g g t c a t c a a a a	
	g c c t t g a c a a a t t g a a g g a g g t g a a g g a g t t t	
	t t g g g t g a g a a c a t a t c c a a c t t t c t t t c c t t	
	a g c t g g c a a t a c t t a c c a a c t c a c a c g a g g c a	40
	t t g g g a a g g a c a t c c g t g c c c t c a g a c g a g c c	
	a g a g c c a a t c t t c a g t c a g t a c c g c a t g c c t c	
	a g c c t c a c g c c c c g g g t c a c t g a g c c a a t c t	
	c a g c t g a a a g c g g t g a a c a g g t g g a g a g a g t t	
	a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g	
	a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a g g c t	
	t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g	
	t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a	
	g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g t g g	

	c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t g c t c
	a a c a a t a a t t a t a a g a t t c t g c a g g c g g a c c a
	a g a a c t g t g a g g g a a t t c g t g a g c g g c c g c a t
	g a t c a g c t g g a t g c a t c g a t c a c g c g t a c c g g
	t g c t c g a g g t a c c g a t g a a t a g c t a a g g t c g a
	g g c c g c a g g t a a g t a t c a a g g t t a c a a g a c a g
	g t t t a a g g a g a c c a a t a g a a a c t g g g c t t g t c
	g a g a c a g a g a a g a c t c t t g c g t t t c t g a t a g g
	c a c c t a t t g g t c t t a c t g a c a t c c a c t t t g c c
	t t t c t c t c c a c a g g t g t c g a c a a t c a a c c t c t
	g g a t t a c a a a a t t t g t g a a a g a t t g a c t g g t a
	t t c t t a a c t a t g t t g c t c c t t t t a c g c t a t g t
	g g a t a c g c t g c t t t a a t g c c t t t g t a t c a t g c
	t a t t g c t t c c c g t a t g g c t t t c a t t t t c t c c t
	c c t t g t a t a a a t c c t g g t t g c t g t c t c t t t a t
	g a g g a g t t g t g g c c c g t t g t c a g g c a a c g t g g
	c g t g g t g t g c a c t g t g t t t g c t g a c g c a a c c c
	c c a c t g g t t g g g g c a t t g c c a c c a c c t g t c a g
	c t c c t t t c c g g g a c t t t c g c t t t c c c c c t c c c
	t a t t g c c a c g g c g g a a c t c a t c g c c g c c t g c c
	t t g c c c g c t g c t g g a c a g g g g c t c g g c t g t t g
	g g c a c t g a c a a t t c c g t g g t g t t g t c g g g g a a
	g c t g a c g t c c t t t c c a t g g c t g c t c g c c t g t g
	t t g c c a c c t g g a t t c t g c g c g g g a c g t c c t t c
	t g c t a c g t c c c t t c g g c c c t c a a t c c a g c g g a
	c c t t c c t t c c c g c g g c c t g c t g c c g g c t c t g c
	g g c c t c t t c c g c g t c t t c g c c t t c g c c c t c a g
	a c g a g t c g g a t c t c c c t t t g g g c c g c c t c c c c
	g c c t g g a c t t c g a g c t c g g t a c g a t c a g c c t c
	g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g
	t t t g c c c c t c c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g
	g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a
	a a a t g a g g a a a t t g c a t c g c a t t g t c t g a g t a
	g g t g t c a t t c t a t t c t g g g g g g t g g g g t g g g g
	c a g g a c a g c a a a g g g g g a g g a t t g g g a a g a c a a
	t a g c c c a g c t t t t g t t c c c t t t a g t g a g g g t t
	a a t t g c g c g c t t g g c g t a a t c a t g g t c a t a g c
	t g t t t c c t g t g t g a a a t t g t t a t c c g c t a a t t
	c a c t c c t c a g g t g c a g g c t g c c t a t c a g a a g g
	t g g t g g c t g g t g t g g c c a a t g c c c t g g c t c a c
	a a a t a c c a c t g a g a t c t t t t t c c c t c t g c c a a
	a a a t t a t g g g g a c a t c a t g a a g c c c c t t g a g c
	a t c t g a c t t c t g g c t a a t a a a g g a a a t t t a t t
	t t c a t t g c a a t a g t g t g t t g g a a t t t t t t g t g
	t c t c t c a c t c g g a a g g a c a t a t g g g a g g g c a a
	a t c a t t t a a a a c a t c a g a a t g a g t a t t t g g t t
	t a g a g t t t g g c a a c a t a t g c c c a t a t g c t g g c
	t g c c a t g a a c a a a g g t t g g c t a t a a a g a g g t c
	a t c a g t a t a t g a a a c a g c c c c c t g c t g t c c a t

10

20

30

40

	t c c t t a t t c c a t a g a a a a g c c t t g a c t t g a g g
	t t a g a t t t t t t t a t a t t t t g t t t t g t g t t a t
	t t t t t t c t t t a a c a t c c c t a a a a t t t t c c t t a
	c a t g t t t t a c t a g c c a g a t t t t t c c t c c t c t c
	c t g a c t a c t c c c a g t c a t a g c t g t c c c t c t t c
	t c t t a t g g a g a t c c c t c g a c c t g c a g c c c a a g
	c t t g g c g t a a t c a t g g t c a t a g c t g t t t c c t g
	t g t g a a a t t g t t a t c c g c t c a c a a t t c c a c a c
	a a c a t a c g a g c c g g a a g c a t a a a g t g t a a a g c
	c t g g g g t g c c t a a t g a g t g a g c t a a c t c a c a t
	t a a t t g c g t t g c g c t c a c t g c c c g c t t t c c a g
	t c g g g a a a c c t g t c g t g c c a g c g g a a c c g c a t
	c t c a a t t a g t c a g c a a c c a t a g t c c c g c c c c t
	a a c t c c g c c c a t c c c g c c c c t a a c t c c g c c c a
	g t t c c g c c c a t t c t c c g c c c c a t g g c t g a c t a
	a t t t t t t t a t t t a t g c a g a g g c c g a g g c c g c
	c t c g g c c t c t g a g c t a t t c c a g a a g t a g t g a g
	g a g g c t t t t t t g g a g g c c t a g g c t t t t g c a a a
	a a g c t a a c t t g t t t a t t g c a g c t t a t a a t g g t
	t a c a a a t a a a g c a a t a g c a t c a c a a a t t t c a c
	a a a t a a a g c a t t t t t t t c a c t g c a t t c t a g t t
	g t g g t t t g t c c a a a c t c a t c a a t g t a t c t t a t
	c a t g t c t g g a a c c g c t g c a t t a a t g a a t c g g c
	c a a c g c g c g g g g a g a g g c g g t t t g c g t a t t g g
	g c g c t c t t c c g c t t c c t c g c t c a c t g a c t c g c
	t g c g c t c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c g g t a
	t c a g c t c a c t c a a a g g c g g t a a t a c g g t t a t c
	c a c a g a a t c a g g g g a t a a c g c a g g a a a g a a c a
	t g t g a g c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g g a a c
	c g t a a a a a g g c c g c g t t g c t g g c g t t t t t c c a
	t a g g c t c c g c c c c c c t g a c g a g c a t c a c a a a a
	a t c g a c g c t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c c g
	a c a g g a c t a t a a a g a t a c c a g g c g t t t c c c c c
	t g g a a g c t c c c t c g t g c g c t c t c c t g t t c c g a
	c c c t g c c g c t t a c c g g a t a c c t g t c c g c c t t t
	c t c c c t t c g g g a a a g c g t g g c g c t t t c t c a t a g
	c t c a c g c t g t a g g t a t c t c a g t t c g g t g t a g g
	t c g t t c g c t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a
	c c c c c c g t t c a g c c c g a c c g c t g c g c c t t a t c
	c g g t a a c t a t c g t c t t g a g t c c a a c c c g g t a a
	g a c a c g a c t t a t c g c c a c t g g c a g c a g c c a c t
	g g t a a c a g g a t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g
	c g g t g c t a c a g a g t t c t t g a a g t g g t g g c c t a
	a c t a c g g c t a c a c t a g a a g a a c a g t a t t t g g t
	a t c t g c g c t c t g c t g a a g c c a g t t a c c t t c g g
	a a a a a g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c
	a a a c c a c c g c t g g t a g c g g t g g t t t t t t t g t t
	t g c a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a g g
	a t c t c a a g a a g a t c c t t t g a t c t t t t c t a c g g

10

20

30

40



	g g t c t g a c g c t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c g t t a a g g g a t t t t g g t c a t g a g a t t a t c a a a a a g g a t c t t c a c c t a g a t c c t t t t a a a t t a a a a a t g a a g t t t t a a a t c a a t c t a a a g t a t a t a t g a g t a a a c t t g g t c t g a c a g t t a c c a a t g c t t a a t c a g t g a g g c a c c t a t c t c a g c g a t c t g t c t a t t t c g t t c a t c c a t a g t t g c c t g a c t c c c c g t c g t g t a g a t a a c t a c g a t a c g g g a g g g c t t a c c a t c t g g c c c c a g t g c t g c a a t g a t a c c g c g a g a c c c a c g c t c a c c g g c t c c a g a t t t a t c a g c a a t a a a c c a g c c a g c c g g a a g g g c c g a g c g c a g a a g t g g t c c t g c a a c t t t a t c c g c c t c c a t c c a g t c t a t t a a t t g t t g c c g g g a a g c t a g a g t a a g t a g t t c g c c a g t t a a t a g t t t g c g c a a c g t t g t t g c c a t t g c t a c a g g c a t c g t g g t g t c a c g c t c g t c g t t t g g t a t g g c t t c a t t c a g c t c c g g t t c c c a a c g a t c a a g g c g a g t t a c a t g a t c c c c c a t g t t g t g c a a a a a a g c g g t t a g c t c c t t c g g t c c t c c g a t c g t t g t c a g a a g t a a g t t g g c c g c a g t g t t a t c a c t c a t g g t t a t g g c a g c a c t g c a t a a t t c t c t t a c t g t c a t g c c a t c c g t a a g a t g c t t t t c t g t g a c t g g t g a g t a c t c a a c c a a g t c a t t t c t g a g a a t a g t g t a t g c g g c g a c c g a g t t g c t c t t g c c c g g c g t c a a t a c g g g a t a a t a c c g c g c c a c a t a g c a g a a c t t t a a a a g t g c t c a t c a t t g g a a a a c g t t c t t c g g g g c g a a a a c t c t c a a g g a t c t t a c c g c t g t t g a g a t c c a g t t c g a t g t a a c c c a c t c g t g c a c c c a a c t g a t c t t c a g c a t c t t t t a c t t t c a c c a g c g t t t c t g g g t g a g c a a a a a c a g g a a g g c a a a a t g c c g c a a a a a a g g g a a t a a g g g c g a c a c g g a a a t g t t g a a t a c t c a t a c t c t t c c t t t t c a a t a t t a t t g a a g c a t t t a t c a g g g t t a t t g t c t c a t g a g c g g a t a c a t a t t t g a a t g t a t t t a g a a a a a t a a a c a a a t a g g g g t t c c g c g c a c a t t t c c c c g a a a a g t g c c a c c t g g	10
		20
		30
オープンリーディングフレーム からのApoL 1G2DNA配 列 (配列番号2 2)	a t g g a g g g a g c t g c t t t g c t g a g a g t c t c t g t c c t c t g c a t c t g g a t g a g t g c a c t t t t c c t t g g t g t g g g a g t g a g g g c a g a g g a a g c t g g a g c g a g g g t g c a a c a a a a c g t t c c a a g t g g g a c a g a t a c t g g a g a t c c t c a a a g t a a g c c c c t c g g t g a c t g g g c t g c t g g c a c c a t g g a c c c a g a g a g c a g t a t c t t t a t t g a g g a t g c c a t t a a g t a t t t c a a g g a a a a a g t g a g c a c a c a g a a t c t g c t a c t c c t g c t g a c t g a t a a t g a g g c c t g g a a c g g a t t c g t g g c t g c t g c t g a a c t g c c c a g g a a t g a g g c a g a t g a g c t c c g t a a a g c t c t g g a c a a c c t t g c a a g a c a a a t g a t c a t g a a a g a c a a a a c t g g c a c g a t a a a g g c c a g c a g t a c a g a a a c t g	40

	g t t t c t g a a a g a g t t t c c t c g g t t g a a a a g t a a g c t t g a g g a t a a c a t a a g a a g g c t c c g t g c c c t t g c a g a t g g g g t t c a g a a g g t c c a c a a a g g c a c c a c c a t c g c c a a t g t g g t g t c t g g c t c t c t c a g c a t t t c c t c t g g c a t c c t g a c c c t c g t c g g c a t g g g t c t g g c a c c c t t c a c a g a g g g a g g c a g c c t t g t a c t c t t g g a a c c t g g g a t g g a g t t g g g a a t c a c a g c a g c t t t g a c c g g g a t t a c c a g t a g t a c c a t a g a c t a c g g a a a g a a g t g g t g g a c a c a a g c c c a a g c c c a c g a c c t g g t c a t c a a a a g c c t t g a c a a a t t g a a g g a g g t g a a g g a g t t t t t g g g t g a g a a c a t a t c c a a c t t t c t t t c c t t a g c t g g c a a t a c t t a c c a a c t c a c a c g a g g c a t t g g g a a g g a c a t c c g t g c c c t c a g a c g a g c c a g a g c c a a t c t t c a g t c a g t a c c g c a t g c c t c a g c c t c a c g c c c c c g g g t c a c t g a g c c a a t c t c a g c t g a a a g c g g t g a a c a g g t g g a g a g a g t t a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a a g c t t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g t g g c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t t c t c a a c a a t a a g a t t c t g c a g g c g g a c c a a g a a c t g	10
	g t c g a c a t t g a t t a t t g a c t a g t t a t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t c a t a g c c c a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a c c g c c c a a c g a c c c c c g c c c a t t g a c g t c a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a a t a g g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g g t g g a g t a t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t g g c a g t a c a t c a a g t g t a t c a t a t g c c a a g t a c g c c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t c g a g g t g a g c c c c a c g t t c t g c t t c a c t c t c c c c a t c t c c c c c c c t c c c c a c c c c c a a t t t t g t a t t t a t t t a t t t t t a a t t a t t t t g t g c a g c g a t g g g g g c g g g g g g g g g g g g g g c g c g c g c c a g g c g g g g c g g g g g c g g g g c g a g g g g c g g g g c g g g g c g a g g c g g a g a g g t g c g g c g g c a g c c a a t c a g a g c g g c g c g c t c c g a a a g t t t c c t t t t a t g g c g a g g c g g c g g c g g c g g c g g c c c t a t a a a a a g c g a a g c g c g c g g c g g g c g g g a g t c g c t g c g c g c t g c c t t c g c c c c g t g c c c c g c t c c g c c g c c g c c t c g c g c c g c c c g c c c c g g c t c t g a c t g a c c g c g t t a c t c c c a c a g g t g a g c g g g c g g g	30
ApoL1G2 DNAコンスト ラクトの全配列 （配列番号2 3）	g t c g a c a t t g a t t a t t g a c t a g t t a t t a a t a g t a a t c a a t t a c g g g g t c a t t a g t t c a t a g c c c a t a t a t g g a g t t c c g c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a c c g c c c a a c g a c c c c c g c c c a t t g a c g t c a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a a t a g g g g a c t t t c c a t t g a c g t c a a t g g g t g g a g t a t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t g g c a g t a c a t c a a g t g t a t c a t a t g c c a a g t a c g c c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c a t t a t g c c c a g t a c a t g a c c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a g t c a t c g c t a t t a c c a t g g t c g a g g t g a g c c c c a c g t t c t g c t t c a c t c t c c c c a t c t c c c c c c c t c c c c a c c c c c a a t t t t g t a t t t a t t t a t t t t t a a t t a t t t t g t g c a g c g a t g g g g g c g g g g g g g g g g g g g g c g c g c g c c a g g c g g g g c g g g g g c g g g g c g a g g g g c g g g g c g g g g c g a g g c g g a g a g g t g c g g c g g c a g c c a a t c a g a g c g g c g c g c t c c g a a a g t t t c c t t t t a t g g c g a g g c g g c g g c g g c g g c g g c c c t a t a a a a a g c g a a g c g c g c g g c g g g c g g g a g t c g c t g c g c g c t g c c t t c g c c c c g t g c c c c g c t c c g c c g c c g c c t c g c g c c g c c c g c c c c g g c t c t g a c t g a c c g c g t t a c t c c c a c a g g t g a g c g g g c g g g	40

	a c g g c c c t t c t c c t c c g g g c t g t a a t t a g c g c
	t t g g t t t a a t g a c g g c t t g t t t c t t t t c t g t g
	g c t g c g t g a a a g c c t t g a g g g g c t c c g g g a g g
	g c c c t t t g t g c g g g g g a g c g g c t c g g g g g t
	g c g t g c g t g t g t g t g t g c g t g g g g a g c g c c g c
	g t g c g g c t c c g c g c t g c c c g g c g g c t g t g a g c
	g c t g c g g g c g c g g c g g g g c t t t g t g c g c t c
	c g c a g t g t g c g c g a g g g g a g c g c g g c c g g g g
	c g g t g c c c c g c g g t g c g g g g g g g g c t g c g a g g
10	g g a a c a a a g g c t g c g t g c g g g g t g t g t g c g t g
	g g g g g t g a g c a g g g g g t g t g g g c g c g t c g g t
	c g g g c t g c a a c c c c c c t g c a c c c c c c t c c c c
	g a g t t g c t g a g c a c g g c c c g g c t t c g g g t g c g
	g g g c t c c g t a c g g g g c g t g g c g c g g g g c t c g c
	c g t g c c g g g c g g g g g g t g g c g g c a g g t g g g g g
	t g c c g g g c g g g g c g g g g c c g c c t c g g g c c g g g
	g a g g g c t c g g g g g a g g g g c g c g g c g g c c c c g
	g a g c g c c g g c g g c t g t c g a g g c g c g g c g a g c c
	g c a g c c a t t g c c t t t a t g g t a a t c g t g c g a g
20	a g g g c g c a g g g a c t t c c t t t g t c c c a a a t c t g
	t g c g g a g c c g a a a t c t g g g a g g c g c c g c c g c a
	c c c c c t c t a g c g g g c g c g g g g c g a a g c g g t g c
	g g c g c c g g c a g g a a g g a a a t g g g c g g g g a g g g
	c c t t c g t g c g t c g c c g c g c c g c c g t c c c c t t c
	t c c c t c t c c a g c c t c g g g g c t g t c c g c g g g g g
	g a c g g c t g c c t t c g g g g g g a c g g g g c a g g g c
	g g g g t t c g g c t t c t g g c g t g t g a c c g g c g g c t
	c t a g a g c c t c t g c t a a c c a t g t t c a t g c c t t c
	t t c t t t t t c c t a c a g c t c c t g g g c a a c g t g c t
30	g g t t g t t g t g c t g t c t c a t c a t t t t g g c a a a g
	a c t t c g g t a c c g c g g g c c c g g g a t c c a c c a t g
	g a g g g a g c t g c t t t g c t g a g a g t c t c t g t c c t
	c t g c a t c t g g a t g a g t g c a c t t t t c c t t g g t g
	t g g g a g t g a g g g c a g a g g a a g c t g g a g c g a g g
	g t g c a a c a a a a c g t t c c a a g t g g g a c a g a t a c
	t g g a g a t c c t c a a a g t a a g c c c c t c g g t g a c t
	g g g c t g c t g g c a c c a t g g a c c c a g a g a g c a g t
	a t c t t t a t t g a g g a t g c c a t t a a g t a t t t c a a
	g g a a a a a g t g a g c a c a c a g a a t c t g c t a c t c c
	t g c t g a c t g a t a a t g a g g c c t g g a a c g g a t t c
40	g t g g c t g c t g c t g a a c t g c c c a g g a a t g a g g c
	a g a t g a g c t c c g t a a a g c t c t g g a c a a c c t t g
	c a a g a c a a a t g a t c a t g a a a g a c a a a a a c t g g
	c a c g a t a a a g g c c a g c a g t a c a g a a a c t g g t t
	t c t g a a a g a g t t t c c t c g g t t g a a a a g t a a g c
	t t g a g g a t a a c a t a a g a a g g c t c c g t g c c c t t
	g c a g a t g g g g t t c a g a a g g t c c a c a a a g g c a c
	c a c c a t c g c c a a t g t g g t g t c t g g c t c t c t c a
	g c a t t t c c t c t g g c a t c c t g a c c c t c g t c g g c

	a t g g g t c t g g c a c c c t t c a c a g a g g g a g g c a g c c t t g t a c t c t t g g a a c c t g g g a t g g a g t t g g g a a t c a c a g c a g c t t t g a c c g g g a t t a c c a g t a g t a c c a t a g a c t a c g g a a a g a a g t g g t g g a c a c a a g c c c a a g c c c a c g a c c t g g t c a t c a a a a g c c t t g a c a a a t t g a a g g a g g t g a a g g a g t t t t t g g g t g a g a a c a t a t c c a a c t t t c t t t c c t t a g c t g g c a a t a c t t a c c a a c t c a c a c g a g g c a t t g g g a a g g a c a t c c g t g c c c t c a g a c g a g c c a g a g c c a a t c t t c a g t c a g t a c c g c a t g c c t c a g c c t c a c g c c c c c g g g t c a c t g a g c c a a t c t c a g c t g a a a g c g g t g a a c a g g t g g a g a g a g t t a a t g a a c c c a g c a t c c t g g a a a t g a g c a g a g g a g t c a a g c t c a c g g a t g t g g c c c c t g t a a g c t t c t t t c t t g t g c t g g a t g t a g t c t a c c t c g t g t a c g a a t c a a a g c a c t t a c a t g a g g g g g c a a a g t c a g a g a c a g c t g a g g a g c t g a a g a a g g t g g c t c a g g a g c t g g a g g a g a a g c t a a a c a t t c t c a a c a a t a a g a t t c t g c a g g c g g a c c a a g a a c t g t g a g g g a a t t c g t g a g c g g c c g c a t g a t c a g c t g g a t g c a t c g a t c a c g c g t a c c g g t g c t c g a g g t a c c g a t g a a t a g c t a a g g t c g a g g c c g c a g g t a a g t a t c a a g g t t a c a a g a c a g g t t t a a g g a g a c c a a t a g a a a c t g g g c t t g t c g a g a c a g a g a a g a c t c t t g c g t t t c t g a t a g g c a c c t a t t g g t c t t a c t g a c a t c c a c t t t g c c t t t c t c t c c a c a g g t g t c g a c a a t c a a c c t c t g g a t t a c a a a a t t t g t g a a a g a t t g a c t g g t a t t c t t a a c t a t g t t g c t c c t t t t a c g c t a t g t g g a t a c g c t g c t t t a a t g c c t t t g t a t c a t g c t a t t g c t t c c c g t a t g g c t t t c a t t t t c t c c t c c t t g t a t a a a t c c t g g t t g c t g t c t c t t t a t g a g g a g t t g t g g c c c g t t g t c a g g c a a c g t g g c g t g g t g t g c a c t g t g t t t g c t g a c g c a a c c c c c a c t g g t t g g g g c a t t g c c a c c a c c t g t c a g c t c c t t t c c g g g a c t t t c g c t t t c c c c c t c c c t a t t g c c a c g g c g g a a c t c a t c g c c g c c t g c c t t g c c c g c t g c t g g a c a g g g g c t c g g c t g t t g g g c a c t g a c a a t t c c g t g g t g t t g t c g g g g a a g c t g a c g t c c t t t c a t g g c t g c t c g c c t g t g t t g c c a c c t g g a t t c t g c g c g g g a c g t c c t t c t g c t a c g t c c c t t c g g c c c t c a a t c c a g c g g a c c t t c c t t c c c g c g g c c t g c t g c c g g c t c t g c g g c c t c t t c c g c g t c t t c g c c t t c g c c c t c a g a c g a g t c g g a t c t c c c t t t g g g c c g c c t c c c g c c t g g a c t t c g a g c t c g g t a c g a t c a g c c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g t t t g c c c c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a t g a
--	---

10

20

30

40

	g g a a a t t g c a t c g c a t t g t c t g a g t a g g t g t c	
	a t t c t a t t c t g g g g g t g g g g t g g g g c a g g a c	
	a g c a a g g g g g a g g a t t g g g a a g a c a a t a g c c c	
	a g c t t t t g t t c c c t t t a g t g a g g g t t a a t t g c	
	g c g c t t g g c g t a a t c a t g g t c a t a g c t g t t t c	
	c t g t g t g a a a t t g t t a t c c g c t a a t t c a c t c c	
	t c a g g t g c a g g c t g c c t a t c a g a a g g t g g t g g	
	c t g g t g t g g c c a a t g c c c t g g c t c a c a a a t a c	
	c a c t g a g a t c t t t t t c c c t c t g c c a a a a a t t a	
	t g g g g a c a t c a t g a a g c c c c t t g a g c a t c t g a	10
	c t t c t g g c t a a t a a a g g a a a t t t a t t t t c a t t	
	g c a a t a g t g t g t t g g a a t t t t t t g t g t c t c t c	
	a c t c g g a a g g a c a t a t g g g a g g g c a a a t c a t t	
	t a a a a c a t c a g a a t g a g t a t t t g g t t t a g a g t	
	t t g g c a a c a t a t g c c c a t a t g c t g g c t g c c a t	
	g a a c a a a g g t t g g c t a t a a a g a g g t c a t c a g t	
	a t a t g a a a c a g c c c c c t g c t g t c c a t t c c t t a	
	t t c c a t a g a a a a g c c t t g a c t t g a g g t t a g a t	
	t t t t t t t a t a t t t t t g t t t t g t g t t a t t t t t t	
	c t t t a a c a t c c c t a a a a t t t t c c t t a c a t g t t	20
	t t a c t a g c c a g a t t t t t c c t c c t c t c c t g a c t	
	a c t c c c a g t c a t a g c t g t c c c t c t t c t c t t a t	
	g g a g a t c c c t c g a c c t g c a g c c c a a a g c t t g g c	
	g t a a t c a t g g t c a t a g c t g t t t c c t g t g t g a a	
	a t t g t t a t c c g c t c a c a a t t c c a c a c a a c a t a	
	c g a g c c g g a a g c a t a a a g t g t a a a g c c t g g g g	
	t g c c t a a t g a g t g a g c t a a c t c a c a t t a a t t g	
	c g t t g c g c t c a c t g c c c g c t t t c c a g t c g g g a	
	a a c c t g t c g t g c c a g c g g a a c c g c a t c t c a a t	
	t a g t c a g c a a c c a t a g t c c c g c c c c t a a c t c c	30
	g c c c a t c c c g c c c c t a a c t c c g c c c a g t t c c g	
	c c c a t t c t c c g c c c c a t g g c t g a c t a a t t t t t	
	t t t a t t t a t g c a g a g g c c g a g g c c g c c t c g g c	
	c t c t g a g c t a t t c c a g a a g t a g t g a g g a g g c t	
	t t t t t g g a g g c c t a g g c t t t t g c a a a a a g c t a	
	a c t t g t t t a t t g c a g c t t a t a a t g g t t a c a a a	
	t a a a g c a a t a g c a t c a c a a a t t t c a c a a a t a a	
	a g c a t t t t t t t c a c t g c a t t c t a g t t g t g g t t	
	t g t c c a a a c t c a t c a a t g t a t c t t a t c a t g t c	
	t g g a a c c g c t g c a t t a a t g a a t c g g c c a a c g c	40
	g c g g g g a g a g g c g g t t t g c g t a t t g g g c g c t c	
	t t c c g c t t c c t c g c t c a c t g a c t c g c t g c g c t	
	c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c g g t a t c a g c t	
	c a c t c a a a g g c g g t a a t a c g g t t a t c c a c a g a	
	a t c a g g g g a t a a c g c a g g a a a g a a c a t g t g a g	
	c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g g a a c c g t a a a	
	a a g g c c g c g t t g c t g g c g t t t t t c c a t a g g c t	
	c c g c c c c c c t g a c g a g c a t c a c a a a a a t c g a c	
	g c t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c c g a c a g g a	

	c t a t a a a g a t a c c a g g c g t t t c c c c c t g g a a g	
	c t c c c t c g t g c g c t c t c c t g t t c c g a c c c t g c	
	c g c t t a c c g g a t a c c t g t c c g c c t t t c t c c c t	
	t c g g g a a g c g t g g c g c t t t c t c a t a g c t c a c g	
	c t g t a g g t a t c t c a g t t c g g t g t a g g t c g t t c	
	g c t c c a a g c t g g g c t g t g t g c a c g a a c c c c c c	
	g t t c a g c c c g a c c g c t g c g c c t t a t c c g g t a a	
	c t a t c g t c t t g a g t c c a a c c c g g t a a g a c a c g	
	a c t t a t c g c c a c t g g c a g c a g c c a c t g g t a a c	
	a g g a t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g c g g t g c	10
	t a c a g a g t t c t t g a a g t g g t g g c c t a a c t a c g	
	g c t a c a c t a g a a g a a c a g t a t t t g g t a t c t g c	
	g c t c t g c t g a a g c c a g t t a c c t t c g g a a a a a g	
	a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a	
	c c g c t g g t a g c g g t g g t t t t t t t g t t t g c a a g	
	c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a a g g a t c t c a	
	a g a a g a t c c t t t g a t c t t t t c t a c g g g g t c t g	
	a c g c t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c g t t a a g g g	
	a t t t t g g t c a t g a g a t t a t c a a a a a g g a t c t t	
	c a c c t a g a t c c t t t t a a a t t a a a a a t g a a g t t	20
	t t a a a t c a a t c t a a a g t a t a t a t g a g t a a a c t	
	t g g t c t g a c a g t t a c c a a t g c t t a a t c a g t g a	
	g g c a c c t a t c t c a g c g a t c t g t c t a t t t c g t t	
	c a t c c a t a g t t g c c t g a c t c c c c g t c g t g t a g	
	a t a a c t a c g a t a c g g g a g g g c t t a c c a t c t g g	
	c c c c a g t g c t g c a a t g a t a c c g c g a g a c c c a c	
	g c t c a c c g g c t c c a g a t t t a t c a g c a a t a a a c	
	c a g c c a g c c g g a a g g g c c g a g c g c a g a a g t g g	
	t c c t g c a a c t t t a t c c g c c t c c a t c c a g t c t a	
	t t a a t t g t t g c c g g g a a g c t a g a g t a a g t a g t	30
	t c g c c a g t t a a t a g t t t g c g c a a c g t t g t t g c	
	c a t t g c t a c a g g c a t c g t g g t g t c a c g c t c g t	
	c g t t t g g t a t g g c t t c a t t c a g c t c c g g t t c c	
	c a a c g a t c a a g g c g a g t t a c a t g a t c c c c c a t	
	g t t g t g c a a a a a a g c g g t t a g c t c c t t c g g t c	
	c t c c g a t c g t t g t c a g a a g t a a g t t g g c c g c a	
	g t g t t a t c a c t c a t g g t t a t g g c a g c a c t g c a	
	t a a t t c t c t t a c t g t c a t g c c a t c c g t a a g a t	
	g c t t t t c t g t g a c t g g t g a g t a c t c a a c c a a g	
	t c a t t c t g a g a a t a g t g t a t g c g g c g a c c g a g	40
	t t g c t c t t g c c c g g c g t c a a t a c g g g a t a a t a	
	c c g c g c c a c a t a g c a g a a c t t t a a a a g t g c t c	
	a t c a t t g g a a a a c g t t c t t c g g g g c g a a a a c t	
	c t c a a g g a t c t t a c c g c t g t t g a g a t c c a g t t	
	c g a t g t a a c c c a c t c g t g c a c c c a a c t g a t c t	
	t c a g c a t c t t t t a c t t t c a c c a g c g t t t c t g g	
	g t g a g c a a a a a c a g g a a g g c a a a a t g c c g c a a	
	a a a a g g g a a t a a g g g c g a c a c g g a a a t g t t g a	
	a t a c t c a t a c t c t t c c t t t t c a a t a t t a t t g	

	a a g c a t t t a t c a g g g t t a t t g t c t c a t g a g c g g a t a c a t a t t t g a a t g t a t t t a g a a a a t a a a c a a a t a g g g g t t c c g c g c a c a t t t c c c c g a a a a g t g c c a c c t g g
タンパク質免疫 のためのApo L1G0アミノ 酸配列 (配列番号2 4)	m h h h h h h g e n l y f q g s d p e s s i f i e d a i k y f k e k v s t q n l l l l l t d n e a w n g f v a a a e l p r n e a d e l r k a l d n l a r q m i m k d k n w h d k g q q y r n w f l k e f p r l k s e l e d n i r r l r a l a d g v q k v h k g t t i a n v v s g s l s i s s g i l t l v g m g l a p f t e g g s l v l l e p g m e l g i t a a l t g i t s s t m d y g k k w w t q a q a h d l v i k s l d k l k e v r e f l g e n i s n f l s l a g n t y q l t r g i g k d i r a l r r a r a n l q s v p h a s a s r p r v t e p i s a e s g e q v e r v n e p s i l e m s r g v k l t d v a p v s f f l v l d v v y l v y e s k h l h e g a k s e t a e e l k k v a q e l e e k l n i l n n n y k i l q a d q e l g n s

10

## 【0195】

## 参考文献

Chapman, M. J., Goldstein, S., Lagrange, D., L  
aplaud, P. M., 1981. A density gradient ultr  
acentrifugal procedure for the isolation  
of the major lipoprotein classes from h  
uman serum. J Lipid Res 22, 339 - 358.

20

Davidson, W. S., Silva, R. A., Chantepie, S., L  
agor, W. R., Chapman, M. J., Kontush, A., 2009. P  
roteomic analysis of defined HDL subpopu  
lations reveals particle-specific protei  
n clusters: relevance to antioxidative fu  
nction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29  
, 870 - 876.

30

Duchateau, P. N., Movsesyan, I., Yamashita, S  
, Sakai, N., Hirano, K., Schoenhaus, S. A., O' C  
onnor - Kearns, P. M., Spencer, S. J., Jaffe, R. B  
, Redberg, R. F., Ishida, B. Y., Matsuzawa, Y.,  
Kane, J. P., Malloy, M. J., 2000. Plasma apolip  
oprotein L concentrations correlate with  
plasma triglycerides and cholesterol le  
vels in normolipidemic, hyperlipidemic, an  
d diabetic subjects. J Lipid Res 41, 1231 -  
1236.

40

Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Orellana,  
R. E., Kunitake, S. T., Naya - Vigne, J., O' Conno  
r, P. M., Malloy, M. J., Kane, J. P., 1997. A polip  
oprotein L, a new human high density lip  
oprotein apolipoprotein expressed by the  
pancreas. Identification, cloning, charact  
erization, and plasma distribution of apo  
lipoprotein L. The Journal of biological  
chemistry 272, 25576 - 25582.

50

Freedman, B. I. , Kopp, J. B. , Langefeld, C. D. , Genovese, G. , Friedman, D. J. , Nelson, G. W. , Winkler, C. A. , Bowden, D. W. , Pollak, M. R. , 2010. The apolipoprotein L1 (APO L1) gene and nondiabetic nephropathy in African Americans. J Am Soc Nephrol 21, 1422 - 1426.

Freedman, B. I. , Langefeld, C. D. , Lu, L. , Divers, J. , Comeau, M. E. , Kopp, J. B. , Winkler, C. A. , Nelson, G. W. , Johnson, R. C. , Palmer, N. D. , Hicks, P. J. , Bostrom, M. A. , Cooke, J. N. , McDonough, C. W. , Bowden, D. W. , 2011. Differential effects of MYH9 and APO L1 risk variants on FRMD3 Association with Diabetic ESRD in African Americans. PLoS Genet 7, e1002150.

Hsu, C. Y. , Lin, F. , Vittinghoff, E. , Shlipak, M. G. , 2003. Racial differences in the progression from chronic renal insufficiency to end-stage renal disease in the United States. J Am Soc Nephrol 14, 2902 - 2907.

Kao, W. H. , Klag, M. J. , Meoni, L. A. , Reich, D. , Berthier-Schaad, Y. , Li, M. , Coresh, J. , Patterson, N. , Tandon, A. , Powe, N. R. , Fink, N. E. , Sadler, J. H. , Weir, M. R. , Abboud, H. E. , Adler, S. G. , Divers, J. , Iyengar, S. K. , Freedman, B. I. , Kimmel, P. L. , Knowler, W. C. , Kohn, O. F. , Kramp, K. , Leehey, D. J. , Nicholas, S. B. , Pahl, M. V. , Schelling, J. R. , Sedor, J. R. , Thornley-Brown, D. , Winkler, C. A. , Smith, M. W. , Parekh, R. S. , 2008. MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. Nature genetics 40, 1185 - 1192.

Kopp, J. B. , Nelson, G. W. , Sampath, K. , Johnson, R. C. , Genovese, G. , An, P. , Friedman, D. , Briggs, W. , Dart, R. , Korbett, S. , Mokrzycki, M. H. , Kimmel, P. L. , Limou, S. , Ahuja, T. S. , Berns, J. S. , Fryc, J. , Simon, E. E. , Smith, M. C. , Trachtman, H. , Michel, D. M. , Schelling, J. R. , Vlahov, D. , Pollak, M. , Winkler, C. A. , 2011. APO L1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. J Am Soc Nephrol 22, 2129 - 2137.

Kopp, J. B. , Smith, M. W. , Nelson, G. W. , Johnson, R. C. , Freedman, B. I. , Bowden, D. W. , Oleksyk, T. , McKenzie, L. M. , Kajiyama, H. , Ahuja, T. S. , Berns, J. S. , Briggs, W. , Cho, M. E. , Dart, R. A. , Kimmel, P. L. , Korbett, S. M. , Michel, D. M. , Mokrzycki, M. H. , Schelling, J. R. , Simon, E. , Trachtman, H. , Vlahov, D. , Winkler, C. A. , 2008. MYH9 is a major-effect risk gene for focal

10

20

30

40

50



segmental glomerulosclerosis. Nature genetics 40, 1175 - 1184.

Lee, V. W., Harris, D. C., 2011. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. Nephrology (Carlton) 16, 30 - 38.

Madhavan, S. M., O'Toole, J. F., Konieczkowski, M., Ganesan, S., Bruggeman, L. A., Sedor, J. R., 2011. APOL1 localization in normal kidney and nondiabetic kidney disease. J Am Soc Nephrol 22, 2119 - 2128.

10

McPherson, P. A., Young, I. S., McKibben, B., McEneny, J., 2007. High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation. J Lipid Res 48, 86 - 95.

Page, N. M., Olano-Martin, E., Lanaway, C., Turner, R., Minihane, A. M., 2006. Polymorphisms in the Apolipoprotein L1 gene and their effects on blood lipid and glucose levels in middle age males. Genes Nutr 1, 133 - 135.

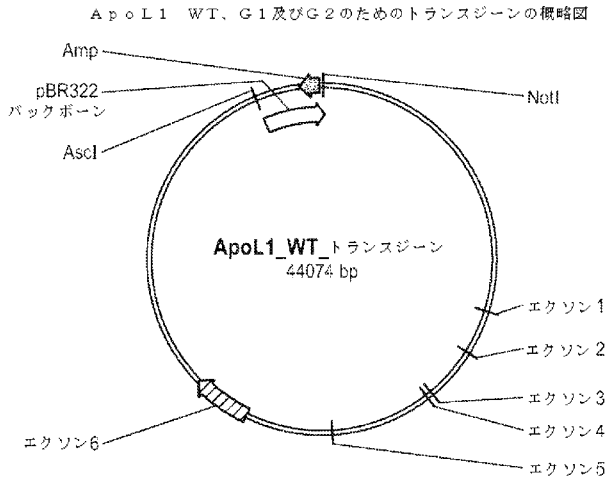
20

Parsa, A., Kao, W. H., Xie, D., Astor, B. C., Li, M., Hsu, C. Y., Feldman, H. I., Parekh, R. S., Kusek, J. W., Greene, T. H., Link, J. C., Anderson, A. H., Choi, M. J., Wright, J. T., Jr., Lash, J. P., Freedman, B. I., Ojo, A., Winkler, C. A., Raj, D. S., Kopp, J. B., He, J., Jensvold, N. G., Tao, K., Lipkowitz, M. S., Appel, L. J., 2013. APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. N Engl J Med 369, 2183 - 2196.

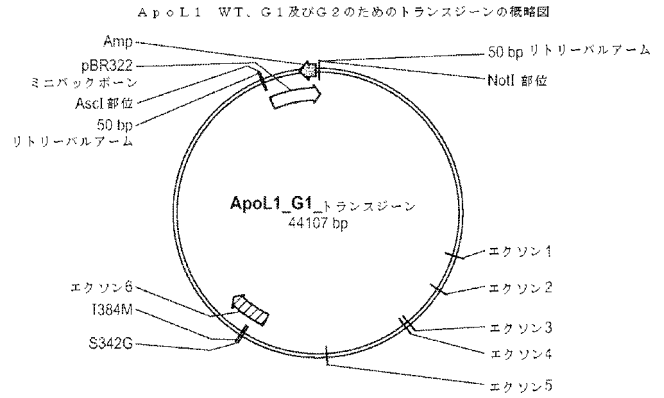
30

Saleem, M. A., O'Hare, M. J., Reiser, J., Coward, R. J., Inward, C. D., Farren, T., Xing, C. Y., Ni, L., Mathieson, P. W., Mundel, P., 2002. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. J Am Soc Nephrol 13, 630 - 638.

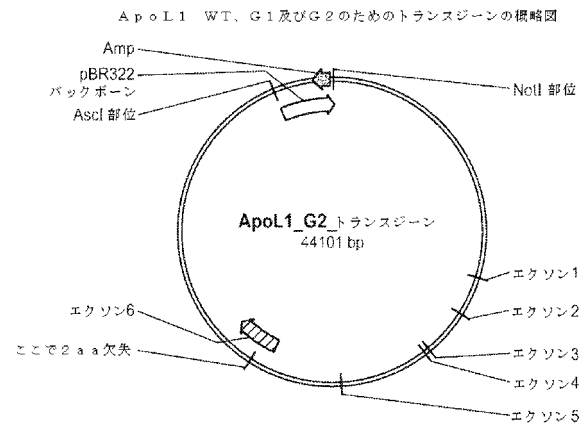
【図 1 A】



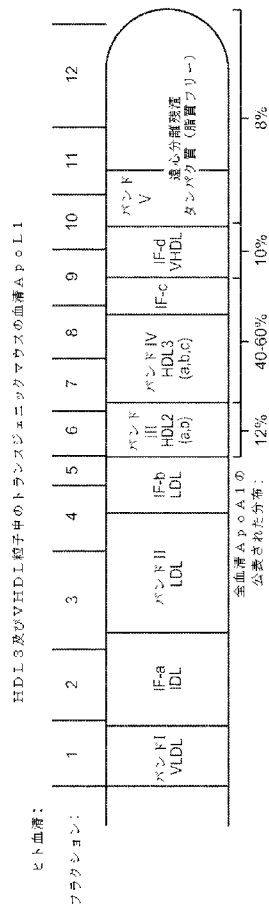
【図 1 B】



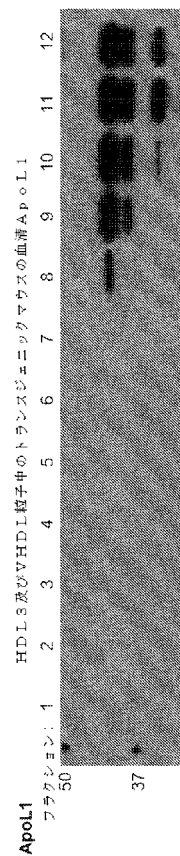
【図 1 C】



【図 2 A】

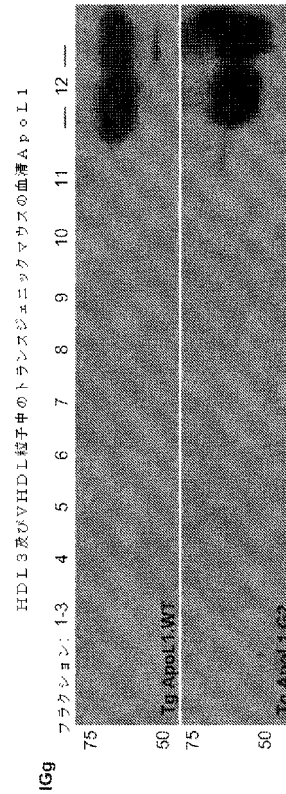


【図 2 B】

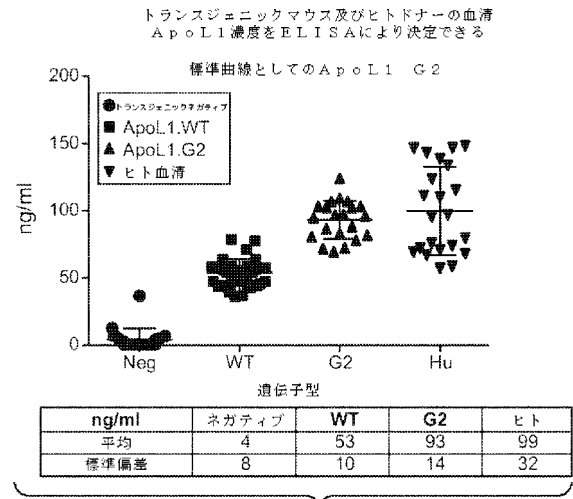




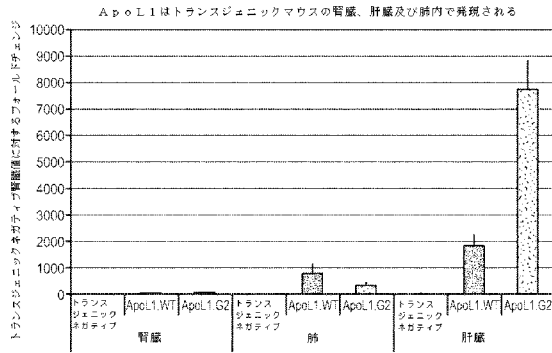
【 図 2 H 】



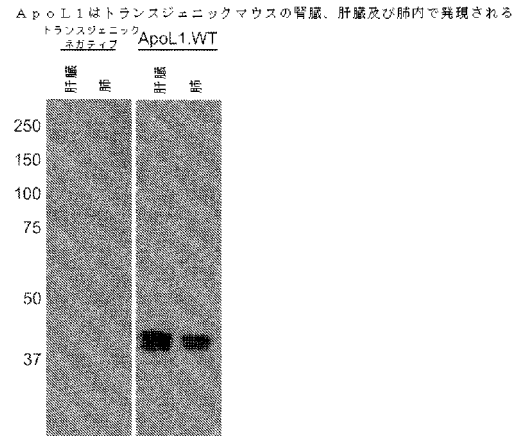
【 ㄨ 3 B 】



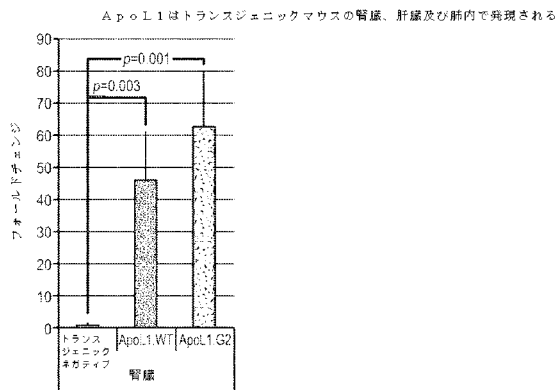
【図 4 A - 1】



【図 4 B】

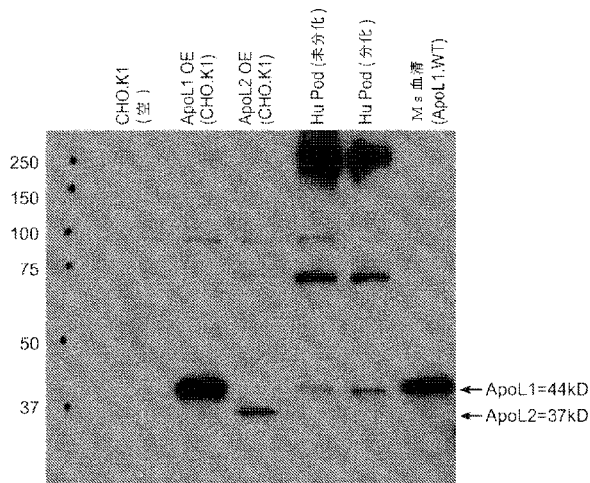


【図 4 A - 2】

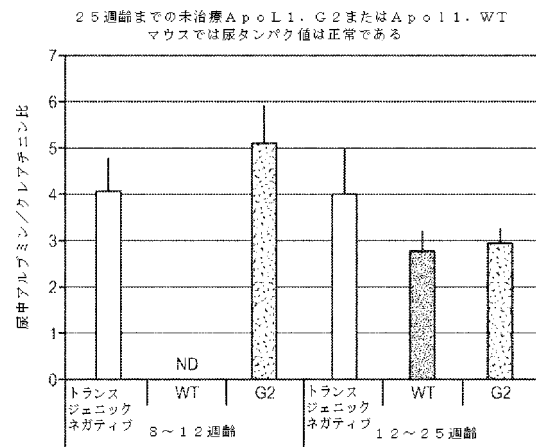


【図 4 C】

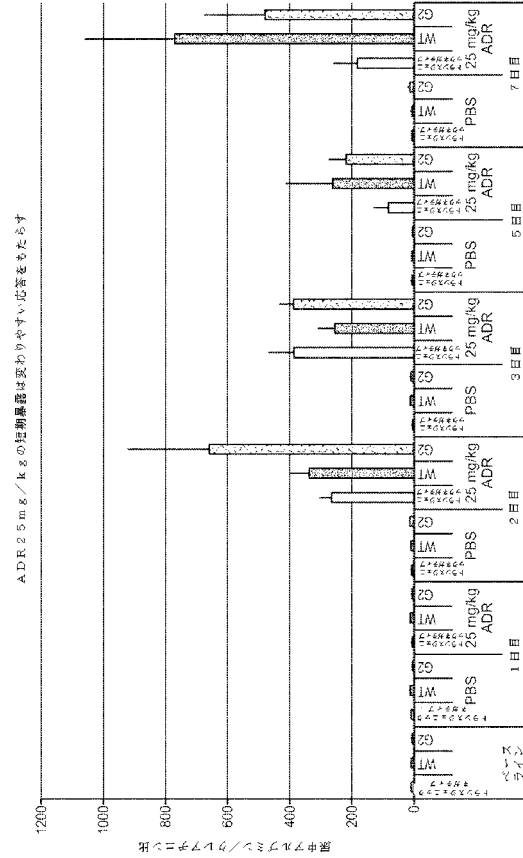
ApoL1はトランスジェニックマウスの腎臓、肝臓及び肺内で発現される



【図 5】




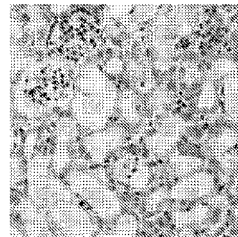
【 図 7 A 】



【 図 7 D 】

ADR 25 mg/kg の短期  
暴露は変わりやすい応答  
をもたらす

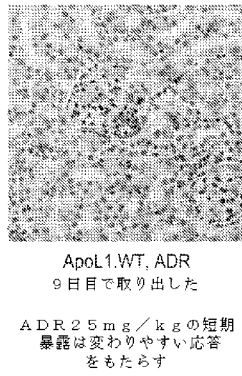
ApoL1.WT, ADR  
7日目で取り出した



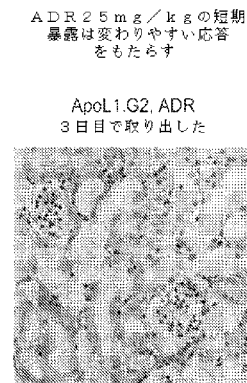
トランスジェニックネガティブ, PPS  
9日目で取り出した

ADR 25 mg/kg の短期  
暴露は変わりやすい応答  
をもたらす

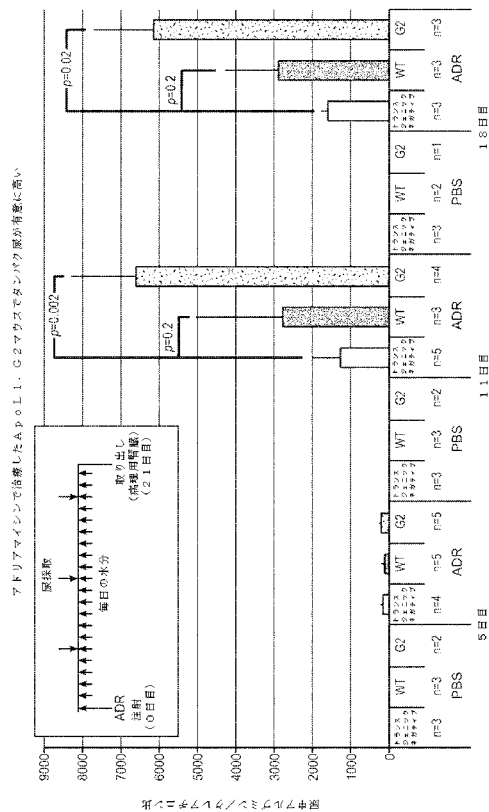
【図 7 E】



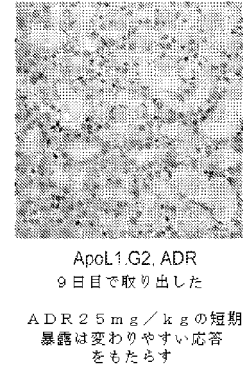
【図 7 F】



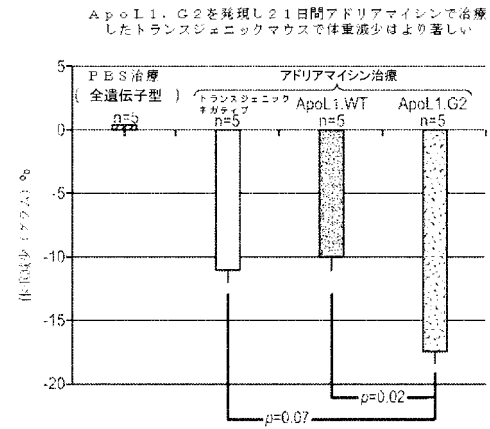
【図 9】



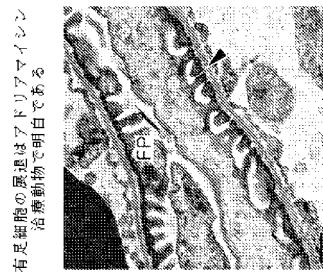
【図 7 G】



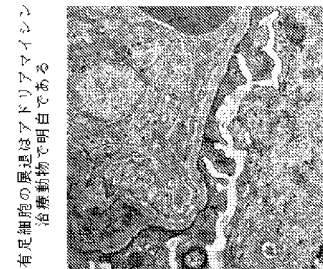
【図 8】



【図 10 A】

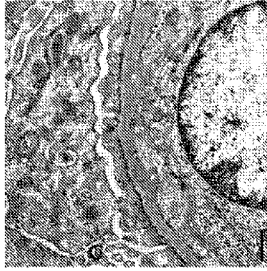


【図 10 B】



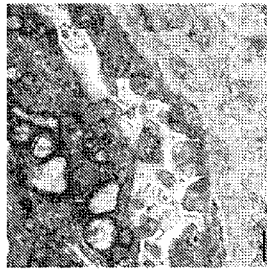
【図 10C】

有足細胞の戻退はアドリアマイシン  
治療動物で明白である



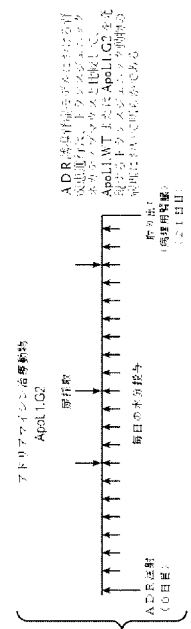
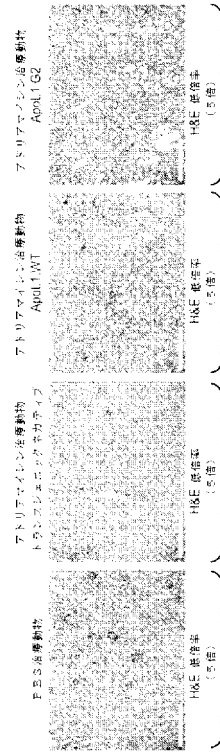
【図 10D】

有足細胞の戻退はアドリアマイシン  
治療動物で明白である



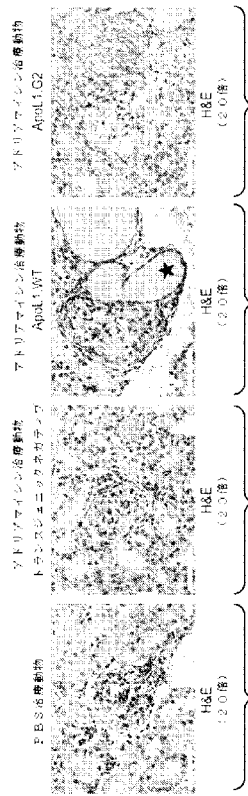
【図 11A - E】

ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。



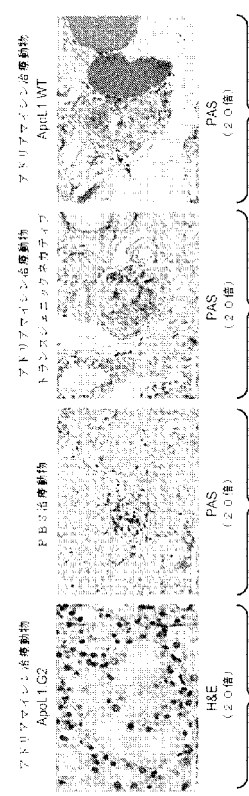
【図 11F - I】

ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。



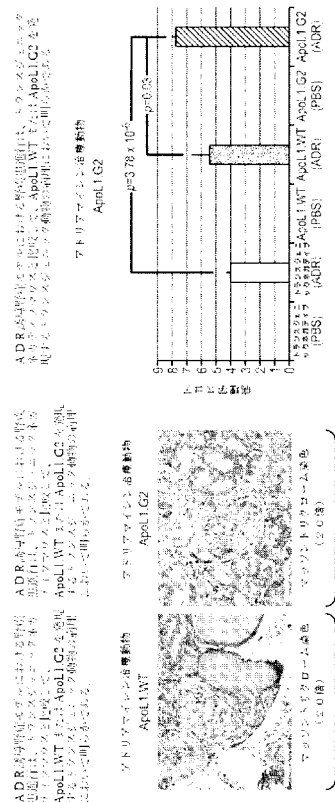
【図 11J - M】

ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。ADR誘発性癌モデルにおける有足細胞の戻退は、アドリアマイシン治療動物で明白である。

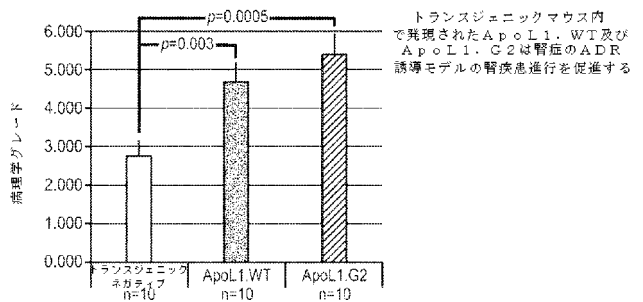




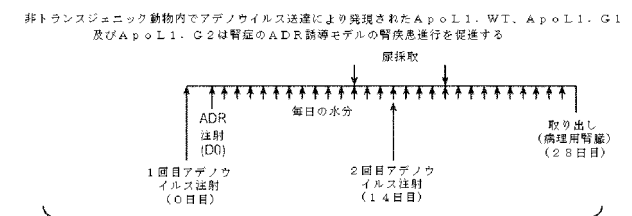
【 図 1 1 R - T 】



【 図 1 2 C 】

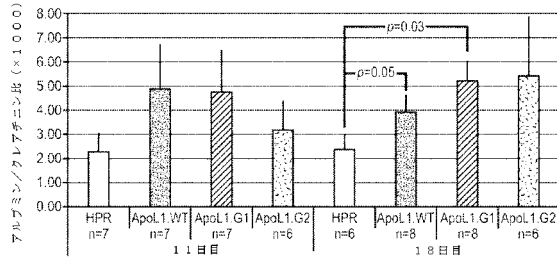


【 図 1 3 A 】

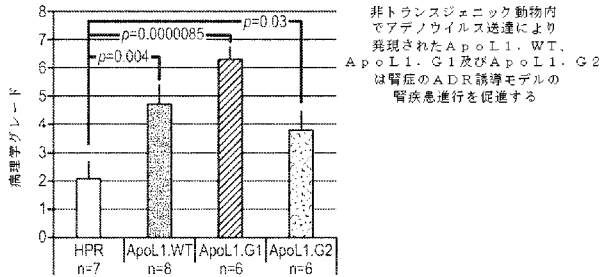


【図 13 B】

非トランスジェニック動物内でアデノウイルス送達により発現されたApoL1. WT、ApoL1. G1及びApoL1. G2は腎症のADR誘導モデルの腎疾患進行を促進する

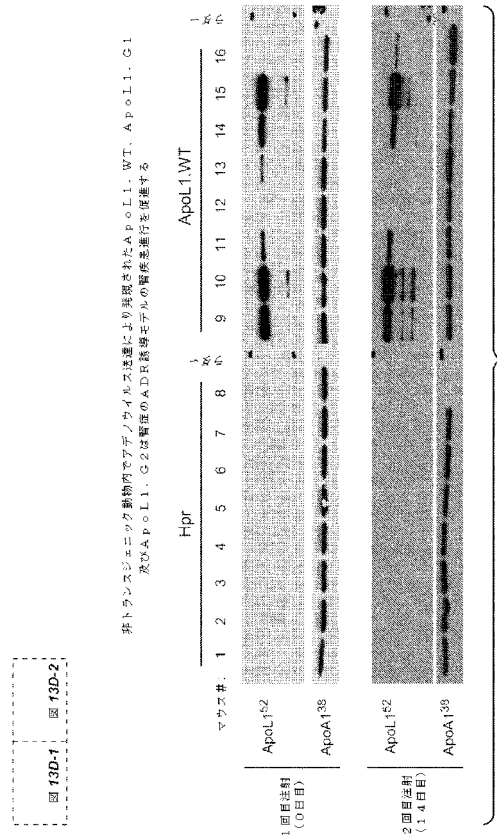


【図 13 C】

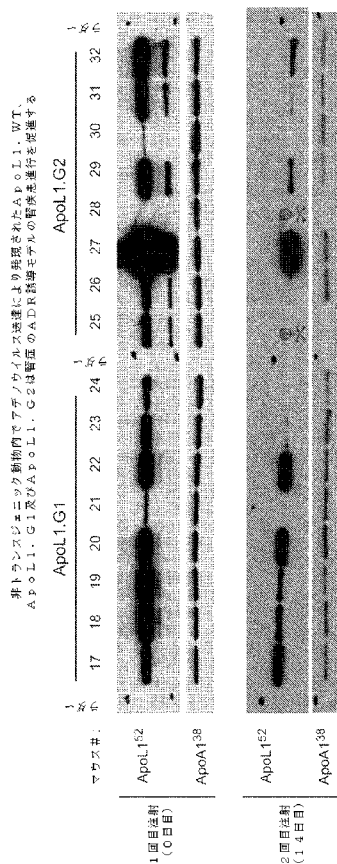


非トランスジェニック動物内でアデノウイルス送達により発現されたApoL1. WT、ApoL1. G1及びApoL1. G2は腎症のADR誘導モデルの腎疾患進行を促進する

【図 13 D - 1】

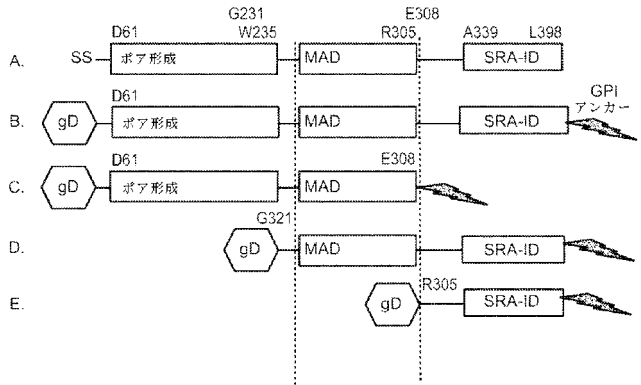


【図 13 D - 2】

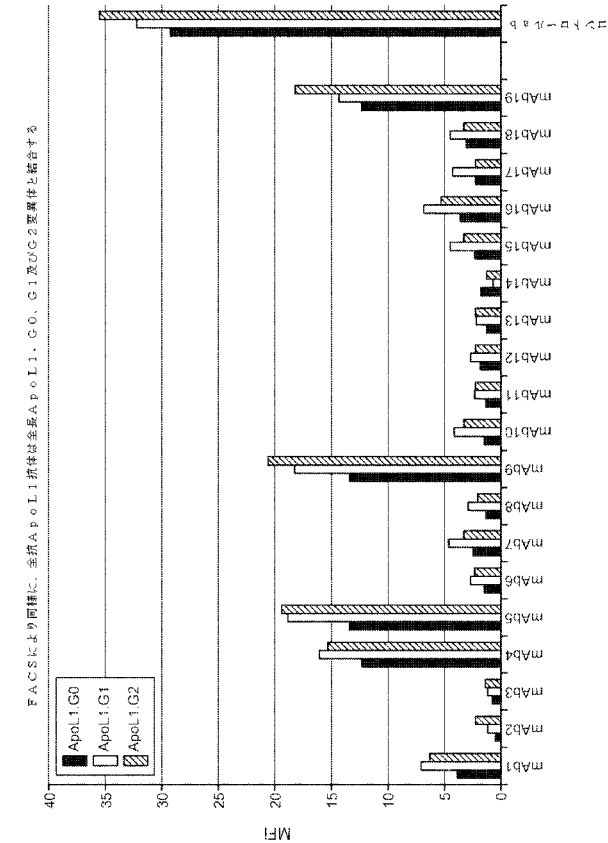


【図 14】

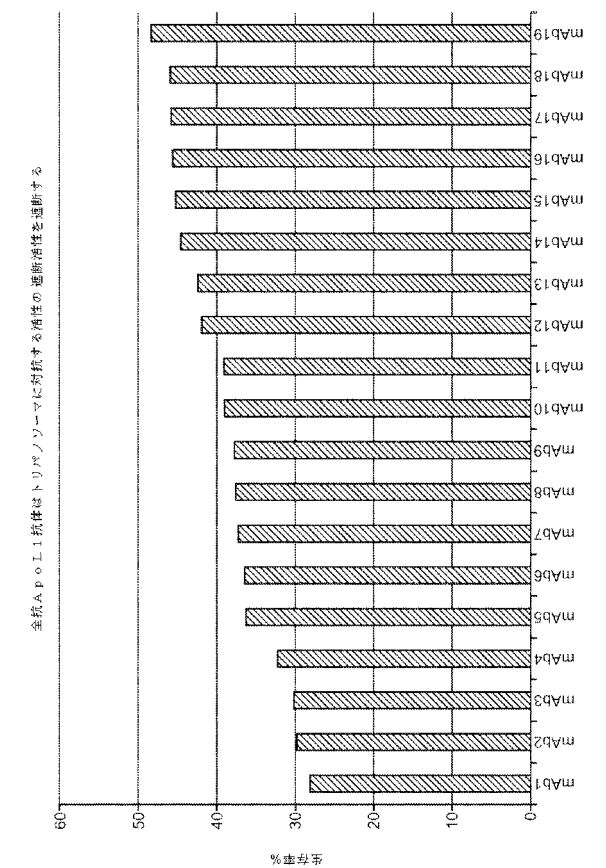
FACSによりマッピングする全ドメインのApoL1コンストラクト



【図 15】



【図 16】



【配列表】

2018500882000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2015/059987

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A01K67/027 C12N15/85 C07K16/18 C07K14/775 A61K49/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/020865 A1 (UNIV BRUXELLES [BE]; PAYS ETIENNE [BE]; LECORDIER LAURENCE [BE]; VANHO) 24 February 2011 (2011-02-24)	1-5,8, 26,27, 30-36, 40-44
Y	paragraph [0004] - paragraph [0011] paragraph [0028] - paragraph [0036]; claims; sequences	1-5,8,9, 26-44
X	WO 2012/162394 A2 (BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; FRIEDMAN DAVID J [US]; POLLAK MARTIN R [US]) 29 November 2012 (2012-11-29)	1,2,5,8, 26-44
Y	page 44, line 1 - page 49, line 24; claims; example 6	1-5,8,9, 26-44
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 January 2016		22/02/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Sommer, Birgit

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/059987

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/030078 A1 (RAPER JAYNE [US] ET AL) 3 February 2011 (2011-02-03)	1-4,8, 26,27, 30-36,40
Y	page 2, paragraph 0010; claims; sequences	1-5,8,9, 26-44
X	----- THOMSON R ET AL: "Evolution of the primate trypanolytic factor APOL1", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 111, no. 20, 7 May 2014 (2014-05-07), pages E2130-E2139, XP055243608, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1400699111	1-4,8, 26,27, 30-36,40
Y	abstract, results, materials and methods; figures 4B-E, 5B	1-5,8,9, 26-44
X	----- MOLINA-PORTELA M P ET AL: "Distinct roles of apolipoprotein components within the trypanosome lytic factor complex revealed in a novel transgenic mouse model", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 205, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 1721-1728, XP002584510, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20071463 [retrieved on 2008-08-04]	1-4,8, 26,27, 30-36,40
Y	abstract, materials and methods; -----	1-5,8,9, 26-44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
PCT/US2015/059987

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

## Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2015/059987

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-44

products and methods related to human apolipoprotein L1 (ApoL1)

1.1. claims: 1-25

a non-human transgenic animal expressing human ApoL1 as well as subject-matter related thereto;

1.2. claims: 26-44

an isolated antibody which binds to the human G0 variant of ApoL1 and to one or both of the human G1 variant of ApoL1 and the human G2 variant of ApoL1 as well as subject-matter related thereto;

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/059987

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011020865 A1	24-02-2011	CA 2768640 A1	24-02-2011
		EP 2470658 A1	04-07-2012
		US 2012128682 A1	24-05-2012
		US 2015011735 A1	08-01-2015
		WO 2011020865 A1	24-02-2011
-----			
WO 2012162394 A2	29-11-2012	US 2012195902 A1	02-08-2012
		WO 2012162394 A2	29-11-2012
-----			
US 2011030078 A1	03-02-2011	NONE	
-----			



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	
<b>C 0 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/46	
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
<b>G 0 1 N 33/68 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/68	
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 P 13/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 P 13/12	

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

(72) 発明者 フォーマン, オーデッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
 ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72) 発明者 ビーターソン, アンドリュー  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
 ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72) 発明者 ウェン, シアオホイ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
 ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック インコーポレイテッド

(72) 発明者 スケールズ, スザンナ ジェー.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー  
 ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック インコーポレイテッド

F ターム(参考) 2G045 AA29 CA26 DA66  
 4B064 AG01 AG26 AG27 CA01 CA02 CA05 CA08 CA09 CA10 CA11  
 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 AC15  
 BA01 CA24 CA25 CA44 CA46  
 4C085 AA14 AA16 BB13 BB36 CC08 DD62 EE01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74