(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-509390
(P2023-509390A)
(43)公表日　令和5年3月8日(2023.3.8)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13	ZNA	4B064
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4B065
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		4C076
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19		4C084
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		4C085

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全212頁）　最終頁に続く

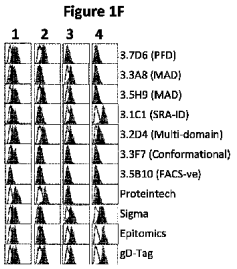
(21)出願番号　特願2022-538362(P2022-538362)
(86)(22)出願日　令和2年12月21日(2020.12.21)
(85)翻訳文提出日　令和4年7月14日(2022.7.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2020/066377
(87)国際公開番号　WO2021/133723
(87)国際公開日　令和3年7月1日(2021.7.1)
(31)優先権主張番号　62/953,097
(32)優先日　令和1年12月23日(2019.12.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

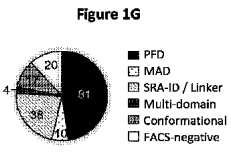
(71)出願人　509012625
ジェネンテック， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　スケーレス， スザンナ ジェーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ 1， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者　グプタ， ニディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94065， レッドウッド シティー， ルフ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　アポリポタンパク質Ｌ１特異的抗体及びその使用方法

(57)【要約】
本開示は、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）のＧ０型及びＧ１型をＧ２型と区別し、ポドサイト上に見られるＡＰＯＬ１を血清中のＨＤＬ粒子上に見られるＡＰＯＬ１と区別し、且つＡＰＯＬ１をアポリポタンパク質Ｌ２、Ｌ３及びＬ６（ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６）と区別する抗ＡＰＯＬ１抗体を含む、抗アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）抗体を提供する。
【選択図】図１Ａ－１Ｇ







【特許請求の範囲】
【請求項１】
アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｃ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）：
（ｄ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｅ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｆ）配列番号５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｇ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｈ）配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｉ）配列番号８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｊ）配列番号９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号９５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変

領域（ＶＨ）と、配列番号９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号９７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｋ）配列番号１０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｌ）配列番号１１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｍ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｎ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｏ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｐ）配列番号１５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｑ）配列番号１６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｒ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｓ）配列番号１８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｔ）配列番号１９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１９５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重

鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１９７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は

（ｕ）配列番号２０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）

を含む、単離された抗体。

【請求項２】

請求項１に記載の抗体であって、

（ａ）請求項１の（ａ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｂ）請求項１の（ｂ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｃ）請求項１の（ｃ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｄ）請求項１の（ｄ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｅ）請求項１の（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｆ）請求項１の（ｆ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｇ）請求項１の（ｇ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｈ）請求項１の（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｉ）請求項１の（ｉ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

（ｊ）請求項１の（ｊ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくと

も９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｋ）請求項１の（ｋ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｌ）請求項１の（ｌ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｍ）請求項１の（ｍ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｎ）請求項１の（ｎ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｏ）請求項１の（ｏ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｐ）請求項１の（ｐ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｑ）請求項１の（ｑ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｒ）請求項１の（ｒ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｓ）請求項１の（ｓ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
（ｔ）請求項１の（ｔ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；又は
（ｕ）請求項１の（ｕ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含む、抗体。
【請求項３】
請求項１又は２に記載の抗体であって、
請求項１の（ａ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｂ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶ

ＨＨを含むか；
請求項１の（ｃ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｄ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｅ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｆ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｇ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｈ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｉ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｊ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｋ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｌ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｍ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｎ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｏ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｐ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｑ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｒ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｓ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
請求項１の（ｔ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；又は
請求項１の（ｕ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列を含むＶＨを含む、抗体。

【請求項４】

請求項１又は２に記載の抗体であって、
請求項１の（ａ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
請求項１の（ｂ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
請求項１の（ｃ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
請求項１の（ｄ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
請求項１の（ｅ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号５０のアミノ酸配列を含むＶ

Ｌを含むか；
　請求項１の（ｆ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号６０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｇ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号７０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｈ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号８０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｉ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号９０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｊ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１００のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｋ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｌ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｍ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｎ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｏ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｐ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｑ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｒ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｓ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
　請求項１の（ｔ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２００のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；又は
　請求項１の（ｕ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含む、抗体。
【請求項５】
　請求項１又は２に記載の抗体であって、
　配列番号９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号２９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号３０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号３９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号４０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号５９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号６０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号６９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号７０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号７９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号８０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号８９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号９０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号９９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１００のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号１０９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１１０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１２０のアミノ酸配列を含むＶＬ；

配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１４０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１４９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１５０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１６０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１８０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１８９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１９０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１９９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２００のアミノ酸配列を含むＶＬ；又は
配列番号２０９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１０のアミノ酸配列を含むＶＬ
を含む、抗体。

【請求項６】

請求項１－５のいずれか一項に記載の抗体であって、
請求項１の（ａ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び／若しくは配列番号１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｂ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｃ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号３１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｄ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号４１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号４２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｅ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号５１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号５２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｆ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号６１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号６２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｇ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号７１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号７２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

請求項１の（ｈ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号８１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号８２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｉ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号９１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号９２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｊ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１０２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｋ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｌ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｍ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１３２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｎ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１４２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｏ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１５２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｐ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１６２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｑ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１７２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｒ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列

を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１８２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｓ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１９２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
請求項１の（ｔ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２０２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；又は
請求項１の（ｕ）に記載のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含む、抗体
【請求項７】
請求項１に記載の抗体であって、
配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号４１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号４２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号５１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号５２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号６１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号６２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号７１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号７２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号８１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号８２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号９１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号９２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１０１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１０２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１１１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１２１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１３１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１３２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１４１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１４２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１５１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１５２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

配列番号１６１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１６２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１７１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１７２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１８１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１８２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１９１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号２０１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２０２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；又は
配列番号２１１のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含む、抗体。

【請求項８】
アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
ａ）ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸６１－１０３に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；且つ／又は
ｂ）ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１１１－１５０に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に
血清中に見られるＡＰＯＬ１よりも、ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１を優先的に認識する、単離された抗体。

【請求項９】
請求項８に記載の抗体であって、
（ａ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか；又は
（ｂ）配列番号１８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、抗体。

【請求項１０】
アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
ａ）ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１０３－１１１に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；
ｂ）ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１５０－１７２に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；
ｃ）ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸３１４－３３３に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；且つ／又は
ｄ）ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸３７６－３９８に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に
ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１と血清中に見られるＡＰＯＬ１の両方を認識する、単離された抗体。

【請求項１１】
請求項１０に記載の単離された抗体であって、
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域

（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｃ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｄ）配列番号８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｅ）配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｆ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｇ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は
（ｈ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、単離された抗体。
【請求項１２】
アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸２６０－３１４に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に、
ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１よりも血清中に見られるＰＯＬ１を優先的に認識する、単離された抗体。
【請求項１３】
請求項１２に記載の抗体であって、
（ａ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか；又は
（ｂ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列

を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、抗体。

【請求項１４】

アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型に優先的に結合する、単離された抗体。

【請求項１５】

請求項１４に記載の抗体であって、

（ａ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｂ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は

（ｃ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、抗体。

【請求項１６】

アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合し、（ａ）アポリポタンパク質Ｌ２若しくはＬ３（ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ３）に有意には結合せず、且つ／又は（ｂ）アポリポタンパク質Ｌ２若しくはＬ６（ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ６）に有意には結合しない単離された抗体であって、

（ａ）配列番号１６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｂ）配列番号１０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は

（ｃ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、単離された抗体。

【請求項１７】

抗体がヒト化又はキメラである、請求項１から５又は８から１６のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項１８】

ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのＩｇＧ抗体である、請求項１から５

又は８から１６のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項１９】
完全長抗体である、請求項１から１８のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項２０】
Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ、Ｆａｂ’又は（Ｆａｂ’）2などの抗体断片である、請求項１から５又は８から１６のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項２１】
二重特異性若しくは多重特異性抗体であるか又は少なくとも１つの他の分子に共有結合的若しくは非共有結合的にコンジュゲートされている、請求項１から２０のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項２２】
少なくとも１つの他の分子と共有結合的又は非共有結合的にコンジュゲートされており、前記少なくとも１つの他の分子は検出標識及び／又は医薬品を構成する、請求項２１に記載の抗体。
【請求項２３】
配列番号２、配列番号２１３及び／又は配列番号２１４のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、請求項１から２２のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項２４】
請求項１から２３のいずれか一項に記載の抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項２５】
請求項１から２３のいずれか一項に記載の抗体の重鎖及び軽鎖をコードする１又は複数の核酸を含む、単離されたベクター。
【請求項２６】
請求項２４に記載の核酸又は請求項２５に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。
【請求項２７】
ＡＰＯＬ１に結合する抗体の製造方法であって、請求項２６に記載の宿主細胞を、前記抗体の発現に適した条件下で培養することを含む、製造方法。
【請求項２８】
宿主細胞から前記抗体を回収することを更に含む、請求項２７に記載の製造方法。
【請求項２９】
請求項２８に記載の方法によって製造される抗体。
【請求項３０】
サンプル中のアポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）の検出方法であって、前記検出方法が、
－　ＡＰＯＬ１、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４又はＡＰＯＬ６のうちの少なくとも１つを含むサンプルを提供すること；
－　前記サンプルを請求項１から２３のいずれか一項に記載の抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させること；及び
－　抗ＡＰＯＬ１抗体によるＡＰＯＬ１タンパク質の認識に基づいて、前記サンプル中の前記タンパク質の存在を検出すこと
を含み、
任意選択的に、前記サンプルがヒト腎臓細胞、ヒトポドサイト細胞、ヒト内皮細胞を含むか、又は任意選択的に、前記サンプルがヒト血清若しくは血液サンプルである、検出方法。
【請求項３１】
内因性アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）をアポリポタンパク質Ｌ２（ＡＰＯＬ２）、アポリポタンパク質Ｌ３（ＡＰＯＬ３）、アポリポタンパク質Ｌ４（ＡＰＯＬ４）及びアポリポタンパク質Ｌ６（ＡＰＯＬ６）と区別する方法であって、前記方法が、ＡＰＯＬ１、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６のうちの少なくとも１つを含

み得るサンプルを提供することと、前記サンプルを請求項１６から２３のいずれか一項に記載の抗ＡＰＯＬ１抗体に接触させることと、前記抗体の前記サンプルへの結合を検出することとを含み、ここで前記抗体は、ＡＰＯＬ１に特異的に結合するが、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６うちの１又は複数には有意には結合しない、区別する方法。

【請求項３２】

前記抗体が、例えば配列番号１６３－１６８を含む抗体５．１７Ｄ１２のＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３とＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３とを含む、請求項３０又は３１に記載の方法。

【請求項３３】

ＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型をＧ２型と区別することができる抗ＡＰＯＬ１抗体と前記サンプルを接触させることを更に含む、請求項３０又は３１又は３２に記載の方法であって、例えば抗体は、抗体４．１１Ａ１０（配列番号１３３－１３８を含む）、４．１２Ｅ５（配列番号１２３－１２８を含む）又は４．１１Ｈ１１（配列番号１４３－１４８を含む）のＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３とＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３とを含む、方法。

【請求項３４】

アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）Ｇ０型及びＧ１型をＡＰＯＬ１　Ｇ２型と区別する方法であって、前記方法が、Ｇ０、Ｇ１及びＧ２型のうちの少なくとも１つを含み得るサンプルを提供することと、前記サンプルを請求項１４、１５、又は１７から２３のいずれか一項に記載の抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させることと、前記抗体の前記サンプルへの結合を検出することとを含み、前記抗体は、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型に優先的に結合する、区別する方法。

【請求項３５】

前記サンプルが、ヒト腎臓細胞、ヒトポドサイト細胞又はヒト内皮細胞を含む、請求項３０から３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３６】

アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）を発現するポドサイト細胞を特異的に検出する方法であって、前記方法は、ポドサイト細胞を含むサンプルを提供することと、前記サンプルを請求項１から１１又は１７から２３のいずれか一項に記載の抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させることと、前記抗体の前記サンプルへの結合を検出することを含み、前記抗体は、（ａ）血清中に見られるＡＰＯＬ１よりもポドサイト細胞上に見られるＡＰＯＬ１に対して優先的に結合し、（ｂ）ＡＰＯＬ２に有意には結合せず、且つ／又は（ｃ）ＡＰＯＬ６にも有意には結合しない、検出する方法。

【請求項３７】

（ａ）ポドサイト上と血清中の両方で見られるＡＰＯＬ１を認識し、且つ／若しくは血清中（例えばＨＤＬ粒子中）に見られるＡＰＯＬ１を認識するコントロール抗体と前記サンプルを接触させること、並びに／又は（ｂ）ＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型をＧ２型と区別できる抗ＡＰＯＬ１抗体と前記サンプルを接触させること、のうちの少なくとも一方を更に含む、請求項３６に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

［００１］　本開示は、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）のＧ０型及びＧ１型とＧ２型とを区別し、ポドサイト上に見られるＡＰＯＬ１と血清中のＨＤＬ粒子上に見られるＡＰＯＬ１とを区別し、且つ／又はＡＰＯＬ１をアポリポタンパク質Ｌ２及びＬ３（ＡＰＯＬ２及びＡＰＯＬ３）と区別することができる抗ＡＰＯＬ１抗体を含む、抗アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）抗体を提供する。また、本開示は特に、上記抗体の使用方法及び製造方法、並びに上記抗体をコードする核酸を提供する。

【背景技術】

【０００２】
［００２］　ＡＰＯＬ１に特異的に結合する抗体は、例えば、腎臓ポドサイト細胞上のＡＰＯＬ１を評価し、それをＡＰＯＬ２及びＡＰＯＬ３などの他の関連タンパク質と区別すること、ＡＰＯＬ１の特定のバリアントを区別すること、並びにＡＰＯＬ１の発現を血清ＨＤＬ粒子などの他の位置とポドサイト上とで比較することに関連するなどの、様々な検出方法において有用であり得る。例えば、Ｇ１及びＧ２と呼ばれるＡＰＯＬ１の２つのバリアント（野生型ＡＰＯＬ１はＧ０と呼ばれる）は、ヨーロッパ系アメリカ人と比較して、特にアフリカ系アメリカ人における腎疾患の危険因子である。エビデンスにより、循環ＡＰＯＬ１ではなく腎臓のポドサイトにおけるＡＰＯＬ１の発現が腎臓疾患の原因である可能性の高いことがサポートされている。したがって、様々な検出方法には、ポドサイトに局在するＡＰＯＬ１を認識し、異なる型のＡＰＯＬ１を区別することもできるような特異的抗体を用いることが有用であろう。
【０００３】
［００３］　しかし、公開されているほとんどの抗体はＡＰＯＬ２と交差反応するため、内因性ＡＰＯＬ１の局在性は確定していない。例えば、これまでの免疫局在性研究では、後述の実施例において本発明者らがＡＰＯＬ２と交差反応することを実証している市販の抗体が利用されていた。ＡＰＯＬ２は、少なくともＡＰＯＬ１と同じくらい腎臓及びポドサイトに豊富に含まれている。ほとんどの研究では、正常な輸送ができない可能性がある過剰発現したＡＰＯＬ１も使用されており、使用された抗体は、関連するＡＰＯＬファミリーメンバーとの交差反応性について特性評価されていなかった。これらの抗体はヒト腎臓のポドサイト、内皮細胞及び近位尿細管の内因性ＡＰＯＬ１を染色したと報告されている。しかし、これらの過去の実験で使用された抗体もＡＰＯＬ２を認識することがわかったため、ＡＰＯＬ１がこれらの言われている全ての位置で本当に発現しているかどうかは、それらの抗体からでは確信が持てない。後述の実施例に記載されているように、本発明者らは、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１を検出するのに十分な感度を持つ、ＡＰＯＬ１に特異的に結合する抗体を生成した。その一部は、ｒＡＰＯＬ１をＡＰＯＬ２及び他のアポリポタンパク質ファミリーメンバー（ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４、ＡＰＯＬ６など）と区別することができる。いくつかの態様において、これらの抗体は、ポドサイトに局在するＡＰＯＬ１の検出において使用することができ、免疫蛍光顕微鏡法及び免疫組織化学法などの検出方法において使用され得る。
【０００４】
［００４］　また、本明細書の抗体は、ＡＰＯＬ１分子の異なる領域に対して生成されたことにより、ポドサイト上では露出しているが、例えば血清ＨＤＬ粒子中に見られるＡＰＯＬ１では埋もれているＡＰＯＬ１の部分に関する情報を得ることができる。このような抗体は、例えば、ポドサイト、内皮細胞及び肝細胞などの細胞上に見られるＡＰＯＬ１を、ＨＤＬ粒子上などの血清中に見られるＡＰＯＬ１と区別するのに有用であり得る。更に、このような抗体は、ポドサイト細胞、内皮細胞及び肝細胞などのＡＰＯＬ１発現細胞に特異的に薬物などの他の分子を標的化することを可能させ得る。
【発明の概要】
【０００５】
［００５］　本明細書の開示は、特定の抗アポリポタンパク質Ｌ１抗体に関する。例示的な実施態様は、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体を含み、ここで、該抗体は、以下を含む。
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変

領域（ＶＨ）と、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｃ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｄ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｅ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｆ）配列番号５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｇ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｈ）配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｉ）配列番号８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｊ）配列番号９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号９５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号９７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｋ）配列番号１０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｌ）配列番号１１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重

鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｍ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｎ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｏ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｐ）配列番号１５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｑ）配列番号１６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｒ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｓ）配列番号１８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｔ）配列番号１９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１９５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１９７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は

（ｕ）配列番号２０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）。

【０００６】

［００６］　いくつかの実施態様において、上記抗体は、

上記実施態様（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含む；

上記実施態様（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；

上記実施態様１（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一である

ＶＨ及び／若しくは配列番号１３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
上記実施態様（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；又は
上記実施態様（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含む。

【０００７】

［００７］　いくつかの実施態様において、上記のように、抗体は、
実施態様（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様１（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；
実施態様（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；又は
実施態様（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列を含むＶＨを含む。

【０００８】

［００８］　いくつかの実施態様において、上記抗体は、
実施態様（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１００のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；

実施態様（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２００のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；又は
実施態様（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含む。

【０００９】

［００９］　いくつかの態様において、上記抗体は、
配列番号９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号２９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号３０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号３９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号４０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号５９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号６０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号６９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号７０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号７９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号８０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号８９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号９０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号９９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１００のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１０９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１１０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１２０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１４０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１４９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１５０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１６０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１８０のアミノ酸配列を含むＶ

Ｌ；
　配列番号１８９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１９０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
　配列番号１９９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２００のアミノ酸配列を含むＶＬ；又は
　配列番号２０９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１０のアミノ酸配列を含むＶＬ
を含む。
【００１０】
　［００１０］　場合によっては、上記抗体は、
　実施態様（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号７２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
　実施態様（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号９２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１０２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１３２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１７２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

実施態様（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１９２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２０２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；又は
実施態様（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含む。

【００１１】

［００１１］　いくつかの実施態様において、上記抗体は、
配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号４１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号４２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号５１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号５２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号６１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号６２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号７１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号７２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号８１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号８２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号９１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号９２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１０１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１０２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１１１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１２１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１３１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１３２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１４１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１４２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１５１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１５２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１６１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１６２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１７１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１７２のアミノ酸配列

を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１８１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１８２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１９１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号２０１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２０２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；又は
配列番号２１１のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含む。

【００１２】

［００１２］　本開示はまた、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体を含み、ここで該抗体は、ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸６１－１０３に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；且つ／又はＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１１１－１５０に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し、更に、該抗体は、血清中に見られるＡＰＯＬ１よりもポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１を優先的に認識する。場合によって、該抗体は、
（ａ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか；又は
（ｂ）配列番号１８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００１３】

［００１３］　本明細書の実施態様はまた、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体を含み、ここで該抗体は、ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１０３－１１１に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１５０－１７２に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸３１４－３３３に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；且つ／又はＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸３７６－３９８に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に、該抗体は、ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１と血清中に見られるＡＰＯＬ１の両方を認識する。場合によって、該抗体は、
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｃ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む

軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｄ）配列番号８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｅ）配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｆ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｇ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は
（ｈ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００１４】

［００１４］　本明細書の実施態様はまた、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体を含み、ここで該抗体は、ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸２６０－３１４に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に、該抗体は、ポドサイト上に発現されらＡＰＯＬ１よりも血清中に見られるＡＰＯＬ１を優先的に認識する。場合によって、該抗体は、
（ａ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか；又は
（ｂ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００１５】

［００１５］　本開示は、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体を更に含み、ここで該抗体は、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型に優先的に結合する。場合によって、該抗体は、
（ａ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ

－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は
（ｃ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００１６】

［００１６］　本開示はまた、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合し、（ａ）アポリポタンパク質Ｌ２若しくはＬ３（ＡＰＯＬ２若しくはＡＰＯＬ３）に有意には結合しない、且つ／若しくは（ｂ）アポリポタンパク質Ｌ２若しくはＬ６（ＡＰＯＬ２若しくはＡＰＯＬ６）に有意には結合しない分離された抗体を含み、該抗体は、
（ａ）配列番号１６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号１０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は
（ｃ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００１７】

［００１７］　上記実施態様のいずれにおいても、抗体は、任意選択的に、ヒト化であってもキメラであってもよい。また、抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのＩｇＧ抗体であってもよい。いくつかの実施態様では、抗体は完全長抗体である。他の実施態様では、抗体は、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ、Ｆａｂ’又は（Ｆａｂ’）２などの抗体断片である。いくつかの実施態様では、抗体は、二重特異性若しくは多重特異性抗体とすることができ、又は少なくとも１つの他の分子に共有結合的若しくは非共有結合的にコンジュゲートさせることができる。いくつかの実施態様では、抗体は、少なくとも１つの他の分子と共有結合的又は非共有結合的にコンジュゲートされており、該少なくとも１つの他の分子は、検出標識及び／又は医薬品を構成する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２、配列番号２１３及び／又は配列番号２１４のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する。

【００１８】

［００１８］　本開示はまた、本明細書に記載の抗体をコードする単離された核酸を含む。本開示はまた、本明細書の抗体の重鎖及び軽鎖をコードする１又は複数の核酸を含む単離されたベクターも包含する。本開示はまた、本明細書の抗体をコードする核酸又は核酸のセットを含む単離された宿主細胞も包含する。更に、本開示は、抗体の発現に適した条件下で、本明細書の抗体をコードする核酸又は核酸のセットを含む宿主細胞を培養することを含む、ＡＰＯＬ１に結合する抗体を製造する方法を企図するものである。場合によ

っては、この方法は、宿主細胞から抗体を回収することを更に含む。本開示はまた、これらの方法によって製造された抗体を含む。

【００１９】

［００１９］　また、本明細書の開示は、サンプル中のアポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）を検出する方法も包含し、この方法は、例えば、ＡＰＯＬ１、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４又はＡＰＯＬ６の少なくとも１つを含むサンプルを提供すること；そのサンプルを本開示による抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させること；及び抗ＡＰＯＬ１抗体によるタンパク質の認識に基づいて該サンプル中のＡＰＯＬ１タンパク質の存在を検出することを含む。このサンプルは、任意選択的に、ヒト腎臓細胞、ヒトポドサイト細胞、ヒト内皮細胞を含み、又はこのサンプルは、任意選択的に、ヒト血清若しくは血液サンプルである。

【００２０】

［００２０］　本願は更に、内因性アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）をアポリポタンパク質Ｌ２（ＡＰＯＬ２）、アポリポタンパク質Ｌ３（ＡＰＯＬ３）、アポリポタンパク質Ｌ４（ＡＰＯＬ４）及びアポリポタンパク質Ｌ６（ＡＰＯＬ６）と区別する方法を開示しており、この方法は、ＡＰＯＬ１、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６のうちの少なくとも１つを含むサンプルを提供することと、該サンプルを抗ＰＯＬ１抗体に接触させることと、該抗体の該サンプルへの結合を検出することとを含み、ここで該抗体は、ＡＰＯＬ１に特異的に結合するが、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６うちの１又は複数には有意には結合しない。場合によって、該抗体は、例えば配列番号１６３－１６８を含む抗体５．１７Ｄ１２の上記ＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３と上記ＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３を含む。場合によって、上記方法は、ＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型をＧ２型と区別することができる抗ＡＰＯＬ１抗体と該サンプルを接触させることを更に含み、例えば抗体は、抗体４．１１Ａ１０（配列番号１３３－１３８を含む）、４．１２Ｅ５（配列番号１２３－１２８を含む）又は４．１１Ｈ１１（配列番号１４３－１４８を含む）の上記ＶＨ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３と上記ＶＬ　ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３を含む。

【００２１】

［００２１］　いくつかの実施態様において、本開示は、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）Ｇ０型及びＧ１型をＡＰＯＬ１　Ｇ２型と区別する方法を提供し、該方法は、Ｇ０、Ｇ１及びＧ２型のうちの少なくとも１つを含むサンプルを提供することと、該サンプルを本開示による抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させることと、該抗体の該サンプルへの結合を検出することとを含み、ここで該抗体は、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型に優先的に結合する。場合によって、該サンプルは、ヒト腎臓細胞、ヒトポドサイト細胞又はヒト内皮細胞を含む。

【００２２】

［００２２］　本開示は、アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）を発現するポドサイト細胞を特異的に検出する方法も企図しており、この方法は、ポドサイト細胞を含むサンプルを提供することと、そのサンプルを本明細書の抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させることと、該抗体の該サンプルへの結合を検出することを含み、ここで該抗体は、（ａ）血清中に見られるＡＰＯＬ１よりもポドサイト細胞上に見られるＡＰＯＬ１に対して優先的に結合し、（ｂ）ＡＰＯＬ２に有意には結合せず、且つ／又は（ｃ）ＡＰＯＬ６に有意には結合しない。場合によっては、これらの方法は、次の少なくとも１つを含む：（ａ）ポドサイトと血清の両方で見られるＡＰＯＬ１を認識し、且つ／若しくは血清中（例えばＨＤＬ粒子中）に見られるＡＰＯＬ１を認識するコントロール抗体と上記サンプルを接触させること、並びに／又は（ｂ）ＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型をＧ２型と区別できる抗ＡＰＯＬ１抗体と上記サンプルを接触させること。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１Ａ－１Ｇ】［００２３］　図１Ａ－Ｃは、ＡＰＯＬ１コンストラクトと抗ＡＰＯＬ

１抗体のドメイン特異性を示す。図１Ａは、ＣＨＯ細胞上の抗体をドメインマッピングするために使用される全長及び切断型ｉＡＰＯＬ１コンストラクトの模式図である。シグナル配列（ｓｓ）、孔形成ドメイン（ＰＦＤ、黒）、膜アドレッシングドメイン（Membrane Addressing Domain）（ＭＡＤ、斑点）、血清抵抗性関連相互作用ドメイン（Serum Resistance Associated-Interacting domain）（ＳＲＡ－ＩＤ、斜線）が示されており、これらの間に位置するリンカードメイン（Ｌ）が白い長方形で示されている。ＡＰＯＬ１が細胞表面タンパク質であるかどうかまだ確証がなかったため、野生型全長（ａａ　２８－３９８）天然ＡＰＯＬ１－Ｇ０（ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ；コンストラクトａ、その天然シグナル配列（ｓｓ、白）付き）と、陽性コントロールとしてのＮ末端抗ｇＤエピトープタグ（ｇＤ）（分泌のための独自の効率的なシグナル配列を含む）及び膜への付着を確実にするためのＣ末端ＧＰＩアンカー付き（いずれもコンストラクトｂ－ｅでは灰色）のＧ０（ａａ　６１－３９８；コンストラクトｂ）とが作製された（ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩ－ＣＨＯ）。切断変異体（コンストラクトｃ－ｅ）を示す：ｇＤ－ＰＦＤ－ＭＡＤ－ＧＰＩ（コンストラクトｃ）、ｇＤ－ＭＡＤ－ＳＲＡ－ＩＤ－ＧＰＩ（コンストラクトｄ）、及びｇＤ－ＳＲＡ－ＩＤ－ＧＰＩ（コンストラクトｅ）。全てのコンストラクトは、ドキシサイクリン誘導性プロモーター下、ＣＨＯ細胞内で安定的に発現された。アミノ酸番号は、Ｐａｙｓらによって定義されたドメイン境界を示す（実施例１、参考文献１参照）。ＭＡＤは単独では不安定であると予測されたため、ＰＦＤ又はＳＲＡ－ＩＤと一緒に発現させた。本発明者らの免疫原がａａ　６１から始まっているため、本発明者らのマッピングコンストラクトｂとｃは、アミノ酸６１から始まっている。　［００２４］　図１Ｂは、ドメインマッピングにつながるフローサイトメトリーの結果の例である。５μｇ／ｍｌのｄｏｘで４８時間誘導した後、（Ａ）に示したｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩコンストラクトを発現する、安定的にトランスフェクトされた生（固定又は透過処理していない）ＣＨＯ細胞は、５μｇ／ｍｌでの抗体結合の差異を示している。ＰＦＤ－ＭＡＤを発現しているがＭＡＤ－ＳＲＡ－ＩＤには結合していない細胞に結合する抗体は、ＰＦＤエピトープ（ａａ　６１－２３５）を持つものとし、ＭＡＤ－ＳＲＡ－ＩＤには結合するがＳＲＡ－ＩＤには結合しないもの（すなわちａａ　２３８と３０５の間のエピトープ）はＭＡＤバインダー、ＭＡＤ－ＳＲＡ－ＩＤとＳＲＡ－ＩＤの双方に結合するものをＳＲＡ－ＩＤバインダー（ａａ　３０５－３９８））（これには、リンカードメイン（ａａ　３０６－３３８）も含まれる）と名付けた。白いヒストグラムは、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス又は抗ラビット二次抗体（ｓｅｃｏｎｄａｒｉｅｓ）のみ；灰色のヒストグラムは、抗ＡＰＯＬ１シグナルである。各カテゴリーの代表的なヒストグラムが示されている：ＰＦＤには３．７Ｄ６；ＭＡＤのＣ末端には３．３Ａ８、ＭＡＤのＮ末端には３．５Ｈ９；ＳＲＡ－ＩＤには３．１Ｃ１；マルチドメインには３．２Ｄ４；コンフォメーションには３．３Ｆ７；ＦＡＣＳ陰性（ＦＡＣＳ－ｖｅ）には３．５Ｂ１０。抗体名の接頭辞３は、方法＃３からのマウスモノクローナル抗体（後述の実施例１に示す）を示す；数字４で始まる他の抗体（ここでは図示せず）は、タンパク質で追加的にブーストしたマウスから得られたマウスモノクローナル抗体であり；接頭辞５の名前の抗体は方法＃５からのウサギモノクローナル抗体（表２Ａ；及び実施例２）である。Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ社の市販のウサギポリクローナル（１１４８６－２－ＡＰ；特にＰＦＤに対して産生；ａａ　１－２３８）は、本発明者らの方法を検証するために使用されたＰＦＤバインダーである。Ｓｉｇｍａ社のポリクローナル（ＨＰＡ０１８８８５；ａａ　２６３－３８７に対して産生）及びＥｐｉｔｏｍｉｃｓ社のウサギモノクローナル（ＥＰＲ２９０７（２）；未開示のペプチドに対して産生）は、ＳＲＡ－ＩＤバインダーである。各コンストラクトのＡＰＯＬ１表面発現の成功は、抗ｇＤエピトープタグ（ｇＤ－ｔａｇ）抗体（単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Ｄに対する）で確認された。　［００２５］　図１Ｃは、全１７０の抗体の全ドメインマッピングの結果をまとめた円グラフである。ＰＦＤ：８１（１７０のうち４８％）；ＭＡＤ：１０（６％）；ＳＲＡ－ＩＤ：３８（２２％）；マルチドメイン：４（２％）；コンフォメーション：１７（１０％）；ＦＡＣＳ陰性：２０（１２％）。

【図２Ａ－Ｄ】［００２６］　図２Ａ－Ｄは、抗ＡＰＯＬ１抗体の天然ＡＰＯＬ１－Ｇ０結合とＧ１／Ｇ２認識を示したものである。図２Ａは、ドキシサイクリンで誘導（５μｇ／ｍｌで４８時間）された全長天然タグなし（及び非ＧＰＩアンカー型）ＷＴ　ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０（図１Ａのコンストラクトａ）を安定的にトランスフェクトされ、５μｇ／ｍｌの全１７０の抗体を含む生（固定又は透過処理していない）ＣＨＯ細胞のフローサイトメトリーを示す。各ドットは、個々の抗体を表わす。８８％の抗体がＣＨＯ細胞表面上の全長ＡＰＯＬ１を認識している。破線は、陽性バインダーのカットオフを示す。誘導されていないｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞を染色した抗体はなく（データは示していない）、ＣＨＯ細胞のバックグラウンド染色がないことを示している。　［００２７］　図２Ｂは、天然ＡＰＯＬ１がＧＰＩアンカー化ＡＰＯＬ１と同様の表面コンフォメーションを有することを示す。５μｇ／ｍｌの全１７０の抗体を含む、天然全長の、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０（図１Ａのコンストラクトａ；ｙ軸）発現生ＣＨＯ細胞及びｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩ（図１Ａのコンストラクトｂ；ｘ軸）発現生ＣＨＯ細胞（いずれも５μｇ／ｍｌドキシサイクリンで２４時間誘導）のフローサイトメトリー。各三角形は、両方のコンストラクトに対するＦＡＣＳによる個々の抗体のＭＦＩを表し、抗体３．３Ａ８は黒ではなく白で描かれ、グラフでは矢印で示されている。ほぼ全ての抗体は、両方の型のＡＰＯＬ１に同様の強度で結合した。このことから、ＡＰＯＬ１は細胞表面に安定に発現しており、ＧＰＩアンカーは、やや予想外に、その表面アクセス可能性にほとんど影響を及ぼしていないことが示された。　［００２８］　図２Ｃは、全長天然ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１又はＧ２発現ＣＨＯ細胞と３８のＳＲＡ－ＩＤ抗体のみを用いた以外は図２Ａと同じである。ＦＡＣＳ陽性抗体は全てＡＰＯＬ１－Ｇ１と交差反応したが（塗りつぶした長方形）、７の抗体はＡＰＯＬ１　Ｇ２を認識しなかった（白三角：４．１１Ａ１０、４．１１Ｈ１１、４．１２Ｅ５、４．１Ｈ８、４．９Ｆ７、３．２Ｂ５及び３．１Ｃ４）。　［００２９］　図２Ｄは、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１又はＧ２を発現するＣＨＯ細胞からのライセートのウェスタンブロットを示し、これは、２．５μｇ／ｍｌの抗体４．１１Ａ１０及び４．１２Ｅ５によるＡＰＯＬ－Ｇ２の認識の欠如を確認し（他の抗体についてはデータを示していない）、Ｇ２を認識できないことが細胞表面の設定に制限されていないことを示す。陽性コントロール抗体３．７Ｄ６（２．５μｇ／ｍｌ）は、３つのバリアント全てを認識する。

【図３Ａ－３Ｇ】［００３０］　図３Ａ－３Ｇは、内因性ＡＰＯＬ１がポドサイトの細胞表面に存在していることを示している。図３Ａは、全１７０の抗ＡＰＯＬ１抗体（５μｇ／ｍｌ）を含む、１００ｎｇ／ｍｌのＩＦＮｇで誘導された野生型（ＷＴ）ポドサイトのフローサイトメトリーを示し、各ドットは個々の抗体を表す。ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞と同様に、ほとんどの抗体は、ＷＴポドサイトの細胞表面に結合した内因性ＡＰＯＬ１を認識できた。　［００３１］　図３Ｂ－３Ｄは、それぞれ図３Ａ及び図２ＡからのＭＦＩデータを用いた、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１（ｘ軸）及び誘導ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞（ｙ軸）間の抗体結合の相関プロットである。各ドットは、ＰＦＤ（図３Ｂ）、ＭＡＤ（図３Ｃ）又はＳＲＡ－ＩＤ（図３Ｄ）に対する個々の抗体を表す。ポドサイトはｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞よりも低いレベルのＡＰＯＬ１を発現したが（下記の図３Ｅ、３Ｆ及び３Ｇを比較）、ＭＡＤ及びＳＲＡ－ＩＤのシグナルがＣＨＯ細胞よりもポドサイトで顕著に低いことを除いて、各抗体の相対シグナルは類似の傾向を示した。　［００３２］　図３Ｅは、１００ｎｇ／ｍｌ　ＩＦＮｇによる２４時間（ｈ）の誘導あり（黒）又は誘導なし（灰色）の、抗ＡＰＯＬ１　ＰＦＤ抗体３．７Ｄ６を５μｇ／ｍｌ含むポドサイトのフローサイトメトリーを示す。白色は、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス二次抗体単独である。内因性ＡＰＯＬ１はポドサイトの表面で検出可能であり、シフトはＩＦＮｇのアップレギュレーション後に増加する。挿入画像は、透過処理されていないＷＴＩＦＮγ誘導ポドサイトの表面ＡＰＯＬ１の免疫蛍光を示す。　［００３３］　図３Ｆは、５μｇ／ｍｌで２４時間のドキシサイクリン誘導した後（但しＩＦＮｇなし）のｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞を用いた以外は、図３Ｅと同様である。挿入画像は、透過処理されていないｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞での免疫蛍光による抗体３．７Ｄ６を用いた表面ＡＰＯＬ１染色を示す。

［００３４］　図３Ｇは、ＷＴポドサイトとｉＡＰＯＬ１細胞株のウェスタンブロットを示す。ＩＦＮｇ（１００ｎｇ／ｍｌ、４８時間）で誘導されていない（－）又は誘導された（＋）ＷＴポドサイトの６μｇライセート（左から右）；ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイト（後で説明）±１０ｎｇ／ｍｌドキシサイクリン（４８時間）；ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ－ＧＰＩ（図１Ａのコンストラクトｂ）；及び全長ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ（コンストラクトａ）、いずれも±５μｇ／ｍｌドキシサイクリン誘導（４８時間）。上のブロットを、０．４４μｇ／ｍｌのＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ抗ＡＰＯＬ１ポリクローナル（これはＡＰＯＬ２も認識する；（実施例２参照））でプローブし、その後これを剥がして０．０５μｇ／ｍｌウサギ３．１Ｃ１／３．７Ｄ６自社製抗体（中央）及びカルネキシンローディングコントロール（下）で再プローブした。ＡＰＯＬ１シグナルは再プローブのために弱いが、ＡＰＯＬ２は存在しない。ポドサイトの３６ｋＤａのＡＰＯＬ２バンドは、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ抗体でのみ認められ、ＩＦＮｇによってアップレギュレートされるが、ｄｏｘではアップレギュレートされない。安定した細胞株では、ポドサイトよりもｉＡＰＯＬ１（４１ｋＤａ）の発現が高い。ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩ－ＣＨＯ（ａａ６１－３９８、２５　ａａ　ｇＤタグから２．６ｋＤａを含む４０．５ｋＤａと予測）のＧＰＩアンカーは、より小さなタンパク質をコードしているにもかかわらず、バンドがｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ（ａａ　２８－３９８、予測４１．１ｋＤａ）のバンドよりも高くなっているため、インタクトであると推定される。

【図４Ａ－４Ｃ】［００３５］　図４Ａ－４Ｃは、ポドサイトの表面シグナルがＡＰＯＬ１であることの確認を示している。図４Ａは、最良のＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトクローンの特徴付けを示す。最も急速に成長するＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトクローン８９４０１－３（灰色）とＷＴポドサイト（黒色）（いずれも１００ｎｇ／ｍｌ　ＩＦＮｇで２４時間処理）でのＰＦＤ抗体３．７Ｄ６を使用したＦＡＣＳ。ＡＰＯＬ１　ＫＯクローンは、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス二次抗体単独（白）と同様の抗ＡＰＯＬ１　３．７Ｄ６シグナルを示しており、ＡＰＯＬ１のノックアウトが成功したことを示している。　［００３６］　図４Ｂは、クローン８９４０１－３（４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上のレーンあたり６μｇのライセート）における完全なＡＰＯＬ１ノックアウトの確認を、様々なドメイン特異的抗体：３．７Ｄ６と３．６Ｄ１２（ＰＦＤ）；３．３Ａ８（ＭＡＤ）；３．１Ｃ１と３．６Ｅ１０（ＳＲＡ－ＩＤ）（全てＡＰＯＬ１の喪失を示す）で示したものである。抗体３．６Ｄ１２はＡＰＯＬ２と交差反応しており（後述の実施例２）、この特定のクローンにおいてはＡＰＯＬ２レベルがいくらかの低下しているようだが、意図したように、ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトにおいてＡＰＯＬ２が欠失しないことを示している。　［００３７］　図４Ｂは、ポドサイト上のＦＡＣＳシフトの特異性を示す。ＡＰＯＬ１　ＫＯクローン８９４０１－３のフローサイトメトリーは、試験したほぼ全ての抗ＡＰＯＬ１抗体でシグナルの完全な喪失が示している。平均蛍光強度データは、少なくとも３回の独立した実験を行ったうちの一回の代表的な実験からプロットしたものである。少数の小さなシグナルは、ＣＨＯ細胞上でＦＡＣＳ陰性と分類された抗体からのものではなく、ＷＴポドサイト上のこれらの抗体のシグナルがはるかに高かったため、低レベルの非特異的バックグラウンド結合を表すものである（図６）。Ｐ－ｔｅｃｈはＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈのポリクローナル抗ＡＰＯＬ１である。

【図５Ａ－５Ｅ】［００３８］　図５Ａ－５Ｅは、抗体の大部分が循環ＡＰＯＬ１を認識本することを示している。　［００３９］　図５Ａは、発明者らの抗ＡＰＯＬ１トリパノソーマ溶解ブロッキングアッセイの模式図を示す。ＡＰＯＬ１を自然に含む正常ヒト血清（ＮＨＳ）と共に９６ウェルプレートでインキュベートされたトリパノソーマ（ＳＲＡ陰性ブルーストリパノソーマ（Ｔ．ｂｒｕｃｅｉ　ｂｒｕｃｅｉ））は死滅し、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ生死判別試薬の青色を変化させない。抗ＡＰＯＬ１抗体（「Ｙ」）がＡＰＯＬ１活性をブロックすれば、トリパノソーマは生き残り、生きているトリパノソーマの代謝活性のレベルに比例してＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅが赤色に変化する。右側には、死んだトリパノソーマ（上）と生きているトリパノソーマ（下）の代表的な位相差画像が示されている。　［００４０］　図５Ｂは、トリパノソーマ溶解活性について、ＮＨＳ（黒）、

精製された高密度リポタンパク質（ＨＤＬ；白）、及びリポタンパク質欠損ＮＨＳ（ＬＰＤＳ；灰色）の滴定を示したものである。Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ生存アッセイを使用して評価した、生きているトリパノソーマのパーセンテージを希釈の関数としてプロットした。プロットされたデータは、ＮＨＳではｎ＝６、ＬＰＤＳではｎ＝２の実験による平均値とＳ．Ｄ．である。データは、ＮＨＳ及びＨＤＬと比較して、ＬＰＤＳの溶解活性が低いことを示している。ＮＨＳ１％以下でのトリパノソーマの殺傷効率には日日変動があったが、これはＮＨＳの供給源、又は－８０℃で適切に保存されていない場合のＡＰＯＬ１の分解による活性の喪失に起因する可能性がある。　［００４１］　図５Ｃは、１μｇ／ｍｌの抗ＡＰＯＬ１抗体の存在下での血清関連ＡＰＯＬ１媒介性トリパノソーマ溶解活性のブロッキングをプロットしたものである。抗体は、図１Ｃで決定されたドメイン認識に従ってグループ化されている。ブロッキングのパーセンテージは、抗体なしのコントロール（ＮＨＳのみ）に正規化することによって計算される。各記号は、所与の抗体についての２つの独立した実験の平均値を表す。図５Ｄと図１７の免疫沈降アッセイで使用された抗体は、灰色でプロットされている。全ての実験は１μｇ／ｍｌと１０μｇ／ｍｌの抗体で並行して行われたが、より高いストリンジェンシーのため、１μｇ／ｍｌのデータのみが示されていることに留意されたい。２５％の破線はブロック剤のカットオフ限界を示し、６０％の線は「強い」ブロック剤のカットオフを示す。　［００４２］　図５Ｄは、ＮＨＳからのＡＰＯＬ１の免疫沈降を示す。各ドメインに対するクローン化抗ＡＰＯＬ１抗体のサブセット（ブロッキング活性の範囲で選択（図５Ｃ参照））をＤｙｎａｂｅａｄｓにコンジュゲートさせ、ＮＨＳとインキュベートした。免疫沈降物をウサギ抗ＡＰＯＬ１（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ、上）又はウサギ抗ＡＰＯＡ１（Ｒｏｃｋｌａｎｄ、下）で４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上でウェスタンブロッティングした。強いブロック剤は大量のＡＰＯＬ１をプルダウンし、弱いブロック剤はＡＰＯＬ１をほとんど又は全くプルダウンせず、非ブロック剤はＡＰＯＬ１を全くプルダウンしなかった。括弧内の灰色の数字は、図５Ｃにプロットされているブロッキング活性％を示す。ＨＤＬ粒子の約５％しか構成しない（実施例１の参考文献５１）ＨＤＬ３ｂにのみにＡＰＯＬ１が存在するため（実施例１の参考文献５０）、予想通り、最良の抗ＡＰＯＬ１抗体によって共免疫沈降するのは全ＡＰＯＡ１の一部だけである。ＨＰＲプルダウンも加えた、他のいくつかの抗体を含む別の実験を図１７に示す。　［００４３］　図５Ｅは、トリパノソーマ溶解阻止と血清ＡＰＯＬ１認識の相関プロットを示す。図５Ｄの各抗体のトリパノソーマ溶解のブロッキングパーセンテージ（Ｙ軸）に対する免疫沈降したＡＰＯＬ１バンドの強度（２－３ブロットの平均値）をＸ軸にプロットしてある。１つの抗体（３．６Ｈ５、灰色で表示）を除いて、ブロック剤は全て免疫沈降によってＡＰＯＬ１を認識し、バンド強度とかなりよく相関している（スピアマンのｒｈｏ係数は０．６２５；（３．６Ｈ５を除くと０．７５））。

【図６Ａ－６Ｃ】［００４４］　図６Ａ‐６Ｃは、ＡＰＯＬ１のコンフォメーションが循環ＡＰＯＬ１と細胞表面のＡＰＯＬ１との間で異なることを示す。１００ｎｇ／ｍｌのＩＦＮｇで４８時間誘導したＷＴポドサイト（図６Ａ）及び１０ｎｇ／ｍｌのｄｏｘで２４時間誘導したフローサイトメトリーｉＡＰＯＬ１－Ｇ０　ポドサイト（図６Ｂ）では、全ての個々の抗体で同様の結合パターンを示している。Ｙ軸は平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す。誘導性ポドサイトよりもＷＴのスケールが小さいことに注意。クローン化抗体（太字）については３回の独立した実験の平均値とＳＤを、ハイブリドーマ精製抗体については１－２回の実験の平均値とＳＤをプロットしている。ＮＤは、（非クローン化）抗体が利用できないため、「決定されていない」ことを示す。　［００４５］　図６Ｃは、血清ＡＰＯＬ１結合の代用としてプロットされた血清ＡＰＯＬ１媒介性トリパノソーマ溶解の阻止を示す。Ｙ軸はブロッキング活性％を表す（３つの独立した実験の平均値とＳＤ、各々抗体なしコントロールに正規化）。非ブロック剤は破線を下回る（２５％以下のブロッキング）。抗体は、ＡＰＯＬ１の長さに沿って暫定的な結合順序（Ｎ末端からＣ末端）で記載されている。但し、コンフォメーション抗体（Ｃｏｎｆ）は、全長のＡＰＯＬ１しかを認識しないためマッピングできなかった（図７と図１９－２０を参照）。

【図７Ａ－７Ｂ】［００４６］　図７Ａ－７Ｂは、抗ＡＰＯＬ１抗体のエピトープマッピングとＡＰＯＬ１トポロジーのモデルを示す。図７Ａは、個々のクローン化抗体のドメインマッピング結果の模式図（縮尺に合わせて描画）をＡＰＯＬ１－Ｇ０上に示す。３つの予測膜貫通（ｔｍ）ドメイン（Ｔｈｏｍｓｏｎら；実施例１の参考文献２２）を灰色の長方形、ＬはＭＡＤとＳＲＡ－ＩＤ間のリンカーである。縦の点線は、様々な抗体がマッピングされたエピトープの境界を示しており、下部にａａ番号が付いている（図１９及び２０参照）。下の点は、その領域にマッピングされた抗体の数を示す。Ｇ１バリアントと Ｇ２バリアントの位置がそれぞれ示されている。　［００４７］　図７Ｂ　ポドサイト（上）及び血清ＡＰＯＬ／ＨＤＬ（下）におけるＡＰＯＬ１エピトープの予測暴露。黒いバーは露出した領域、白いバーはアクセスできない領域、灰色は抗体を取得しなかった領域（主に膜貫通ドメインと周囲の残基）を示す。縦の点線と数字はエピトープマッピングによって決定された露出／非露出境界の位置を示す。

【図８Ａ－８Ｂ】［００４８］　図８Ａ－８Ｂは、低ｐＨがＡＰＯＬ１トポロジーに検出可能な影響を与えないことを示している。図８Ａは、１０ｎｇ／ｍｌドキシサイクリンで２４時間処理したｉＡＰＯＬ１ポドサイトのフローサイトメトリーを示す。４℃でｐＨ７．０（黒）又はｐＨ５．５（灰色）のＰＢＳの存在下で一次抗体とインキュベートした生細胞の平均蛍光強度を、二次抗体単独のバックグラウンドを差し引いて示している。低ｐＨでは、どの抗体も３つの異なるドメイとの結合に検出可能な差はなかった。この実験は、他の図とは異なるフローサイトメーターで行われたため、ＭＦＩの読み取り値が高くなっている。２つの独立した実験からの２回の平均値と標準偏差がプロットされている。

【図８Ｂ】［００４９］　図８Ｂは、低ｐＨと中性ｐＨでの血清ＡＰＯＬ１の免疫沈降を示す。血清ＡＰＯＬ１は、抗ＡＰＯＬ１抗体とコンジュゲートしたＤｙｎａｂｅａｄｓを用いて免疫沈降させ、４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上で泳動させた。得られたブロットをＡＰＯＬ１について３．１Ｃ１／３．７Ｄ６で免疫標識したところ、ＡＰＯＡ１と共に抗体（アスタリスク）をブロッキングすることによってのみ、両方のｐＨ条件でＡＰＯＬ１がプルダウンされたことが明らかになり；弱いブロック剤又は非ブロック剤はｐＨ５．５ではバインダーにならなかった。

【図９Ａ－９Ｃ】［００５０］　図９Ａ－９Ｃは、ＡＰＯＬ１トポロジーのモデルを示している。図９Ａは、２つの膜貫通ドメインのうちの少なくとも第１のドメインが正しいという仮定に基づく、ＡＰＯＬ１トポロジーの細胞ベースのモデルを示す（これらはＤＡＳ及びＳＰＬＩＴサーバーの予測に従って番号付けされている；下記の表２Ｂ）。図９Ａでは、ＡＰＯＬ１における予測膜貫通ドメイン数は、使用されるプログラム（表２Ｂ）によって１から４まで変化する（表２Ｂ）が、第１の膜貫通部分がａａおよそ１７７－１９６であることは全てのプログラムで一致している。本発明者らのデータは、２つのＰＦＤ膜貫通ドメイン（１７５と２２４の間）が実在し、第３のドメイン（およそ３３８－３５３）が完全な膜貫通通過ではなくループである場合を除いて、いずれの膜貫通予測とも完全に一致しない。おそらくこれらの予測疎水性領域が抗原に埋もれていたために、これらの領域のいずれに対しても抗体は得られなかった。細胞表面の二重層は破線で描かれ、数字は図７と同様にａａの位置を示している。ＡＰＯＬ１のＮ末端とＣ末端の両方が暴露されていることから、通常は偶数の膜貫通ドメインが予測されるが、その間のリンカードメイン（ａａ　３１４－３３３）がはっきりと暴露されていることから、２つ又は４つの膜貫通ドメインは不可能になる。その上、第２のドメイン（あまり強く予測されていないもの）が「ハーフスパニングループ（half-spanning loop）」である３つの膜貫通ドメインは、リンカーの暴露とＣＨＯ細胞上でＭＡＤが露出しているという事実を同様に説明することができない。したがって、ＳＲＡ－ＩＤ膜貫通ドメイン（ｔｍ３）はハーフスパニングループであることが予想される。但し、ＡＰＯＬ１の一部は、他のタンパク質に埋もれているか、又は、脂質に埋め込まれているのではなく単にアクセスできない向きにある可能性がある。数字はＤＡＳ及びＳＰＬＩＴサーバーによって予測された膜貫通ドメインを示す（表２Ｂ）。孔形成ドメインは第１膜貫通ドメインまで完全に露出しており、ＭＡＤは細胞外にある可能性が高いが、ＭＡＤがヒトではアクセス不可能でありＣＨＯでは露

出しているという事実を説明するために、ポドサイトや他のヒト細胞株では発現するがＣＨＯ細胞では発現しない仮説的抗体ブロッキングタンパク質（影付きの楕円形）によって隠されている。リンカーの末端は露出しているが、第３膜貫通部分とＳＲＡ－ＩＤの前半部分はアクセス不可能であり、ＳＲＡ－ＩＤのＣ末端（Ｇ１　Ｉ３８４ＭとＧ２変異を含む）のみが露出している。図９Ｂ－９Ｃは、本発明者らのトリパノソーマ溶解アッセイが主にＨＤＬ関連ＡＰＯＬ１活性を測定した（図５Ｄに示すように）という仮定に基づいて、血清中のＡＰＯＬ１トポロジーのモデルを示している。但し、ＨＤＬ膜に埋もれているように描かれた領域は理論的には代わりにＴＬＦ２のＩｇＭなど他の血清タンパク質によって結合されている可能性がある。図９Ｂのモデルでは、予測膜貫通ドメインがＨＤＬ粒子に埋もれていると仮定しているが、図９Ｃのモデルではこの仮定をせず、トリパノソーマブロッキングの結果のみを示している。

【図１０Ａ－１０Ｆ】［００５１］　図１０Ａ－１０Ｆは、ＡＰＯＬ１免疫原が機能していることを示している。図１０Ａは、his_6－ＡＰＯＬ１抗原のＳ２００カラム精製を示す。ＮｉＮＴＡで精製したhis_6－ＡＰＯＬ１を、０．１％ＤＤＭの存在下で大きなＳ２００カラムで分画した。１１４２ｍｌのメインピークは全長モノマーに相当する。画分Ｂ４－Ｃ１（黒い長方形）は、特徴付けと免疫化のためにプールされた。［００５２］　図１０Ｂは、his_6－ＡＰＯＬ１抗原の最終プール画分Ｂ４－Ｃ１のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。サンプルを還元サンプル緩衝液で煮沸し、Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　ＳＤＳ緩衝液中、Ｂｏｌｔ４－２０％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ　ＰＬＵＳゲル上で泳動させ、その後クーマシーブルー染色を行った。主要な３７ｋＤａのバンドは全長のhis_6－ＡＰＯＬ１を表し、２４ｋＤａと１６ｋＤａに切断産物がある。［００５３］　図１０Ｃは、トリパノソーマ溶解アッセイに使用したＦＬＡＧ－ＡＰＯＬ１のＳ２００カラム精製を示す。ＦＬＡＧ－ＡＰＯＬ１を抗ＦＬＡＧ抗体カラムで精製し、０．０２６％ＤＤＭの存在下でＳ２００カラムで分画した。７０ｍｌのメインピークは全長モノマーに相当し、黒い長方形はトリパノソーマ溶解アッセイに使用するためにプールされた分画１９－２１を示す。［００５４］　図１０Ｄは、図１０ＣのＳ２００画分のクーマシーブルー染色４－２０％　Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示しており、全長タンパク質に相当する一本の主要バンドを示している。画分１９－２１（黒い長方形）をプールして使用した。分子量マーカーはＳｅｅ　Ｂｌｕｅ　Ｐｌｕｓ　２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＬＣ５６２５）であったため、ＡＰＯＬ１はこのゲル上では約４１ｋＤａに現れる。［００５５］　図１０Ｅは、組換えＡＰＯＬ１（ｒＡＰＯＬ１）がトリパノソーマの殺傷に有効であることを示している。全て０．０２６％ＤＤＭを含む緩衝液中に配合した３つの異なるプレップのトリパノソーマ溶解活性を比較した。トリパノソーマ溶解アッセイ（黒い点線）に使用した最初のhis_6－ＡＰＯＬ１抗原プレップ（図１０Ａから；黒い実線）及びその次の（改良された、分解の少ない）his_6－ＡＰＯＬ１プレップ、並びにブーストリパノソーマと共にインキュベートしたＦＬＡＧ－ＡＰＯＬ１（図１０Ｃ－Ｄから；灰色の実線）の希釈系列は、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイで同じような組換えタンパク質の用量依存性溶解活性を示す。ｙ軸は、図５と同様に計算した死滅トリパノソーマのパーセンテージを示す。［００５６］　図１０Ｆは、等量のＤＤＭ緩衝液のみ（白）ではトリパノソーマの死滅が起こらないことから、トリパノソーマ溶解はＤＤＭではなく組換えＡＰＯＬ１によるものであることを示している。

【図１１】［００５７］　図１１は、ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩ発現ＣＨＯ細胞でのＡＰＯＬ１の抗体認識を示す。全長ｇＤ－ＡＰＯＬ１－Ｇ０－ＧＰＩ（図１Ａのコンストラクトｂ）上の全１７０の抗体を用いたフローサイトメトリー。軸は平均蛍光強度（ＭＦＩ、対数スケール）を示す。各ドットは、個々の抗体を表わす。１５０のＦＡＣＳ陽性抗体（８８％）は点線より上、２０の陰性抗体（１２％）は点線より下にある。

【図１２Ａ－１２Ｄ】［００５８］　図１２Ａ－１２Ｄは、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を介したＡＰＯＬ１　ＫＯ戦略及びクローンの特徴付けを示す。図１２Ａは、相同組換えによるＡＰＯＬ１　ノックアウトを試みるためにＡＰＯＬ１　ゲノム遺伝子座全体のエクソン１とエクソン７を標的とする一対のガイドＲＮＡの位置の模式図である。括弧内はヌクレ

オチドにおけるガイド位置を示す。Ｌは左、Ｒは右である。［００５９］　図１２Ｂは、トランスフェクションごとに使用されたｇＲＮＡの対を示し、各対は番号で示されている。細胞株は、それぞれのｇＲＮＡ対にちなんで命名されている。［００６０］　図１２Ｃは、個々のトランスフェクションから得られた、全ての単一細胞クローンの、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈポリクローナル抗ＡＰＯＬ１によるウェスタンブロットを示す。アスタリスクは、ＡＰＯＬ１の完全な喪失を示したクローン（８９４０１－１、８９４０１－３、９０１０９－２及び９０１１１－１；ゲノムデータは示していない）を示し、一方、２つのクローンは全長のＡＰＯＬ１を保持した（８９４０２－２及び９０１１０－２）。全長ＡＰＯＬ１の有無にかかわらず、ＡＰＯＬ１の切断型（ｔＡＰＯＬ１）の発現により、５つのクローンが拒否された。意図したとおり、ＡＰＯＬ２がノックアウトされたクローンはなかったが、更にウェスタン分析を行ったところ、８９４０１－３で１つの対立遺伝子が失われている可能性が示唆された（図４Ｂと２２を参照）。アクチンはローディングコントロールとして機能した。［００６１］　図１２Ｄは、選択した単一細胞ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトクローンの抗体３．７Ｄ６を用いたフローサイトメトリーを示しており、親ＷＴポドサイト（黒いヒストグラム）と比較した表面上（灰色のヒストグラム）のＡＰＯＬ１の喪失（すなわちノックアウト成功；上段）又は存在（ノックアウト失敗；下段）を示す。白ヒストグラムは、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス二次抗体単独である。クローン８９４０１－３（太字）は、親細胞と形態や増殖速度がより似ているため、更なる研究のために選択された。

【図１３Ａ－１３Ｃ】［００６２］　図１３Ａ－１３Ｃは、ｉＡＰＯＬ１ポドサイトの特徴付けを示す図である。図１３Ａは、ＷＴ及びＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト（いずれも２４時間ＩＦＮｇ後）とｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイト±ドキシサイクリン刺激（１６時間）の４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上の溶解物におけるＡＰＯＬ１発現のウェスタンブロット（０．０４μｇ／ｍｌウサギ３．１Ｃ１及び３．７Ｄ６混合物を用いる）を示す。１０ｎｇ／ｍｌ　Ｄｏｘで１６時間処理した後、ＷＴ＋ＩＦＮｇより１０倍高い発現が見られる。［００６３］　図１３Ｂは、フローサイトメトリーによる表面ＡＰＯＬ１発現が、１μｇ／ｍｌの３．７Ｄ６抗体を用いて、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイト（黒い実線；５ｎｇ／ｍｌ　ｄｏｘで２４時間誘導）においてＷＴ（灰色；１００ｎｇ／ｍｌ　ＩＦＮｇで２４時間誘導）よりも１０倍高いことを示している。ＡＰＯＬ１　ＫＯ（黒線）は完全に陰性で、予想通りＡｌｅｘａ４８８抗マウス二次単独（灰色線）と重なっている。３－４回の実験の代表的なヒストグラムを示す。［００６４］　図１３Ｃは、増加するドキシサイクリン濃度（ｎｇ／ｍｌ）におけるｉＡＰＯＬ１－Ｇ０　ポドサイト（黒いバー）の表面ＡＰＯＬ１のフローサイトメトリーを示し、それが１０ｎｇ／ｍｌのｄｏｘで飽和し、１ｎｇ／ｍｌは内因性の非ＩＦＮｇ刺激ポドサイト（灰色のバー）と同様のレベルを生成することを示している。１０ｎｇ／ｍｌのｄｏｘを今後の実験に選択した。３回の実験の代表的なヒストグラムを示す。ｙ軸はｌｏｇ　ＭＦＩである。

【図１４】［００６５］　図１４は、透過化ＡＰＯＬ１－ポドサイトとインタクトなＡＰＯＬ１ポドサイトのフローサイトメトリーである。１００ｎｇ／ｍｌ　ＩＦＮｇで２４時間誘導し、９つの代表的な抗体で染色した、固定・サポニン透過処理済み（灰色）と生きた非透過化ＡＰＯＬ１　ＷＴポドサイト（黒）の平均蛍光強度（ＭＦＩ）データをプロットしている。バーの上の数字は、細胞表面（非透過化）対全（透過化）ＡＰＯＬ１　ＭＦＩの比率で計算した、細胞表面上のＡＰＯＬ１の％を示す。ＭＡＤ抗体３．３Ａ８及び４．６Ａ９は、非透過処理化ポドサイト上の表面ＡＰＯＬ１を検出できないが、透過化ポドサイト上の細胞内ＡＰＯＬ１を検出でき（後述の実施例２も参照）、更に、非透過化ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ生細胞（図２Ｂの白い三角形）も検出できる。

【図１５】［００６６］　図１５は、ヒト細胞株ではＭＡＤがアクセス不可能であることを示している。１００ｎｇ／ｍｌのＩＦＮｇで４８時間処理したＪＨＨ－１（肝臓）、７８６－Ｏ（腎臓）、ＨＣＣ８２７（肺）細胞で異なるドメインに対する抗体を用いたフローサイトメトリーは全てポドサイト（内因性で安定的にトランスフェクトされたもの）と同様の内因性ＡＰＯＬ１暴露パターンを示すが、１０μｇ／ｍｌのｄｏｘで４８時間処理

したｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞は、よりアクセスしやすいＭＡＤドメインを有する（抗体３．３Ａ８と４．６Ａ９でより大きなシフト）。

【図１６】［００６７］　図１６は、抗体によるトリパノソーマ溶解の阻止が用量依存的であることを示す。抗ＡＰＯＬ１抗体用量滴定は、各ドメインのトリパノソーマブロッキング抗体：ＰＦＤ抗体３．７Ｄ６（塗りつぶした丸；IC_{50}　０．５ｎＭ；ＭＡＤ抗体３．３Ａ８（塗りつぶした四角；IC_{50}　０．４ｎＭ）；及びＳＲＡ－ＩＤ抗体３．１Ｃ７（塗りつぶした三角、IC_{50}　１ｎＭ）のうち１つを用いてトリパノソーマブロッキングアッセイで行った。図４Ｃと同様にＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイを用いて生きたトリパノソーマを測定し、ブロッキング％は、値を抗体なしのコントロールサンプルに正規化することによって計算した。３つの独立した実験の平均値とＳＤをプロットしている。IC_{50}は、ＫａｌｅｉｄａＧｒａｐｈ　ｖ４．１で方程式$y=m_1/(1+(m_2/m_0)\hat{}\,m_3)$を用いて計算された。

【図１７Ａ－１７Ｃ】［００６８］　図１７Ａ－１７Ｃは、様々なセットのＡＰＯＬ１抗体でのＮＨＳからのＡＰＯＬ１の免疫沈降を示す。図１７Ａは、図５Ｄと同様に、コンフォメーション抗体３．７Ｆ５（配列番号２０３－２１２）（これはブロック剤としても劣る）を除いて全てのブロッキング抗体がＡＰＯＬ１を免疫沈降させることができたことを示している。一方、図１７Ｂも、図５Ｄと同様に、どの非ブロック剤もＡＰＯＬ１をプルダウンしなかったことを示す。ブロッキング抗体３．７Ｄ６が陽性コントロールとして最後のレーンに含まれていた。　［００６９］　図１７Ｃは、ＨＰＲがＡＰＯＬ１とも共免疫沈降したかどうかを決定するためのブロッキング抗体と非ブロッキング抗体のサブセットを示す。ＨＰＲは、ブロッキング抗体によるＡＰＯＡ１プルダウンと同じパターンを示した。

【図１８Ａ－１８Ｂ】［００７０］　図１８Ａ－１８Ｂは、ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ認識と抗ＡＰＯＬ１抗体によるトリパノソーマ溶解阻止との間の相関の欠如を示す。１μｇ／ｍｌでの各抗体（方法＃３の全１０５のハイブリドーマ）のトリパノソーマ溶解ブロッキングのパーセンテージを、同じ濃度のｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞（図１８Ａ）又はｉＡＰＯＬ１－ポドサイト細胞（図１８Ｂ）（図１Ａのコンストラクトａ）上での平均蛍光強度（ＭＦＩ）に対してプロットしている。各ドットは、個々の抗体を表わす。表面結合とトリパノソーマ溶解阻止の相関は低い。これは、約２０の非ブロッキング抗体がＦＡＣＳでＡＰＯＬ１をよく認識できたが（黒の囲み）、逆に約２０の強いブロック剤はＣＨＯ細胞上のＡＰＯＬ１を弱くしか認識しなかった（ＭＦＩ＜２０；灰色の囲み）からである。ＦＡＣＳデータは２つの個別の実験の代表値であり、ブロッキングデータは２つの実験の平均値である。図１８ＢはＷＴポドサイトのＭＦＩ（ＩＦＮｇ誘導）を示し、この細胞株においても表面結合とトリパノソーマ溶解との相関がないことが確認された。データは、図６Ａと図６Ｃにおけるものの再プロットを表している。

【図１９Ａ－１９Ｂ】［００７１］　図１９Ａ－１９Ｂは、表面プラズモン共鳴による抗ＡＰＯＬ１抗体のエピトープマッピングを示す。抗ＡＰＯＬ１抗体を含む２０ｍｅｒペプチドのＷａｓａｔｃｈデータの例を、ＰＦＤ（図１９Ａ）又はＳＲＡ－ＩＤ（図１９Ｂ）ペプチドのＰＦＤ抗体及びＳＲＡ－ＩＤ抗体について示す。ＭＡＤ抗体はこの方法では全て陰性であったため、示していない。

【図２０Ａ－２０Ｅ】［００７２］　図２０Ａ－２０Ｅは、ウェスタンブロッティングによる抗ＡＰＯＬ１抗体のエピトープマッピングを示したものである。図２０Ａは、ＡＰＯＬ１タンパク質の模式図を示しており、その長さに沿って、黒線として下に示した約２０ｍｅｒのペプチドがオーバーラップしている。ＰはＰＦＤ、ＭはＭＡＤ、ＳはＳＲＡ－ＩＤを示し、ペプチドは各ドメインごとに順番に番号を付けた。切断型ＡＰＯＬ１を発現するＳｆ９ライセートを用いたウェスタンブロットにより、いくつかのＰＦＤ及びＭＡＤ抗体について、より広いドメインを決定することができた。ＦＬＡＧ、ＦＬＡＧタグ付き切断型コンストラクトに対する抗ＦＬＡＧ抗体。　［００７３］　図２０Ｂ－Ｄ　上記ペプチドのウェスタンブロッティングによるドメインマッピングの例。ほとんどのＰＦＤ及びＭＡＤ抗体はこれらのペプチドに対して陰性であったが、これは、これらのペプチドの高

度なオリゴマー化又はこれらの抗体のより長い若しくは非線状のエピトープが原因である可能性がある。ＳＲＡ－ＩＤ抗体（図２０Ｄ）は、それらの同族ペプチドによく結合し、線状エピトープを示した。ペプチドＳ６は不溶性のためロードされなかったことに留意されたい。ＳＡ、ストレプトアビジン－ＨＲＰコントロールは、どのペプチドがブロット上で検出可能であるかを決定するためのものである。ＦＬ、全長組換えＡＰＯＬ１コントロール（ａａ　６１－３９８）。

【図２０Ｅ】［００７４］　図２０Ｅは、切断型ＡＰＯＬ１を発現するＳｆ９ライセートを用いたウェスタンブロットにより、いくつかのＰＦＤ及びＭＡＤ抗体について、より広いドメインを決定することができた。ＦＬＡＧ、ＦＬＡＧタグ付き切断型コンストラクトに対する抗ＦＬＡＧ抗体。

【図２１Ａ－２１Ｉ】［００７５］　図２１Ａ－２１Ｅは、腎臓ポドサイトにおけるＡＰＯＬ１、２及び６の発現を示す。図２１Ａは、各ＡＰＯＬファミリーメンバーに対して特異的なプローブを用いた、５つの正常なヒト腎臓のＲＴ－ＰＣＲを示す。データはＲＰＬ１９に正規化され、５つの腎臓の平均値とＳＤが個々のデータ点の上にプロットされている（各腎臓には固有の記号が割り当てられ、最大３つの独立したＲＴ－ＰＣＲの相対発現量（2^{-dCT}）の平均値が各サンプルについてプロットされている）。ＡＰＯＬプローブの特異性については、図３０Ａを参照。　［００７６］　図２１Ｂは、ＡＰＯＬ１－Ｃ２（赤いチャネル）に対するプローブを単独で使用した（ａ、ｂ）、又はＮＰＨＳ２（ポドシン、ｃ、ｄ）に対するプローブと共に若しくは内皮マーカーＥＧＦＬ７－Ｃ１（上皮成長因子様７、血管内皮スタチンとしても知られる、ｅ）に対するプローブと共に用いた、５９歳男性の正常ヒト腎臓の二重ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）を緑で示している。ＡＰＯＬ１プローブがＡＰＯＬ２と交差反応しないエビデンスは、後述の図３０Ｂに示されている。内皮の検出を改善するために、ＩＨＣによる内皮ＰＶＬＡＰ（原形質膜小胞関連タンパク質：plasmalemmal vesicle-associated protein）（ｆ、緑の発色団）とＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡをＩＳＨ　Ｃ２プローブ（赤）で共染色し、ＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡが内皮の検出限界を下回っていることを確認した。近位尿細管の拡散したピンク色の染色は、点状ではなく、陰性コントロールプローブＤＡＰＢでも見られたため赤色色素の非特異的アーチファクトである（後述の図３０Ｃ）。矢印は、ＡＰＯＬ１ｍＲＮＡのみ、ＮＰＨＳ２若しくはＥＧＦＬ７のみ、又は二重陽性（ＡＰＯＬ１とＮＰＨＳ２の場合のみであった）の細胞のサブセットを示している。スケールバーは、ａ、ｃでは５０μｍ；ｂ、ｄ、ｅでは２０μｍ、ｆでは１０μｍである。このデータは、他の３つの正常な腎臓で見られたものを代表するものである。　［００７７］　図２１Ｃは、図２１Ａと同じプローブを用いた、不死化分化（Ｄｉｆｆ、上向き三角形、３８℃で培養）又は未分化（Ｕｎｄｉｆｆ、四角形、３３℃で培養）のヒトポドサイトのＲＴ－ＰＣＲ（３回の別々の継代の平均±ＳＤ、それぞれ二重に分析）を示している。この変化性は、ＡＰＯＬ１レベルが継代中に低下するという本発明者らの観測に起因する可能性がある。白い三角形又は四角形は未処理、黒い三角形又は四角形はＩＦＮｇ処理（１００ｎｇ／ｍｌ、２４時間）。ＡＰＯＬ３は、未分化のポドサイトではＩＦＮｇ処理後に検出可能になったが、分化したポドサイトでは検出されなかった。アスタリスクは、両側スチューデント独立ｔ検定（＊＊，ｐ＜０．０１；＊＊＊，ｐ＜０．００１）に従って、ＩＦＮｇ処理により発現が有意に上昇したＡＰＯＬを示す。　［００７８］　図２１Ｄは、ＡＰＯＬ１及びＡＰＯＬ２を認識するＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈポリクローナルを用いた、不死化未分化（ＵＤ）及び分化（Ｄｉｆｆ）ポドサイト±ＩＦＮｇ刺激の４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上の代表的なウェスタンブロットを示す（図２２Ｂを参照）。アスタリスクは、他の抗ＡＰＯＬ１抗体では見られない非特異的なバンドを示す。アクチンはローディングコントロールとして機能した。

【図２２Ａ－２２Ｄ】［００７９］　図２２Ａ－２２Ｄは、いくつかの抗ＡＰＯＬ１抗体がＡＰＯＬ２と交差反応することを示している。図２２Ａは、免疫蛍光法による抗体のＡＰＯＬファミリー反応性を示す。ＣＯＳ細胞に、タグなしＡＰＯＬ１－Ｇ０、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３ａ－ｍｙｃ－ＦＬＡＧ、ＡＰＯＬ４－ｍｙｃ又はＡＰＯＬ６－ｍｙｃ－ＦＬ

ＡＧをトランスフェクトした（ｃＤＮＡについては表３を参照）。４０－４８時間後、細胞をＰＦＡ固定し、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過処理し、示された市販のウサギポリクローナル抗ＡＰＯＬ１抗体（１μｇ／ｍｌで；Ｐｔｅｃｈ、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ；Ｅｐｉｔｏｍｉｃｓ）、続いてＡｌｅｘａ４８８抗ラビットを用いて染色した。ＡＰＯＬ３－６のトランスフェクションは、エピトープタグの染色（ＡＰＯＬ４－ｍｙｃに対してはマウス抗ＦＬＡＧ－Ｍ２又はマウス抗ｍｙｃ　９Ｅ１０を用い、その後Ａｌｅｘａ６４７抗マウスを用いる）により確認し、任意の陽性シグナルは予想通りタグと共局在した（図３１Ｂ）。全ての結果は、少なくとも１つの独立した実験で検証された。　［００８０］　図２２Ｂは、２４時間のＩＦＮｇ刺激後のＡＰＯＬトランスフェクトＣＯＳ細胞又はポドサイトの内因性ＡＰＯＬ１を、０．４４μｇ／ｍｌの市販ポリクローナル抗体を使用したウェスタンブロットを示す。これは、ＩＦデータを確証するものである。ライセートを４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上で泳動させ、アクチンはローディングコントロールとして機能させた。ＵＴ、トランスフェクトされていないＣＯＳ；Ｇ０、Ｇ１（Ｉ３８４Ｍ、Ｓ３４２Ｇ）、Ｇ２（△Ｎ３８８、Ｙ３８９）は３つのＡＰＯＬ１バリアントである；Ｌ２、ＡＰＯＬ２；Ｌ３、ＡＰＯＬ３ａ－ｍｙｃ－ＦＬＡＧ；Ｌ４、ＡＰＯＬ４－ｍｙｃ、Ｌ６：タグなしＡＰＯＬ６；ＷＴ、野生型ポドサイト；ＫＯ、ＡＰＯＬ１　ＣＲＩＳＰＲノックアウトポドサイト。　［００８１］　図２２Ｃは、１μｇ／ｍｌの自社製マウスｍＡｂを用いた以外は、図２２Ａと同様である。二次抗体は、５．１７Ｄ１２ではＡｌｅｘａ４８８抗ウサギ、その他ではＡｌｅｘａ４８８抗マウスであった。５．１７Ｄ１２と３．７Ｄ６はＡＰＯＬ１特異的であり、ｍＡｂ　４．１７Ａ５はＡＰＯＬ４と弱い交差反応を示したが、この組織ではＡＰＯＬ４が発現していないため、腎臓の染色の目的ではＡＰＯＬ１特異的と見なすことができる（図２１Ａ及び２１Ｃ）。対照的に、３．６Ｄ１２　ｍＡｂはＩＦによってＡＰＯＬ２、３及び４と交差反応する。　［００８２］　図２２Ｄは、ライセートが図２２Ｂのものと同じであり、上段の自社製マウスｍＡｂ　２μｇ／ｍｌ又はウサギ３．７Ｄ６と３．１Ｃ１との混合物０．０５μｇ／ｍｌ（最下段のブロット）でプローブしたものを示す。この混合物はＡＰＯＬ１の両末端をカバーし、ウェスタンブロッティングに好ましい試薬である。比較のために、Ｃ末端ＡＰＯＬ１－Ｇ２エピトープにマッピングされる抗体４．１２Ｅ５も含まれている（後述の実施例１）。これはウェスタンブロッティングではＡＰＯＬ１－Ｇ２をほとんど認識せず、ＡＰＯＬ２－６とは交差反応しない（同じくＩＦで、図３１Ｂ）。この結果は、コンフォメーションに敏感であるように見えるＡＰＯＬ４交差反応性を除いて、ＩＦ交差反応性を確証するものである。３．６Ｄ１２抗体は、ＡＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト（実施例１に記載したように生成）のＡＰＯＬ２を認識し続ける。４．１７Ａ５ウェスタンは、他のものよりも長い暴露で示されていることに留意されたい。

【図２３】［００８３］　図２３は、内因性ＡＰＯＬ１が腎臓のポドサイトと内皮細胞に見られることを免疫組織化学で示したものである。０．５μｇ／ｍｌ　ＡＰＯＬ１特異的ウサギモノクローナル抗体（ｒａｂｍａｂ）で染色したホルマリン固定パラフィン包埋正常ヒト腎臓の１０倍（左、４０μｍスケールバー）若しくは２０倍（中央及び右、２０μｍスケールバー）５．１７Ｄ１２又は隣接するセクションのウサギＩｇＧアイソタイプコントロール（右）の免疫組織化学。濃い矢印はポドサイトと糸球体内皮におけるそれぞれのＡＰＯＬ１染色を示す。糸球体外の毛細血管も陽性であり、循環ＡＰＯＬ１を染色しているものと推定される（白の矢印）。過去の報告（実施例２、参考文献７３）とは異なり、近位尿細管に顕著な染色は見られなかった。この染色パターンは、異なるエピトープに対する他の２つの上位抗ＡＰＯＬ１抗体によって複製され、検査された少なくとも５つの腎臓を代表するものである（図３３Ｂ及びデータは示していない）。Ｇ、糸球体；ＰＴ、近位尿細管。

【図２４Ａ－２４Ｄ】［００８４］　図２４Ａ－２４Ｄは、内因性で安定的にトランスフェクトされたＡＰＯＬ１が培養ポドサイトの小胞体に局在することを示す。図２４Ａ－２４Ｃは、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトのｉＥＭを示す。ＡＰＯＬ１－Ｇ０　ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０を再発現するＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト（４８時間５ｎｇ／ｍｌドキシサイク

リン誘導後）を４％ＰＦＡ固定し、２５μｇ／ｍｌ　ｒａｂｍａｂ　５．１７Ｄ１２で免疫標識し、その後プロテインＡ－金で免疫標識した。ＥＲ（図２４Ａ－Ｂ）及びゴルジ（Ｇｏｌｇｉ）（図２４Ｃ）におけるＡＰＯＬ１の代表的な染色を示す。スケールバーは全て２００ｎｍである。＊　ＥＲ内腔；Ｍ　ミトコンドリア；Ｌ　リソソーム；Ｅ　初期エンドソーム；Ｇ　ゴルジ。ＡＰＯＬ１は、ＥＲ及びゴルジでのみ見られ、ミトコンドリア又はエンドリソソーム系には見られない。ＥＲのより核周囲領域でのＡＰＯＬ１染色の例と、ミトコンドリア及びＭＡＭからのその非存在の例を、抗体染色がＡＰＯＬ１特異的であることを示す非誘導コントロール（図３９Ｅ－３９Ｆ）と共に図３９Ａ－３９Ｄに示す。　［００８５］　図２４Ｄは、野生型分化ポドサイト（上段）における内因性ＡＰＯＬ１を、２μｇ／ｍｌ　ＡＰＯＬ１　５．１７Ｄ１２（緑染色）とマウス抗カルネキシン（赤染色）で共染色したＰＦＡ固定サポニン透過化細胞で示し、核ＤＡＰＩとの併合を右側に示したものである。ＩＦＮｇ処理したＷＴ細胞（中）はより強いＥＲのＡＰＯＬ１標識を示すが、ＡＰＯＬ１ノックアウト（下）のポドサイトはこれが欠いていた。多くの細胞で核の斑点（ＤＡＰＩとオーバーラップしている）がはっきり表れているが、これはＷＴ細胞と同様にＫＯ細胞にも見られることから、明らかに非特異的（ＡＰＯＬ１ではない）であることに留意されたい。スケールバーは４０μｍである。ＡＰＯＬ１は、分化ポドサイトと未分化ポドサイトの両方において、他の８の抗体と同様にＥＲに局在していた（４．１７Ａ５の図４１参照、データは示していない）。

【図２５Ａ－２５Ｃ】［００８６］　図２５Ａ－２５Ｃは、内因性ポドサイトのＡＰＯＬ１のごく一部が形質膜にあるが、ＡＰＯＬ２にはないことを示している。図２５Ａでは、生きたＷＴ（左）又はＡＰＯＬ１　ＫＯ（右）ポドサイトを、２．５μｇ／ｍｌ　３．６Ｄ１２（ＡＰＯＬ２交差反応性ｍＡｂ）と共に氷上で１時間（固定も透過化もせずに）インキュベートした。灰色はＡｌｅｘａ４８８抗マウス二次抗体単独、青は未処理、赤はＩＦＮｇ処理細胞である。ＷＴ細胞にはシフトがあるが、ＫＯ細胞（ＡＰＯＬ２を発現しているがＡＰＯＬ１を発現していない）にはシフトがない。ＡＰＯＬ１　ＫＯ細胞にシグナルがないことは、ＡＰＯＬ２が、ＡＰＯＬ１よりも豊富であるにもかかわらず、細胞表面にないことを示している（図２１Ｄ及び図４６Ａ）。したがって、ＷＴ細胞において３．６Ｄ１２で見られるシフトは、ＡＰＯＬ１を表すはずであり、予想どおり、ＩＦＮｇと共に増加する。　［００８７］　図２５Ｂは、生きたＩＦＮｇ処理ＷＴポドサイト（上）、ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト（中央）及び肝臓ＪＨＨ－１細胞（下）を示す。これらは、５μｇ／ｍｌのＡＰＯＬ１特異的３．７Ｄ６（左）又はＡＰＯＬ２交差反応性３．６Ｄ１２（右）と氷上で１時間インキュベートし、その後、洗浄し、ＰＦＡ固定し、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス（緑色の染色；青色染色の核ＤＡＰＩの上に重なっている）で（豊富な細胞内ＥＲシグナルが見えないように透過化せずに）検出したものである。点状のシグナルがＷＴとＪＨＨ－１の細胞表面に見られるが、ＡＰＯＬ１特異的抗体とＡＰＯＬ２交差反応性抗体の両方を有するＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトには見られず、ＡＰＯＬ１のみが細胞表面にあることを示している。スケールバーは４０μｍである。ポドサイトで同様の結果が、異なるエピトープに対する８以上の他の抗体で見られた（データは示していない）。　［００８８］　図２５Ｃは、ＡＰＯＬ１特異的抗体５．１７Ｄ１２と３．６Ｅ１０を用いたＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトのｉＥＭであり、細胞表面に分散したＡＰＯＬ１免疫金粒子（矢印）のごく一部を示している。＊　ＥＲ内腔。Ｇ　ゴルジ。Ｎ　細胞核。スケールバー（上から下）：１００、２００、２００、及び５００ｎｍ。

【図２６Ａ－２６Ｄ】［００８９］　図２６Ａ－２６Ｄは、ＡＰＯＬ１がＥＲ膜の内面に関連していることを示している。図２６Ａは、ＰＦＡ固定細胞であって、細胞表面とＥＲ膜をサポニン（又はＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００；上）で透過化したもの（破線）と、細胞表面に限定してジギトニンで透過処理を行ったもの（ＥＲ膜はインタクト、実線；下）の模式図を示す。界面活性剤（ｄｅｔｅｒｇｅｎｔ）に関係なく、ＰＦＡ固定は一部の細胞（Ｎｕｃ、灰色）の核（核膜）を透過化することに留意されたい。　［００９０］　図２６Ｂは、ＡＰＯＬ２、又はドキシサイクリン誘導（５μｇ／ｍｌ、２０時間）ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ安定体（後述の実施例１）を一過性にトランスフェクトしたＣＯＳ細胞を、Ｐ

ＦＡ固定し、サポニンで透過化したもの（上）又はジギトニンで透過化（下）したものを示す。ＡＰＯＬ２は、３．６Ｄ１２（Ｎ末端孔形成ドメイン（ＰＦＤ）に対するｍＡｂ）で染色して示しているが、他の４３のＡＰＯＬ２－交差反応体（ｒｅａｃｔｏｒ）（全てＰＦＤに対するもの、データは示していない）でも同様の結果が得られた。ＡＰＯＬ２－ＣＯＳ細胞の抗カルネキシン内腔ドメイン染色は、透過条件のコントロールとしてＡＰＯＬ２の隣に示されている（この抗体はＣＨＯカルネキシンと交差反応しない）。ＡＰＯＬ１は、ＰＦＤ　ｍＡｂ　３．７Ｄ６、膜アドレッシングドメイン（ＭＡＤ）ｍＡｂ　３．３Ａ８又はＳＲＡ相互作用ドメイン（ＳＲＡ－ＩＤ）ｍＡｂ　３．１Ｃ１で染色され、それぞれＡｌｅｘａ４８８抗体マウスで検出されたもの（エピトープマッピングについては後述の実施例１参照）を示したが、３つのドメイン全てに対する他の全てのＡＰＯＬ１特異的抗体でも同様の結果が得られた（データは示さず）。ＡＰＯＬ２の網目状ＥＲパターンはジギトニン（形質膜のみ）透過化された細胞で持続するが、ＡＰＯＬ１では持続しないことから、ＡＰＯＬ２はＥＲの細胞質面にあり、ＡＰＯＬ１は内側にあることが示されている。ＰＦＡは核膜を半透過化するため、ジギトニンを含むＡＰＯＬ１の核膜シグナルは、一部の細胞では界面活性剤なしでも見られる（データは示していない）。ジギトニンを使用すると、ここに示したＰＦＤ抗体（３．７Ｄ６）及びＳＲＡ－ＩＤ（３．１Ｃ１）抗体など、いくつかのより高感度な抗体（但しＭＡＤ抗体３．３Ａ８は除く）が、トポロジー的にＥＲ内腔に相当する形質膜上（矢印）にもＡＰＯＬ１を追加で検出した。　［００９１］　図２６Ｃは、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイト（５ｎｇ／ｍｌドキシサイクリンで２４時間誘導）の代表的な免疫電子顕微鏡写真を示す。ＡＰＯＬ１（左；ウサギ抗マウス二次抗体で増幅）又は可溶性内腔マーカー抗ＫＤＥＬ（右）に対して３．６Ｅ１０で免疫標識されており、それぞれ１０ｎｍのプロテインＡ－金で検出された。＊　ＥＲ内腔；Ｍ　ミトコンドリア。スケールバーは２００ｎｍである。ＡＰＯＬ１は内腔側のＫＤＥＬよりもＥＲ膜内面に密接に関連しているように見える。　［００９２］　図２６Ｄは、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトにおいて、ＡＰＯＬ１がＫＤＥＬと比較してＥＲ内膜により関連していることを示す。図２６Ｃのように染色された５５枚の画像からのＥＲ関連金粒子の定量化。但し抗体－プロテインＡ－金複合体のサイズを最小限に抑え、定量化をより正確にするために、ウサギ抗マウス二次抗体の増幅は行わない。ＡＰＯＬ１（計数されたｎ＝８１の金粒子）は、主にＥＲ膜内面に関連しており、ＥＲ槽幅に対して抗体－プロテインＡ－金複合体のサイズが大きいため、少量が外膜／細胞質ゾル又は中央内腔に存在する（詳細は図４８Ａを参照）。対照的に、内腔ＫＤＥＬコントロールマーカー（ｎ＝１００）は、ＥＲ内腔と同等に関連し、内膜面から２０ｎｍ以内にあるように見え、且つ予想通り、外膜又は細胞質ゾルでは検出されなかった。

【図２７Ａ－２７Ｃ】［００９３］　図２７Ａ－２７Ｃは、ＡＰＯＬ１アイソフォームがポドサイト安定体においてＥＲ膜の両面に局在していることを示している。図２７Ａは、ＰＦＡ固定し、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で完全に透過化して、全ＡＰＯＬの分布を明らかにしたＡＰＯＬアイソフォームの安定したプールを示しており、ＡＰＯＬ１／２がウサギ抗カルネキシン細胞質テール（細胞内ドメイン、ＩＣＤ）で、続いてＡｌｅｘａ４８８抗ＩｇＧ２ａ及びＤｙ６４９抗ウサギで共染色されたものである。全てのＡＰＯＬ１アイソフォームとＡＰＯＬ２は、ＥＲと関連しているように見え、この条件下でカルネキシンとよく共局在する。　［００９４］　図２７Ｂは、細胞質ＡＰＯＬのみを明らかにするジギトニン透過化と、マウス抗カルネキシン細胞外（内腔／ＥＣＤ）ドメイン及びアイソタイプ特異的二次抗体（ＡＰＯＬの場合はＡｌｅｘａ４８８抗ＩｇＧ２ａ；カルネキシンの場合はＡｌｅｘａ６４７抗ＩｇＧ１）以外は、図２７Ａと同じである。ＡＰＯＬ１．ｖＡ、ｖＢ１と、ｖＣを発現するいくつかの細胞は、内腔染色を示し（非細胞質、矢印；矢印は、網目状（細胞質）シグナルと同じ細胞内の核膜（内腔側）シグナルを示す）、ｖＢ３、ＡＰＯＬ２と、ｖＣの大部分は、ジギトニンによる網目状ＥＲ染色パターンを保持しているため、細胞質側に配向している。カルネキシンＥＣＤ抗体は内腔ＡＰＯＬ１アイソフォームと同様の核膜染色をもたらすことに留意されたい。これは、本発明者らのジギトニン法を実証するものである。　［００９５］　図２７Ｃは、（ＵＩ、誘導されていないｖ

Ａコントロールを除いて）１０ｎｇ／ｍｌドキシサイクリンで２２時間誘導した後、１μｇ／ｍｌの３．６Ｄ１２及びＡｌｅｘａ４８８抗マウスで染色したＡＰＯＬ１－Ｇ０アイソフォーム及びＡＰＯＬ２ポドサイト安定プール（生（ＰＩ陰性）細胞でゲート）のフローサイトメトリーを示す。図２７Ｂのジギトニンによって識別されるトポロジーによると、ＡＰＯＬ１．ｖＡ及びｖＢ１は大きなＦＡＣＳシフトをもたらし、それらが分泌型であることを示す。ｖＣは小さなシフト（部分的に分泌型）をもたらし、ｖＢ３とＡＰＯＬ２（Ｌ２）はほとんどシフトがない（すなわち非分泌型）。ｙ軸は最大％であり、ｘ軸はＡｌｅｘａ４８８蛍光強度である。分泌アイソフォーム（ｖＡ及びｖＢ１）でさえ、おそらくこれらの予測膜貫通ドメインを介して細胞表面にアンカーされているため、実際には培地に分泌されなかったことに留意されたい（実施例２、参考文献９０）（データは示さず）。

【図２７Ｄ】［００９６］　図２７Ｄは、安定したポドサイトにおける同等のレベルの異なるＡＰＯＬ１アイソフォームの発現を示す。図２７Ｃで使用した細胞の一部を、０．０５μｇ／ｍｌの３．１Ｃ７／３．７Ｄ６（図２２Ｄで実証済み）及びローディングコントロールとしてのカルネキシンを含む１０％ゲルでウェスタンブロットした。異なるアイソフォームの似たような総発現量は、ｖＡ及びｖＢ１でのより大きなＦＡＣＳシフト（図２７Ｃ）がより高い発現量ではなく細胞表面へのより多い分泌輸送に起因することを意味する。更に、ＡＰＯＬ１．ｖＡとｖＢ１のサイズが類似していることは、同じＶＲＡ／ＥＥ部位での切断を示唆しており、シグナル配列プログラムの予測とは反対に、ｖＢ１の４３ａａシグナル配列が機能していることを示している（表５）。ＡＰＯＬ１．ｖＢ３は、ｖＡよりも大きく、シグナル配列の切断がないことと一致している（これはＮ末端タグの保持によって確認された（図５１Ｃ））が、細胞質側で切断される可能性のある小さなバンドも有している。対照的に、ｖＣは、ほとんどが内腔にはないため１ｋＤａ大きいはずであるとの予測にもかかわらず、ｖＡよりも小さく（表５）、したがってｖＣは細胞質側で切り取られる可能性もある。実際、高い発現レベルでは、それは二重線として現れる（図５１Ｂ）。

【図２８Ａ－２８Ｂ】［００９７］　図２８Ａ－２８ＢはポドサイトにおけるＡＰＯＬ１アイソフォームの発現を示している。図２８Ａは、１００ｎｇ／ｍｌ　ＩＦＮでｇ０－４日間刺激したＷＴ及びＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトのウェスタンブロットを示している。図２７Ｄのように、ライセートをＡＰＯＬ１について免疫ブロットし、その後ローディングコントロールとして１Ａ２抗チューブリンで再プローブした。ＩＦＮｇ処理によりＡＰＯＬ１のレベルが上昇し、１０％又は１２％のＴｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲル（ここでは１２％）で、適切な負荷レベルでかすかな上側のバンドも再現性よく検出される。メジャーバンドより小さなバンドはないことに留意されたい。　［００９８］　図２８Ｂは、ＩＦＮｇ刺激ポドサイトの上側のＡＰＯＬ１バンドがｖＢ３と同じ大きさであることを示している。９又は１７μｇのＷＴ　ＩＦＮｇ刺激ポドサイトライセートの隣にロードされた図２７ＤのＡＰＯＬ１アイソフォーム安定ポドサイトライセート及び最後のレーンのより多量のｖＢ３のウェスタンブロットである。内因性ＡＰＯＬ１の上側のバンドのサイズは、翻訳後修飾である可能性を排除できないが、ＡＰＯＬ１．ｖＢ３のバンドのサイズと同様である。分子量予測（表５）から、それは他のどのアイソフォームも表していない可能性がある。ＷＴポドサイトのｖＡの下のバンドは、散発的にしか検出されないため、おそらく分解産物である（図２８Ａと比較されたい）。

【図２９】［００９９］　図２９は、ＡＰＯＬ１アイソフォームとＡＰＯＬ２の細胞内位置をまとめた細胞の図を示す。この図は、ＡＰＯＬ１アイソフォームの局在性と相対的存在量を描いている（ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２はマイナーバリアントに比べて少な過ぎることに留意されたい）。ＡＰＯＬ１．ｖＡ（黒）、ｖＢ１（ストライプ）、及び少量のｖＣ（クロスハッチング）はＥＲ内腔内にあり（内膜に関連している）、それぞれのごく一部が形質膜に輸送される。一方、ＡＰＯＬ１．ｖＢ３（ダッシュ）、ＡＰＯＬ２（チェック）、及びＡＰＯＬ１．ｖＣ（クロスハッチング）の大部分は、細胞表面ではなく、ＥＲの細胞質面にある。このスケッチはＢｉｏＲｅｎｄｅｒで作成された。

【図３０Ａ－３０Ｃ】［００１００］　図３０Ａ－３０Ｃは、ｑＲＴ－ＰＣＲ及びＩｎＳｉｔｕハイブリダイゼーションプローブのＡＰＯＬ特異性を示す。図３０Ａは、ｑＲＴ－ＰＣＲプローブが、指定されたＡＰＯＬファミリーメンバーに対してほとんど特異的であることを示している。図２１Ａと２１Ｃで使用したＡＰＯＬ　ｑＲＴ－ＰＣＲプローブ（Ｌ１－Ｌ６）の、利用可能な各ＡＰＯＬファミリーメンバーに対するｃＤＮＡでの試験による検証（ｃＤＮＡの詳細については表３を参照）。赤いバーは、各プローブの同族ｃＤＮＡを示す。２２より高いＣｔ値（サイクル閾値）は、プローブがそのｃＤＮＡと反応しないことを示す。Ｌ４プローブはＡＰＯＬ３　ｃＤＮＡと少し反応するように見えるが、腎臓とポドサイトでは完全に陰性であったため（図２１Ａ及び２１Ｃ）、この交差反応性はこの特定の目的には重要ではない。１ｎｇのＤＮＡでの２つの独立した実験からの３回の平均値とＳＤを示す。　［００１０１］　図３０Ｂは、ＡＰＯＬ１　ＩＳＨプローブがＡＰＯＬ２と交差反応を示さないことを示している。様々なＦＦＰＥ細胞ペレットを、図２１Ｂで使用したＡＰＯＬ１－Ｃ２（赤）プローブで染色している。プローブはＡＰＯＬ１（ａ）を認識するが、ＡＰＯＬ２（ｂ）をトランスフェクトしたＣＨＯ細胞は認識せず、未分化（ｃ）ヒト不死化ポドサイト及び分化（ｅ）ヒト不死化ポドサイトでは弱いシグナルを与え、ＩＦＮｇ刺激（１００ｎｇ／ｍｌ、２４時間、（ｄ））で大幅に増加した。ＩＦＮｇ処理したＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト（ｆ）では、一方の対立遺伝子のみが完全に欠失し、もう一方は単にフレームシフトしているため、シグナルは（全くなかったわけではないが）少なかった（後述の実施例１）。ＡＰＯＬ２－ＣＨＯ細胞は、ＩＨＣによってＡＰＯＬ２を発現していることが確認された（データは示さず）。　［００１０２］　図３０Ｃは、正常ヒト腎臓にアプライされたＤＡＰＢ－Ｃ２陰性コントロールＩＳＨプローブ（図２１ＢのＡＰＯＬ１－Ｃ２プローブと同じ実験）を示しており、不連続な斑点は全くない。近位尿細管における非特異的な赤色のバックグラウンド染色は、腎臓組織でのこのＩＳＨ法による赤色色素の一般的なアーチファクトであり、プローブ特異的ではない（それは図２１Ｂ、ｃにも見られた）。

【図３１Ａ－３１Ｂ】［００１０３］　図３１Ａ－３１Ｂは、ＡＰＯＬの特異性と抗ＡＰＯＬ１抗体のエピトープタグとの共局在性を示している。図３１Ａでは、結果を確認し、図２２Ａ－Ｄの細胞が実際にトランスフェクトされたことを実証するために、タグなしＡＰＯＬ１及び２、又はＣ末端でｍｙｃ－ＦＬＡＧタグ付きＡＰＯＬ３及び６若しくはＡＰＯＬ４－ｍｙｃトランスフェクトＣＯＳ細胞を、同じ抗ＡＰＯＬ１抗体及びこの研究の他の位置で使用した全ての抗体（緑色チャネルのみ、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス又はウサギ）で染色した。最下段にはトランスフェクトされていないＣＯＳ細胞が示されているが、３．３Ａ８（核）と３．６Ｅ１０（ミトコンドリア）による非特異的なバックグラウンド染色を示している。これらの２つの抗体は、ＡＰＯＬ１を認識するが他のＡＰＯＬを認識しないため、ＡＰＯＬ１特異的とされている。　［００１０４］　図３１Ｂは、ＡＰＯＬ染色がエピトープタグと共局在していることを示している。ＣＯＳ細胞は、ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２もＣ末端でｍｙｃ－ＦＬＡＧタグが付けられていることを除いて、図３１Ａと同様にトランスフェクトされた。ＡＰＯＬ（緑）とエピトープタグ（赤）のオーバーレイ：抗ＡＰＯＬ１ｒａｂｍａｂにはマウス抗ＦＬＡＧ－Ｍ２若しくはマウス抗Ｍｙｃ　９Ｅ１０；又はマウス抗ＡＰＯＬ１とコンジュゲートされたウサギ抗Ｍｙｃ　７１Ｄ１０。黄色のシグナルは、２つの抗体が重なっている（すなわち抗ＡＰＯＬ１がそのＡＰＯＬと交差反応する）ことを示し、赤色のシグナル（エピトープタグのみ）は交差反応がないことを示す。Ａｌｅｘａ６４７抗ウサギ又はマウスをタグに使用して、共局在性がブリードスルーアーチファクトである可能性を排除した。隣接するトランスフェクトされていない細胞のバックグラウンド染色の評価を可能にするために、まばらにトランスフェクトされた領域を画像化した－ＤＡＰＩ核染色（青）は、トランスフェクトされていない細胞核とトランスフェクトされた細胞核の両方を識別する。非トランスフェクト細胞の緑色のシグナルは、非特異的染色を示し、特に３．３Ａ８では核染色が強く、３．６Ｅ１０ではミトコンドリア染色が顕著である。どの抗体も、より遠縁のＡＰＯＬ６とは交差反応を示さないことに留意されたい。＊ＡＰＯＬ２－ｍｙｃ－ＦＬＡＧは、いくつかの抗体とタグなしＡ

ＰＯＬ２ほど交差反応しないことから（図３１Ａと比較）、おそらくミスフォールドされている。市販の抗体は、Ｓｉｇｍａ　ＨＰＡ０１８８８５、Ｅｐｉｔｏｍｉｃｓ　ＥＰＲ２９０７（２）（Ｅｐｉｔｏ）、及びＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ　１１４８６－２－ＡＰ（Ｐｔｅｃｈ）である。交差反応性の結果を表４にまとめた。

【図３２Ａ－３２Ｃ】［００１０５］　図３２Ａ－３２Ｃは、ＩＨＣ染色のためのｒａｂｍａｂ　５．１７Ｄ１２の検証と、市販の抗体との比較を示している。図３２Ａは、ＡＰＯＬ１若しくはＡＰＯＬ２　ｃＤＮＡをトランスフェクトした若しくはしていないＣＨＯ細胞（上段）；又はＩＦＮｇで２４時間処理した若しくはしていない、若しくはＡＰＯＬ１をノックアウトした、非トランスフェクトポドサイト（下段）のＦＦＰＥペレットを０．２５μｇ／ｍｌの５．１７Ｄ１２で染色したものである。ＡＰＯＬ２細胞ペレットは、ＩＨＣにより３．６Ｄ１２とＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈポリクローナルで陽性であった（データは示していない）。これによりトランスフェクションが成功したことが確認された。

［００１０６］　図３２Ｂは、ＡＰＯＬ１を自身のプロモーター下で発現するＡＰＯＬ１－Ｇ０トランスジェニックマウス（左）又は非トランスジェニック同腹仔（右）のＦＦＰＥ腎臓を０．５μｇ／ｍｌの５．１７Ｄ１２で染色したものである。スケールバーは５０μｍである。左右の矢印はポドサイト、中央下側の黒い矢印は糸球体内皮を示す。Ｇ、糸球体；ＰＴ、近位尿細管。

［００１０７］　図３２Ｃは、２μｇ／ｍｌの市販のＳｉｇｍａ（ＨＰＡ０１８８８５）及びＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ（１１４８６－２－ＡＰ）抗ＡＰＯＬ１ポリクローナル抗体で染色された正常なヒト腎臓を示す。両抗体とも、近位尿細管、糸球体、血管系で非特異的な結合を示す。シグナル対ノイズ比の改善を目的とした抗体滴定アッセイは不成功に終わった（図示せず）。Ｓｉｇｍａ社製抗体は最近のロット（Ｅ１０５９００）で、以前のロットほど強くもなく、きれいでもない。両画像は同じ倍率で表示され、スケールバーは５０μｍである。

【図３３Ａ－３３Ｂ】［００１０８］　図３３Ａ－３３Ｂは、肝臓におけるＡＰＯＬ１の発現を示す。図３３Ａの左パネルは、図２１Ｂ、Ｆの腎臓と同じ実験で、ＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡ（赤色のＣ２プローブ、矢印）とＰＶＬＡＰタンパク質（緑色）に対して共染色された正常なヒト肝臓を示す。ＲＴ－ＰＣＲ（データは示していない）及びウェスタンブロッティングで同様のシグナルが得られたにもかかわらず、肝臓のＲＮＡシグナルが腎臓のシグナルよりも予想外に弱いのは、おそらくＡＰＯＬ１陽性肝細胞（図３３Ｂ参照）が肝臓シグナルの大部分を構成するのに対し、糸球体は腎臓全体の約２％を構成するだけであるからである。図３３Ａの右パネルは、陰性コントロールＤＡＰＢ－Ｃ２プローブではシグナルが見られないことを示す。スケールバーは２０μｍである。

［００１０９］　図３３Ｂは、正常なヒトの腎臓（上）と肝臓（下）を、図２３と同様に０．５μｇ／ｍｌのウサギ５．１７Ｄ１２抗ＡＰＯＬ１又はアイソタイプコントロールで染色したものである。ＡＰＯＬ１は肝細胞に中心小葉状パターンで見られ、強度は腎糸球体におけるものよりも弱い。スケールバーは５倍のパネル（左）で２００μｍ、２０倍のパネルで５０μｍである。

【図３４】［００１１０］　図３４は、一過性にトランスフェクトされたＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１及びＧ２、並びにＡＰＯＬ２が全て、ＣＯＳ７細胞のＥＲに関連していることを示す。ＣＯＳ７細胞は、４３時間トランスフェクトし、ＰＦＡ固定し、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過処理したものである。ＡＰＯＬ１に対するマウス４．１７Ａ５又はＡＰＯＬ２に対する３．６Ｄ１２　１μｇ／ｍｌによるＡＰＯＬ１染色（＋Ａｌｅｘａ４８８抗マウス、緑チャンネル）を上段に示しており、ＥＲ特異的シャペロンのウサギ抗カルネキシン（＋Ａｌｅｘａ６４７抗ウサギ、赤チャンネル）は中段、下段がオーバーレイ（共局在性は黄色に見える）。ＤＡＰＩ核染色は青色である。スケールバーは１５μｍである。同様のＡＰＯＬ１共局在性は、別のＥＲ特異的シャペロンであるプロテインジスルフィドイソメラーゼでも得られた（データは示していない）。

【図３５】［００１１１］　図３５は、一過性にトランスフェクトされたＡＰＯＬ１が、ＩＦによってＣＯＳ７細胞のＥＲ以外のコンパートメントで検出されないことを示す。ＣＯＳ７細胞にＡＰＯＬ１を４３時間トランスフェクトし、ＰＦＡ固定し、サポニンで透過

化した。但し、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００透過処理でより良く機能するシトクロムｃとの共染色は除く。ウサギ３．７Ｄ６によるＡＰＯＬ１染色（又はウサギ抗カルネキシンとペリリピン２共染色の場合はマウス４．１７Ａ５、赤チャンネル）は左側に、コンパートメントマーカーは緑色で（中央）、マージは右側に示す。これらにおいて、オーバーラップは黄色に見える。ＡＰＯＬ１は、カルネキシンに対するＥＲ抗体と明らかに広範囲に重なっている。トランスゴルジネットワークマーカーであるｐ２３０（ゴルジン２４５）；初期エンドソーム自己抗原１（ＥＥＡ１）；後期エンドソーム及びリソソームマーカーであるＬＡＭＰ１；リサイクリングエンドソームマーカーであるトランスフェリン受容体（ＴｆＲ）；ミトコンドリア膜間空間マーカーであるシトクロムＣ（Ｃｙｔ　Ｃ）；又はペリリピン２（ＰＬＩＮ２、Ｐｒｏｔｅｉｎｅｃｈ　１５２９４－１－ＡＰ、図３６で検証）とＡＰＯＬ１とのオーバーラップはないか、非常にわずかであった。脂肪滴を増強するオレイン酸処理を行っても、ＣＯＳ細胞が高レベル又は低レベルのＡＰＯＬ１又はペリリピン２を発現したかどうかにかかわらず、ＣＯＳ細胞においてＡＰＯＬ１は脂肪滴に移動しなかった（図３７Ａ）。スケールバーは１５μｍで、挿入画像は、各抗体対について、オーバーラップの最も「黄色い」領域（囲み）である大体核周囲領域を３倍に拡大して示しており、ＥＲ以外のどのコンパートメントとも意味のあるオーバーラップがないことが確認されている。ＡＰＯＬ１とミトコンドリア細管との見かけの部分的オーバーラップが時折見られるが、三重染色により、そのような管とカルネキシンとの「共局在性」も明らかになる（データは示していない）。このことは、ＥＲとミトコンドリアがその位置で同じ微小管トラックを共有していると考えられ、単にこの落射蛍光顕微鏡（ＡｘｉｏＭ２）では分解できないことを示唆している。他のコンパートメントマーカー抗体の検証は、実施例２に記載されている。

【図３６Ａ－３６Ｂ】［００１１２］　図３６Ａ－３６Ｂは、ウサギ抗ペリリピン２抗体の検証を示す。図３６Ａは、トランスフェクトＣＯＳ細胞の免疫蛍光により、２つの抗ペリリピン２抗体がトランスフェクトされたペリリピン２（ＰＬＩＮ２）を認識することを示す。ＣＯＳ細胞にヒトＰＬＩＮ２を４５時間一過性にトランスフェクトした後、ＰＦＡ固定し、サポニン（上）又はトリトンＸ－１００（下）で透過化した。ウサギ抗ペリリピン２（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ　１５２９４－１－ＡＰ　１．７４μｇ／ｍｌ、緑；左）とマウス抗ペリリピン２　ｍＡｂ　ＡＤＦＰ－５（Ｓｉｇｍａ　ＳＡＢ４２００４５２　３．３μｇ／ｍｌ、赤；中央）には、いずれの透過化方法でもトランスフェクト細胞質ペリリピン２が見られる。しかし、脂肪滴上の内因性ペリリピン２は小さな点又は環（矢印）として現れ、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（過去に報告されているようにペリリピン２結合脂質を抽出するもの）ではなくサポニンでだけ検出される[2]。ＡＤＦＰ－５抗体は更にゴルジを染色するが（矢印；抗Ｂ４ＧＡＬＴ３と共局在している（データ示さず））、これはＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈポリクローナルでは見られない。したがって、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ抗ペリリピン２は、脂肪滴に対してより選択的であり、より高感度であるため、好まれた（図３６Ｃ参照）。　［００１１３］　図３６Ｂは、ウサギ抗ペリリピン２が、ウェスタンブロッティングによりペリリピン２を認識することを示す。非トランスフェクト（ＵＴ）ＣＯＳ細胞又はペリリピン２（ＰＬＩＮ２）トランスフェクトＣＯＳ細胞を、最後の２１時間は３５μＭオレイン酸（ＯＡ）を含む（＋）又は含まない（－）１０％ＢＳＡと共に４０時間トランスフェクトした後に、溶解した（－は、１０％脂肪酸なしＢＳＡビヒクルを示す）。ライセートは、１０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲル上で０．０８μｇ／ｍｌウサギ抗ペリピリン２（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ　１５２９４－１－ＡＰ）でウェスタンブロッティングした。非トランスフェクト細胞では、約５４ｋＤａにかすかな二重線バンド（いくつかのバックグラウンドバンドよりも弱い）が見られ、これはＯＡ処理後はより強くなり、ＰＬＩＮ２トランスフェクション後には一層強くなることから、ペリリピン２を表していると強く示唆される。

【図３６Ｃ】［００１１４］　図３６Ｃは、ペリリピン２染色が非トランスフェクトＣＯＳ及びポドサイト細胞の脂肪滴を取り囲んでいることを示している。非トランスフェクトＣＯＳ（上）及び分化ポドサイト（下）におけるペリリピン２の環が脂肪滴であることを

検証するために、細胞をそれぞれ２５μＭ及び１００μＭのオレイン酸で２２時間処理した後、免疫蛍光法（ＰＦＡ／サポニン法）用に処理した。ウサギ抗ペリリピン２（続いてＡｌｅｘａ６４７－抗ウサギ、赤）の染色後、脂肪滴中の脂質を１μｇ／ｍｌ　ＢＯＤＩＰＹ　４９３／５０３（ＤＭＳＯ中のＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　Ｄ３９２２の１ｍｇ／ｍｌストックから；緑チャンネル）で３０分間標識し、洗浄し、ＰＦＡで後固定した。矢印は、ＢＯＤＩＰＹで染色された中性脂質を囲む内因性抗ペリリピン２の例を示す。挿入画像は、囲み領域の３倍拡大画像である。

【図３６Ｄ】［００１１５］　図３６Ｄは、内因性ペリリピン２が分化ポドサイトのウェスタンブロッティングにより検出されることを示す。ポドサイトを、最後の２４時間は１００ｎＭアンジオテンシンＩＩ（ＡｎｇＩＩ）及び／又は１００μＭオレイン酸あり又はなしで、４２時間ＩＦＮｇで処理してＡＰＯＬ１をアップレギュレートし、溶解し、図３６Ｂのようにウサギ抗ペリリピン２でウェスタンブロッティングを行った。右のレーンは、サイズマーカーとしての図３６ＢのＰＬＩＮ２－ＣＯＳ（非ＯＡ処理）サンプルであり、同じゲル上で泳動させたが、全ての抗体を取り込まないように別々に切断しブロットした（間のレーンは除去した）。トランスフェクトされたペリリピン２と同じ大きさで走っていつ５４ｋＤａバンドは、予想されたように（実施例２、参考文献１０９）アンジオテンシンＩＩ処理後に強度がわずかに上昇し、オレイン酸処理後により一層上昇し、それが確かにペリリピン２であることを示唆している。ＡＰＯＬ１レベルがこれらの処理によって影響を受けないことを示すために、ブロットを剥がし、ウサギ３．１Ｃ１／３．７Ｄ６抗ＡＰＯＬ１で再プローブした。チューブリン（ｍＡｂ　１Ａ２）はローディングコントロールとして機能する。

【図３７Ａ－３７Ｂ】［００１１６］　図３７Ａ－３７Ｂは、オレイン酸処理した細胞ではＡＰＯＬ１が脂肪滴上に見られないことを示している。図３７Ａは、タグなしＡＰＯＬ１を４５時間一過性にトランスフェクトし、最後の１６時間は３０μＭのオレイン酸で処理したＣＯＳ細胞を示す。その後、細胞を、６μｇ／ｍｌのラット４．１７Ａ５抗ＡＰＯＬ１（＋Ｃｙ３抗ラット）とマウス抗ペリリピン２（＋Ａｌｅｘａ４８８抗マウス）でＰＦＡ／サポニン免疫蛍光法用に処理した。高レベル及び低レベルのＡＰＯＬ１トランスフェクション並びに高レベル及び低レベルのペリリピン２染色を表している細胞を示す。局在性に影響を与える可能性のあるＣ末端ＲＦＰタグを用いた過去の研究（実施例２、参考文献７４）とは異なり、脂肪滴の表面におけるＡＰＯＬ１とペリリピン２の共局在性はいかなる場合も見られなかった。　［００１１７］　図３７Ｂは、オレイン酸で脂肪滴が拡大されても、ＡＰＯＬ１はポドサイトＥＲに留まっていることを示している。分化したＷＴポドサイトを、１５０μＭのオレイン酸で２４時間処理して脂肪滴形成を促進し（及び１００ｎｇ／ｍｌのＩＦＮγでＡＰＯＬ１を刺激）、３μｇ／ｍｌのマウス抗ＡＰＯＬ１４．１７Ａ５（＋Ｃｙ３抗マウス）、ウサギ抗カルネキシン（＋Ｄｙ６４９抗ウサギ）で免疫蛍光処理（ＰＦＡ／ＴＸ－１００）した。脂肪滴は、１μｇ／ｍｌ　ＢＯＤＩＰＹ　４９３／５０３（緑、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　Ｄ－３９２２）で透過化後、１５分間染色した。挿入画像は、囲み領域の３倍拡大画像である。ＡＰＯＬ１はカルネキシン（マージではマゼンタ）と共局在したままであり、いずれのタンパク質もＢＯＤＩＰＹ陽性脂肪滴の外側にソーティングされない。

【図３８Ａ－３８Ｂ】［００１１８］　図３８Ａ－３８Ｂは、安定にトランスフェクトされたＡＰＯＬ１　Ｇ０、Ｇ１及びＧ２並びにＡＰＯＬ２が全て、ポドサイトのＥＲに関連していることを示す。図３８Ａにおいて、ドキシサイクリン誘導性ＡＰＯＬ１ポドサイトの安定プール（「ｉＡＰＯＬ１」ポドサイト（後述の実施例１に記載のように作製））を、１０ｎｇ／ｍｌのドキシサイクリンで２０時間誘導し、ＰＦＡ固定し、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で透過化した。１μｇ／ｍｌのマウス４．１７Ａ５（緑チャンネル）でのＡＰＯＬ１染色が左側に、ウサギ抗カルネキシン（Ａｂ２２５９５、赤、中央）及びマージが右側に示されており、強い共局在性が黄色で現れ、核ＤＡＰＩは青である。細胞はスピニングディスク共焦点顕微鏡で撮像した。スケールバーは４０μｍである。　［００１１９］　図３８Ｂは、図３８Ａと全く同じｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトの、カルネキシン（

青）に加えてマウスＩｇＧ１抗チトクロムｃ（赤チャンネル）による三重標識を示し、ＡＰＯＬ１（Ｌ１、緑）のミトコンドリアとの共局在性はほとんど見られない（右上のマージに黄色染色がない）。二次抗体は、Ａｌｅｘａ４８８抗ＩｇＧ２ａ（ＡＰＯＬ１、「Ｌ１」用）、Ａｌｅｘａ５５５抗ＩｇＧ１（シトクロムｃ、「Ｃｙｔ　Ｃ」用）、及びＤｙ６４９抗ウサギ（カルネキシン、「Ｃｎｘ」用）である。左下はトリプルマージ、中央下は囲み領域を３倍に拡大したものである。主にシアンのシグナルは、ＡＰＯＬ１（緑）とカルネキシン（青）のオーバーラップが優れ、黄色（ＡＰＯＬ１／シトクロムｃのオーバーラップ）がほとんどないことを表している。トリプルオーバーラップのいくつかの領域は白で表示され、ＥＲのＡＰＯＬ１がミトコンドリアに近接している位置を示している。中央下の囲み領域には個々のチャンネルが表示されている（更に２倍に拡大）。右下：これらのＡＰＯＬ１ノックアウト（ＫＯ）ポドサイトに４．１７Ａ５シグナル（緑）がないことを示す非誘導ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０細胞；ＤＡＰＩは青色である。ｉｉＡＰＯＬ１－Ｇ１及びＧ２についてもミトコンドリアのオーバーラップの同様の欠如が得られた（図示せず）。スケールバーは３０μｍである。

【図３９Ａ－３９Ｆ】［００１２０］　図３９Ａ－３９Ｄは、免疫電子顕微鏡によるポドサイト内のミトコンドリアではなくＥＲへのＡＰＯＬ１局在性の更なる例を示す。図２４と同様に５．１７Ｄ１２（図３９Ａ－３９Ｃ）、又は３．６Ｅ１０（図３９Ｄ）で染色した誘導ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトの核周囲領域は、ＥＲとミトコンドリアが密接に隣接している位置、すなわちミトコンドリア関連小胞体膜（ＭＡＭ）でも、ＡＰＯＬ１はＥＲ内に残り、ミトコンドリアでは検出されないことを示している。スケールバーは２００ｎｍである。図３９Ｅ及び３９Ｆは、陰性コントロールの非誘導ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトを示しており、どのコンパートメントにおいてもＡＰＯＬ１　ｉＥＭ染色（５．１７Ｄ１２抗体による）がないことを示す。矢印は、時折見られるバックグラウンドの金粒子である。＊　ＥＲ内腔。Ｌ　リソソーム。Ｍ　ミトコンドリア。Ｎ　細胞核。ＮＥ　核膜。スケールバーは２００ｎｍである。

【図４０Ａ－４０Ｄ】［００１２１］　図４０Ａ－４０Ｄは、ＡＰＯＬ１がＭＡＭのＥＲにあり、ミトコンドリアにはないことを分画とｉＥＭにより確認したものである。図４０Ａは、４－２０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲル上でのＩＦＮγ処理ＷＴポドサイト（ＥＲも５μｇでロード）のＥＲ、ＭＡＭ及びミトコンドリアのパーコール勾配分離からの各画分の１０μｇのウェスタンブロットを示す。上から順に、マーカーは次の通り：カルネキシン（ＥＲ膜）、カルレティキュリン（ＥＲ内腔）、ＴＯＭ２０（ミトコンドリア外膜）、シトクロムｃ（ミトコンドリア膜間空間）、マイトフュージン２（ＭＡＭ）、ＧＭ１３０（ゴルジマトリックス）、チューブリン（細胞質ゾル）、ＡＰＯＬ１（ウサギ３．１Ｃ１／３．７Ｄ６でプローブ）、及びＡＰＯＬ１＋２（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ；２回の暴露を示した）。ＡＰＯＬ１は予想通りＥＲ画分に最も多く存在するが、ＭＡＭにも存在し、粗ミトコンドリアにも少ないながら見られた（Ｓｈａｈらと一致）（実施例２、参考文献９４）。しかし、精製ミトコンドリアでは、長い暴露と高いロード量でもＡＰＯＬ１は全く認められなかった（最下段、データは示さず）。細胞質画分には内在性膜（integral membrane）のカルネキシンではなく可溶性カルレティキュリンが濃縮されていることから、超音波処理中にＥＲ膜の一部が破裂した可能性がある。ＡＰＯＬ１の一部は細胞質画分に認められることから、これは、ＥＲ内膜のＡＰＯＬ１は周辺に付着し、酸性のゴルジを通過する間に統合される可能性があるという考え方を潜在的にサポートする。形質膜については、細胞を採取する際に用いたトリプシンによって表面のＡＰＯＬ１が完全に消失するため、解析しなかった（ＦＡＣＳで評価、データは示さず）。ＥＲの細胞質ゾル面への局在性と一致して、ＡＰＯＬ２は、ＥＲ画分に最も多く含まれたが、細胞質ゾル側に比較的多く、ＭＡＭと画分ではＡＰＯＬ１よりも少なかった。ＭＡＭ画分は予想通りＭＡＭマーカーであるマイトフュージン２が濃縮されており、２つのＥＲタンパク質も含まれていたが、ＴＯＭ２０外膜ミトコンドリアマーカーは含まれていなかった（実施例２、参考文献８３）。ゴルジ膜（ＧＭ１３０陽性）もＥＲ画分に存在した。　［００１２２］　図４０Ｂ－４０Ｄは、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイト（図４０Ｂ）と一過性ＡＰＯＬ

１トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞（図４０Ｃ－Ｄ）のミトコンドリア関連小胞体膜（ＭＡＭ）でのＡＰＯＬ１のｉＥＭを示し、ＭＡＭ（ミトコンドリア関連小胞体膜、ＥＲのサブドメイン）のミトコンドリアがＡＰＯＬ１を欠き、分画と一致していることを示している。ＡＰＯＬ１は、両方の細胞種において、ＭＡＭのＥＲ内腔の内側にあり、関連しているミトコンドリアにはない。免疫金標識は、２つの最も強力なＡＰＯＬ１特異的抗体である５．１７Ｄ１２（図４０Ｂ）及び３．６Ｅ１０（図４０Ｃ－Ｄ）を用いて行われた。＊　ＥＲ内腔。矢印　ポドサイト内のＡＰＯＬ１金粒子。ＩＭＭ　＆　ＯＭＭ　ミトコンドリア内膜とミトコンドリア外膜。スケールバー：１００ｎｍ（図４０Ｂ）、２００ｎｍ（図４０Ｃ－Ｄ）。

【図４１Ａ－４１Ｂ】［００１２３］　図４１Ａ－４１Ｂは、内因性ＡＰＯＬ１が未分化ポドサイトにおいてもＥＲに局在していることを示す。図４１Ａは、ＩＦＮｇ刺激ポドサイトをＰＦＡ固定し、サポニン透過処理し、図２４Ｄで用いた抗体とは別の抗ＡＰＯＬ１抗体、２μｇ／ｍｌマウス４．１７Ａ５（＋Ａｌｅｘａ４８８抗マウス；緑）及びウサギ抗カルネキシン＋Ｃｙ３抗ウサギ（赤）で共染色した分化ＷＴ（上）又はＡＰＯＬ１　ＫＯ（下）を示す。マージの黄色は、２つのタンパク質の良好な共局在性を示している。４．１７Ａ５はＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトの一部の核に非特異的な斑点が見られることに留意（一部のＷＴ核では明らかではない）。スケールバーは４０μｍである。図４１Ｂは、未分化ポドサイトとＥＲマーカーとしてのウサギ抗タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（ＰＤＩ）を用いた以外は、図４１Ａと同様のデータを示している。マージ（右）の黄色は共局在性を示し、ＤＡＰＩは青色である。内因性ＡＰＯＬ１のＥＲ局在性はポドサイトの分化の際に変化しないが、ＥＲは概して、未分化細胞よりも分化細胞の方が、全てのマーカーで網目状に見えにくい（図４３とも比較されたい）。

【図４２】［００１２４］　図４２は、内因性肝細胞ＡＰＯＬ１がＩＦによってＥＲ以外のコンパートメント内で検出されないことを示している。ＪＨＨ－１細胞を、１００ｎｇ／ｍｌのＩＦＮｇで２４時間処理し、ＰＦＡ固定し、サポニン透過処理し（ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で最適に機能するシトクロムｃを除いて）、その後ウサギ抗ＡＰＯＬ１　５．１７Ｄ１２（続いてＡｌｅｘａ４８８抗ウサギ、緑色）とマウスコンパートメントマーカー抗体（Ｃｙ３抗マウスを使用）で赤色に共染色をした。マウス抗ＧＭ１３０を（シス）－ゴルジに、そしてマウス抗カルネキシン（クローン３７）をＥＲに使用した以外は、図３５と同じ検証済みコンパートメントマーカーを使用した。脂肪滴（ＬＤ）はウサギ抗ペリリピン２で染色されたため、これらのパネルではマウス４．１７Ａ５をＡＰＯＬ１として使用した。内因性ＡＰＯＬ１は、ミトコンドリア、ゴルジ、初期若しくは後期エンドソーム／リソソームにおいても、又は脂肪滴においても検出されず、このコンパートメントの１００μＭのオレイン酸（１０％酪酸不含ＢＳＡ中のＮｕＣｈｅｋＰｒｅｐから）による２１時間の蓄積後でも検出されない（ＬＤ＋ＯＡ）。スケールバーは４０μｍである。ＡＰＯＬ１が有意にオーバーラップしているコンパートメント（マージの黄色いシグナル）はＥＲのみである。

【図４３】［００１２５］　図４３は、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１がＩＦによってＥＲ以外のコンパートメント内に検出されていないことを示している。分化ＷＴポドサイトは、図４２のＪＨＨ－１細胞と同様に染色された。ＡＰＯＬ１（及びカルネキシン）と脂肪滴の結果との関連性の欠如は、脂肪滴の独立したマーカーであるＢＯＤＩＰＹを用いて検証された（図３７Ｂ）。

【図４４Ａ－４４Ｂ】［００１２６］　図４４Ａ－４４Ｂは、三重標識により、ポドサイト内の内因性ＡＰＯＬ１がミトコンドリアへ特異的に標的化されないことを確認したことを示している。図４４Ａは、ＩＦＮｇ刺激ＷＴ（上）又はＡＰＯＬ１　ＫＯ（下）ポドサイトをＰＦＡ固定し、サポニン透過処理し、ラット抗ＡＰＯＬ１　４．１７Ａ５（＋マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　７１２－１６６－１５３）に対して高度に交差吸着したＣｙ３抗ラット）、ウサギ抗カルネキシン（＋Ａｌｅｘａ６４７抗ウサギ（Ｊａｃｋｓｏｎ　７１１－６０６－１５２）、青）、及びマウス抗シトクロムｃ（＋Ａｌｅｘａ４８８抗マウス、ラット（Ｊａｃｋｓｏｎ　７１１－５４６－１５１）に対して交差吸着、緑）で三重染色

した。マージでは、ＡＰＯＬ１がカルネキシンとオーバーラップする部分ではマゼンタ染色を示し、黄色の染色（ＡＰＯＬ１がシトクロムｃのみとオーバーラップした場合に起こる）はない。ＥＲとミトコンドリアがオーバーラップしているように見える、限られた三重陽性領域は白で表示されている。これらのデータは、ＡＰＯＬ１がミトコンドリアへ特異的に標的化されないことを示しているが、ミトコンドリアとＥＲが近すぎて分解できない領域ではＡＰＯＬ１がミトコンドリアに見えることがある。４．１７Ａ５抗体でシグナルを欠くＡＰＯＬ１　ＫＯ細胞（下段）では、見かけのミトコンドリアとＥＲがオーバーラップする領域（主に膜が豊富な核周囲領域）がシアン色を示している。スケールバーは４０μｍである。　［００１２７］　図４４Ｂは、ミトコンドリアのオーバーラップの欠如が単なる色の検出バイアスではないことを確認にするために、二次抗体のフルオロフォアをカルネキシン（Ａｌｅｘａ４８８抗ウサギ（Ｊａｃｋｓｏｎ　７１１－５４６－１５２）、緑）とシトクロムｃ（Ａｌｅｘａ６４７抗マウス（ラットに対して交差吸着；Ｊａｃｋｓｏｎ　７１５－６０６－１５１）、青）に切り替えた以外は、図４４Ａにおけるのと同様である。この場合、マージは、マゼンタ（ミトコンドリアのみ）のオーバーラップではなく、ＥＲのＡＰＯＬ１の豊富な黄色のシグナル（又は白のトリプルオーバーラップ）を示している。ＡＰＯＬ１　ＫＯ細胞のマージでは、ここでもシアンが、ＥＲとミトコンドリアが密接に隣接している位置を示している。スケールバーは４０μｍである。

【図４５Ａ－４５Ｂ】［００１２８］　図４５Ａ－４５Ｂは、内因性ポドサイトのＡＰＯＬ１がＭＡＭに隣接していることを示している。図４５Ａは、未分化のＷＴポドサイトをメタノール固定し（－２０℃で５分間、ＭＡＭマーカーには最適なプロトコールだが、ＡＰＯＬ１には最適とはいえない）、ＡＰＯＬ１を赤で（２μｇ／ｍｌ　５．１７Ｄ１２（上段）又は３μｇ／ｍｌ　４．１７Ａ５（下段））とＭＡＭマーカーであるマウス抗マイトフュージン２　ｍａｂ　６Ａ８（Ａｂ５６８８９　１μｇ／ｍｌ；上段）又はウサギ抗ＦＡＣＬ４（Ａｂ１３７５２５　１μｇ／ｍｌ；下段）を緑色で共染色したものを示している。ＤＡＰＩとのマージは右側に示し、挿入画像はそれぞれの囲み領域の３倍拡大画像である。図４５Ｂは、２つのＭＡＭマーカー（緑）がＥＲ（カルネキシン；上段）よりもミトコンドリア（シトクロムｃ；下段）（いずれも赤色）とオーバーラップしていることを示す。挿入画像は、それぞれの囲み領域の３倍拡大画像である。

【図４６Ａ－４６Ｂ】［００１２９］　図４６Ａ－４６Ｂは、内因性ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２がポドサイトの膜の両側にあり、ＡＰＯＬ２がシグナルの大部分を構成していることを示している。図４６Ａは、ＩＦＮｇ処理したＷＴ又はＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトをＰＦＡ固定し、サポニンで完全に透過化（上段）又はジギトニンで形質膜のみ透過化（下段；図２６Ａ参照）し、ＡＰＯＬ１特異的５．１７Ｄ１２（左の２列）で染色又はＡＰＯＬ２交差反応性Ｓｉｇｍａ　ＨＰＡ０１８８８５（右の２列）で染色し、続いて両方ともＡｌｅｘａ４８８抗ラビットで染色したものを示す。内因性ＡＰＯＬ１はＥＲの内側にある。なぜなら、サポニンで見られる網目状のＥＲシグナルがジギトニン透過処理後に核膜シグナルに置き換えられ、核膜と連続したＥＲの内腔側のＡＰＯＬ１を表しているからである。予想通り、いずれのシグナルもＡＰＯＬ１依存性で、ＫＯ細胞では存在しない。一方、Ｓｉｇｍａ抗体は、内腔側のＡＰＯＬ１に加えて細胞質側に配向したＡＰＯＬ２も認識するため、両方の界面活性剤で網目状のＥＲパターンが明らかである。ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトのシグマ抗体のシグナルは、当然全てＡＰＯＬ２のものである。実際、ＷＴポドサイトのＳｉｇｍａ抗体シグナルの大部分もＡＰＯＬ２である。なぜなら、第一に、ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトではサポニン透過化細胞のＷＴと比較してトータルシグナルがあまり減少しておらず、第二に、ジギトニン透過化ＷＴ細胞の核膜ＡＰＯＬ１シグナルはＥＲ外面のＡＰＯＬ２シグナルよりはるかに弱いからである。このことは、ウェスタンブロッティングで見られるより強いＡＰＯＬ２バンドと一致する（図２１Ｄ、２２Ｂ）。ジギトニン透過化ポドサイトでは、ＡＰＯＬ１のエンドソーム又はリソソーム染色が検出されなかったことに留意されたい（オーバーレイについては図５２を参照）。図４６Ｂは、ＡＰＯＬ２交差反応性自社ｍＡｂ　３．６Ｄ１２（Ａｌｅｘａ４８８抗マウスで検出）がＷＴとＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト両方のジギトニン透過処理後にＥＲの細胞質面をＳｉ

ｇｍａ抗体と同様に染色し、ＫＯ細胞のＥＲシグナルはＡＰＯＬ２であることが確認されたことを示している。

【図４７Ａ－４７Ｂ】［００１３０］　図４７Ａ－４７Ｂは、ＡＰＯＬ１がｉＡＰＯＬ１ポドサイトの細胞表面に到達し、発現レベルと共に増加することを示している。図４７Ａは、１０ｎｇ／ｍｌドキシサイクリンで誘導され、図２５Ｂと同様に抗体３．６Ｄ１２と氷上でインキュベートされ、その後固定され、Ａｌｅｘａ４８８抗マウスで染色された生きたｉＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１及びＧ２ポドサイトを示す。ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１、Ｇ２の間で、形質膜の染色に違いはなかった。ＵＩは、表面ＡＰＯＬ１を欠く非誘導ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０（すなわちＡＰＯＬ１　ＫＯ）細胞である。図４７Ｂは、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０　ポドサイトにおけるドキシサイクリン用量反応が０から７．５ｎｇ／ｍｌである点を除いて、図４７Ａ　と同じである。最後のパネルは、ＩＦＮｇ刺激ＷＴポドサイトの内因性ＡＰＯＬ１を示し、ＦＡＣＳデータ（図１３Ｃ参照）と一致して、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０　細胞の１ｎｇ／ｍｌドキシサイクリンと同様の表面シグナルを示している。

【図４８Ａ－４８Ｃ】［００１３１］　図４８Ａ－４８Ｃは、ｉＥＭによるＡＰＯＬ１及びＡＰＯＬ２のＥＲ膜の内面と外面の局在性の定量化を示している。図４８Ａは、金粒子の定量基準の模式図である。細胞質ゾルは青で、ＥＲ内腔は黄色で、ＥＲ膜は７ｎｍのリン脂質二重層として描かれており、リボソーム（青い楕円）が点在するＥＲ膜の（細胞質ゾル側の）外膜面（ＯＭＦ）と（内腔側の）内膜面（ＩＭＦ）が表示されている。中心が幅２０ｎｍの薄青色ゾーンにあってＥＲ外膜のリーフレットに接して配置された１０ｎｍの金粒子をＯＭＦ上で標識としてスコア化し、中心が幅２０ｎｍの薄黄色ゾーンにあってＥＲ内膜のリーフレットに接して配置された金粒子をＩＭＦの標識としてスコア化した。中心が濃黄色の領域にある金粒子は、ＥＲ内腔にあるものとしてスコア化された。薄青色と薄黄色のゾーンの幅は、長さ約２５ｎｍの抗体－プロテインＡ－１０ｎｍ金粒子複合体のサイズの関数として選択されたものである。インキュベーションの終わりに標識した切片を乾燥させると、結合した金粒子が切片上でランダムな方向に沈殿する。垂直に切断されたＥＲ槽上の、したがって膜が鮮明に見える金粒子のみを定量化した。ポドサイト内のＡＰＯＬ１の定量化のために、最小内腔幅６０ｎｍの垂直に切断されたＥＲ槽のストレッチ上の金粒子のみをサンプリングした。　［００１３２］　図４８Ｂは、ＡＰＯＬ１（３．３Ａ８で標識、左）又はＡＰＯＬ２（３．５Ｃ１０で標識、右）を一過性にトランスフェクトされ、１０ｎｍプロテインＡ－金で検出されたパラホルムアルデヒド／グルタルアルデヒド固定ＨＥＫ－２９３細胞の代表的電子顕微鏡写真であり、両方のタンパク質のＥＲ局在性を示している。＊　ＥＲ内腔；Ｍ　ミトコンドリア；Ｎ　細胞核；ＮＥ　核膜；矢印　ミトコンドリア膜に近接したＥＲ関連金粒子。スケールバーは１００ｎｍである。

［００１３３］　図４８Ｃは、ＥＲ結合金粒子の定量化により、ＨＥＫ－２９３細胞のＥＲ膜内のＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２についての差分分布が明らかになったことを示す。ＡＰＯＬ１－２９３細胞は、抗ＡＰＯＬ１　ｍＡｂ　３．６Ｅ１０（ＳＲＡ－ＩＤに対するもの、塗りつぶした四角（ｎ＝９７））又は３．３Ａ８（ＭＡＤ、白い四角（ｎ＝１７３））で標識された。ＡＰＯＬ２－２９３細胞（青）は、抗ＡＰＯＬ２交差反応性ＰＦＤ　ｍＡｂ　３．５Ｃ１０（塗りつぶした丸（ｎ＝２５４））又は４．２Ｃ４（白い丸（ｎ＝２６４））で標識された。金粒子を（Ａ）で概説したように定量化した；ｎは各抗体についてカウントした金粒子の総数を示す。ＡＰＯＬ１の大部分は、２つの異なるドメインに対する抗体により内膜面に関連しており、ポドサイトがＨＥＫ－２９３細胞よりもはるかに幅広のＥＲ槽を有するにもかかわらず、ポドサイトで見られるものとほぼ同じ分布を示す（図２６Ｃを比較）。対照的に、両方の抗ＡＰＯＬ２抗体は、ＩＦで見られる細胞質へのアクセス可能性と一致して、明らかにＥＲの外側の細胞質ゾル面に向かってより多く分布していた（図２６Ｂ）。抗体の交差反応性の検証は、図３１Ａ－Ｂを参照。これらの４つは、ｉＥＭに適したパラホルムアルデヒド及びグルタルアルデヒドによる固定で最も強く作用した。

【図４９Ａ－４９Ｃ】［００１３４］　図４９Ａ－４９Ｃは、分化したＷＴポドサイトにおけるＡＰＯＬ１アイソフォームの相対的存在量のＲＴ－ＰＣＲによる定量化を示す。図

４９Ａは、ＡＰＯＬ１の様々なＮ末端スプライスアイソフォームのアライメントとｑＲＴ－ＰＣＲプローブの位置を示す。アイソフォームＡＰＯＬ１．ｖＡ（参照配列又はｖ１としても知られている）（配列番号２１７）、ｖＢ１（ｖ２）（配列番号２１８）、ｖＢ３（ｖ２－３）（配列番号２１９）、及びｖＣ（ｖ４）（配列番号２２０）は、各エクソンを強調する異なる影を付けて整列させている。主要なアイソフォームｖＡ（３９８ａａ長）はエクソン３及び４を発現するため、これら２つのエクソンを包含するプローブＡ（Ｈｓ０１０６６２８０＿ｍ１）により検出される。アイソフォームｖＢ１（４１４　ａａ）は、アイソフォームｖＡと比較して、エクソン２がコードする余分なＮ末端１６　ａａを有するため、プローブＡとエクソン２－３の境界にまたがるプローブＢ（ＡＰＴＺ９ＸＲ＿ｍ１）とによって認識される。アイソフォームｖＢ３（３９６　ａａ）はｖＢ１と同じＮ末端伸長部を発現しているが、シグナル配列切断部位を持つエクソン４を欠くため、プローブＢとエクソン３－５の境界にまたがるプローブＣ（Ｈｓ＿０１０６０１８９＿ｍ１）とによって認識される。アイソフォームｖＣ（３８０　ａａ）はエクソン２と４の両方を欠いているため、プローブＣによってのみ認識される。したがって、エクソン４（ｖＡのａａ　２７以降）がコードする通常のシグナル配列切断部位（ＶＲＡ／ＥＥ）はｖＢ３とｖＣには存在せず、ＥＲ取り込みが発生した場合は代わりにエクソン５がコードするＮＶＰ／ＳＧ（ｖＡのａａ　４０以降）にあると予測される。　［００１３５］　図４９Ｂは、ｑＲＴ－ＰＣＲプローブは全て、意図されたＡＰＯＬ１アイソフォームを認識することを示す。ＴａｑＭａｎプローブ（図４９Ａに記載）の特異性が、ＡＰＯＬ１　ｃＤＮＡ（ＡＰＯＬ１アイソフォームｖＡ、ｖＢ１、ｖＢ３、ｖＣ、及びベクターのみ、水を陰性コントロールとする）のｑＰＣＲサイクル閾値（C_t）を分析することによって検証された。ＤＮＡを１反応あたり４ｎｇから１２５ｐｇまで２倍に段階希釈し、各希釈液につき三重試験を行った。標準曲線は、Ｃｔと標準ＤＮＡの$\log_{10}$開始濃度（ピコグラム単位）との線形回帰として作成された。ＡＰＯＬ１アイソフォーム（表５）とその結果のC_t値を各ＤＮＡ濃度についてプロットしている。２２を超えるＣｔ値はプローブ反応性がないことを示す。ｖＡとｖＢ１はプローブＣによって全く検出されなかった（アスタリスク）ので、プロットすることができなかった。予想通り、各特異的プローブは予想されるアイソフォームと等しく反応し、試験した濃度範囲で線形感度を示した。　［００１３６］　図４９Ｃは、ＡＰＯＬ１．ｖＡ（参照配列）がポドサイトにおいて圧倒的に豊富なＡＰＯＬ１アイソフォームであることを示している。ＲＮＡを、４８時間のＩＦＮｇ刺激（１００ｎｇ／ｍｌ）有り及び無しの、継代２３、２４及び２５で分化したヒトポドサイトから逆転写し、３つのアイソフォーム特異的プローブによるｑＲＴ－ＰＣＲに供した。Ｃｔ値をＲＰＬ１９に正規化し、ＩＦＮｇ無しのＡＰＯＬ１．ｖＡ／Ｂ１（プローブＡ、Ｈｓ０１０６６２８０＿ｍ１）に対する変化倍率として表した。各アイソフォームの３回継代の平均値とＳＤがプロットされている。通常の条件下では、アイソフォームｖＡ／ｖＢ１（分泌型）は、ほとんど検出できないｖＢ１／ｖＢ３及びｖＢ３／ｖＣ（細胞質型）よりもそれぞれ１２５倍及び２９倍高く発現するため、ｖＡがｖＡ／ｖＢ１シグナルの大部分を構成するはずである。ＩＦＮｇ処理は全てのアイソフォームを３０倍程度アップレギュレートし、分泌型アイソフォームｖＡ／ｖＢ１はｖＢ１／ｖＢ３及び細胞質型ｖＢ３／ｖＣよりもそれぞれ７０倍及び２７倍高い発現量を維持する。したがって、分泌型アイソフォームｖＡは、ＩＦＮｇ刺激有りと無しの両方で、明らかに他の全てのアイソフォームよりもはるかに豊富である。よって、これらの細胞において細胞質型アイソフォームがＩＦで検出されないことは驚くにはあたらない。

【図５０Ａ－５０Ｃ】［００１３７］　図５０Ａ－５０Ｃは、ＣＯＳ細胞に一過性にトランスフェクトされると、全てのＡＰＯＬ１アイソフォーム及びＡＰＯＬ２は、異なるＥＲトポロジーにもかかわらず、細胞表面に到達するように見えることを示している。図５０Ａは、ＡＰＯＬ１アイソフォームｖＡ、ｖＣ、その２７ａａシグナル配列が欠失しているｖＡ（△ｓｓ）又はＡＰＯＬ２（Ｌ２）による、生きた非透過化一過性トランスフェクトＣＯＳ細胞のフローサイトメトリーを示す。Ａｌｅｘａ４８８抗マウス二次抗体は灰色、３．６Ｄ１２（１μｇ／ｍｌ）は赤色である。予期せぬことに、（△ｓｓ）とＡＰＯＬ２

を含む全ての発現ＤＮＡは、トランスフェクトされていない（ＤＮＡなし）細胞と比較してシフトを示した。これは、ＨＥＫ－２９３細胞で過去に見られたように、一過性の過剰発現のアーチファクトであることを示唆している（実施例２、参考文献８５）。ｙ軸は最大値の％である。ＡＰＯＬ２は、ＡＰＯＬ１　ＤＮＡよりもはるかに良好に一過性にトランスフェクトされたため、シフトが大きいことは必ずしも膜輸送が大きいことを示しているわけではないが、同じ細胞種（Ｌ２安定、再下段のパネル）において安定的に発現させた場合には、表面ＡＰＯＬ２は見られなかったことに留意されたい。　［００１３８］　図５０Ｂは、示されたＡＰＯＬ１アイソフォーム又はＡＰＯＬ２（Ｌ２）を一過性にトランスフェクトしたサポニン透過化ＣＯＳ細胞の免疫蛍光を示す。細胞は、抗ＡＰＯＬ１／２　３．６Ｄ１２及びウサギ抗カルネキシン細胞内ドメイン（Ｃｎｘ　ＩＣＤ、細胞質テール（Ａｂ２２５９５））で染色し、全てのアイソフォームがＥＲに局在することを示した。スケールバーは１５μｍである。　［００１３９］　図５０Ｃは、ジギトニン透過化とｒａｂｍａｂ　５．１７Ｈ８（ＡＰＯＬ２と交差反応するもの、図３１Ａ－３１Ｂ）及びマウス抗カルネキシン細胞外（内腔）ドメイン（クローン３７）による共染色を除いて図５０Ｂと同じｃＤＮＡトランスフェクションの免疫蛍光を示したものである。ジギトニンのデータから、ｖＡ、ｖＢ１及び少量のｖＣが分泌型（核膜シグナルを与える）であるのに対し、ｖＢ３、△ｓｓ、ＡＰＯＬ２（Ｌ２）及びほとんどのｖＣはＥＲの細胞質面に存在することが示された。ＡＰＯＬ１．ｖＣはほとんどの細胞で細胞質にあり、いくつかの細胞では内腔にあり、いくつかの細胞では（ここに示した細胞のように）混合したトポロジーであった。カルネキシン内腔ドメイン抗体はジギトニンで核膜染色もでき、本発明者らの技術を検証することに留意されたい。

【図５１Ａ－５１Ｃ】［００１４０］　図５１Ａ－５１Ｃは、ＣＯＳ細胞における一過性のトランスフェクションのアーチファクトを示す。ＡＰＯＬ２及びシグナル配列を持たないＡＰＯＬ１アイソフォームは、内腔にないにもかかわらず、培地に現れる。図５１Ａは、分泌型及び非分泌型ＡＰＯＬ１／２が、一過性の過剰発現により培地に分泌されることを示す。図５０ＡのＦＡＣＳ実験から残った一過性トランスフェクトＣＯＳ細胞を溶解し、プロテインＧセファロースビーズを用いて１μｇ／ｍｌ　３．６Ｄ１２と共に免疫沈降させ、１μｇ／ｍｌウサギ５．１７Ｈ８を用いて１２％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲルでイムノブロットした（上段；このｒａｂｍａｂはウェスタンブロッティングでＡＰＯＬ２と弱く交差反応するだけであることに注意；実際、ＡＰＯＬ２はＩＦによって評価すると他よりはるかによくトランスフェクトされた）。コンディショニングした細胞培地も濃縮し、同様に免疫沈降させた（中央のパネル）。インプットライセートは、５．１７Ｈ８よりもＡＰＯＬ２をよく認識する１μｇ／ｍｌ　３．６Ｄ１２で免疫標識して最下段のパネルに示している（トランスフェトなしとＡＰＯＬ２は異なる順序でロードされたが、この図では白線で示すように正しい順序にカットアンドペーストされたことに留意されたい）。全てのタンパク質は、非分泌型アイソフォームがＥＲの細胞質面に正しく局在しているにもかかわらず、機能的シグナル配列に関係なく、全ライセートと同じ相対レベルで培地中に検出され（図５０Ａ－Ｃ）、見かけ上の「分泌」は過剰発現のアーチファクトであることがと示唆された。なお、△ｓｓはｖＡと同じサイズであることも留意されたい。これは、予測されるようにｖＡでは２７ａａのシグナル配列が正常に切断されることが示す（表４）。ＵＴ　トランスフェクトなし；Ｌ２　ＡＰＯＬ２；Ａ　ＡＰＯＬ１．ｖＡ；△ｓｓ　２７ａａシグナル配列が欠失しているＡＰＯＬ１．ｖＡ；Ｃ　ＡＰＯＬ１．ｖＣ。　［００１４１］　図５１Ｂは、示されたＡＰＯＬ１　ｉアイソフォームで４６時間一過性にトランスフェクトされ（図２７Ａ－Ｄのポドサイト安定株の生成に使用したプラスミドを使用）、０．０４μｇ／ｍｌウサギ抗ＡＰＯＬ１　３．１Ｃ７／３．７Ｄ６混合物で１０％Ｔｒｉｓ－ＧｌｙｃｉｎｅゲルにウェスタンブロットされたＣＯＳ細胞の全ライセートを示している。スプライスアイソフォームについては、異なるＤＮＡプレップを使用した２つの独立したトランスフェクションが互いに隣接して示されている。ＣＯＳ細胞におけるこれらのＡＰＯＬ１アイソフォームのサイズは、別の実験で同じブロットにかけたとき、安定ポドサイトにおけるものと同じであった（データは示していない）。　［００１

４２］　図５１Ｃは、シグナル切断の欠如と一致して、ＡＰＯＬ１－Ｇ０．ｖＢ３ではＮ末端が保持されていることを示している。タグなし又はＮ末端ＦＬＡＧタグ付きＡＰＯＬ１．ｖＢ３を一過性にトランスフェクトしたＣＯＳ細胞を溶解し、０．０５μｇ／ｍｌＰＦＤ抗体３．７Ｄ６、２μｇ／ｍｌ　Ｃ末端抗体４．１２Ｅ５（Ｇ２ドメイン；実施例１）又は１μｇ／ｍｌ抗ＦＬＡＧ－Ｍ２と共に１０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ上でウェスタンブロッティングを行った。ＦＬＡＧタグは、予想通り、コンストラクトを大きくし、抗ＦＬＡＧで上のバンドを検出したことから明らかなように、切断されなかった。

【図５２Ａ－５２Ｂ】［００１４３］　図５２Ａ－５２Ｂは、ＡＰＯＬ１がジギトニン透過化ポドサイトのエンドソームと関連していないことを示している。図５２Ａは、ＩＦＮｇ処理したＷＴ（上）又はＡＰＯＬ１　ＫＯ（下）ポドサイトを、ＰＦＡ固定し、ジギトニン透過化し、内因性ＡＰＯＬ１については２μｇ／ｍｌのマウス４．１７Ａ５（緑）と、初期エンドソームについては１μｇ／ｍｌヤギ抗ＥＥＡ１（赤）と、後期エンドソーム及びリソソームについては１μｇ／ｍｌウサギ抗ＬＡＭＰ１細胞質ドメイン（青）と、続いて、それぞれ、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス、Ｃｙ３抗ヤギ（Ｊａｃｋｓｏｎ　７０５－１６６－１４７）、Ａｌｅｘａ６４７抗ウサギと共染色したものを示す。このジギトニン法を用いたＡＰＯＬ２交差反応性Ｓｉｇｍａ抗体を使用した過去の研究（実施例２、参考文献１９）とは異なり、点状の核外ＡＰＯＬ１シグナルは、初期又は後期エンドソーム及びリソソームマーカーであるＥＥＡ１又はＬＡＭＰ１とも一致しなかった。したがって、ＡＰＯＬ１特異的抗体を用いることは、このタンパク質の局在性を解釈する上で非常に重要である。核外膜のシグナルは、おそらく形質膜である可能性が高い。スケールバーは４０μｍである。　［００１４４］　図５２Ｂは、１０ｎｇ／ｍｌ　ｄｏｘで２１時間誘導した　ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０．ｖＢ３　ポドサイトをＰＦＡ固定し、サポニン（上）又はジギトニン（下）で透過化し、（Ａ）と同様に染色したものである。ＡＰＯＬ１．ｖＢ３は完全な細胞質アイソフォームであるにもかかわらず、エンドソーム又はリソソームと安定的に関連しない。挿入画像は囲み領域の３倍拡大図である。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

Ｉ．定義

［００１４５］　別段の定義がない限り、本発明に関連して使用される科学的及び技術的用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。更に、文脈上特に必要とされない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【００２５】

［００１４６］　本出願では、「又は」の使用は、特に明記しない限り、「及び／又は」を意味する。多数項従属クレームの文脈では、「又は」の使用は、複数の先行する独立又は従属クレームを択一的な形式によってのみ引用する。また、「要素」又は「成分」などの用語は、特に明記しない限り、１つの単位を含む要素及び成分と、複数のサブユニットを含む要素及び成分の両方を包含する。

【００２６】

［００１４７］　組換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、組織培養及び形質転換（例えばエレクトロポレーション、リポフェクション）、酵素反応、及び精製技術に関連して用いられる例示的な技術は、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ　ｅｄ．，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９））などに記載されている。

【００２７】

［００１４８］　本開示に従って利用される場合、以下の用語は、別段の指示がない限り、以下の意味を有すると理解されるものとする。

【００２８】

［００１４９］　本明細書で使用される「ＡＰＯＬ１」及び「アポリポタンパク質Ｌ１

」という用語は、別段の指示がない限り、天然アイソフォーム及びＧ０、Ｇ１、Ｇ２バリアント型、並びにシグナル配列を有する型及び有しない型を含む任意の天然ヒトＡＰＯＬ１を指す。この用語は、「全長」、未処理のヒトＡＰＯＬ１と、細胞内でのプロセシングによりもたらされる任意の型のＡＰＯＬ１とを包含する。この用語はまた、例えば、アクセッション番号が本明細書の表３と５に提供されているｖＡ、ｖＢ１、ｖＢ３及びｖＣアイソフォームを含むヒトＡＰＯＬ１の天然に存在するアイソフォーム、並びに本明細書で明示的に言及されていない他の一塩基多型も包含する。Ｇ０型の例示的なヒトＡＰＯＬ１タンパク質のアミノ酸配列（シグナルペプチド（アミノ酸１－２７）を持つものも持たないものも）が、配列番号１及び２に示されている。シグナル配列を持たない他の例示的な天然に存在するＡＰＯＬ１Ｇ０アイソフォームは、配列番号２１３－２１４に示されている。ＡＰＯＬ１のＧ１バリアントは、Ｓ３４２Ｇ置換及びＩ３８４Ｍ置換を含む点でＧ０型とは異なる。例示的なＧ１配列は、配列番号２１５に提供されている。Ｇ２バリアントは、アミノ酸Ｎ３８８とＹ３８９が欠失している点でＧ０型とは異なる。例示的なＧ２配列は、本明細書の配列番号２１６に見られる。

【００２９】

［００１５０］　本開示において、アミノ酸残基又は残基の範囲がＡＰＯＬ１配列への明示的な言及なしに提供される場合、参照配列は、配列番号２の配列であることを意味する。

【００３０】

［００１５１］　「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）との間の非共有結合性相互作用の強さの総和を指す。別途示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。一般に、分子Ｘの、そのパートナーＹに対する親和性は、解離定数（K_D）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。結合親和性を測定するための詳しく具体的且つ例示的な方法を以下で説明する。

【００３１】

［００１５２］　本明細書において「抗体」とは、重鎖の少なくとも相補性決定領域（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３）と軽鎖の少なくともＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む分子であって、抗原と結合可能な分子をいう。「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望のＡＰＯＬ１特異的結合活性を呈する限り、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）、完全長抗体、単鎖抗体、及び抗体断片を含むがこれらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。

【００３２】

［００１５３］　「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から分離されているものである。いくつかの態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えば、イオン交換又は逆相ＨＰＬＣ）法で決定して、純度が９５％又は９９％より高くなるまで精製される。抗体純度の評価のための方法の総説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ　８４８：７９－８７（２００７）を参照されたい。

【００３３】

［００１５４］　「抗原」は、抗体の標的、すなわち、抗体が特異的に結合する分子を指す。「エピトープ」という用語は、タンパク質性、非タンパク質性を問わず、抗体が結合する抗原上の部位を指す。タンパク質上のエピトープは、連続するアミノ酸のストレッチから形成される（線状エピトープ）ことも、例えば抗原のフォールディングに起因して（すなわち、タンパク質性抗原の三次フォールディングによって）空間的に近接している非連続のアミノ酸で構成される（コンフォメーションエピトープ）こともあり得る。線状エピトープは、タンパク質性抗原を変性剤に暴露した後でも、通常、抗体によって結合さ

れているが、コンフォメーションエピトープは、通常、変性剤で処理すると、破壊される。エピトープは、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、又は８－１０のアミノ酸を独特の空間的コンフォメーションで含む。

【００３４】

［００１５５］　「抗ＡＰＯＬ１抗体」又は「ＡＰＯＬ１抗体」又は「ＡＰＯＬ１に特異的に結合する抗体」及び類似の表現は、上に記載の、ＡＰＯＬ１に特異的に結合する抗体を意味する。本開示において、「特異的に結合する」又は「特異的結合」及び類似の用語は、結合親和性が十分に強くて、結合対のメンバー間の相互作用がランダムな分子会合（すなわち「非特異的結合」）に起因し得ないことを意味する。一般に、特異的結合には１μＭ以下の解離定数（K_D）が必要である。特異的結合は、多くの場合、１０ｎＭ以下のK_Dが必要とする。

【００３５】

［００１５６］　「重鎖」という用語は、リーダー配列を伴っても伴わなくても、少なくとも重鎖可変領域を含むポリペプチドを指す。いくつかの実施態様では、重鎖は、重鎖定常領域の少なくとも一部を含む。用語「全長重鎖」は、リーダー配列を伴っても伴わなくても、重鎖可変領域と重鎖定常領域とを含むポリペプチドを指す。

【００３６】

［００１５７］　「軽鎖」という用語は、リーダー配列を伴っても伴わなくても、少なくとも軽鎖可変領域を含むポリペプチドを指す。いくつかの実施態様では、軽鎖は、軽鎖定常領域の少なくとも一部を含む。用語「全長軽鎖」は、リーダー配列を伴っても伴わなくても、軽鎖可変領域と軽鎖定常領域とを含むポリペプチドを指す。

【００３７】

［００１５８］　本明細書で使用される「超可変領域」又は「ＨＶＲ」という用語は、配列が超可変であり、抗原結合特異性を決定する抗体可変領域、例えば「相補性決定領域」（ＣＤＲ）の各領域を指す。一般に、抗体は、ＶＨに３つ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、ＶＬに３つ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）の合計６つのＣＤＲを含む。特に指示がない限り、ＣＤＲは本明細書の配列表に従って決定される。当業者であれば、ＣＤＲの指定は、上記Ｃｈｏｔｈｉａ、上記ＭｃＣａｌｌｕｍ又は任意の他の科学的に受け入れられた命名法に従って決定することもできることを理解するであろう。特異性：

（ａ）アミノ酸残基２６－３２（Ｌ１）、５０－５２（Ｌ２）、９１－９６（Ｌ３）、２６－３２（Ｈ１）、５３－５５（Ｈ２）、及び９６－１０１（Ｈ３）で生じる超可変ループは、さもなければＣｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲを構成する（Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））；

（ｂ）アミノ酸残基２４－３４（Ｌ１）、５０－５６（Ｌ２）、８９－９７（Ｌ３）、３１－３５ｂ（Ｈ１）、５０－６５（Ｈ２）及び９５－１０２（Ｈ３）で生じるＣＤＲは、Ｋａｂａｔ　ＣＤＲを構成する（Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））；並びに

（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ－３６（Ｌ１）、４６－５５（Ｌ２）、８９－９６（Ｌ３）、３０－３５ｂ（Ｈ１）、４７－５８（Ｈ２）及び９３－１０１（Ｈ３）で生じる抗原接触は、ＭａｃＣａｌｌｕｍ　ＣＤＲを構成する（ＭａｃＣａｌｌｕｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６））。本明細書において抗体のＣＤＲの配列表に配列が記載されておらず、上記３種類のＣＤＲのいずれかが、「例えばＣｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲ又はＫａｂａｔ　ＣＤＲ」と特記されていなければ、Ｋａｂａｔ　ＣＤＲが意図される。

【００３８】

［００１５９］　「フレームワーク」又は「ＦＲ」は、相補的決定領域（ＣＤＲ）の一部ではない可変領域残基を指す。通常、可変領域のＦＲは４つのＦＲ：ＦＲ１、ＦＲ２、

ＦＲ３、及びＦＲから成る。したがって、ＣＤＲ配列及びＦＲ配列は通常、ＶＨ（又はＶＬ）の配列：ＦＲ１－ＣＤＲ－Ｈ１（ＣＤＲ－Ｌ１）－ＦＲ２－ＣＤＲ－Ｈ２（ＣＤＲ－Ｌ２）－ＦＲ３－ＣＤＲ－Ｈ３（ＣＤＲ－Ｌ３）－ＦＲ４に現れる。

【００３９】

［００１６０］　「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原に対する結合に関与する、抗体の重鎖又は軽鎖のドメインをいう。通常、天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨ、ＶＬ）は、類似の構造を有し、各ドメインが４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を備える。例えば、Ｋｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６th　ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．，ｐａｇｅ　９１（２００７）を参照のこと。可変ドメインは、ＦＲ１及び／又はＦＲ４の全て又は一部を含むか含まない重鎖（ＨＣ）ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３；並びにＦＲ１及び／又はＦＲ４の全て又は一部を含むか含まない軽鎖（ＬＣ）ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３を含んでもよい。すなわち、可変ドメインは、抗原結合活性を保持する限り、ＦＲ１及び／又はＦＲ４の一部を欠いてもよい。抗原結合特異性を付与するには、単一のＶＨ又はＶＬドメインで十分である。更に、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体のＶＨドメイン又はＶＬドメインを用いて単離し、それぞれ、相補的なＶＬドメイン又はＶＨドメインのライブラリーをスクリーニングすることができる。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照のこと。

【００４０】

［００１６１］　抗体の軽鎖及び重鎖の「定常領域」とは、ＦＲ、ＣＤＲ、及び可変領域の外側にある更なる配列部分をいう。特定の抗体断片は、定常領域の全て又は一部を欠くことがある。Ｎ末端からＣ末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン又は重鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（ＶＨ）を有し、それに続いて３つの定常重ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）を有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン又は軽鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（ＶＬ）を有し、それに続いて定常軽（ＣＬ）ドメインを有する。

【００４１】

［００１６２］　本明細書で「Ｆｃ領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。該用語は、天然配列Ｆｃ領域及びバリアントＦｃ領域を包含する。一態様では、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６から、又はＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。但し、宿主細胞によって産生される抗体は、重鎖のＣ末端から１つ以上、特に１つ又は２つのアミノ酸の翻訳後切断を受けてもよい。したがって、全長重鎖をコードする特定の核酸分子の発現によって、宿主細胞によって産生される抗体は、全長重鎖を含んでいてもよく、又は全長重鎖が切断されたバリアントを含んでいてもよい。これは、重鎖の最終的な２つのＣ末端アミノ酸がグリシン（Ｇ４４６）及びリジン（Ｋ４４７、ＥＵインデックスによる番号付け）である場合であってもよい。ゆえに、Ｆｃ領域のＣ末端リジン（Ｌｙｓ４４７）又はＣ末端グリシン（Ｇｌｙ４４６）及びリジン（Ｌｙｓ４４７）は存在してもしていなくてもよい。したがって、例えば「全長ＩｇＧ１」には、Ｇｌｙ４４６とＬｙｓ４４７を含むＩｇＧ１か、又はＬｙｓ４４７を含まないかＩｇＧ１、又はＧｌｙ４４６とＬｙｓ４４７の両方を含まないＩｇＧ１が含まれる。Ｆｃ領域を含む重鎖のアミノ酸配列は本明細書において、別様に示されない場合、Ｃ末端グリシン－リジンジペプチドを含まずに表される。一態様では、本発明による抗体に含まれる、本明細書で明記したＦｃ領域を含む重鎖は、Ｇｌｙ４４６及びＬｙｓ４４７（ＥＵインデックスによる番号付け）を含んでもよい。一態様では、本発明による抗体に含まれる、本明細書で明記したＦｃ領域を含む重鎖は、Ｇｌｙ４４６（ＥＵインデックスによる番号付け）を含んでもよい。本明細書で特に明記されない限り、Ｆｃ領域又は定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、

Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，１９９１に記載されるようなＥＵ番号付けシステム（ＥＵインデックスとも呼ばれる）に従う。

【００４２】

［００１６３］　「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域に起因する生物学的活性のことで、抗体のアイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例には、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；貪食；細胞表面受容体（例えばＢ細胞受容体）のダウンレギュレーション；並びにＢ細胞の活性化が含まれる。

【００４３】

［００１６４］　抗体の「クラス」とは、その重鎖によって保有される定常ドメイン又は定常領域の型を指す。抗体には５つの主要なクラス、すなわちＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭがあり、これらのいくつかは、更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、及びIgA_2に分けることができる。特定の態様では、抗体は、IgG_1アイソタイプのものである。特定の態様では、抗体は、Ｆｃ領域エフェクター機能を低下させるためのＰ３２９Ｇ、Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａ変異を有するIgG_1アイソタイプのものである。他の態様では、抗体は、IgG_2アイソタイプのものである。特定の態様では、抗体は、IgG_4抗体の安定性を改善するためにヒンジ領域にＳ２２８Ｐ変異を有するIgG_4アイソタイプのものである。いくつかの態様において、抗体は、非ヒトＩｇＧ定常領域を有してよく、例えば、マウスＩｇＧ２ａ　ＬＡＬＡＰＧ抗体などのマウスＩｇＧ２ａ抗体であってよい。免疫グロブリン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α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２つの種類のうちの１つに割り当てられてもよい。

【００４４】

［００１６５］　「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原（すなわちＡＰＯＬ１）に結合し、インタクトな抗体の一部分を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えばｓｃＦｖ及びｓｃＦａｂ）；単一ドメイン抗体（ｄＡｂ）；抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の総説としては、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ａｎｄ Ｈｕｄｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２３：１１２６－１１３６（２００５）を参照されたい。

【００４５】

［００１６６］　用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有する抗体か、又は、ＩｇＧ抗体の場合、本明細書で定義されるＦｃ領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

【００４６】

［００１６７］　用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が特定の起源又は種に由来する一方、重鎖及び／又は軽鎖の残りは別の起源又は種に由来する抗体を指す。

【００４７】

［００１６８］　「ヒト化」抗体とは、非ヒトＣＤＲ由来のアミノ酸残基とヒトＦＲ由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の態様では、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインのほぼ全てを含み、そのドメイン中ではＣＤＲの全て又はほぼ全てが非ヒト抗体のＣＤＲに対応し、ＦＲの全て又はほぼ全てがヒト抗体のＦＲに対応することになる。ヒト化抗体は、場合によって、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでよい。抗体（例えば非ヒト抗体）の「ヒト化型」は、ヒト化を

遂げた抗体を指す。
【００４８】
［００１６９］　本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体集団、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、一般に少量で存在し得るバリアント抗体（例えば自然発生の変異を含んでいるものか又はモノクローナル抗体調製物の製造時に発生するもの）を除いて、同一であり、且つ／又は同じエピトープに結合する集団から得られる抗体を意味する。様々な決定基（エピトープ）に対する様々な抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の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ものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈すべきではない。例えば、本発明に従うモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製することができ、これらの方法及びモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は本明細書に記載されている。
【００４９】
［００１７０］　「抗体コンジュゲート」は、治療剤を含むがそれに限定されない１又は複数の異種分子にコンジュゲートされている抗体である。
【００５０】
［００１７１］　参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、最大の配列同一性パーセントを得るように配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後の、整列の目的のためにいかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさない、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当分野の技術範囲内にある様々な方法、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ、Ｍｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェア又はＦＡＳＴＡプログラムパッケージなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して得ることができる。当業者であれば、比較する配列の全長にわたって最大のアライメントを得るのに必要な任意のアルゴリズムを含めた、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。代替的には、同一性パーセントの値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を使用して生成することができる。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．によって作成されており、ソースコードは、Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ Ｏｆｆｉｃｅ（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．，２０５５９）のユーザードキュメンテーションにファイルされており、Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ Ｒｅｇｉｓｔｒａｔｉｏｎ Ｎｏ．ＴＸＵ５１００８７の下に登録されており、且つ、国際公開第２００１／００７６１１号に記載されている。
【００５１】
［００１７２］　特に断りのない限り、本明細書において、アミノ酸配列同一性パーセントの値は、ＢＬＯＳＵＭ５０比較マトリックスと共にＦＡＳＴＡパッケージ バージョン３６．３．８ｃ以降のｇｇｓｅａｒｃｈプログラムを使用して生成される。ＦＡＳＴＡプログラムパッケージは、Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｄ．Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９８８），“Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｔｏｏｌｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ”，ＰＮＡＳ ８５：２４４４－２４４８；Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ（１９９６）“Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ”Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：２２７－２５８；及びＰｅａｒｓｏｎ ｅｔ．ａｌ．（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４６：２４－３６記載されており、ｗｗｗ．ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｆａｓｔａ＿ｄｏｗｎ．ｓｈｔｍｌ又はｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｓｓｓ／ｆａｓｔａから公的に入手可能である。代替的には、ｇｇｓｅａｒｃｈ（ｇｌｏｂａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ：ｐｒｏｔｅｉｎ）プログラムとデフォルトオプション（ＢＬＯＳ

ＵＭ５０；ｏｐｅｎ：－１０；ｅｘｔ：－２；Ｋｔｕｐ＝２）を使用して、ローカルではなくグローバルアライメントを実行し、ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／ｆｉｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｉｎｄｅｘ．ｃｇｉでアクセスできるパブリックサーバーを使用して配列を比較することも可能である。アミノ酸同一性パーセントは、アウトプットアライメントヘッダーに示される。

【００５２】

［００１７３］　「核酸分子」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物及び／又は物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基、具体的にはプリン塩基又はピリミジン塩基（すなわち、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）又はウラシル（Ｕ））；糖（すなわち、デオキシリボース又はリボース）；及びリン酸基で構成される。多くの場合、核酸分子は塩基の配列で記述され、それにより前記塩基は、核酸分子の一次構造（線状構造）を表している。塩基の配列は、典型的には、５’から３’へと表される。本明細書において、核酸分子という用語は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、例えば、相補性ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）及びゲノムＤＮＡ、リボ核酸（ＲＮＡ）、特に、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＤＮＡ又はＲＮＡの合成形態、及びこれらの分子の２以上を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は、線状であっても環状であってもよい。その上、核酸分子という用語は、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方、並びに単鎖形態及び二本鎖形態を含む。更に、本明細書に記載の核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド又は天然に存在しないヌクレオチドを含むことができる。天然に存在しないヌクレオチドの例には、誘導体化された糖又はリン酸骨格結合又は化学修飾された残基を有する、修飾されたヌクレオチド塩基が挙げられる。核酸分子は、例えば、宿主又は患者において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏで本発明の抗体の直接的な発現のためのベクターとして適したＤＮＡ分子及びＲＮＡ分子も包含する。そのようなＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）又はＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ベクターは、修飾されていてもいなくてもよい。例えば、ｍＲＮＡは、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗体を産生するために対象にｍＲＮＡを注入することができるように、ＲＮＡベクターの安定性及び／又はコードされた分子の発現を高めるように化学修飾されてもよい（例えば、Ｓｔａｄｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０１７，２０１７年６月１２日（オンライン公開），ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｍ．４３５６又はＥＰ第２１０１８２３号を参照されたい）。

【００５３】

［００１７４］　「単離された」核酸は、その自然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、その核酸分子は、染色体外に、又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

【００５４】

［００１７５］　「抗ＡＰＯＬ１抗体をコードする単離された核酸」は、抗ＡＰＯＬ１抗体の重鎖及び軽鎖をコードする１又は複数の核酸分子（又はその断片）を指し、これには、単一のベクター又は別個のベクター中の当該核酸分子、及び宿主細胞の１又は複数の位置に存在する当該核酸分子が含まれる。

【００５５】

［００１７６］　本明細書で使用される用語「ベクター」は、結合する別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター及び導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それが作動可能に連結されている核酸の発現を誘導することができる。そのようなベクターを本明細書では、「発現ベクター」と呼ぶ。

【００５６】

［００１７７］　「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の後代を含む。

【００５７】

［００１７８］　「リーダー配列」という用語は、ポリペプチドのＮ末端に位置し、哺乳類細胞からのポリペプチドの分泌を促進するアミノ酸残基の配列をいう。リーダー配列は、哺乳類細胞からのポリペプチドの輸送の際に切断されて、成熟タンパク質を形成することがある。リーダー配列は、天然であっても合成であってもよく、それらが付着しているタンパク質に対して異種であっても同族であってもよい。非限定的な例示的リーダー配列は、異種タンパク質からのリーダー配列も含む。いくつかの実施態様では、抗体は、リーダー配列を欠く。いくつかの実施態様では、抗体は、天然抗体リーダー配列及び異種リーダー配列から選択することができる少なくとも１つのリーダー配列を含む。

【００５８】

ＩＩ．組成物及び方法

Ａ．例示的抗ＡＰＯＬ１抗体

［００１７９］　一態様では、本発明は、ＡＰＯＬ１に特異的に結合する抗体を提供する。いくつかの態様において、本抗体は、ポドサイトの表面では露出しているが血清ＨＤＬ粒子中に見られるＡＰＯＬ１では埋もれている可能性のあるＡＰＯＬ１の特定の部分に特異的に結合する。このような抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているように、ポドサイトの表面上のＡＰＯＬ１を、ＨＤＬ粒子上に通常見出される、血清中のＡＰＯＬ１と区別する際に有用であり得る。実施例で後述するように、ＡＰＯＬ１の露出部分と埋没部分は、ポドサイト局在性ＡＰＯＬ１とＨＤＬ局在性ＡＰＯＬ１とで多少いくらか異なっており、これにより特定の抗体は、各タイプに対する結合親和性の違いによりこれらの形態を区別することができる。

【００５９】

［００１８０］　ＡＰＯＬ１タンパク質には様々なドメイン（図７参照）、例えばアミノ酸２８－２３５のＰＦＤ（孔形成ドメイン）、膜貫通ドメイン、アミノ酸２３８－３０５のＭＡＤ（膜アドレッシングドメイン）、アミノ酸３０５－３３８のＬ（リンカー）ドメイン、アミノ酸３３９－３９８のＳＲＡ－ＩＤ（血清抵抗性関連相互作用ドメイン）が含まれている。（配列番号１、２、２１３及び２１４を参照）。

【００６０】

［００１８１］　本明細書における特定の抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ（孔形成ドメイン）部分内、例えばＡＰＯＬ１－Ｇ０のアミノ酸６１からアミノ酸１７２（配列番号２のアミノ酸６１－１７２）までに結合する。いくつかの態様において、抗体は、ＰＦＤ領域のアミノ酸６１からアミノ酸１０３までの領域（配列番号２のアミノ酸６１－１０３）に結合するか、又はＰＦＤ領域のアミノ酸１１１からアミノ酸１５０までの領域に結合し、そのいずれによっても、抗体は、ポドサイトに発現するＡＰＯＬ１は認識できるがＨＤＬ粒子の一部として循環するＡＰＯＬ１は認識できない可能性がある。これは、ＡＰＯＬ１のこれらの部分がポドサイトのＡＰＯＬ１では露出しているが、ＨＤＬのＡＰＯＬ１ではアクセスできない可能性があるためである。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のアミノ酸１０３からアミノ酸１１１までの領域又はアミノ酸１５０からアミノ酸１７２までの領域に結合し、これにより抗体は、これらの部分がいずれのタイプのＡＰＯＬ１においても露出しているため、ＨＤＬ粒子上及びポドサイト上に発現したＡＰＯＬ１を同様に認識できる可能性がある。このような抗体は、例えばコントロールとして機能することにより、ポドサイトと血清のＡＰＯＬ１を区別するアッセイにおいても有用であろう。

【００６１】

［００１８２］　本明細書のいくつかの抗体は、アミノ酸２６０から３０５までのＡＰＯＬ１のＭＡＤ（膜アドレッシングドメイン）部分内に結合する（配列番号２のアミノ酸２６０－３０５を参照）。特定の態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のアミノ酸２６０からアミノ酸３１４までの領域に結合し、これは、タンパク質のＭＡＤ及びＬ（リンカー）領域の一部を含み、これにより抗体は、ＨＤＬ粒子に見出されるＡＰＯＬ１を認識することができるが、ポドサイト細胞に発現するＡＰＯＬ１を認識できない可能性がある。

【００６２】

［００１８３］　他の抗体は、アミノ酸３１４と３３３の間のＡＰＯＬ１のＬ（リンカ

ー）領域内に結合し（配列番号２のアミノ酸３１４－３３３を参照）、これにより抗体はポドサイトとＨＤＬ粒子の両方でＡＰＯＬ１を認識することができる可能性がある。同様に、いくつかの抗体は、アミノ酸３７６から３９８までのＡＰＯＬ１のＳＲＡ－ＩＤ（血清抵抗性関連相互作用ドメイン）部分内に結合し（配列番号２のアミノ酸３７６－３９８）、これにより抗体はポドサイト及びＨＤＬ粒子の両方でＡＰＯＬ１を認識することができ可能性がある。

【００６３】

［００１８４］　ポドサイトへの抗体の結合は、例えば、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、免疫組織化学（ＩＨＣ）、免疫沈降、フローサイトメトリー又はウェスタンブロッティングによって試験することができる。ポドサイトとＨＤＬ粒子との間の結合を区別するために、天然状態のＡＰＯＬ１を用いて、例えばフローサイトメトリー又は免疫沈降法で結合を試験してもよい。固定化及び／若しくは透過化又は変性ウェスタンブロットでの変性後、異なるＡＰＯＬ１エピトープが露出するようになる。

【００６４】

［００１８５］　血清中の、すなわちＨＤＬ粒子上のＡＰＯＬ１への抗体の結合は、例えば、トリパノソーマ溶解をブロックする抗体の能力を報告する本明細書の実施例に記載されているアッセイによって、試験することができる。したがって、ＨＤＬ粒子上のＡＰＯＬ１を認識する抗体はトリパノソーマ溶解を有意にブロックする可能性があるが、ＨＤＬ粒子上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない抗体は、本明細書に記載のアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を有意にはブロックしない可能性がある。

【００６５】

［００１８６］　血清ＡＰＯＬ１に対する抗体の特異性を記すために本明細書で使用されるトリパノソーマ溶解アッセイは、以下の通りである。ブルーストリパノソーマを、ＡＴＣＣから入手し、ＩＭＤＭ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、熱不活化（５６℃で３０分間）ＦＢＳ（Ｓｅｒａｄｉｇｍ　ＩＸＬ９／０６８０７／ＧＥＮ）、１％血清プラス（Ｓｉｇｍａ　１４００８Ｃ）、ＨＭＩ－９（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）及び１％ヒポキサンチン（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）を含むＨＭＩ－９培地で培養した。トリパノソーマ溶解を、1×10^5トリパノソーマをＮＨＳ又は組換えＡＰＯＬ１の段階希釈液で１６時間、合計１００μｌで処理することにより行った。生細胞の読み取りは、製造元のプロトコールに従い、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイで行われた（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、ＤＡＬ１１００）。簡潔に言えば、１０μｌのＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅを各ウェルに添加し、３７℃で４時間インキュベートした。生きているトリパノソーマを示す赤色蛍光は、ＳｏｆｔＭＡＸ（登録商標）ＰＲＯで動作するＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）蛍光光度計で、励起波長５３０ｎｍ、発光波長５９０ｎｍで測定された。抗体ブロッキングアッセイでは、１％正常ヒト血清を１－１０μｇ／ｍｌの抗ＡＰＯＬ１抗体又は培地と室温で２０分間プレインキュベートした後、トリパノソーマを添加した。１６時間後、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイを上記のように行い、培地のみのバックグラウンド値を減算し、抗体なしのコントロールに正規化することによりブロッキング％を計算した。アッセイで試験したように、トリパノソーマ溶解を有意にブロックする抗体は、少なくとも２５％のブロッキング活性を示す。

【００６６】

［００１８７］　本明細書の実施例は、いくつかの抗ＡＰＯＬ１抗体を記載している。多くの抗体のＡＰＯＬ１結合特性は実施例に記載されており、また、特定の抗体のアミノ酸配列も決定された場合、それらは実施例のセクションに続く配列表に提供されている。後述の実施例において、本明細書の抗体を生成するために使用される参照配列は、「ＥＭＲ」（Ｅ１５０、Ｍ２２８、Ｒ２５５）ＡＰＯＬ１バリアント型（ＲｅｆＳｅｑ）を表す配列番号２のものに対応する。本明細書におけるＣＯＳ細胞一過性発現実験は、「ＫＩＫ」バリアント（Ｋ１５０、Ｉ２２８Ｉ、Ｋ２５５）を用いて行われ、本明細書で使用されるｉＡＰＯＬ１ポドサイトは、アフリカンバリアント又は「ＥＩＫ」バリアント型（Ｅ１５０、Ｉ２２８、Ｋ２５５）を発現した。（それぞれ配列番号２１３、２１４を参照）。

本明細書における抗体は、これら３つのＡＰＯＬ１型（ｆｏｒｍ）の全てを特異的に認識することが見出された。

【００６７】

［００１８８］　例えば、抗体５．１７Ｈ８、５．１１Ｈ２、３．６Ｄ１２、３．６Ｈ５、３．６Ｇ１１、３．５Ａ１２、３．６Ｃ２、３．５Ｃ２、３．２Ａ７、３．３Ａ７、３．２Ｂ１１、３．３Ｂ６、３．７Ｄ６、及び４．１７Ａ５は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ領域に特異的に結合する。これらの抗体のうち、抗体５．１７Ｈ８、５．１７Ｈ２及び３．６Ｃ２、並びに３．５Ｃ２、３．６Ｃ２、３．５Ａ１２、３．２Ａ７、３．３Ａ７及び３．２Ｂ１１は、ＨＤＬ粒子上の血清ＡＰＯＬ１と比べてポドサイトに優先的に結合する。対照的に、ＰＦＤ領域にも特異的に結合する抗体４．１７Ａ５と３．７Ｄ６は、ポドサイトに結合するが、トリパノソーマ溶解も著しくブロックする可能性があり、ポドサイト上のＡＰＯＬ１と血清（すなわちＨＤＬ）のＡＰＯＬ１の両方を認識していることを示す。抗体３．６Ｄ１２、３．６Ｇ１１、３．６Ｈ５、及び５．１７Ｄ１２もポドサイトと血清の両方でＡＰＯＬ１を認識する。更なる例として、抗体４．６Ａ９、１．１１Ｇ１、及び３．３Ａ８は、アミノ酸２６０から２９４のタンパク質のＭＡＤ領域に結合してトリパノソーマ溶解を強くブロックする一方で、ポドサイトへの結合は低レベルでしか示さず、血清（すなわちＨＤＬ）ＡＰＯＬ１を優先的に認識することを示している。同様に、抗体３．２Ｃ１１、３．７Ｅ８、及び３．７Ｂ５は、アミノ酸２９４－３１４のＭＡＤ－Ｌ領域に結合し、ポドサイトのＡＰＯＬ１よりも血清のＡＰＯＬ１を優先的に認識する。抗体３．１Ｃ１、３．１Ｃ７、３．６Ｅ１０、３．６Ｈ１０、及び３．４Ｇ１０は、タンパク質のＬ部分に結合し、ポドサイトと血清の両方にあるＡＰＯＬ１を認識する。しかし、抗体３．６Ｈ１０は、ポドサイト上のＡＰＯＬ１を優先的に認識する可能性がある。抗体４．１１Ａ１０、４．１１Ｈ１１、及び４．１２Ｅ５は、ＡＰＯＬ１のＳＲＡ－ＩＤ部分に結合し、ポドサイトと血清の両方のＡＰＯＬ１を認識する。

【００６８】

［００１８９］　本明細書の特定の抗体は、ＡＰＯＬ２及び／又はＡＰＯＬ３、並びにＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６などのアポリポプロテインリガンドファミリーの他のメンバーには有意には結合しない。したがって、いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ２に有意には結合しない。いくつかの態様において、抗体は、後述の実施例に記載される検出方法に従って、ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ６に対する検出可能な結合を示さない。いくつかの態様において、抗体は、後述の実施例に記載される検出方法に従って、ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ６に対する検出可能な結合を示さない。いくつかの態様において、抗体は、後述の実施例に記載される検出方法に従って、ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ３に対する検出可能な結合を示さない。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４又はＡＰＯＬ６のいずれかに対する検出可能な結合を示さない。例えば、抗体５．１７Ｄ１２と３．７Ｄ６はＡＰＯＬ１に特異的に結合し、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４、ＡＰＯＬ６などの他のアポリポタンパク質リガンドファミリーへの結合をほとんど又は全く示さない。一方、抗体４．１７Ａ５は、ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ４を検出するが、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３又はＡＰＯＬ６を検出しない。一方、例えば抗体３．６Ｄ１２は、ＡＰＯＬ１だけでなくＡＰＯＬ２とＡＰＯＬ３にも結合する。また、５．１７Ｄ１２、４．１７Ａ５、及び３．７Ｄ６の各々は、ＡＰＯＬ１のＧ０、Ｇ１、及びＧ２バリアントの全てを特異的に認識する。

【００６９】

［００１９０］　いくつかの態様において、本明細書の抗体は、ＡＰＯＬ１の異なる型、すなわちＧ０、Ｇ１、及びＧ２バリアントを区別することができる。例えば、抗体４．１１Ａ１０、４．１２Ｅ５、及び４．１１Ａ１０は、ＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型に特異的に結合するが、Ｇ２型には有意には結合しない。したがって、これらの抗体は、Ｇ０型及びＧ１型とＧ２型を区別することができる。

【００７０】

［００１９１］　したがって、本明細書の抗体の異なる結合特性は、ポドサイト上のＡ

ＰＯＬ１を血清中（すなわちＨＤＬ粒子上）のＡＰＯＬ１と区別する必要がある場合、ＡＰＯＬ１をＡＰＯＬ２及び／若しくはＡＰＯＬ３と、又はＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６の全てと区別する必要がある場合、並びに／又はＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型をＧ２型と区別する必要がある場合、種々の診断アッセイ及び用途のためのいくつかの態様において有用であり得る。

【００７１】

［００１９２］　後述の実施例に記載される特定の抗体クローンが配列決定され、それらの抗体のＣＤＲ、可変領域、並びに重鎖及び軽鎖配列が、以下のサブセクションと配列表に提供されている。いくつかの態様において、本開示の抗体は以下を含む。

【００７２】

［００１９３］　１．アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、

（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｂ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｃ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｄ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｅ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｆ）配列番号５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｇ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｈ）配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７７のアミ

ノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｉ）配列番号８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｊ）配列番号９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号９５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号９７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｋ）配列番号１０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｌ）配列番号１１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｍ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｎ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｏ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｐ）配列番号１５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｑ）配列番号１６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｒ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１

７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｓ）配列番号１８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｔ）配列番号１９３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１９４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１９５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１９６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１９７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１９８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は
（ｕ）配列番号２０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む、単離された抗体。
【００７３】
［００１９４］　２．実施態様１に記載の抗体であって、
実施態様１（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含む；
実施態様１（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及

び／若しくは配列番号８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号１９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；
実施態様１（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含むか；又は

実施態様１（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＨ及び／若しくは配列番号２１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるＶＬを含む、抗体。

【００７４】

［００１９５］　３．実施態様１又は２に記載の抗体であって、

実施態様１（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；

実施態様１（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列を含むＶＨを含むか；又は

実施態様１（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列を含むＶＨを含む、抗体。

【００７５】

［００１９６］　４．実施態様１又は２に記載の抗体であって、

実施態様１（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１００のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９０のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；
実施態様１（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２００のアミノ酸配列を含むＶＬを含むか；又は
実施態様１（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１０のアミノ酸配列を含むＶＬを含む、抗体。

【００７６】

［００１９７］　５．実施態様１又は２に記載の抗体であって、
配列番号９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号２９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号３０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号３９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号４０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号４９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号５９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号６０のアミノ酸配列を含むＶＬ；

配列番号６９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号７０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号７９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号８０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号８９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号９０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号９９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１００のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１０９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１１０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１２０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１４０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１４９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１５０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１６０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１８０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１８９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号１９０のアミノ酸配列を含むＶＬ；
配列番号１９９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２００のアミノ酸配列を含むＶＬ；又は
配列番号２０９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１０のアミノ酸配列を含むＶＬ
を含む、抗体。

【００７７】

［００１９８］　６．実施態様１－５のいずれか一項に記載の抗体であって、
実施態様１（ａ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び／若しくは配列番号１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｂ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｃ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号３１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｄ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号４１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号４２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｅ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号５１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号５２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％

若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｆ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号６１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号６２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｇ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号７１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号７２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｈ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号８１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号８２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｉ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号９１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号９２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｊ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１０２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｋ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｌ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｍ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１３２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｎ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１４２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｏ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１５２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｐ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１６２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｑ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１７２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｒ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１と少なくとも９０％、少なく

とも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１８２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｓ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１９２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｔ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２０２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
実施態様１（ｕ）のＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２１２と少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％若しくは少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含む、抗体。

【００７８】

［００１９９］　７．実施態様１に記載の抗体であって、
配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号４１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号４２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号５１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号５２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号６１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号６２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号７１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号７２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号８１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号８２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号９１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号９２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１０１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１０２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１１１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１２１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１２２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１３１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１３２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１４１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１４２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１５１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１５２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１６１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１６２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；

配列番号１７１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１７２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１８１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１８２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号１９１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；
配列番号２０１のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）及び配列番号２０２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含むか；又は
配列番号２１１のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号２１２のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）を含む、抗体。

【００７９】

［００２００］　８．アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸６１－１０３に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；且つ／又は
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１１１－１５０に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に
血清中に見られるＡＰＯＬ１よりも、ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１を優先的に認識する、単離された抗体。

【００８０】

［００２０１］　９．実施態様８に記載の抗体であって、
（ａ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか；又は
［００２０２］　（ｂ）配列番号１８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００８１】

［００２０３］　１０．アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１０３－１１１に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸１５０－１７２に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸３１４－３３３に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；且つ／又は
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸３７６－３９８に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に
ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１と血清中に見られたＡＰＯＬ１の両方を認識する、単離された抗体。

【００８２】

［００２０４］　１１．実施態様１０に記載の単離された抗体であって、
（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域

（ＶＬ）；
（ｂ）配列番号５３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号５４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号５５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｃ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｄ）配列番号８３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号８４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号８５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号８６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号８７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号８８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｅ）配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号７４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｆ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｇ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は
（ｈ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、単離された抗体。
【００８３】
［００２０５］　１２．アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、
ＡＰＯＬ１　Ｇ０（配列番号２）のアミノ酸２６０－３１４に対応するＡＰＯＬ１の領域に特異的に結合し；更に、ポドサイト上に発現されるＡＰＯＬ１よりも血清中に見られるＡＰＯＬ１を優先的に認識する、単離された抗体。
【００８４】
［００２０６］　１３．実施態様１２に記載の抗体であって、
（ａ）配列番号３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか；又は
（ｂ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列

を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、抗体。

【００８５】

［００２０７］　１４．アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合する単離された抗体であって、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型に優先的に結合する、単離された抗体。

【００８６】

［００２０８］　１５．実施態様１４に記載の抗体であって、

（ａ）配列番号１４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｂ）配列番号１２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は

（ｃ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、抗体。

【００８７】

［００２０９］　１６．アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）に特異的に結合し、（ａ）アポリポタンパク質Ｌ２若しくはＬ３（ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ３）に有意には結合せず、且つ／又は（ｂ）アポリポタンパク質Ｌ２若しくはＬ６（ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ６）に有意には結合しない単離された抗体であって、

（ａ）配列番号１６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；

（ｂ）配列番号１０３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号１０４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号１０５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１０６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号１０７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号１０８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；又は

（ｃ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、抗体。

【００８８】

［００２１０］　１７．抗体がヒト化又はキメラである、実施態様１から５又は８から１６のいずれか１つに記載の抗体。

【００８９】

［００２１１］　１８．ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのＩｇＧ抗体

である、実施態様１から５又は８から１６のいずれか１つに記載の抗体。
【００９０】
［００２１２］　１９．完全長抗体である、実施態様１から１８のいずれか１つに記載の抗体。
【００９１】
［００２１３］　２０．Ｆｖ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ、Ｆａｂ’又は（Ｆａｂ’）$_2$などの抗体断片である、実施態様１から５又は８から１６のいずれか１つに記載の抗体。
【００９２】
［００２１４］　２１．二重特異性若しくは多重特異性抗体であるか又は少なくとも１つの他の分子に共有結合的若しくは非共有結合的にコンジュゲートされている、実施態様１から２０のいずれか１つに記載の抗体。
【００９３】
［００２１５］　２２．少なくとも１つの他の分子と共有結合的又は非共有結合的にコンジュゲートされており、前記少なくとも１つの他の分子は検出標識及び／又は医薬品を構成する、実施態様２１に記載の抗体。
【００９４】
［００２１６］　２３．配列番号２、配列番号２１３及び／又は配列番号２１４のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、実施態様１から２２のいずれか１つに記載の抗体。
【００９５】
［００２１７］　更なる態様では、本明細書の抗ＡＰＯＬ１抗体は、後述のセクション１－６記載される特徴のいずれかを、単独で又は組み合わせて組み込むことができる。本開示による特定の抗体は、上記セクション直下のサブセクションで更に詳細に説明されている。
【００９６】
抗体３．６Ｄ１２
［［００２１８］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号３、４及び５を含む３．６Ｄ１２抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号６、７及び８を含む３．６Ｄ１２抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４、５、６、７及び８を含む、３．６Ｄ１２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。
【００９７】
［００２１９］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少な

くとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号９及び／又は配列番号１０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【００９８】

［００２２０］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３、４及び５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６、７及び８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１２軽鎖フレームワーク領域

に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１１及び／又は配列番号１２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【００９９】

［００２２１］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸１０３－１１１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトＡＰＯＬ１と血清ＡＰＯＬ１の両方を認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、トリパノソーマ溶解をブロックし且つ野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識し、例えば、抗体がポドサイト上と血清中の両方にあるＡＰＯＬ１に結合することを示す。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３及びＡＰＯＬ４を認識するが、ＡＰＯＬ６は認識しないので、ＡＰＯＬ６を他のファミリーメンバーと区別するために使用することができる。

【０１００】

抗体３．３Ｂ６

［００２２２］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１３、１４及び１５を含む３．３Ｂ６抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１６、１７及び１８を含む３．３Ｂ６抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４、１５、１６、１７及び１８を含む、３．３Ｂ６の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１０１】

［００２２３］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５

の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号２０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１９及び／又は配列番号２０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１０２】

［００２２４］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号２１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４及び１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６、１７及び１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号２２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号２２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号２１及び／又は配列番号２２の

フレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１０３】

［００２２５］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトＡＰＯＬ１と血清ＡＰＯＬ１の両方を認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、トリパノソーマ溶解をブロックし且つ野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識し、例えば、抗体がポドサイト上と血清中の両方にあるＡＰＯＬ１に結合することを示す。

【０１０４】

抗体３．７Ｄ６

［００２２６］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号２３、２４及び２５を含む３．７Ｄ６抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号２６、２７及び２８を含む３．７Ｄ６抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、３２４、２５、２６、２７及び２８を含む、３．７Ｄ６の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１０５】

［００２２７］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号２９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番

号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号３０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号２９及び／又は配列番号３０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１０６】

［００２２８］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号３１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２３、２４及び２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２６、２７及び２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号３２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号３１及び／又は配列番号３２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１０７】

［００２２９］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸１５０－１７２のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトＡＰＯＬ１と血清ＡＰＯＬ１の両方を認

識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、トリパノソーマ溶解をブロックし且つ野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識し、例えば、抗体がポドサイト上と血清中の両方にあるＡＰＯＬ１に結合することを示す。いくつかの態様において、抗体は他のＡＰＯＬファミリーメンバーのいずれも認識せず、ＡＰＯＬ１に対して特異的である。

【０１０８】

抗体３．３Ａ８

［００２３０］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号３３、３４及び３５を含む３．３Ａ８抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号３６、３７及び３８を含む３．３Ａ８抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４、３５、３６、３７及び３８を含む、３．３Ａ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１０９】

［００２３１］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号３９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号４０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号３９のアミノ酸配

列を含む重鎖可変領域と、配列番号４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号３９及び／又は配列番号４０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１１０】

［００２３２］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号４１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号３３、３４及び３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号３６、３７及び３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号４２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号４１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号４２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号４１及び／又は配列番号４２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１１１】

［００２３３］　いくつかの態様において、３．３Ａ８抗体は、ＡＰＯＬ１のＭＡＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸２６０－２９４のＭＡＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイト

メトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しないが、ＣＨＯ細胞において安定的に発現したＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ２－６を認識しない。

【０１１２】

抗体３．２Ｃ１１

［００２３４］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号４３、４４及び４５を含む３．２Ｃ１１抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号４６、４７及び４８を含む３．２Ｃ１１抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４、４５、４６、４７及び４８を含む、３．２Ｃ１１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１１３】

［００２３５］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号４９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号５０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号４９及び／又は配列番号５０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１１４】

［００２３６］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつか

の実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号５１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号４３、４４及び４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号４６、４７及び４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号５２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号５１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号５２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号５１及び／又は配列番号５２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１１５】

［００２３７］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＭＡＤとリンカー（Ｌ）部分の間の接合部を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸２９４－３１４のＬ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。

【０１１６】

抗体３．１Ｃ１

［００２３８］いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号５３、５４及び５５を含む３．１Ｃ１抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号５６、５７及び５８を含む３．１Ｃ１抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４、５５、５６、５７及び５８を含む、３．１Ｃ１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１１７】

［００２３９］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号５９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号６０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号５９及び／又は配列番号６０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１１８】

［００２４０］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５

６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号６１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号５３、５４及び５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号５６、５７及び５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号６２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号６１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号６２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号６１及び／又は配列番号６２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１１９】

［００２４１］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のリンカー（Ｌ）部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸３１４－３３３のＬ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ　２、３、４又は６を認識しない。

【０１２０】

抗体３．１Ｃ７

［００２４２］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号６３、６４及び６５を含む３．７Ｃ１抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号６６、６７及び６８を含む３．７Ｃ１抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４、６５、６６、６７及び６８を含む、３．７Ｃ１の重鎖及び軽

鎖ＣＤＲを含む。
【０１２１】
［００２４３］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号６９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号７０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号６９及び／又は配列番号７０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。
【０１２２】
［００２４４］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％

、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号７１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号６３、６４及び６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号６６、６７及び６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号７２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号７１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号７２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号７１及び／又は配列番号７２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１２３】

［００２４５］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のリンカー（Ｌ）部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸３１４－３３３のＬ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。

【０１２４】

抗体３．４Ｇ１０

［００２４６］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号７３、７４及び７５を含む３．４Ｇ１０抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号７６、７７及び７８を含む３．４Ｇ１０抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４、７５、７６、７７及び７８を含む、３．４Ｇ１０の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１２５】

［００２４７］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖Ｃ

ＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号７９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号８０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号７９及び／又は配列番号８０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１２６】

［００２４８］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なく

とも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号８１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号７３、７４及び７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号７６、７７及び７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号８２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号８１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号８２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号８１及び／又は配列番号８２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１２７】

［００２４９］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のリンカー（Ｌ）部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸３２４－３４３のＬ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。

【０１２８】

抗体３．６Ｅ１０

［００２５０］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号８３、８４及び８５を含む３．６Ｅ１０抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号８６、８７及び８８を含む３．６Ｅ１０抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４、８５、８６、８７及び８８を含む、３．６Ｅ１０の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１２９】

［００２５１］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なく

とも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号８９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号９０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号８９及び／又は配列番号９０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１３０】

［００２５２］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号

９１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号８３、８４及び８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号８６、８７及び８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号９２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号９１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号９２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号９１及び／又は配列番号９２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１３１】

［００２５３］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のリンカー（Ｌ）部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸３１４－３３３のＬ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。

【０１３２】

抗体３．３Ｆ７

［００２５４］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号９３、９４及び９５を含む３．３Ｆ７抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号９６、９７及び９８を含む３．３Ｆ７抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４、９５、９６、９７及び９８を含む、３．３Ｆ７の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１３３】

［００２５５］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に

、配列番号１００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号９９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１００軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号９９及び／又は配列番号１００のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１３４】

［００２５６］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１０２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１０１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号９３、９４及び９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号９６、９７及び９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１０２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１０１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１０２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１

０１及び／又は配列番号１０２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１３５】

［００２５７］　いくつかの態様において、抗体は、図１Ｃ及び実施例に示されているように、フローサイトメトリーによって全長（例えば配列番号２）を認識するが任意の個々のドメインを認識しないため、天然ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、過剰発現ポドサイト上のＡＰＯＬ１を認識する。

【０１３６】

［００２５８］　抗体３．７Ｆ５

［００２５９］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号２０３、２０４及び２０５を含む３．７Ｆ５抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号２０６、２０７及び２０８を含む３．７Ｆ５抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４、２０５、２０６、２０７及び２０８を含む、３．７Ｆ５の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１３７】

［００２６０］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号２０９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０

７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号２１０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号２０９及び／又は配列番号２１０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１３８】

［００２６１］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号２１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号２１１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号２０３、２０４及び２０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号２０６、２０７及び２０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２１２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号２１２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２１１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号２１２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号２１１及び／又は配列番号２１２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１３９】

［００２６２］　いくつかの態様において、抗体は、全長ＡＰＯＬ１（例えば配列番号２）を認識するが任意の個々のドメイン（図１Ｃ及び実施例に示されている３．３Ｆ７と

同様）を認識しないため、天然ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも４５％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで測定した場合、過剰発現ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。

【０１４０】

抗体４．１７Ａ５

［００２６３］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１０３、１０４及び１０５を含む４．１７Ａ５抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１０６、１０７及び１０８を含む４．１７Ａ５抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４、１０５、１０６、１０７及び１０８を含む、４．１７Ａ５の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１４１】

［００２６４］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１１０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含むが、配列番号１０９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１１０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１０９及び／又は配列番号１１０のフレームワー

ク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１４２】

［００２６５］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１０９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１１０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１１２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１１１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１０３、１０４及び１０５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１０６、１０７及び１０８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１１２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１１１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１１２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１１１及び／又は配列番号１１２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１４３】

［００２６６］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸１５０－１７２のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなフローサイトメトリーで

測定した場合、野生型ポドサイト上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ２を有意には認識しない。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ４を認識する。いくつかの態様では、抗体は、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３又はＡＰＯＬ６のいずれをも有意には認識しない。したがって、いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１及び／又はＡＰＯＬ４を、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３及び／又はＡＰＯＬ６などの他の関連タンパク質と区別するために使用され得る。

【０１４４】

抗体４．２Ｃ４

［００２６７］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１１３、１１４及び１１５を含む４．２Ｃ４抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１１６、１１７及び１１８を含む４．２Ｃ４抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４、１１５、１１６、１１７及び１１８を含む、４．２Ｃ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１４５】

［００２６８］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１２０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含むが、配列番号１１９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１２０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１１９及び／又は配列番号１２０のフレームワー

ク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１４６】

［００２６９］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１２１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１１３、１１４及び１１５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１１６、１１７及び１１８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１２２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１２１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１２２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１２１及び／又は配列番号１２２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１４７】

抗体４．１２Ｅ５

［００２７０］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１２３、１２４及び１２５を含む４．１２Ｅ５抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１２６、１２７及び１２８を含む４．１２Ｅ５抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４、１５、１２６、１２７及び１２８を含

む、４．１２Ｅ５の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１４８】

［００２７１］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１３０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１２９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１３０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１２９及び／又は配列番号１３０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１４９】

［００２７２］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１２９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１３０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配

列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１３２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１３１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１２３、１２４及び１２５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１２６、１２７及び１２８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１３２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１３１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１３２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１３１及び／又は配列番号１３２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１５０】

［００２７３］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＳＲＡ－ＩＤ部分、例えばアミノ酸３７６－３９８のＳＲＡ－ＩＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＧ０型及びＧ１型を優先的に認識する。したがって、いくつかの態様において、抗体は、Ｇ０型及びＧ１型とＧ２型を区別することができる。

【０１５１】

抗体４．１１Ａ１０

［００２７４］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１３３、１３４及び１３５を含む４．１１Ａ１０抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１３６、１３７及び１３８を含む４．１１Ａ１０抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４、１３５、１３６、１３７及び１３８を含む、４．１１Ａ１０の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１５２】

［００２７５］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少な

くとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１４０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１３９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１４０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１３９及び／又は配列番号１４０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１５３】

［００２７６］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１３９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１４０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列

番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１４２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１４１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３３、１３４及び１３５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１３６、１３７及び１３８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１４２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１４１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１４２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１４１及び／又は配列番号１４２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１５４】

［００２７７］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＳＲＡ－ＩＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸３７６－３９８のＳＲＡ－ＩＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも６０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＧ０型及びＧ１型を優先的に認識する。したがって、いくつかの態様において、抗体は、Ｇ０型及びＧ１型とＧ２型を区別することができる。

【０１５５】

抗体４．１１Ｈ１１

［００２７８］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１４３、１４４及び１４５を含む４．１１Ｈ１１抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１４６、１４７及び１４８を含む４．１１Ｈ１１抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１３、１４、１５、１４６、１４７及び１４８を含む、４．１１Ｈ１１の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１５６】

［００２７９］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤ

Ｒを含み、更に、配列番号１５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１５０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１４９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１５０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１４９及び／又は配列番号１５０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１５７】

［００２８０］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１５２のアミノ酸配列と少な

くとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１５１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１４３、１４４及び１４５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１４６、１４７及び１４８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１５２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１５２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１５１及び／又は配列番号１５２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１５８】

［００２８１］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＳＲＡ－ＩＤ部分、例えばアミノ酸３７６－３９８のＳＲＡ－ＩＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＧ２型よりもＧ０型及びＧ１型を優先的に認識する。したがって、いくつかの態様において、抗体は、Ｇ０型及びＧ１型とＧ２型を区別することができる。

【０１５９】

抗体４．２９Ｃ４

［００２８２］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１５３、１５４及び１５５を含む４．２９Ｃ４抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１５６、１５７及び１５８を含む４．２９Ｃ４抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４、１５５、１５６、１５７及び１５８を含む、４．２９Ｃ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１６０】

［００２８３］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列

を含む重鎖可変領域と、配列番号１６０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１５９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１６０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１５９及び／又は配列番号１６０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１６１】

［００２８４］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１５９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１６０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１６２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配

列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１６１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１５３、１５４及び１５５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１５６、１５７及び１５８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１６２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１６１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１６２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１６１及び／又は配列番号１６２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１６２】

［００２８５］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＳＲＡ－ＩＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸３６４－３７６のＳＲＡ－ＩＤ部分を認識する。これらのアミノ酸は、ポドサイト発現ＡＰＯＬ１と血清ＡＰＯＬ１のいずれにおいても、比較的アクセスしにくいように見える。したがって、いくつかの態様では、抗体は、ポドサイト発現ＡＰＯＬ１又は血清ＡＰＯＬ１のいずれも有意には認識しない。

【０１６３】

抗体５．１７Ｄ１２

［００２８６］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１６３、１６４及び１６５を含む５．１７Ｄ１２抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１６６、１６７及び１６８を含む５．１７Ｄ１２抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４、１６５、１６６、１６７及び１６８を含む、５．１７Ｄ１２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１６４】

［００２８７］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１７０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並

びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１６９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１７０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１６９及び／又は配列番号１７０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１６５】

［００２８８］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１６９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１７０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１７２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１７１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１６３、１６４及び１６５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１６６、１６７及び１６８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１７２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミ

ノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１７１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１７２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１７１及び／又は配列番号１７２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１６６】

［００２８９］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトの表面上の野生型ＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、血清ＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解をブロックする。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を少なくとも４０％ブロックする。いくつかの態様において、抗体は、フローサイトメトリーなどによって、ポドサイト細胞上の内因性ＡＰＯＬ１に結合する。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ２を有意には認識しない。いくつかの態様では、抗体は、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４又はＡＰＯＬ６のいずれをも有意には認識しない。したがって、いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１を、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及び／又はＡＰＯＬ６などの他の関連タンパク質と区別するために使用され得る。

【０１６７】

抗体５．１７Ｈ８

［００２９０］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１７３、１７４及び１７５を含む５．１７Ｈ８抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１７６、１７７及び１７８を含む５．１７Ｈ８抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４、１７５、１７６、１７７及び１７８を含む、５．１７Ｈ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１６８】

［００２９１］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１８０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８

０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１７９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１８０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１７９及び／又は配列番号１８０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１６９】

［００２９２］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１７９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１８０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１８２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１８１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１７３、１７４及び１７５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１７６、１７７及び１７８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１８２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１８１の

アミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１８２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号１８１及び／又は配列番号１８２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１７０】

［００２９３］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸６１－１０３のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、例えばフローサイトメトリーにより、ポドサイトのＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイト細胞上に発現した野生型ＡＰＯＬ１に特異的に結合する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を有意にはブロックしない。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を２０％未満ブロックする。したがって、いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトＡＰＯＬ１を血清ＡＰＯＬ１と区別するために使用され得る。いくつかの態様では、更に本抗体は、ＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３及びＡＰＯＬ４を認識するが、ＡＰＯＬ６は認識しないため、ＡＰＯＬ６を他のファミリーメンバーと区別するために使用され得る。

【０１７１】

抗体５．１１Ｈ２

［００２９４］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１８３、１８４及び１８５を含む５．１１Ｈ１２抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１８６、１８７及び１８８を含む５．１１Ｈ１２抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４、１８５、１８６、１８７及び１８８を含む、５．１１Ｈ１２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１７２】

［００２９５］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１９０のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配

列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１８９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号１９０軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１８９及び／又は配列番号１９０のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１７３】

［００２９６］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１８９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号１９０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１９２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号１９１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１８３、１８４及び１８５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１８６、１８７及び１８８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号１９２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１９１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１９２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列

番号１９１及び／又は配列番号１９２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１７４】

［００２９７］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、アミノ酸６１－１０３のＰＦＤ部分を認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトＡＰＯＬ１を優先的に認識する。いくつかの態様において、抗体は、ポドサイト細胞上に発現した野生型ＡＰＯＬ１に特異的に結合する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を有意にはブロックしない。例えば、いくつかの態様において、抗体は、そのようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を２０％未満又は１０％未満ブロックする。したがって、いくつかの態様において、抗体は、ポドサイトＡＰＯＬ１を血清ＡＰＯＬ１と区別するために使用され得る。

【０１７５】

５．１４Ｄ６抗体

［００２９８］　いくつかの態様において、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体に関し、重鎖可変領域は、配列番号１９３、１９４及び１９５を含む５．１４Ｄ６抗体の重鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、配列番号１９６、１９７及び１９８を含む５．１４Ｄ６抗体の軽鎖ＣＤＲを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４、１９５、１９６、１９７及び１９８を含む、５．１４Ｄ６の重鎖及び軽鎖ＣＤＲを含む。

【０１７６】

［００２９９］　いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２００のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号１９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含むが、配列番号１９９の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は

、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むが、配列番号２００軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から成るが、配列番号１９９及び／又は配列番号２００のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１７７】

［００３００］　いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号１９９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号２００のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、例えば、上記のセクションに記載されているように、重鎖及び／又は軽鎖定常領域を更に含む。いくつかの実施態様では、抗体は、例えばヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４などのヒトＩｇＧ定常領域を含む。他の実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号２０２のアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は９９％の同一のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０１のアミノ酸配列を含む重鎖を含むが、配列番号２０１の重鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様において、抗体は、配列番号１９３、１９４及び１９５の重鎖ＣＤＲ、並びに／又は配列番号１９６、１９７及び１９８の軽鎖ＣＤＲを含み、更に、配列番号２０２のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むが、配列番号２０２軽鎖フレームワーク領域に最大５まで、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。いくつかの実施態様では、抗体は、配列番号２０１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号２０２のアミノ酸配列を含む軽鎖から成るが、配列番号２０１及び／又は配列番号２０２のフレームワーク領域に最大５までのアミノ酸置換、挿入又は欠失、例えば１、２、３、４又は５のアミノ酸置換、挿入又は欠失を有する。

【０１７８】

［００３０１］　いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１のリンカー（Ｌ）部分

を認識する。いくつかの態様において、抗体は、残基３０４－３２３でＡＰＯＬ１を認識する。いくつかの態様において、抗体は、本明細書の実施例に記載されるようなアッセイにおいてトリパノソーマ溶解を有意にブロックする。いくつかの態様では、抗体は、本明細書に記載されるアッセイにおいて、ポドサイト細胞上のＡＰＯＬ１を有意には認識しない。

【０１７９】

１．抗体親和性

［００３０２］　特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、ＡＰＯＬ１に特異的に結合し、ＡＰＯＬ１に対して≦１μＭの解離定数（K_D；親和性）を有することを示す。いくつかの態様において、抗体は、ＡＰＯＬ１に対して≦１００ｎＭ又は≦１０ｎＭの親和性を有し得る。

【０１８０】

［００３０３］　ある態様では、K_Dは、表面プラズモン共鳴を使用して測定することができる。ある態様では、K_Dは、ＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}　Ｔ２００又はＢＩＡｃｏｒｅ^{TM}　８Ｋアッセイなどの（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^{TM}　８Ｋ（ＢＩＡｃｏｒｅ社、ニュージャージー州ピスカタウェイ）を用いたアッセイは、プロテインＡチップ上に固定化した抗体を使用して、２５℃又は３７℃で約３００応答単位（ＲＵ）で実施することが可能である。抗原の１０倍段階希釈液を３７℃のＨＢＳ－Ｐ緩衝液に３０μＬ／ｍｉｎの流量で注入する。代替的には、抗原の１０倍段階希釈液を２５℃のＨＢＳ－Ｐ緩衝液に３０μＬ／ｍｉｎの流量で注入する。会合速度（ｋａ）及び解離速度（ｋｄ）を、１：１ラングミュア結合モデルを使用して計算する（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｓｉｇｈｔ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　バージョン２．０を使用）。平衡解離定数（ＫＤ）は、比率ｋｄ／ｋａとして計算される。

【０１８１】

［００３０４］　別の方法として、K_Dは、放射標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される。一態様では、ＲＩＡは、目的の抗体及びその抗原のＦａｂバージョンを用いて実施される。例えば、抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定シリーズの存在下で、最小濃度の（^{125}Ｉ）標識抗原を用いてＦａｂを均衡化し、その後抗Ｆａｂ抗体コーティングプレートで結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えばＣｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１（１９９９）を参照）。アッセイ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、５μｇ／ｍｌの捕捉抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ　Ｌａｂｓ）を含む５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）で一晩コーティングし、続いて２％（ｗ／ｖ）のウシ血清アルブミンを含むＰＢＳで２－５時間室温（約２３℃）でブロックする。非吸着プレート（Ｎｕｎｃ　＃２６９６２０）において、１００ｐＭ又は２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を目的のＦａｂの段階希釈液と混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：４５９３－４５９９（１９９７）の抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ－１２の評価と一致する）。その後、目的のＦａｂを一晩インキュベートする。但し、確実に平衡状態に達するように、インキュベーションはより長い時間にわたって（例えば約６５時間）継続してもよい。その後、混合物を捕捉プレートに移し、室温で（インキュベートする例えば１時間）。その後、溶液を除去し、０．１％のポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ－２０（登録商標））を含むＰＢＳでプレートを８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ｗｅｌｌのシンチラント（ＭＩＣＲＯＳＣＩＮＴ－２０^{TM}；Ｐａｃｋａｒｄ）を加え、そのプレートをＴＯＰＣＯＵＮＴ^{TM}ガンマカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ）で１０分間カウントする。最大結合の２０％以下が得られる各Ｆａｂの濃度が、競合結合アッセイ使用するために選択される。

【０１８２】

２．抗体断片

［００３０５］　ある特定の態様では、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。
【０１８３】
［００３０６］　ある態様では、抗体断片は、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ又はＦ（ａｂ’）$_2$断片、特にＦａｂ断片である。インタクトな抗体をパパイン消化により、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片が生成される。これは、各々の重鎖と軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨとＶＬ）と、軽鎖の定常ドメイン（ＣＬ）及び重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）を含む。よって、「Ｆａｂ断片」とは、ＶＬドメイン及びＣＬドメインを含む軽鎖と、ＶＨドメイン及びＣＨ１ドメインを含む重鎖断片とを含む抗体断片をいう。「Ｆａｂ’断片」は、ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に抗体ヒンジ領域の１又は複数のシステインを含む残基が付加されたＦａｂ断片と異なる。Ｆａｂ’－ＳＨとは、定常ドメインのシステイン残基）が遊離チオール基を有するＦａｂ’断片である。ペプシン処理により、２つの抗原結合部位（２つのＦａｂ断片）と、Ｆｃ領域の一部とを有するＦ（ａｂ’）$_2$断片が得られる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、且つｉｎ　ｖｉｖｏ半減期が増大されたＦａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$断片の議論については、米国特許第５８６９０４６号を参照のこと。
【０１８４】
［００３０７］　別の態様では、抗体断片は、ダイアボディ、トリアボディ又はテトラボディである。「ダイアボディ」は、２つの抗原結合部位を有する抗体断片であって、二価又は二重特異性であり得る。例えば、ＥＰ第４０４０９７号、国際公開第１９９３／０１１６１号；Ｈｕｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９－１３４（２００３）；及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８（１９９３）を参照されたい。また、トリアボディ及びテトラボディは、Ｈｕｄｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．９：１２９－１３４（２００３）においても説明されている。
【０１８５】
［００３０８］　更なる態様において、抗体断片は単鎖Ｆａｂ断片である。「単鎖Ｆａｂ断片」又は「ｓｃＦａｂ」は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１）、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）、及びリンカーから成るポリペプチドであり、前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、Ｎ末端からＣ末端方向に、以下の順序：ａ）ＶＨ－ＣＨ１－リンカー－ＶＬ－ＣＬ、ｂ）ＶＬ－ＣＬ－リンカー－ＶＨ－ＣＨ１、ｃ）ＶＨ－ＣＬ－リンカー－ＶＬ－ＣＨ１、又はｄ）ＶＬ－ＣＨ１－リンカー－ＶＨ－ＣＬのいずれかを有する。特に、前記リンカーは、少なくとも３０アミノ酸、好ましくは３２から５０の間のアミノ酸から成るポリペプチドである。前記一本鎖Ｆａｂ断片は、ＣＬドメインとＣＨ１ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化されている。更に、これらの単鎖Ｆａｂ断片は、システイン残基（例えば、Ｋａｂａｔ番号付けによる可変重鎖の４４位と可変軽鎖の１００位）の挿入による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化される可能性がある。
【０１８６】
［００３０９］　別の態様では、抗体断片は、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。「単鎖可変断片」又は「ｓｃＦｖ」は、抗体の重鎖（ＶＨ）可変ドメインと軽鎖（ＶＬ）可変ドメインをリンカーで接続した、融合タンパク質である。特に、リンカーは、１０－２５アミノ酸の短いポリペプチドであり、通常、柔軟性のためにグリシンを、また、溶解性のためにセリン又はスレオニンを多く含み、ＶＨのＮ末端とＶＬのＣ末端を（又はその逆）接続させることができる。このタンパク質は、定常領域が取り除かれ、リンカーが導入されているにもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。ｓｃＦｖ断片の総説については、例えば、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ　ａｎｄ　Ｍｏｏｒｅ　ｅｄｓ．，（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ），ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照；また、国際公開第９３／１６１８５号；及び米国特許第５５７１８９４号及び同第５５８７４５８号を参照。

【０１８７】
［００３１０］　別の態様では、抗体断片は単一ドメイン抗体である。「単一ドメイン抗体」とは、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部、又は軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部を含む抗体断片である。特定の態様では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Ｄｏｍａｎｔｉｓ社、マサチューセッツ州ウォルサム；例えば、米国特許第６２４８５１６号を参照されたい）。
【０１８８】
［００３１１］　抗体断片は、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解消化及び組換え宿主細胞（例えば大腸菌）による組換え生産を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製することができる。
【０１８９】
３．キメラ抗体及びヒト化抗体
［００３１２］　ある特定の態様では、本明細書で提供される抗体はキメラ抗体である。いくつのキメラ抗体が、例えば米国特許第４８１６５６７号及びＭｏｒｒｉｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８１：６８５１－６８５５（１９８４）に記載されている。一例として、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、ウサギ又は非ヒト霊長類（サルなど）由来の可変領域）とヒト定常領域とを含む。更なる例として、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合断片も含まれる。
【０１９０】
［００３１３］　特定の態様において、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したまま、ヒトに対する免疫原性を低下させるためにヒト化される。通常、ヒト化抗体は、ＣＤＲ（又はその一部）が非ヒト抗体に由来し、ＦＲ（又はその一部）はヒト抗体配列に由来する１又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、場合によってヒト定常領域の少なくとも一部を含むであろう。いくつかの態様では、ヒト化抗体のいくつかのＦＲ残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、ＣＤＲ残基が由来する抗体）の対応する残基で置換される。
【０１９１】
［００３１４］　ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えばＡｌｍａｇｒｏ　ａｎｄ　Ｆｒａｎｓｓｏｎ，Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｓｃｉ．１３：１６１９－１６３３（２００８）にて総説されており、更に、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３－３２９（１９８８）；Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１００２９－１００３３（１９８９）；米国特許第５８２１３３７号、同第７５２７７９１号、同第６９８２３２１号及び同第７０８７４０９号；Ｋａｓｈｍｉｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　３６：２５－３４（２００５）（特異性決定領域（ＳＤＲ）のグラフティングを記述）；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）、並びにＯｓｂｏｕｒｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　３６：６１－６８（２００５）及びＫｌｉｍｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ，８３：２５２－２６０（２０００）（ＦＲシャッフリングに対する「誘導選択」アプローチを記述）に記載されている。
【０１９２】
［００３１５］　ヒト化に用いることのできるヒトフレームワーク領域には、限定されないが、「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）；軽鎖又は重鎖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に由来するフレームワーク領域（例えば、Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．

Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２）；及びＰｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５１：２６２３（１９９３）を参照）；ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域又はヒトの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）を参照）；及びＦＲライブラリーをスクリーニングして得られたフレームワーク領域（例えば、Ｂａｃａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７２：１０６７８－１０６８４（１９９７）及びＲｏｓｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：２２６１１－２２６１８（１９９６）を参照）が含まれる。

【０１９３】

４．多重特異性抗体

［００３１６］ 特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、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、すなわち、異なる抗原上の異なるエピトープ又は同じ抗原上の異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の態様では、多重特異性抗体は３つ以上の結合特異性を有する。特定の態様において、結合特異性のうちの１つはＡＰＯＬ１に対するものであり、他の特異性は任意の他の抗原に対するものである。特定の実施態様では、二重特異性抗体は、抗原の２つ（又はそれ以上）の異なるエピトープに結合し得る。多重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片として調製されてもよい。

【０１９４】

［００３１７］ 多重特異性抗体を作製するための技術には、限定されないが、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が含まれる（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ ａｎｄ Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ ３０５：５３７（１９８３））及び「ノブ・イン・ホール」操作（例えば、米国特許第５７３１１６８号及びＡｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７０．．２６（１９９７）参照）。非限定的且つ例示的なノブ・イン・ホール置換には、Ｔ３６６Ｗ（ノブ）及びＴ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ（ホール）が含まれる。いくつかの実施態様では、ノブ・イン・ホール置換はＩｇＧ１定常ドメインにある。

【０１９５】

［００３１８］ また、多重特異性抗体は、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利用することによっても作製することができる。例えば、国際公開第２００９／０８９００４号；Ｄｉｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍａｂｓ ９（２）：２１３－２３０（２０１７）を参照されたい。非限定的な例として、２つの重鎖可変領域と２つの軽鎖可変領域を含む二重特異性抗体において、第１の重鎖可変領域はＱ３９Ｅ置換（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み得、第１の軽鎖可変領域はＱ３８Ｋ置換（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み得；第２の重鎖可変領域はＱ３９Ｋ置換（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み得、第２の軽鎖可変領域はＱ３８Ｅ置換（Ｋａｂａｔ番号付け）を含み得る。いくつかの実施態様では、Ｑ３９Ｅ／Ｑ３８Ｋ及びＱ３９Ｋ／Ｑ３８Ｅ置換は、二重特異性抗体の重鎖と軽鎖の誤対合を減少させる。同様に、第１の重鎖定常領域はＳ１８３Ｋ置換（ＥＵ番号付け）を含み得、第１の軽鎖定常領域はＶ１３３Ｅ置換（ＥＵ番号付け）を含み得、第２の重鎖定常領域はＳ１８３Ｅ置換（ＥＵ番号付け）を含み得、第２の軽鎖定常領域はＶ１３３Ｋ置換（ＥＵ番号付け）を含み得る。いくつかの実施態様では、Ｓ１８３Ｋ／Ｖ１３３Ｅ及びＳ１８３Ｅ／Ｖ１３３Ｋ置換は、二重特異性抗体の重鎖と軽鎖の誤対合を減少させる。

【０１９６】

［００３１９］ いくつかの実施態様において、二重特異性抗体は、結合ドメインにおけるＱ３９Ｅ／Ｑ３８Ｋ及びＱ３９Ｋ／Ｑ３８Ｅ置換、並びに定常領域におけるＳ１８３Ｋ／Ｖ１３３Ｅ及びＳ１８３Ｅ／Ｖ１３３Ｋ置換を含む。いくつかの実施態様において、二重特異性抗体は、ノブ・イン・ホール置換と静電的置換の両方を含む。例えば、国際公開第２０１６／１７２４８５を参照されたい（これは、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に援用される）。

【０１９７】
［００３２０］　したがって、いくつかの実施態様において、多特異性抗体が提供され、これは、ａ）第１の重鎖ポリペプチド（Ｈ１）及び第１の軽鎖ポリペプチド（Ｌ１）を含む、第１の抗原に結合する第１の重鎖／軽鎖対と、ｂ）第２の重鎖ポリペプチド（Ｈ２）及び第２の軽鎖ポリペプチド（Ｌ２）を含む、第２の抗原に結合する第２の重鎖／軽鎖対とを含み、ここで、各Ｈ１及びＨ２は重鎖可変ドメイン（ＶＨ）と重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）とを含み、各Ｌ１及びＬ２は軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）と軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）とを含み；Ｈ１のＣＨ１ドメインはＳ１８３（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含み、Ｌ１のＣＬドメインはＶ１３３（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含み；Ｈ１のＶＨドメインはＱ３９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ１のＶＬドメインはＱ３８位にアミノ酸置換を含み、且つ／又はＨ２のＶＨドメインにＱ３９位にアミノ酸置換を含み、Ｌ２のＶＬドメインはＱ３８位にアミノ酸置換を含む（全てＫａｂａｔ番号付け）。いくつかの実施態様において、Ｈ１のＶドメインはＱ３９（Ｋａｂａｔ番号付け）におけるアミノ酸置換を含み、Ｌ１のＶＬドメインはＱ３８（Ｋａｂａｔ番号付け）におけるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施態様において、Ｈ２のＣＨ１ドメインはＳ１８３（ＥＵ番号付け）におけるアミノ酸置換を含み、Ｌ２のＣＬドメインはＶ１３３（ＥＵ番号付け）におけるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施態様において、Ｈ２のＶＨドメインは、Ｑ３９位におけるアミノ酸置換を更に含み、Ｌ２のＶＬドメインはＱ３８位におけるアミノ酸置換を更に含む（Ｋａｂａｔ番号付け）。いくつかの実施態様において、Ｈ１のＣＨ１ドメインはＳ１８３Ｋ変異を含み、Ｌ１のＣＬはＶ１３３Ｅ変異を含み、Ｈ２のＣＨ１はＳ１８３Ｅ変異を含み、Ｌ２のＣＬドメインはＶ１３３Ｋ変異を含む。いくつか実施態様において、Ｈ１のＶＨドメインはＱ３９Ｅ変異を含み、Ｌ１のＶＬドメインはＱ３８Ｋ変異を含み、Ｈ２のＶＨドメインはＱ３９Ｋ変異を含み、Ｌ２のＶＬドメインはＱ３８Ｅ変異を含む（全てＫａｂａｔ番号付け）。
【０１９８】
［００３２１］　多重特異性抗体は、また、２つ以上の抗体若しくは断片の架橋（例えば、米国特許第４６７６９８０号及びＢｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）参照）；ロイシンジッパーを使用した二重特異性抗体の生成（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）及び国際公開第２０１１／０３４６０５号参照）；軽鎖の誤対合問題を回避するための一般的な軽鎖技術の使用（例えば、国際公開第９８／５０４３１号参照）；二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術の使用（例えば、Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）参照）；及び単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用（例えば、Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）参照）；並びに例えばＴｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）に記載されている三重特異性抗体の調製によって作製することができる。
【０１９９】
［００３２２］　例えば「オクトパス抗体」又はＤＶＤ－Ｉｇなど、３つ以上の抗原結合部位を有する操作抗体も本明細書に含まれる（例えば国際公開第２００１／７７３４２号及び同第２００８／０２４７１５号を参照）。３つ以上の抗原結合部位を有する多重特異性抗体の他の例は、国際公開第２０１０／１１５５８９号、国際公開第２０１０／１１２１９３号、国際公開第２０１０／１３６１７２号、国際公開第２０１０／１４５７９２号、及び国際公開第２０１３／０２６８３１号に見出すことができる。二重特異性抗体又はその抗原結合断片には、ＡＰＯＬ１及び別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用性ＦＡｂ（Ｄｕａｌ　Ａｃｔｉｎｇ　ＦＡｂ）」又は「ＤＡＦ」も含まれる（例えば米国特許出願公開第２００８／００６９８２０号及び国際公開第２０１５／０９５５３９号参照）。
【０２００】
［００３２３］　多重特異性抗体はまた、同じ抗原特異性の１又は複数の結合アームに

ドメインクロスオーバーを伴う非対称の形で、すなわちＶＨ／ＶＬドメインを交換することによって（例えば国際公開第２００９／０８０２５２号及び同第２０１５／１５０４４７号参照）、ＣＨ１／ＣＬドメインを交換することによって（例えば国際公開第２００９／０８０２５３号参照）又は完全なＦａｂアームを交換することによって（例えば国際公開第２００９／０８０２５１号、同第２０１６／０１６２９９号参照。また、Ｓｃｈａｅｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ，ＰＮＡＳ，１０８（２０１１）１１８７－１１９１及びＫｌｅｉｎａｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ　８（２０１６）１０１０－２０も参照）提供されてもよい。一態様では、多重特異性抗体はクロスＦａｂ断片を含む。用語「クロスＦａｂ断片」又は「ｘＦａｂ断片」又は「クロスオーバーＦａｂ断片」は、Ｆａｂ断片であって、重鎖及び軽鎖の可変領域又は定常領域のいずれかが交換されているものを指す。クロスＦａｂ断片は、軽鎖可変領域（ＶＬ）と重鎖定常領域１（ＣＨ１）とで構成されるポリペプチド鎖、及び重鎖可変領域（ＶＨ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）とで構成されるポリペプチド鎖を含む。非対称Ｆａｂアームは、荷電又は非荷電アミノ酸変異をドメイン界面に導入して正しいＦａｂ対合を誘導することによって操作することもできる。例えば、国際公開第２０１６／１７２４８５号を参照されたい。

【０２０１】

［００３２４］　多重特異性抗体の様々な更なる分子フォーマットが当技術分野で既知であり、本明細書に含まれる（例えば、Ｓｐｉｅｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　６７（２０１５）９５－１０６参照）。

【０２０２】

［００３２５］　このために有用であり得る二重特異性抗体フォーマットの例には、２つのｓｃＦｖ分子が柔軟なリンカーによって融合されている、いわゆる「ＢｉＴＥ」（二重特異性Ｔ細胞エンゲージャー（ｅｎｇａｇｅｒ））分子（例えば、国際公開第２００４／１０６３８１号、同第２００５／０６１５４７号、同第２００７／０４２２６１号及び同第２００８／１１９５６７号、Ｎａｇｏｒｓｅｎ　ａｎｄ　Ｂａｅｕｅｒｌｅ，Ｅｘｐ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ　３１７，１２５５－１２６０（２０１１）参照）；ダイアボディ（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔ　Ｅｎｇ　９，２９９－３０５（１９９６））及びその誘導体、例えばタンデムダイアボディ（「ＴａｎｄＡｂ」；Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２９３，４１－５６（１９９９））；ダイアボディフォーマットに基づくが、安定化付加のためのＣ末端ジスルフィド架橋を特徴とする「ＤＡＲＴ」（二重親和性再標的化）分子（Ｊｏｈｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　３９９，４３６－４４９（２０１０））、並びに全ハイブリッドマウス／ラットＩｇＧ分子であるいわゆるトリオマブ（triomab）（Ｓｅｉｍｅｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｒｅａｔ　Ｒｅｖ　３６，４５８－４６７（２０１０）に概説）が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に含まれる特定のＴ細胞二重特異性抗体フォーマットは、国際公開第２０１３／０２６８３３号、国際公開第２０１３／０２６８３９号、国際公開第２０１６／０２０３０９号；Ｂａｃａｃ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　５（８）（２０１６）ｅ１２０３４９８に記載されている。

【０２０３】

５．抗体バリアント

［００３２６］　特定の態様では、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列バリアントが企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的性質を変化させることが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列バリアントは、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することにより、又はペプチド合成により調製することができる。このような改変には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び／若しくは置換、並びに／又は該残基への挿入が含まれる。最終的なコンストラクトが抗原結合性などの所望の特性を有するという条件で、最終的なコンストラクトに到達するために、欠失、挿入、置換の任意の組み合わせを行うことができる。

【０２０４】

ａ）置換、挿入、及び欠失バリアント

［００３２７］　特定の態様では、１又は複数のアミノ酸置換を有する抗体バリアントが提供される。置換変異誘発の対象部位には、ＣＤＲ及びＦＲが含まれる。表１において、保存的置換は、「好ましい置換」の見出しの下に示されている。表１において、より実質的な変更は、「例示的な置換」の見出しの下に提供されており、またアミノ酸側鎖クラスを関連して更に以下に記載されるとおりである。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、その生成物を、所望の活性、例えば保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性又は改善されたＡＤＣＣ若しくはＣＤＣについてスクリーニングすることができる。

表１

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;ﾉﾙﾛｲｼﾝ	Leu
Leu(L)	ﾉﾙﾛｲｼﾝ;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;ﾉﾙﾛｲｼﾝ	Leu

【０２０５】

［００３２８］　アミノ酸は共通の側鎖特性に従ってグループ化することができる。

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

（２）中性の親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

（５）鎖配向に影響する残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；

（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０２０６】
［００３２９］　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のメンバーと交換することを伴うことになる。
【０２０７】
［００３３０］　ある種の置換バリアントは、親抗体（例えばヒト化又はヒト抗体）の１又は複数の超可変領域残基を置換することを伴う。一般的には、結果として得られ、更なる研究のために選択されたバリアント（複数可）は、親抗体と比較して、特定の生物学的特性の改変（例えば改善）（例えば親和性の向上、免疫原性の低下）を有し、且つ／又は親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持するであろう。例示的な置換バリアントは親和性成熟抗体であり、これは、例えば本明細書に記載されるようなファージディスプレイベースの親和性成熟技術を用いて、簡便に生成することができる。簡潔に言えば、１又は複数のＣＤＲ残基が変異し、バリアント抗体がファージに表示され、特定の生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングされる。
【０２０８】
［００３３１］　例えば抗体親和性を向上させるために、ＣＤＲにおいて変更（例えば置換）を行ってもよい。このような変更は、ＣＤＲ内の「ホットスポット」、すなわち体細胞成熟過程中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされた残基（例えばＣｈｏｗｄｈｕｒｙ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２０７：１７９－１９６（２００８）を参照）、及び／又は抗原に接する残基内で行うことができ、結果として得られたバリアントＶＨ又はＶＬの結合親和性が試験される。二次ライブラリーから構築し選択し直すことによる親和性成熟が、例えばＨｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．，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態様では、多様性は、様々な方法（例えば、エラープローンＰＣＲ、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指定変異誘発）のいずれかによって、成熟のために選択された可変遺伝子に導入される。その後、二次ライブラリーが作製される。その後、このライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する抗体バリアントを同定する。多様性を導入する別の方法は、複数のＣＤＲ残基（例えば一度に４－６残基）がランダム化されるＣＤＲ指向の手法を含む。抗原結合に関与するＣＤＲ残基は、例えばアラニンスキャニング変異誘発又はモデリングを使用して、特異的に特定され得る。特にＣＤＲ－Ｈ３及びＣＤＲ－Ｌ３が、しばしば標的とされる。
【０２０９】
［００３３２］　特定の態様では、置換、挿入又は欠失は、このような変更が抗体の抗原に結合する能力を実質的に低減させない限り、１又は複数のＣＤＲ内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的な変更（例えば、本明細書で提供されている保存的置換）がＣＤＲ内で行われてもよい。このような変更は、例えば、ＣＤＲ内の抗原接触残基の外側にある場合もある。上述の特定のバリアントＶＨ配列及びＶＬ配列において、各ＣＤＲは変更されていないか又はわずか１、２若しくは３のアミノ酸置換を含むかのいずれかである。
【０２１０】
［００３３３］　変異誘発のために標的とすることができる抗体の残基又は領域を特定するための有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　ａｎｄ　Ｗｅｌｌｓ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１－１０８５によって記載されているように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基又は標的残基群（ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、及びｇｌｕなどの荷電残基）を特定し、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えばアラニン又はポリアラニン）で置換して、抗原と抗体との相互作用が影響を受けているどうかを判定する。最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸の位置に、更なる置換を導入することもできる。代替的に又は追加的に、抗原－抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点を特定することができる。このような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的化しても除去してもよい。バリアントをスクリー

ニングして、それらが所望の特性を含むかどうか判定することができる。
【０２１１】
［００３３４］　アミノ酸配列挿入には、１残基から１００以上の残基を含むポリペプチドまでの長さのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端の融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入物の例には、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入バリアントとしては、抗体の血清半減期を増大させる酵素（例えばＡＤＥＰＴ（抗体指向酵素プロドラッグ療法）用）又はポリペプチドに対する抗体のＮ末端又はＣ末端への融合体が含まれる。
【０２１２】
６．抗体コンジュゲート
［００３３５］　特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、追加のタンパク質又は非タンパク質部分を含むように改変されてもよい。本抗体の誘導体化に適した部分は、限定されないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されないが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、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（ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか）、及びデキストラン又はポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレン（propropylene）グリコールホモポリマー、ポリプロピレン（prolypropylene）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、並びにこれらの混合物が含まれる。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のために製造上の利点を有し得る。このポリマーは任意の分子量のものであってよく、分岐していても分岐していなくてもよい。本抗体に結合するポリマーの数は様々であり、複数のポリマーが結合している場合、それらは同じ分子でも異なる分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、抗体の改善すべき特定の特性又は機能、その抗体誘導体が定義された条件下で治療に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事項に基づいて決定することができる。
【０２１３】
［００３３６］　本発明はまた、細胞傷害性剤、薬物又は放射性同位元素などの１種以上の治療剤にコンジュゲート（化学的に結合）した本明細書の抗体を含むコンジュゲートを提供する。一態様では、コンジュゲートは、例えば抗体が１種以上の治療剤にコンジュゲートしている抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）である。抗体は、典型的には、リンカーを用いて１種以上の治療剤に接続される。ＡＤＣ技術の概要は、Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｒｅｖｉｅｗ ６８：３－１９（２０１６）に記載されている。
【０２１４】
［００３３７］　抗体と別の薬剤とのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばＮ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、イミノチオラン（ＩＴ）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣｌなど）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレートなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビスアジド化合物（ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス－ジアゾニウム誘導体（ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トルエン２，６－ジイソシアネートなど）、及び二活性化（bis-active）フッ素化合物（１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンなど）を使用して作製することができる。例えば、リシンイムノトキシンは、Ｖｉｔｅｔｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３８：１０９８（１９８７）に記載されているようにして調製することができる。炭素－１４－標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示的キレート剤

である。国際公開第９４／１１０２６号を参照のこと。リンカーは、細胞内で細胞傷害性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー（Ｃｈａｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５２：１２７－１３１（１９９２）；米国特許第５２０８０２０号）が使用され得る。

【０２１５】

［００３３８］　本明細書のコンジュゲート又はＡＤＣは、限定されないが、（例えば、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、米国イリノイ州ロックフォードから）市販されているＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ及びスルホ－ＳＭＰＢ、並びにＳＶＳＢ（スクシンイミジル－（４－ビニルスルホン）ベンゾエート）を含むがこれらに限定されない架橋試薬を用いて調製されたコンジュゲートなどが明確に企図されている。

【０２１６】

Ｂ．組換え方法及び組成物

［００３３９］　抗体は、例えば米国特許第４８１６５６７号に記載されているような組換え方法及び組成物を用いて製造することができる。これらの方法のために、抗体をコードする１又は複数の単離された核酸が提供される。

【０２１７】

［００３４０］　天然抗体又は天然抗体断片の場合、２つの核酸が必要であり、１つは軽鎖又はその断片用で、もう１つは重鎖又はその断片用である。このような核酸は、抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び／又はＶＨを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／又は重鎖（複数可））をコードする。これらの核酸は、同じ発現ベクター上にあっても、異なる発現ベクター上にあってもよい。

【０２１８】

［００３４１］　ヘテロ二量体重鎖を有する二重特異性抗体の場合、４つの核酸が必要であり、１つは第１の軽鎖用、１つは第１のヘテロモノマーＦｃ領域ポリペプチドを含む第１の重鎖用、１つは第２の軽鎖用、１つは第２のヘテロモノマーＦｃ領域ポリペプチドを含む第２の重鎖用である。これら４つの核酸は、１又は複数の核酸分子又は発現ベクターに含まれ得る。このような核酸は、抗体の第１のヘテロモノマーＦｃ領域を含む、第１のＶＬを含むアミノ酸配列及び／若しくは第１のＶＨを含むアミノ酸配列、並びに／又は抗体の第２のヘテロモノマーＦｃ領域を含む、第２のＶＬを含むアミノ酸配列及び／若しくは第２のＶＨを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の第１及び／若しくは第２の軽鎖、並びに／又は第１及び／若しくは第２の重鎖）をコードする。これらの核酸は、同じ発現ベクター上にあっても異なる発現ベクター上にあってもよく、通常、これらの核酸は２つ又は３つの発現ベクター上に位置し、すなわち、１つのベクターがこれらの核酸を２つ以上含んでもよい。これらの二重特異性抗体の例は、ＣｒｏｓｓＭａｂである（例えばＳｃｈａｅｆｅｒ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ，ＰＮＡＳ，１０８（２０１１）１１１８７－１１９１を参照されたい）。例えば、ヘテロモノマー重鎖の一方は、いわゆる「ノブ変異」（Ｔ３６６Ｗ、場合によってはこれに加えて、Ｓ３５４Ｃ又はＹ３４９Ｃの一方）を含み、他方は、いわゆる「ホール変異」（Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖ、場合によってはこれらに加えてＹ３４９Ｃ又はＳ３５４Ｃ）（ＥＵ番号付けに従う）を含む（例えばＣａｒｔｅｒ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２（１９９６）７３参照）。

【０２１９】

［００３４２］　ある態様では、本明細書で報告される方法で使用される抗体をコードする単離された核酸が提供される。

【０２２０】

［００３４３］　ある態様では、抗体を作製する方法であって、上記のように提供される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

、任意選択的に、抗体を宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から回収することとを含む方法が提供される。

【０２２１】

［００３４４］　抗体の組換え生産のために、抗体をコードする核酸が、例えば上述のように単離され、宿主細胞内での更なるクローニング及び／又は発現のために、１又は複数のベクターに挿入される。このような核酸は、一般的な手順を用いて（例えば、抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合でき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）容易に単離及び配列決定することができ、或いは組換え法によって製造することも又は化学合成によって得ることも可能である。

【０２２２】

［００３４５］　抗体をコードするベクターのクローニング又は発現に適した宿主細胞は、本明細書に記載の原核生物細胞又は真核細胞を含む。例えば、特に、グリコシル化及びＦｃエフェクター機能が必要ない場合には、細菌内で抗体を生産することもできる。細菌内での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば米国特許第５６４８２３７号、同第５７８９１９９号、及び同第５８４０５２３号を参照。（また、大腸菌における抗体断片の発現を記載しているＣｈａｒｌｔｏｎ，Ｋ．Ａ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８，Ｌｏ，Ｂ．Ｋ．Ｃ．（ｅｄ．），Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ（２００３），ｐ．２４５－２５４も参照）。発現後、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから抗体を単離し、更に精製することも可能である。

【０２２３】

［００３４６］　原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの有用真核微生物が抗体をコードするベクターの適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、これにはグリコシル化経路が「ヒト化」されている真菌類及び酵母株が含まれ、部分的又は完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす。Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ，Ｔ．Ｕ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２２（２００４）１４０９－１４１４；及びＬｉ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２４（２００６）２１０－２１５を参照のこと。

【０２２４】

［００３４７］　（グリコシル化）抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株が同定されており、これらは特にヨトウガ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と併せて使用することができる。

【０２２５】

［００３４８］　植物細胞培養物を宿主として利用することもできる。例えば、米国特許第５９５９１７７号、同第６０４０４９８号、同第６４２０５４８号、同第７１２５９７８号及び同第６４１７４２９号（トランスジェニック植物における抗体生産のためのＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ^{TM}技術を記載）を参照。

【０２２６】

［００３４９］　脊椎動物細胞も宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳類細胞株は、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，Ｆ．Ｌ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．３６（１９７７）５９－７４に記載の２９３細胞又は２９３Ｔ細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）；マウスのセルトリ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ，Ｊ．Ｐ．，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３（１９８０）２４３－２５２に記載のＴＭ４細胞）；サル腎細胞（ＣＶ１）；アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８）；ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２）；マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２）；ＴＲＩ細胞（例えばＭａｔｈｅｒ，Ｊ．Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ

．Ｓｃｉ．３８３（１９８２）４４－６８に記載）；ＭＲＣ５細胞；及びＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７（１９８０）４２１６－４２２０）；並びにＹ０、ＮＳ０及びＳｐ２／０などの骨髄腫細胞株が含まれる。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の総説については、例えばＹａｚａｋｉ，Ｐ．ａｎｄ　Ｗｕ，Ａ．Ｍ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，　Ｖｏｌ．２４８，Ｌｏ，Ｂ．Ｋ．Ｃ．（ｅｄ．），Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ（２００４），ｐｐ．２５５－２６８を参照。

【０２２７】

［００３５０］　ある態様において、宿主細胞は、真核生物、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞又はリンパ球細胞（例えばＹ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。

【０２２８】

Ｃ．アッセイ

［００３５１］　本明細書で提供される抗ＡＰＯＬ１抗体は、様々なアッセイによってその物理的／化学的性質及び／又は生物学的活性について特定、スクリーニング又は特徴付けされ得る。

【０２２９】

［００３５２］　一態様において、本発明の抗体は、例えばＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット等の既知の方法により、その抗原結合活性について試験される。抗体のポドサイトへの結合は、例えば、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、免疫組織化学（ＩＨＣ）、免疫沈降、フローサイトメトリー又はウェスタンブロッティングによって試験することができる。ポドサイトとＨＤＬ粒子との間の結合を区別するために、天然状態のＡＰＯＬ１を用いて、例えばフローサイトメトリー又は免疫沈降法で結合を試験してもよい。固定化及び／若しくは透過化又は変性ウェスタンブロットでの変性後、異なるＡＰＯＬ１エピトープが露出するようになる。

【０２３０】

［００３５３］　血清中、すなわちＨＤＬ粒子上のＡＰＯＬ１への抗体の結合は、例えば、トリパノソーマ溶解をブロックする抗体の能力を報告する本明細書の実施例に記載されているアッセイによって、試験することができる。このアッセイは、上記及び実施例においてより詳細に説明されている。このアッセイは、例えばサンプルにおいて、存在するＡＰＯＬ１がＨＤＬ粒子上に露出する程度を決定するために使用することができる。

【０２３１】

［００３５４］　また、研究者の興味に応じて、上記の任意のアッセイを組み合わせることも可能である。

【０２３２】

Ｄ．診断及び検出のための方法及び組成物

［００３５５］　特定の態様において、本明細書に提供される抗体はいずれも、生物学的サンプル中のＡＰＯＬ１などの標的の存在を検出するのに有用である。本明細書において使用される「検出」という用語は、定量的又は定性的検出を包含する。特定の態様では、生物学的サンプルは、ポドサイト細胞を含むサンプルなど、細胞又は組織を含む。

【０２３３】

［００３５６］　特定の態様では、方法は、抗体のＡＰＯＬ１への結合を許容する条件下で、生物学的サンプルを本明細書に記載の抗ＡＰＯＬ１抗体と接触させることと、抗体と抗原の間に複合体が形成されているか否かを検出することとを含む。このような方法は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ法又はｉｎ　ｖｉｖｏ法であり得る。特定の態様において、検出方法は、サンプル中のポドサイト細胞に関連する内因性ＡＰＯＬ１の発現を決定することを含む。このようなアッセイには、ＡＰＯＬ１をＡＰＯＬ２、ＡＰＯＬ３、ＡＰＯＬ４及びＡＰＯＬ６の１又は複数のような他のＡＰＯＬ形態と区別する抗ＡＰＯＬ１抗体、例えば５

．１７Ｄ２、４．１７Ａ５、３．１Ｃ１及び３．７Ｄ６のＣＤＲを含む抗体などを使用することができる。これらのタンパク質を区別しない他の抗体、例えば３．６Ｄ１２又は５．１７Ｈ８のＣＤＲを有する抗体も、コントロールとしてこのようなアッセイに使用される可能性がある。いくつかのアッセイでは、ポドサイト上のＡＰＯＬ１に特異的に結合するが、血清中のＡＰＯＬ１には有意には結合しないか又は本明細書に記載のトリパノソーマ溶解をブロックする抗体が使用され得る。一部のアッセイでは、ＡＰＯＬ１のＧ０型及びＧ１型とＧ２型とを区別できる抗体、例えば、４．１１Ａ１０、４．１２Ｅ５又は４．１１Ｈ１１のＣＤＲを有する抗体を用いて、ＡＰＯＬ１　Ｇ２がポドサイト上に存在するかどうかを判定することが望ましい場合がある。ポドサイト上のＡＰＯＬ１を検出するために用いられるアッセイには、例えば、フローサイトメトリー、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）、免疫細胞化学（ＩＨＣ）、免疫沈降、ウェスタンブロット等が含まれ得る。いくつかの態様において、血清中に、例えばＨＤＬ粒子上に見られるＡＰＯＬ１を検出するために、本明細書に記載のように、トリパノソーマ溶解アッセイを使用してもよい。

【０２３４】

［００３５７］　特定の態様において、標識された抗ＡＰＯＬ１抗体は、そのようなアッセイに提供される。標識には、限定されないが、（例えば蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、放射性標識等の）直接検出される標識又は部分、及び、例えば酵素反応又は分子間相互作用を介して間接的に検出される酵素又はリガンドなどの部分が含まれる。例示的な標識には、限定されないが、ラジオアイソトープ^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉ、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシェフェラーゼ、例えばホタルルシェフェラーゼ及び細菌ルシェフェラーゼ（米国特許第４７３７４５６号）、ルシェフェリン、２，３－ジヒドロフタルジネジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリフォスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ）、色素前駆体（例えばＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ又はマイクロペルオキシダーゼ等）を酸化させるため過酸化水素を利用し、酵素とカップリングさせた複素環式オキシダーゼ（例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ）、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定な遊離ラジカル等が含まれる。他の態様では、本明細書の抗体は標識されていないが、例えば、標識を組み得る二次抗体又は他の分子の色若しくは状態を変化させることにより標識として作用することができる二次抗体によって認識される。

【０２３５】

Ｇ．製造品

［００３５８］　本発明の別の態様では、上記の診断アッセイに有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、将来の使用のために例えば凍結乾燥で保存されているか又は緩衝液及び安定剤などの他の成分を含む液体製剤中で保存されている本明細書の抗体の少なくとも１つを含む、組成物又はキットであってよい。製造品は、標識試薬など、抗体を用いたアッセイの実施に有用な他の試薬を更に含んでもよい。製造品は、容器と、容器上又は容器に付随するラベルを含んでいてもよい。

【０２３６】

ＩＩＩ．実施例

［００３５９］　以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上に提供された一般的な説明を前提として、他の様々な実施態様が実施され得ることが理解される。

【０２３７】

実施例１：ドメイン特異的抗体は、血清及びポドサイトにおけるＡＰＯＬ１の膜トポロジーの違いを明らかにする

［００３６０］　循環ＡＰＯＬ１（アポリポタンパク質Ｌ１）の２つバリアントであるＧ１及びＧ２は、ブルーストリパノソーマの亜種の感染を防ぐが、同時に慢性腎臓病のリ

スクを高める。腎臓病に冒されたＨＤＬ粒子中又はポドサイト細胞上のＡＰＯＬ１のトポロジーについては、ほとんど知られていない。本発明者らは、ＡＰＯＬ１の長さに沿って抗体を生成することにより、どのドメインが露出しているかを特定し、血清とポドサイト表面のＡＰＯＬ１トポロジーに違いを見出した。これらは、生理学的設定におけるＡＰＯＬ１のコンフォメーションに関する最初の直接的な知見であり、ＡＰＯＬ１腎症に対するＡＰＯＬ１標的薬に影響を及ぼす。

【０２３８】

［００３６１］　循環アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）は、トリパノソーマ溶解因子であり、ヒトの睡眠病を防ぐ。アフリカで一般的なＡＰＯＬ１の２つのバリアントであるＧ１及びＧ２は、野生型に耐性のあるトリパノソーマの種を防御するように進化したが、どういうわけかでヒトを特定の慢性腎臓病（ＣＫＤ）にさせる。但し、ＡＰＯＬ１媒介性腎臓ポドサイト損傷の正確なメカニズムは、ＡＰＯＬ１の細胞内局在性や、それがトリパノソーマ溶解におけるＡＰＯＬ１の役割に関連しているかどうかも含めて、まだ明らかになっていない。フローサイトメトリー、免疫沈降、及びトリパノソーマ溶解アッセイにより血清（ＨＤＬ粒子）及び腎臓ポドサイトにおけるＡＰＯＬ１のトポロジーをマッピングするために、１７０のＡＰＯＬ１ドメイン特異的モノクローナル抗体を生成し、また、抗体の特異性を確認するためにＡＰＯＬ１ノックアウトポドサイトも生成した。その結果、ＡＰＯＬ１は腎臓ポドサイトの細胞表面に局在し、孔形成ドメイン（ＰＦＤ）と血清抵抗性関連相互作用ドメイン（ＳＲＡ－ＩＤ）のＣ末端とがほとんど露出し、膜アドレッシングドメイン（ＭＡＤ）は露出していないことが示された。一方、トリパノソーマ溶解ブロッキング活性の違いから、血清ＡＰＯＬ１ではＭＡＤが露出し、アクセス可能なＰＦＤが少ないことが明らかになった。血清中又はポドサイト上のＡＰＯＬ１の肉眼的トポロジーは、検出可能なほどには低ｐＨによって変化していなかった。これらの抗体により、生理学的に適切な膜における天然のＡＰＯＬ１のトポロジーを調べることができ、血清中と当該細胞表面とで異なるコンフォメーションを有することが明らかになった。この結果は、ＡＰＯＬ１のリスクバリアントを介したポドサイト傷害の表面イオンチャネルモデルに信頼性を与えるとともに、ＡＰＯＬ１を標的とした治療薬を設計するためのドメインアクセス可能性情報を提供する。

【０２３９】

［００３６２］　アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）は、ヒト血清中のトリパノソーマ溶解に関与する成分であり（参考文献１－３）、ＡＰＯＬ１－６遺伝子群の中で唯一シグナル配列を持ち、そのため循環系に分泌される。循環ＡＰＯＬ１は、ブルーストリパノソーマに対する抵抗性を付与し、アフリカ睡眠病からヒトを守る（１）。ＡＰＯＬ１は、ヒト血清中ではＡＰＯＡ１及びハプトグロビン関連タンパク質（ＨＰＲ）と２つの複合体を形成して存在する。トリパノソーマ溶解因子１（ＴＬＦ１）はリポタンパク質粒子（ＨＤＬ３ｂ）であり、一方ＴＬＦ２は脂質に乏しいがＩｇＭを含む（６－８）。ＴＬＦ１／ＨＤＬ粒子がＴｂＨｐＨｂ受容体を介してトリパノソーマに内在化すると（又はこの受容体とは無関係にＴＬＦ２が内在化すると）、ＡＰＯＬ１が低ｐＨのリソソーム膜に挿入されて浸透膨潤し、最終的にトリパノソーマ溶解に至る（６，９－１２）。ＡＰＯＬ１は、トリパノソーマ溶解における推定上の役割にちなんで名付けられた３つのドメイン：孔形成ドメイン（ＰＦＤ）、膜アドレッシングドメイン（ＭＡＤ）、及びＳＲＡ相互作用ドメインを有する（１）。ＡＰＯＬ１の２つのコーディングバリアント（Ｇ１とＧ２）は、ブルセイトリパノソーマの様々な亜種に対する耐性を提供するように進化した（３、１１、１３）が、アフリカ系移民（African diaspora）の慢性腎臓病のリスク増加と強く関連する（１４－１５）。腎疾患は、循環ＡＰＯＬ１ではなく、腎ポドサイト（ＡＰＯＬ１腎症で影響を受ける細胞種）内の内因性ＡＰＯＬ１バリアントによって引き起こされると考えられている（１６－２０）。ＡＰＯＬ１はトリパノソーマと哺乳類細胞の両方でイオンチャンネルとして働くことが提案されているが、その位置とイオンの性質についてはまだ議論があり、同じメカニズムが両方の種において機能するかどうかは不明である（２１－２２、３６）。更に、ポドサイト膜又はＨＤＬ粒子におけるＡＰＯＬ１のトポロジー

に関してもほとんど知られていない。更に、内因性ＡＰＯＬ１がポドサイトの細胞表面に見られるどうかも立証されていない。

【０２４０】

［００３６３］　ポドサイトと血清関連ＡＰＯＬ１両方の特徴をより良く理解するために、本発明者らはＡＰＯＬ１に対する１７０の抗体を生成した。本発明者らは２つの型のＡＰＯＬ１について異なるトポロジーを発見し、ＡＰＯＬ１腎症のためのＡＰＯＬ１結合薬によって標的となる可能性のある領域を特定した。

【０２４１】

材料及び方法

組換えＡＰＯＬ１生成

［００３６４］　免疫化のためのＨｉｓ$_6$－ＡＰＯＬ１：ヒトＡＰＯＬ１（ＮＭ＿００３６６１）ａａ　６１－３９８（全てのスプライスアイソフォームが確実に認識されるようにするため）を、Ｎ末端ｈｉｓ$_6$タグと共にバキュロウイルス細胞内発現ベクター（ｐＢｉＮＴＨ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）にサブクローニングし、１０ｌ　Ｓｆ９細胞内に発現させた。細胞ペレットを、プロテアーゼ及びプロテアソーム阻害剤ＭＧ１３２を含むＴｒｉｓ緩衝液で洗浄し、その後、２ｘ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ　１１８３６１５３００１）を含むＴｒｉｓ緩衝液中１％Ｚｗｉｔｔｅｒｇｅｎｔ　３－１４とプロテアソーム阻害剤ＭＧ１３２で溶解した。それを３ｍｌ　ＮｉＮＴＡカラム、続いてＳ２００カラムで精製した。ＮｉＮＴＡ緩衝液Ａ及びＢは１％Ｚｗｉｔｔｅｒｇｅｎｔ　３－１４及びＣｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤を含み、Ｓ２００緩衝液は０．１％ＤＤＭ（ｎ－ドデシルＢ－Ｄ　マルトシド、Ｓｉｇｍａ）を含んでいる。Ｓ２００画分は全長と分解産物に対応する３つの主要なバンドを示したため（図１０Ａ、Ｂ）、この後のプレップではＦＬＡＧ－ＡＰＯＬ１を用いた改良された方法使用された（下記参照）。４つのプレップ（各画分Ｂ１－Ｃ１）から溶出したタンパク質をプールし、２００ｍＭアルギニン、１３７ｍＭスクシネート、０．０２６％ＤＤＭに配合し（ｐＨ５）、アリコートとして－８０℃で保存した。

【０２４２】

［００３６５］　トリパノソーマ溶解アッセイ用ＦＬＡＧ－ＡＰＯＬ１：ヒトＡＰＯＬ１（ＮＭ＿００３６６１）ａａ　６１－３９８（「全長」）又は抗体マッピングのための切断コンストラクトａａ　６１－２０３、９２－３２１、６１－２６０及び８８－３２１（図２０参照）をバキュロウイルス細胞内発現ベクター（ｐＢｉＮＴＦ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）にサブクローニングし、Ｎ末端ＦＬＡＧタグを得た。Ｓｆ９細胞の２リットル培養物からのペレットを、Ｃｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤（Ｒｏｃｈｅ　１１８３６１５３００１）を含む５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２００ｍＭ　ＮａＣｌ（ｐＨ７．５）（緩衝液Ｂ）に再懸濁させ、マイクロ流路に入れた（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｚｅｄ）。ＤＤＭ（Ａｎａｔｒａｃｅ　Ｄ３１０ＬＡ）を最終濃度１％になるように加え、４℃で３時間撹拌した。細胞破片を遠心分離により除去した（５０，０００　ｘｇで４５分）。緩衝液Ｂ中、ＦＬＡＧ－ＡＰＯＬ１を５ｍｌの抗ＦＬＡＧアフィニティーカラムで精製し、１００ｍＭ酢酸、２００ｍＭ　ＮａＣｌで溶出し、その後Ｓ２００カラムで精製した（図１０Ｃ）。ｐＨを１．５体積の１Ｍ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）で速やかに中和した。使用した全ての緩衝液は、０．０２６％ＤＤＭとＣｏｍｐｌｅｔｅプロテアーゼ阻害剤を含んでいた。溶出したタンパク質画分（全長で１９－２１）をプールし、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．５）、２００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０２６％ＤＤＭに配合した。アリコートを－８０℃で保存した。

【０２４３】

ＡＰＯＬ１マッピングペプチド

［００３６６］　ＡＰＯＬ１（図２０）の長さに沿ったペプチド（約２０ｍｅｒ）を、標準的な固相Ｆｍｏｃ化学法を用いて合成し、逆相ＨＰＬＣで精製した（２３）。

【０２４４】

抗体生成

［００３６７］　ＨＴＶ（高圧での尾静脈注射）によるＤＮＡ送達法＃１では、１０頭

のＢａｌｂ／ｃマウスに、ｐＣＡＧＧベクター中のＡＰＯＬ１－Ｇ１又はＧ２　ｃＤＮＡをｍＧＭ－ＣＳＦアジュバントと共にそれぞれ６回（隔週で５０μｇ）免疫した（２４）。方法＃２では、ｍＧＭ－ＣＳＦ及びｐＯＲＦｍｏＦｌｔ３Ｌアジュバントと共にＧｅｎｅＧｕｎで送達された同じｃＤＮＡで１６回（隔週で０．３μｇ）免疫した５頭のＢａｌｂ／ｃマウスを使用した（２５）。方法＃３では、５頭のＢａｌｂ／ｃマウスの３セットに、次の３つのプロトコールのうちの１つでそれぞれhis_6－ＡＰＯＬ１－Ｇ０を免疫した：ａ）ＲＩＢＩアジュバントと共に１０μｇを週２回、１６回投与（最高力価になる）；ｂ）ＣＦＡ／ＩＦＡアジュバントと共に５０μｇを隔週、７回投与；ｃ）ＴＬＲカクテルと共に１０μｇを週２回、１６回投与。方法＃４では、方法＃３の低力価マウスのうち６頭を、ＲＩＢＩアジュバントと共にhis_6－ＡＰＯＬ１－Ｇ０　ＳＲＡ－ＩＤ（ａａ　３０５－３９８）で６倍ブーストし、ＳＲＡ－ＩＤ結合抗体を強化した。１５，０００以上のＩｇＧ陽性ハイブリドーマ（ＣｌｏｎｅＤｅｔｅｃｔ陽性ハイブリドーマ）をhis_6－ＡＰＯＬ１－Ｇ０の標準ＥＬＩＳＡでスクリーニングし（データは示さず）、各接種から得られた陽性抗体には、使用した免疫戦略を示す接頭辞１－４を付けた（表２Ａに要約）。ウサギモノクローナル生産（方法＃５）は、付随する後述の実施例に記載されている。

【０２４５】

［００３６８］　表２Ａ：マウスに注射したＡＰＯＬ１－Ｇ１とＧ２　ｃＤＮＡを使用してＡＰＯＬ１バリアント特異的抗体を生成する試みはあまり成功せず、当該バリアントに加えてＡＰＯＬ１－Ｇ０にも結合する弱いＡＰＯＬ１結合性モノクローナル抗体４つしか得られなかった（方法１＆２）。タンパク質を注射すると（方法３－５）、より良い結果が得られた（詳細は上記を参照）。ウサギモノクローナル生成（方法５）の詳細については、後述の実施例２を参照されたい。his_6－ＡＰＯＬ１－Ｇ０の特徴付けについては、図１０を参照のこと。略語：ＨＴＶ　ｈｙｄｒｏｄｙｎａｍｉｃ　ｔａｉｌ　ｖｅｉｎ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ：ハイドロダイナミック尾静脈注入法；Ｉ．Ｖ．　ｉｎｔｒａｖｅｎｏｕｓ：静脈注射。

ａ）表２Ａ

免疫化方法（及びAb前固定）	抗原	方法(宿主種)	ELISA陽性抗体
1	APOL1-G1及びG2 DNA	HTV（ﾏｳｽ)	3
2	APOL1-G1及びG2 DNA	GeneGun（ﾏｳｽ)	1
3	His_6-APOL1-G0ﾀﾝﾊﾟｸ質	I.V.（ﾏｳｽ)	105
4	His_6-APOL1-G0ﾀﾝﾊﾟｸ質+SRA-ID-G0ﾌﾞｰｽﾄ	I.V.(ﾏｳｽ)	26
5	His_6-APOL1-G0ﾀﾝﾊﾟｸ質	I.V.(ｳｻｷﾞ)	35

【０２４６】

抗体クローニング

［００３６９］　ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞上のＦＡＣＳシグナルが強いか若しくは全くないか、及び／又はトリパノソーマ溶解をブロックする能力について各ドメインから選択した３５のマウス抗体をＤＮＡクローニングのために選択し、スケールアップと更なる分析のためにＣＨＯ細胞で発現させた。オリジナルのハイブリドーマは破棄した。ベクターは、過去に記載されたように（２６－２７）、エフェクターのない（effectorless）Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｐ３２９Ｇ（ＬＡＬＡＰＧ）変異を有するマウスＩｇＧ２ａ骨格であった（２６－２７）。クローニングされた抗体のうち２２は、ＥＬＩＳＡ法でＡＰＯＬ１を認識することに成功した。また、上位のクローン化マウス抗体のうちいくつかは、ウサギ又はラットの骨格（backbone）を用いて再フォーマット化された。（後述の実施例２参照。）

【０２４７】

細胞株

［００３７０］　ＡＰＯＬ１を安定的に発現するＣＨＯ細胞（ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ）をレンチウイルス感染により作製した。Ｇ０の配列（参照配列ＮＭ＿００３６６１）をコードするＡＰＯＬ１　ｃＤＮＡを、そのまま（ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ）クローンイングするか、又はＮ末端のｇＤエピトープタグとＣ末端のＧＰＩアンカー配列（ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩ－ＣＨＯ又その切断変異体）と共にクローニングして、ｐＩｎｄｕｃｅｒ２０ベクターに挿入し、ＨＥＫ－２９３細胞に感染させてレンチウイルス株を生成した（２８）。ＣＨＯ細胞にＡＰＯＬ１発現レンチウイルスを感染させ、ウェスタンブロッティング及びＦＡＣＳにより発現を分析した。

【０２４８】

［００３７１］　ヒト不死化ポドサイト（ＡＢ　８／１３）は、Ｍｏｉｎ　Ｓａｌｅｅ

ｍ教授のライセンスに基づき入手した（２９）。これらを、３３℃で、新鮮な成長培地：１０％ＦＢＳ（Ｓｅｒａｄｉｇｍ ＩＸＬ９／０６８０７／ＧＥＮ）、１％グルタミン（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ １５１４０－１２２）、１％ＩＴＳ（インスリン、トランスフェリン、セレン；Ｇｉｂｃｏ ４１４００－０４５）を含むＲＰＭＩを週に２－３回供給して成長させた。

【０２４９】

［００３７２］ ウェブサイト「ｃｒｉｓｐｒ（ｄｏｔ）ｍｉｔ（ｄｏｔ）ｅｄｕ．」に記載されたＺｈａｎｇラボ設計ツールを使用して、ＡＰＯＬ１ ＫＯ細胞株を生成する。（Ｈａｅｕｓｓｌｅｒ，Ｍ．；Ｓｃｈｏｎｉｇ，Ｋ．；Ｅｃｋｅｒｔ，Ｈ．；Ｅｓｃｈｓｔｒｕｔｈ，Ａ．；Ｍｉａｎｎｅ，Ｊ．；Ｒｅｎａｕｄ，Ｊ．Ｂ．；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ－Ｍａｕｎｏｕｒｙ，Ｓ．；Ｓｈｋｕｍａｔａｖａ，Ａ．；Ｔｅｂｏｕｌ，Ｌ．；Ｋｅｎｔ，Ｊ．；Ｊｏｌｙ，Ｊ．Ｓ．；Ｃｏｎｃｏｒｄｅｔ，Ｊ．Ｐ．，Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｆｆ－ｔａｒｇｅｔ ａｎｄ ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ ｓｃｏｒｉｎｇ ａｌｇｏｒｉｔｈｍｓ ａｎｄ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ ｉｎｔｏ ｔｈｅ ｇｕｉｄｅ ＲＮＡ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ｔｏｏｌ ＣＲＩＳＰＯＲ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌ ２０１６，１７（１），１４８も参照。）

【０２５０】

［００３７３］ ガイドＲＮＡは、単一のｇＲＮＡを用いた単純な挿入欠損（ｉｎｄｅｌ）戦略が失敗したため、エクソン１及びエクソン７を標的として設計され（図１２）、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔによって合成された。ｐＵＣ＿ＡＩＯ＿ＥＦ１Ｔ２ｃａｓ９ベクター中のＣａｓ９－ＧＦＰ及び対のガイドを共発現するように設計したカスタムプラスミドを、Ｆｕｇｅｎｅ™ ６（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｅ２６９１）を使用してＷＴポドサイトにトランスフェクトした。ＧＦＰシグナルに基づき、トランスフェクタントを単一細胞クローンに選別した。使用したガイドにちなんで名付けられた１２の単一細胞クローン（各２－３クローン）を、ウェスタンブロッティングによりＡＰＯＬ１タンパク質の喪失について分析した。８９４０１－１、８９４０１－３、９０１０９－２、及び９０１１１－１の４つの単一細胞クローンのノックアウトに成功した。クローン８９４０１－３は、親ポドサイト集団と同様の成長及び形態的品質を示し、詳細な特徴付けのために選択された（データは示されていない）。

【０２５１】

［００３７４］ ｉＡＰＯＬ１（ｄｏｘ誘導性ＡＰＯＬ１）ポドサイトについては、タグなしＡＰＯＬ１アイソフォームＡ ｃＤＮＡ（Ｏｒｉｇｅｎｅ ＳＣ１０９９４１）をカスタムｄｏｘ誘導性ＰｉｇｇｙＢａｃベクター（ＰＢ ｉｎｄｕ ＡＰＯＬ１ Ｔ２ ｍＣｈｅｒｒｙ ｐｇｋ ｐｕｒｏ、ｍＣｈｅｒｒｙを除去）に再クローニングし、ＧｅｎｅＪｕｉｃｅ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ ７０９６７）を用いてＰｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼ（ｐＢＯ、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ社）でＡＰＯＬ１ ＫＯクローン８９４０１－３ポドサイトにコトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞は、５μｇ／ｍｌのピューロマイシンで２週間トランスフェクションしてから４８時間後に選択された。ｉＡＰＯＬ１発現細胞のプールから、限界希釈法を用いて単一細胞クローンを作製した。全てのクローンは、テトラサイクリンフリーＦＢＳ（ＴａＫａＲａ ６３１１０１）及び５μｇ／ｍｌピューロマイシン（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ ６３１３０５）を用いた以外は、上記のようにポドサイト培地に３３℃にて維持された。

【０２５２】

［００３７５］ ＪＨＨ－１（ヒト肝細胞癌）、７８６－Ｏ（ヒト腎臓腺癌）及びＨＣＣ８２７（ヒト肺腺癌）細胞は、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ社の細胞リポジトリ（ＳＴＲ分析で株を検証し、マイコプラズマがないことをチェックする）から入手し、１０％ＦＢＳ、１％ＨＥＰＥＳ及び２ｍＭグルタミンを加えたＲＰＭＩ－１６４０で生育した。

【０２５３】

フローサイトメトリー

［００３７６］　５ｍＭ　ＥＤＴＡを含むＰＢＳ中で細胞を回収し、生育培地で１回、ＰＢＳで２回洗浄した。ＰＢＳに再懸濁させた約０．５×１０^{6}／ｍｌの細胞を、抗ＡＰＯＬ１抗体と共に氷上で１時間インキュベートした。２回のＰＢＳ洗浄後、２μｇ／ｍｌのＡｌｅｘａ４８８抗マウス又は抗ウサギ（それぞれＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ａ１１０２９及びＡ２１２０６）を用いて、氷上で１時間検出を行った。細胞をＰＢＳで２回洗浄し、１μｇ／ｍｌのヨウ化プロピジウムを加えたＰＢＳに再懸濁させた。ＦＡＣＳＣｅｌｅｓｔａを使用した図８と図１４を除いて、シグナルはＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ３（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で読み取られ、データはＦｌｏｗＪｏｖ８．４．５を使用して分析された。平均蛍光強度は、二次抗体単独のバックグラウンドの減算後、ＰＲＩＳＭ　ｖ７でプロットした。低ｐＨの実験では、細胞をＰＢＳ（ｐＨ７．０）又はＰＢＳ（ｐＨ５．５）の存在下で氷上１時間インキュベートし、中性ｐＨで二次抗体を用いて検出した。

【０２５４】

ウェスタンブロッティング

［００３７７］　細胞ライセートを、天然ＲＩＰＡ（ＮＰ－４０）溶解緩衝液（１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８）、１％ＮＰ－４０、１ｍＭ　ＰＭＳＦ及び１ｘ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　Ｐｒｏｔｅａｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｓ（Ｒｏｃｈｅ　１８３６１５３００１））を用いて調製した。タンパク質濃度はＢＣＡアッセイ（Ｐｉｅｒｃｅ　２３２２５）を用いて決定した。細胞ライセートをＭＯＰＳ緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＮＰ０００１）中、４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＮＰ０３２２０）上で泳動させ、ｉＢＬＯＴ２を使ってニトロセルロース膜に転写した。特に明記しない限り、分子量の決定には、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｐｌｕｓタンパク質Ｋａｌｅｉｄｏｓｃｏｐｅマーカー（ＢｉｏＲａｄ　＃１６１０３７５）を使用した。５％スキムミルク含有ＴＢＳＴ（０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０入りトリス緩衝生理食塩水）でブロックした膜を、１－２．５μｇ／ｍｌの一次抗体と共に４℃で一晩インキュベートした。３回のＴＢＳＴ洗浄後、二次抗体として抗マウス（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＮＡ９３１Ｖ、１：３０００）又は抗ラビットＨＲＰ（Ｊａｃｋｓｏｎ　７１１－０３６－１５２、１：８０００）を添加した。１時間後、膜を洗浄し、ＭＲフィルム（Ｋｏｄａｋ）に露光したＥＣＬプライム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　ＲＰＮ２２３２）を用いてタンパク質を検出した。抗アクチンＨＲＰコンジュゲート抗体（クローン１３Ｅ５、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　５１２５Ｓ、１：５０００）又はカルネキシン（Ａｂｃａｍ　Ａｂ２２５９５、１：１０００）をローディングコントロールとして使用した。ペプチドマッピングのために、ＤＭＳＯ中の１ｍＭペプチド２μｌを５ｘサンプル緩衝液で煮沸し、１０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲルにロードし、ＭＥＳ緩衝液を用いて泳動させた。Ｓｆ９ライセートの細胞ペレットを天然ＲＩＰＡ（ＮＰ－４０）ライシス緩衝液で溶解し、１０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲル上で泳動させた。

【０２５５】

免疫沈降

［００３７８］　抗ＡＰＯＬ１抗体は、製造元のプロトコールに従ってＤｙｎａｂｅａｄｓ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　１４３１１Ｄ）にコンジュゲートさせた。簡潔に言えば、１０μｇの各抗体を２ｍｇのＤｙｎａｂｅａｄｓに、回転させながら３７℃で一晩コンジュゲートさせた。翌日、結合していない抗体を洗い落とし、コンジュゲートした抗体は最終濃度５０μｇ／ｍｌで再懸濁させた。２－５μｇのコンジュゲート抗体を、１μｌの希釈していないヒト血清と共に４℃、１６時間、ＰＢＳを含む総量５００μｌでインキュベートした。結合していない血清は、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ含有ＰＢＳで洗浄した。結合したＡＰＯＬ１を低ｐＨグリシン緩衝液で溶出した（非特異的に結合したタンパク質の溶出を避けるために直接煮沸するよりもこれが望ましい）。溶出液を５ｘサンプル緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　３９０００）で煮沸し、４－１２％Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＮＰ０３２２０）にロードした。免疫沈降したＡＰＯＬ１は、ウサギポリクローナルＡＰＯＬ１抗体（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ　１１４８６－２－ＡＰ、１

：１０００）とＥＣＬにより検出された。ＡＰＯＡ１はヤギ抗ＡＰＯＡ１（Ｒｏｃｋｌａｎｄ　６００－１０１－１０９）で検出され、ＨＰＲは１μｇ／ｍｌウサギ抗ＨＰＲ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＡＢＳ　１９６）とＥＣＬ　Ｐｒｉｍｅで検出された。低ｐＨ実験では、コンジュゲート抗体をＰＢＳ（ｐＨ７．０又はｐＨ５．５）の存在下、４℃で１－２時間、ヒト血清と共にインキュベートした。

【０２５６】

トリパノソーマアッセイ

［００３７９］　ブルーストリパノソーマを、ＡＴＣＣからＭＴＡの下に入手し、ＩＭＤＭ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、熱不活化（５６℃で３０分間）ＦＢＳ（Ｓｅｒａｄｉｇｍ　ＩＸＬ９／０６８０７／ＧＥＮ）、１％血清プラス（Ｓｉｇｍａ　１４００８Ｃ）、ＨＭＩ－９（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）及び１％ヒポキサンチン（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）を含むＨＭＩ－９培地で培養した。トリパノソーマ溶解を、１ｘ１０^{5}トリパノソーマをＮＨＳ又は組換えＡＰＯＬ１の段階希釈液で１６時間、合計１００μｌで処理することにより行った。生細胞の読み取りは、製造元のプロトコールに従い、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイで行われた（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、ＤＡＬ１１００）（３０）。簡潔に言えば、１０μｌのＡｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅを各ウェルに添加し、３７℃で４時間インキュベートした。生きているトリパノソーマを示す赤色蛍光は、ＳｏｆｔＭＡＸ　ＰＲＯで動作するＳｐｅｃｔｒａＭａｘ蛍光光度計で、励起波長５３０ｎｍ、発光波長５９０ｎｍで測定された。抗体ブロッキングアッセイでは、１％正常ヒト血清を１－１０μｇ／ｍｌの抗ＡＰＯＬ１抗体又は培地と室温で２０分間プレインキュベートした後、トリパノソーマを添加した。１６時間後、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅアッセイを上記のように行い、培地のみのバックグラウンド値を差し引き、抗体なしのコントロールに正規化することによりブロッキング％を計算した。データをＰｒｉｓｍ　ｖ７でプロットした。正常ヒト血清はＧｅｎｅｎｔｅｃｈ社の健康なボランティアから入手した。リポタンパク質欠損血清（ＬＰＤＳ、超遠心分離により枯渇）は、Ｋａｌｅｎ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ（カタログ＃７８０１００）から市販品を入手した。ＫＢｒ密度勾配精製ＨＤＬはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ社から入手した（ＬＰ３－５ＭＧ）。

【０２５７】

表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ）及びＷａｓａｔｃｈビニング

［００３８０］　９６×９６アレイベースのＳＰＲイメージングシステム（Ｃａｒｔｅｒｒａ、米国）を抗ＡｐｏＬ１モノクローナル抗体のエピトープマッピングに使用した。簡潔に言えば、精製したモノクローナル抗体を１０ｍＭ酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ４．５）で１０μｇ／ｍｌに希釈した。アミンカップリングにより、Ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ　Ｆｌｏｗ　Ｍｉｃｒｏｓｐｏｔｔｅｒ（Ｃａｒｔｅｒｒａ、米国）を使用してＳＰＲセンサープリズムＣＭＤ　２００Ｍチップ（ＸａｎＴｅｃ　Ｂｉｏａｎａｌｙｔｉｃｓ、ドイツ）に抗体を直接固定し、抗体のアレイを作成した。カップリング後、抗体をエタノールアミンでブロックし、泳動緩衝液（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、及び０．００５％Ｔｗｅｅｎ２０）でプライミングした。エピトープマッピングは、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、３ｍＭ　ＥＤＴＡ、及び０．００５％Ｔｗｅｅｎ２０から成る泳動緩衝液中、２５℃でバイオセンサーチップ上の固定化抗ＡＰＯＬ１抗体にＡＰＯＬ１の異なるペプチド１００ｎＭを流すことによって実施された。毎回のＡＰＯＬ１ペプチドのフロースルー後に、１０ｍＭのグリシン（ｐＨ２．０）を使用してチップ表面を再生した。結合データは、Ｗａｓａｔｃｈビニングソフトウェアツールを使用して処理した。

【０２５８】

抗ＡＰＯＬ１抗体生成及びドメイン特異性

［００３８１］　抗体を生成するためにいくつかのアプローチが採られ（表２Ａ）、最も成功したのは、トリパノソーマ溶解活性のあるｈｉｓ６タグ付きＡＰＯＬ１－Ｇ０（野生型；図１０）の接種であった。これにより、ＥＬＩＳＡでＡＰＯＬ１抗原を認識する１３５のマウスモノクローナル抗体（うち２２はクローニングに成功）と３５のクローン化

ウサギモノクローナル抗体（実施例２参照）が得られた（データは示していない）。

【０２５９】

［００３８２］　抗体が細胞内に発現したＡＰＯＬ１を認識できるかどうかを調べるために、ドキシサイクリン誘導性ＧＰＩアンカーＷＴ－ＡＰＯＬ１（ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩ－ＣＨＯ；図１Ａ）を安定して発現しているＣＨＯ細胞で、１７０の抗体全てをフローサイトメトリーによって試験した。１５０（８８％）の抗体がｇＤ－ＡＰＯＬ１－ＧＰＩ（コンストラクトｂ）を認識し、２０がＦＡＣＳ陰性であった（図１１）。切断型ｇＤ－ｉＡＰＯＬ１－ＧＰＩコンストラクトｃ－ｅを発現しているＣＨＯ細胞でのフローサイトメトリーは、８１の抗体をＰＦＤ（ａａ　６１－２３５；図１Ｂ、１Ｃ）にマッピングした。このコンストラクトは、ＰＦＤに特異的に産生させたＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈポリクローナル抗体の結合によって更に検証された（図１Ｂ）。１０の抗体がＭＡＤに、３８の抗体がＳＲＡ－ＩＤ又はリンカーにマッピングされた（図１Ｂ、１Ｃ）。抗ＡＰＯＬ１　ＳｉｇｍａポリクローナルとＥｐｉｔｏｍｉｃｓウサギモノクローナルは、ＳＲＡ－ＩＤ／リンカーにも結合した。３つのドメイン全てに結合する４の抗体をマルチドメインと称し、個々のドメインではなく全長ＡＰＯＬ１のみに結合するもの（１７）をコンフォメーションと名付けた。このように、ＡＰＯＬ１の各ドメインに対して複数の抗体が得られた（図１Ｃ）。

【０２６０】

ＡＰＯＬ１は細胞表面に存在する

［００３８３］　ＡＰＯＬ１はリソソーム内で塩化物チャネルを形成しているのか（１２、２１、３２）或いは形質膜で陽イオンチャネルを形成しているのかについては、まだ議論がある（２４、２５）。本発明者らの抗体は、ＣＨＯ細胞内で発現したＧＰＩアンカー型ｇＤ－ＡＰＯＬ１を認識したため、本発明者らは、フローサイトメトリーにより、非ＧＰＩアンカー型タグなし天然全長ＡＰＯＬ１（ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞のコンストラクトａ）が細胞表面にも局在するかどうかを試験した（図２Ａ）。天然ＡＰＯＬ１は、ＧＰＩアンカー型ｇＤ－ＡＰＯＬ１（図２Ｂ）と同じ、抗体（図２Ａ）の８８％（１５０／１７０）によって、実際に細胞表面に検出された。これらの抗体は全てのドメインを網羅しており、典型的なマルチパスイオンチャネルとは異なり、ＡＰＯＬ１のかなりの部分が露出していることを示唆している。抗体はＡＰＯＬ１－Ｇ０に対して産生されたが、全てのＳＲＡ－ＩＤバインダーはＡＰＯＬ１－Ｇ１（Ｓ３４２ＧとＩ３８４Ｍ）も認識し、７つを除く全てがＧ２を認識した（Δ３８８Ｎ／Δ３８９Ｙ；図２Ｃ、２Ｄ）。

【０２６１】

［００３８４］　本発明者らの抗体のほとんどが、透過処理されていない不死化ヒトポドサイトの表面で内因性ＡＰＯＬ１（図３Ａ）も検出したため、ＣＨＯ細胞における表面発現は単なるトランスフェクションアーチファクトではなかった（２６）。ポドサイトは低レベルの内因性ＡＰＯＬ１を発現し、この内因性ＡＰＯＬ１は、予想（２７）の通り、インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）処理後に増加するが（図３Ｅ）、ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞で観察される高レベルには達しなかった（図３Ｆ、図３Ｇ）。ほとんどのＰＦＤ抗体は、ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯと同様に内因性ＡＰＯＬ１を検出した（図３Ｂ）。しかし、ほとんどのＭＡＤバインダー及びＳＲＡ－ＩＤバインダーは、ポドサイトの認識がｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞よりも著しく劣っていた（図３Ｃ及び３Ｄ）。ポドサイトはＡＰＯＬ１誘発性腎症の標的細胞であるため、本発明者らは、本発明者らの抗体レパートリーを利用して、ポドサイトにおけるＡＰＯＬ１の発現とトポロジーを理解することに焦点をあてた。

【０２６２】

ポドサイト表面ＡＰＯＬ１に対する抗体の特異性

［００３８５］　ポドサイト細胞表面におけるＡＰＯＬ１シグナルの特異性を確認するために、本発明者らはまず、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９を用いて内因性ＡＰＯＬ１をノックアウトした（図１２）。ＦＡＣＳ及びウェスタンブロッティングにより、ＡＰＯＬ１の完全な喪失が確認された（但し、ＡＰＯＬ２ではそうではない；図４Ａ、４Ｂ）。重要なこ

とに、ＦＡＣＳによって、どの抗ＡＰＯＬ１抗体でも表面シグナルが検出されず（いくつかの抗体についてのみデータを示す）（図４Ｃ）、図３の表面シグナルが実際にＡＰＯＬ１を表していることが確認された。いくつかの抗体によるＷＴポドサイトの結合が観察されなかったのは（図３Ａ－Ｄ）、低い内因性発現レベルに起因していた可能性がある。そこで、本発明者らは、偽陰性を回避するために、ドキシサイクリン誘導性プロモーターの下で、ＡＰＯＬ１－ＫＯポドサイトにＡＰＯＬ１－Ｇ０を再導入した（ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイト）。これにより、ドキシサイクリン依存的にＡＰＯＬ１タンパク質レベルが制御でき（図１３）、ＷＴポドサイトに比べて全ＡＰＯＬ１及び表面ＡＰＯＬ１がＩＦＮｇ有り／無しでそれぞれ１０－１００倍増加する結果となった。上位の抗体を用いたフローサイトメトリーでは、ＷＴポドサイトとｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトで全体的に類似した結合パターンが見られた（図６Ａ、図６Ｂ）。但し、ＰＦＤとＳＲＡ－ＩＤ抗体は、より高発現のｉＡＰＯＬ１ポドサイトにより強く結合したが、ＭＡＤ抗体は、表面ＡＰＯＬ１の１００倍のアップレギュレーションにもかかわらず、結合しなかった。これは、ＭＡＤが、内因性ＡＰＯＬ１と過剰発現ＡＰＯＬ１の両方でポドサイト表面にアクセスできない可能性があることを示唆している。コントロールとして、透過化ポドサイトはＭＡＤ抗体で染色された（図１４）。ほとんどのＭＡＤ抗体はｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞上のＡＰＯＬ１を検出できたが、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０ポドサイトでは有効に検出できなかった（図３Ｃ）ことから、これは、ＭＡＤがポドサイト膜に埋もれているか又はおそらくヒトタンパク質によってシールドされている可能性を示唆する。なぜなら、ＭＡＤは試験した他のヒト細胞株でも同様にアクセスしにくいためである（図１５）。

【０２６３】

抗ＡＰＯＬ１抗体の機能的活性

［００３８６］　循環ＡＰＯＬ１にも同様にＡＰＯＬ１ドメインの暴露に差があるかどうかを決定するために、トリパノソーマ溶解の媒介における循環ＡＰＯＬ１の実証済みの機能的活性を利用した（１２、３５、３６）。本発明者らは、血清ＡＰＯＬ１のアクセス可能な部分に結合する抗体がＡＰＯＬ１媒介性のブルーストリパノソーマの溶解を阻害するのではないかと仮定し（図５Ａ）、したがって、どのＡＰＯＬ１ドメインが露出しているかを決定するために、抗体の溶解ブロッキング活性を測定した。本発明者らはまず、Ａｌａｍａｒ　Ｂｌｕｅ生存アッセイを用いて正常ヒト血清（ＮＨＳ）の殺傷曲線を確立し、サンドイッチＥＬＩＳＡによって約３．１６±０．１６ｎＭ　ＡＰＯＬ１（ｎ＝２２）を含む１％－１０％ＮＨＳで約０％－１００％殺傷を達成した（図５Ｂ）（データは示さず）。このアッセイでの溶解は主にＨＤＬ関連のＡＰＯＬ１が原因である可能性がある。なぜなら、精製ＨＤＬは同様に活性であり、リポタンパク質欠損ＮＨＳが不活性であったためである（図５Ｂ）。１７０全ての抗体のトリパノソーマ溶解阻止を１μｇ／ｍｌの１％ＮＨＳで試験した結果、０から８０％のブロッキングが得られた（図５Ｃ）。興味深いことに、ブロッキングはＳＲＡ－ＩＤに対する抗体（ＳＲＡがローデシアトリパノソーマのトリパノソーマ溶解を阻害する能力を基に予測）だけでなく、ＰＦＤとＭＡＤに対する抗体によっても達成された。これは、３つのドメイン全てがトリパノソーマ溶解にとって必要だという過去の報告と一致しているか、又は抗体が血清ＡＰＯＬ１のコンフォメーション変化を媒介することを示唆している（１２、２９）。抗体は、強力なブロッカー（＞６０％のブロッキング）、中程度のブロッカー（２６－５９％）又は非ブロッカー（＜２５％：図５Ｃ）に分類された。非ブロッカーは、おそらく、循環ＡＰＯＬ１を認識しなかったか、又は重要でない部位に結合した。ブロッキングは、抗体濃度に対して非常に感受性であり、急峻な阻害曲線と０．４ｎＭ－１ｎＭのＩＣ$_{50}$を示した。（図１６）。更に、全てのブロッキング抗体は、ＮＨＳからＡＰＯＬ１を免疫沈降させることができたため、循環ＡＰＯＬ１と結合した。一方、非ブロッカーはそうならなかった（図５Ｄ及び図１７）。ブロッキングと血清ＡＰＯＬ１への結合との間には強い相関があり（図５Ｅ）、エピトープ暴露が重要な決定要因であることを示唆している。各ドメイン内にブロッカーと非ブロッカーが存在することは、循環系では特定の領域のみがアクセス可能であり、他の領域はおそらくＨＤＬ粒子に埋もれているか又は他のタンパク質に結合していることを示

唆している。ＡＰＯＡ１及びＨＰＲはＡＰＯＬ１と共免疫沈降し（図５Ｄ及び図１７Ｃ）、少なくとも一部のＡＰＯＬ１は遊離ではなく、ＴＬＦ１又はＴＬＦ２と共に複合体になっていることを確認した（３７）。ＩｇＭ（ＴＬＦ２に対して独占的）の共免疫沈降を実証する試み（７）は、抗ＩｇＭ抗体のバックグラウンドが原因で不首尾に終わった。要するに、血清ＡＰＯＬ１を認識する全ての抗体は、結合部位に関係なく、トリパノソーマ溶解もブロックすることができた。

【０２６４】

細胞表面と循環ＡＰＯＬ１アクセス可能性との間の相関

［００３８７］　トリパノソーマ溶解の阻害は血清ＡＰＯＬ１結合の有用な代替物であるため（図５Ｅ）、本発明者らは、ブロッキングデータを用いて血清中と細胞表面のＡＰＯＬ１のトポロジーを効果的に比較することができた。ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ細胞では、結合とトリパノソーマ溶解阻害との相関はなかった（図１８）（７）。これは、ＡＰＯＬ１の２つの供給源でドメインのアクセス可能性が異なることを示唆している。

【０２６５】

［００３８８］　更に重要なことに、血清ＡＰＯＬ１と腎臓病関連ポドサイトとの間でも、ＡＰＯＬ１へのアクセス可能性に差があった（図１８Ｂ）。いくつかの抗体は、ＷＴ及びｉＡＰＯＬ１ポドサイトの表面ＡＰＯＬ１に結合したが（図６Ａ、６Ｂ）、循環ＡＰＯＬ１には結合せず（トリパノソーマ溶解阻止の欠如により判断、図６Ｃ）、逆もまた然りであった。例えば、ほとんどのＰＦＤバインダー（例えば５．１７Ｈ８、５．１１Ｈ２、３．６Ｃ２、３．２Ａ７、３．２Ａ７、及び３．２Ｂ１１）はポドサイトＡＰＯＬ１を認識するが、血清ＡＰＯＬ１をブロック又は免疫沈降させない（図６及び１７）（１０）。逆に、３．３Ｂ６と４．１７Ａ５はトリパノソーマ溶解ブロッカーの上位に入るが、ポドサイト表面の認識は比較的弱かった。更に注目すべきは、ＭＡＤ抗体のほとんど（４．６Ａ９、１．１１Ｇ１、及び３．３Ａ８）は、ポドサイトＡＰＯＬ１の検出率が低く（図６Ｂ、Ｃ）、循環ＡＰＯＬ１を強く免疫沈降させる（図５Ｄ）にもかかわらず強いブロッカーであったことである。同様に、ほとんどのＳＲＡ－ＩＤブロッカー（リンカー領域に対する抗体を含む）は、ポドサイトの認識をほとんど示さない一方で、よくブロックし（例えば、３．７Ｅ８、３．７Ｂ５）、３．６Ｈ１０ではその逆が当てはまった。このことは、ＡＰＯＬ１には、ポドサイト表面と循環ＡＰＯＬ１とでアクセス性のはっきりと異なる領域が存在することを示唆している。

【０２６６】

ＡＰＯＬ１トポロジー

［００３８９］　抗ＡＰＯＬ１抗体のより詳細なエピトープマップを得るために、本発明者らは、表面プラズモン共鳴とウェスタンブロッティング及び切断型ＡＰＯＬ１を発現するＳｆ９ライセートを用いたウェスタンブロッティングによって、ＡＰＯＬ１の全長にまたがるオーバーラップペプチドのパネルへの結合を決定した（図１９Ａ－Ｂと２０Ａ－Ｅに例を示す）。結果と得られたトポロジー予測は図７にまとめられているが、予測された３つの膜貫通ドメイン（２２、３６、３８）が正しいという仮定に大きく依拠するものである。（表２Ｂ参照）

ｂ）表２Ｂ：膜貫通予測プログラムの結果

ﾓﾃﾞﾙ	# tm*	Tm1	Tm2	Tm3	Tm4	FACS ﾃﾞｰﾀにﾌｨｯﾄ?
DAS ｻｰﾊﾞｰ	3	177-197	(183-222)	338-353		tm3 がﾍｱﾋﾟﾝﾙｰﾌﾟの場合のみ
DAS/cgi	2	184-193	341-351			No, MAD は細胞内には存在せず# 、ﾘﾝｶｰは露出している
TMHMM	1	177-199				No, PFD とＣ末端両方が露出
TMpred	2	177-196	332-353			No, MAD は細胞内には存在せず# 、ﾘﾝｶｰは露出している
TMpred	4	177-196	(212-230)	(257-276)	332-353	No, ﾘﾝｶｰが露出
SPLIT ｻｰﾊﾞｰ	3	175-196	(200-224)	338-354		tm3 がﾍｱﾋﾟﾝﾙｰﾌﾟの場合のみ

*Ｎ末端のシグナル配列は膜貫通ドメインとしてカウントされない
アミノ酸はドメインによって色分けされている：ＰＦＤは青、ＭＡＤは緑、リンカー（ポドサイトでは露出した部分は３１４－３３３）は黒、ＳＲＡ－ＩＤは赤。括弧内は弱いｔｍ予測を示す。
#ＭＡＤはポドサイト又は他のヒト細胞株では露出していないが、ＣＨＯ細胞では露出している。したがって、本発明者らは、ポドサイトや他のヒト細胞では、ＭＡＤは細胞内や膜に埋もれているのではなく、別のタンパク質と結合していると考える。なぜなら、種間で膜貫通ドメインが根本的に異なるとは考えにくいからである。
２つの完全な膜貫通ドメインとｔｍ３のヘアピン（半）ループを持つワーキングモデルについては、図９を参照されたい。

【０２６７】

［００３９０］　ポドサイトでは、Ｎ末端とＣ末端の両方が露出しており（図７）、このことは、偶数の膜貫通ドメインの存在、或いは２つの完全な膜貫通ドメインと１つのヘアピン（すなわち半ループ；表２Ｂ）の存在を示唆している。ＰＦＤは最初の予測膜貫通ドメインまで細胞外にあり、２つの膜貫通ドメインは小さな細胞内ループによって分離されていると想定される（そのペプチドに対する抗体が得られなかったため試験不可能）。ＭＡＤは完全にアクセス不可能であるが、ＣＨＯ細胞では露出している。したがって、本発明者らは、膜貫通配置（arrangement）が種間で異ならないことを前提として、ポドサイト又はヒト細胞株特異的タンパク質によって隠されていると仮定する（図１５）。第３膜貫通ドメインへのリンカーは露出しているが、ＳＲＡ－ＩＤはａａ　３７６以降しかアクセスできない。いわゆるＳＲＡ－ＩＤ抗体のほとんどは、実際にはリンカー（ａａ３０６－３３９）にマッピングされており、９の真のＳＲＡ－ＩＤバインダーのうち、８は正にＣ末端にあり、そのうちの７はＡＰＯＬ１－Ｇ２に結合しなかった（図２Ｃ）。残りの１つは、予測コイルドコイルに従って、埋もれている可能性が高い先行ペプチドにマッピングされた（２２）。

【０２６８】

［００３９１］　対照的に、血清（おそらくＨＤＬ粒子）では、ＰＦＤのＮ末端はａａ１０３まで埋もれており（領域１１１－１５０のように）、ＭＡＤとリンカーの開始部分のほとんどが露出しているように見える。膜貫通ドメインが埋もれていると仮定すると（抗体がないため試験不可能）、残りのトポロジーはポドサイトに類似している。但し、膜貫通ドメインがＨＤＬ粒子の表面に露出している可能性も排除できない。

【０２６９】

低ｐＨはＡＰＯＬ１トポロジーに影響しない。

［００３９２］　ＡＰＯＬ１のトポロジーを更に精査するために、本発明者らは、人工膜に挿入する又はＨＤＬからトリパノソーマのリソソーム膜に移動させる（ＭＡＤを経由するとされる）低ｐＨ誘発性コンフォメーション変化をＡＰＯＬ１が必要とするという事前知識（１、２１、３２）に基づいて、低ｐＨによってエピトープ暴露が変わるかどうかを決定しようと試みた。そこで、ｉＡＰＯＬ１－ポドサイトを酸性及び中性ｐＨで各ドメインに対する抗体と共にインキュベートしたが、結合に違いは見られなかった（図８Ａ）ことから、酸性ｐＨではポドサイト上で肉眼的トポロジー変化は起きないことが示唆された。

【０２７０】

［００３９３］　低ｐＨでＡＰＯＬ１がＨＤＬから放出されるかどうかを試験するために、ｐＨ５．５で各ドメインに対する非ブロッキング抗体で免疫沈降を試みたが、成功しなかった（図８Ｂ）。更に、ブロッキング抗体は、低ｐＨでもＡＰＯＬ１と共にＡＰＯＡ１をプルダウンした（図８Ｂ）。どちらの結果も、これらの条件下でＡＰＯＬ１がＨＤＬ粒子から解離しなかったことを示唆しており、ＨＤＬ粒子からのＡＰＯＬ１の解離が酸性ｐＨのみによって誘発されるのかについての疑問を投げかけている。

【０２７１】

結果の考察

［００３９４］　本発明者らは、細胞表面及び血清中のＡＰＯＬ１のトポロジーを調べるために、ＡＰＯＬ１に対する１７０のモノクローナル抗体を生成し、特徴付けた。その結果は、ＡＰＯＬ１が血清中と細胞株上で異なるトポロジーを呈することを実証した。これは、ＡＰＯＬ１の２つの供給源を最適に標的化するには異なる試薬が必要であることを意味する。

【０２７２】

［００３９５］　ＨＤＬ粒子においてＡＰＯＬ１のどのドメインが露出しているかを決定するために、本発明者らは、血清ＡＰＯＬ１の認識のハイスループット代理として、血清媒介性トリパノソーマ溶解の阻止について全ての抗体をスクリーニングした。その結果、血清ＡＰＯＬ１を免疫沈降させることができる全ての抗体が、結合部位に関係なく、トリパノソーマ溶解ブロッカーであることがわかった。この阻止がどの段階で起こるかはまだ決定されていないが、ブロッキング抗体が豊富にあることは、それらがＡＰＯＬ１のコンフォメーション変化を簡単に引き起こすか又は防ぐことができることを示唆している。いくつかの態様では、本明細書の抗体は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの循環ＡＰＯＬ１の役割を研究するための重要なツールを提供し得る。

【０２７３】

［００３９６］　トリパノソーマのリソソームにおけるＡＰＯＬ１のトポロジーはＨＤＬにおけるものとは異なる可能性があるが、本発明者らのデータは、ポドサイトと血清の間のＡＰＯＬ１のコンフォメーションの違いを明らかにしている。トリパノソーマ溶解性ＡＰＯＬ１とポドサイトのＡＰＯＬ１の間のその他の違いは、リスクバリアントのみが哺乳類細胞に対して毒性であること（３９、４０、１９）と、ホモ接合性がＣＫＤの発症リスクを高めること（１４－１５、４１）である。内因性ＡＰＯＬ１の細胞傷害性について提案されているメカニズムは、多様且つ相反するものであり（３３）、例え細胞傷害が細胞内で起こっても細胞表面で起こっても、不明である。本発明者らのデータは、ＡＰＯＬ１がポドサイトの細胞表面にあることを示すエビデンスあり、細胞表面陽イオンチャネルモデルを潜在的にサポートする（３２、３９、４２）。しかし、ＡＰＯＬ１の広範な暴露と予測膜貫通ドメイン数の少なさ（２－４）は、膜貫通ドメイン数が６以上で細胞外残基が少ない典型的なイオンチャネル（４３）とは明らかに異なっている。

【０２７４】

［００３９７］　本発明者らのポドサイトトポロジーモデルは、膜貫通ドメインと隣接残基及びＭＡＤを除くほとんどのＡＰＯＬ１の細胞外暴露を予測している。ＭＡＤは、ＣＨＯ細胞では細胞外にあるが、ポドサイトでは隠されており、試験した他の内因性発現ヒト細胞株と同様に、ヒト特異的結合パートナーによって妨害されていると推定される（図

９Ａ及び図１５）。興味深いことに、ＳＲＡ－ＩＤの良性Ｇ１　Ｉ３８４Ｍ及びＧ２欠失はＡＰＯＬ１で露出している。一方、病原性Ｇ１　Ｓ３４２Ｇ置換は推定第３膜貫通ドメインにあると予測されるが、そのエピトープに対する抗体がないため、そのアクセス可能性の評価はできない。隠されたエピトープが本当に膜に埋め込まれているのか、それとも単に配向又は他のタンパク質との結合が原因でアクセス不可能なだけなのか、まだ不明である。ＰＦＤのＢＨ３－ｏｎｌｙドメイン（ａａ１５８－１６６）は他のＢＨ３－ｏｎｌｙタンパク質と相同性を持つが、アポトーシスとオートファジーにおけるその役割についてはまだ議論が続いている（４４－４５）。このエピトープ（３．７Ｄ６）は、ＢＨ３ドメイン相互作用タンパク質のように細胞質にあるのではなく、明らかに露出している（すなわち内腔にある）ので、それがアポトーシス又はオートファジーに関与する可能性は低いと、本発明者らは考える。多くの電位依存性カリウムチャネルでは、イオン伝導孔は、２つの膜貫通ヘリックスに細胞外ループを加えた４つのユニットで構成されている。ＡＰＯＬ１について、本発明者らは、少なくとも２つのＡＰＯＬ１分子がオリゴマー化する必要があり、おそらくＰＦＤ膜貫通領域が孔を形成すると推測する。これは、チャネルの陽イオン選択性を制御するものとして領域９４－１６９のｐＨと膜依存性のコンフォメーション変化を予測したＢｒｕｎｏらによって提案された低ｐＨモデル（２１）と同様である。本発明者らは、この領域が細胞外にあることに同意するが、全体的なトポロジーのｐＨ依存的な変化は検出できなかった。これは、ＡＰＯＬ１が、形質膜に向かう途中で既に低ｐＨコンパートメント（おそらくゴルジ）（４６）にさらされており、そこにはっきりと埋め込まれているためである可能性がある。しかし、イオンチャネルの開閉を示すようなわずかなコンフォメーション変化は、必ずしも検出されない。

【０２７５】

［００３９８］　血清ＡＰＯＬ１では、ポドサイトとは対照的に、ＰＦＤの大部分はアクセス不可能であり、ＴＬＦ粒子に埋もれているか又はそれ自身に折り畳まれている可能性があるが、ＭＡＤは主に露出している（図９Ｂ、９Ｃ）。但し、全てのブロッキング抗体がマッピング可能であったわけではないので、現在予測されているよりも多くの領域が露出している可能性があることに留意されたい。このトポロジーの違いは、二層ポドサイトと単層リポタンパク質粒子とのタンパク質－脂質相互作用の違いに起因する可能性がある。本発明者らのデータは、ＭＡＤは過去に提案されたＨＤＬ結合領域ではなく（１、１２）、ＰＦＤ及び／又はＳＲＡ－ＩＤの初期部分、おそらく３つの予測膜貫通ドメインであることを示唆している。しかし、これらの疎水性領域に対する抗体がないため、決定的な答えは得られない。ＳＲＡ－ＩＤのＳＲＡに結合する能力と、Ｇ２バリアント（ΔＮ３８８／Ｙ３８９）の結合能の欠如と一致して、ＳＲＡ－ＩＤのＣ末端（３７６－３９８）はＨＤＬでは露出している。しかし、Ｇ１のＳ３４２Ｇが露出しているかどうかを決定することはできなかった（１５、４７）。重要な注意点は、本発明者らの抗体がＴＬＦ１（ＨＤＬ３ｂ）複合体をブロックするのか、ＩｇＭとの脂質の少ないＴＬＦ２複合体をブロックするのかを区別できないことであり、これらは異なるトポロジーを持つ可能性が十分ある。いずれの複合体も、ブロッキングＡＰＯＬ１抗体と共免疫沈降したＡＰＯＡ１及びＨＰＲを含有する（４８）。

【０２７６】

［００３９９］　まとめると、天然ＡＰＯＬ１は、培養されたポドサイト及び安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ細胞の細胞表面に存在する。したがって、非定型のトポロジーではあるが、表面イオンチャネルを形成する正しい位置にあることが示された。更に重要なこととして、ＡＰＯＬ１は細胞表面と循環系で異なるコンフォメーションを有しており、全てのＡＰＯＬ１結合剤が両方のＡＰＯＬ１供給源に結合するわけではないことを意味する。ポドサイトにおいて、提示されているＡＰＯＬ１－ｓｕＰＡＲ相互作用（４９）が本発明者らの抗体のいずれかによってブロックされているかどうかを試験すると、この相互作用におけるＡＰＯＬ１の現在不明な供給源に関する手がかりが得られる可能性がある。本発明者らの抗体は、循環ＡＰＯＬ１を標的とする可能性はあるが、少なくともＩｇＧフォーマットでは糸球体濾過障壁を越えてポドサイトのＡＰＯＬ１にアクセスするこ

とはおそらくないだろう。
【０２７７】
抗体ドメインマッピングの詳細
［００４００］　１つの所与の手法が全ての試験抗体に対して最適ではなかったため、抗体ドメインを理解するために様々なアプローチから得られたデータを組み合わせた。簡潔さのために、「バインダー」はポドサイトＦＡＣＳ陽性抗体を指し、「ブロッカー」はトリパノリシスブロッカー（すなわち血清ＡＰＯＬ１バインダー）を指す。本発明者らの免疫原は最初の６０　ａａを欠いていたので、当然ながらこの領域に対する抗体は存在しなかった。ＰＦＤでは、２つの結合非ブロッカーと弱いブロッカー（５．１１Ｈ２と５．１７Ｈ８）がａａ　６１－９２にマッピングされており（図２０Ｅ）、この領域がポドサイトでは露出しているが血清ＡＰＯＬ１でそうではないことを示唆されている（図７）。更に、上位２つのブロッカーである３．６Ｄ１２と３．７Ｄ６は、優れたポドサイトバインダーであり、ａａ１０１－１３０と１５１－１７２の間の２つの異なる領域にマッピングされた（図１９Ａと２０Ｂ）。１１１－１５０の領域を認識する他の抗体のほとんどは、３つの抗体を除いて、非ブロッカーと弱いバインダーであった（図１８）。ａａ　１７０－２４０にマッピングされた抗体はなかった。おそらく、２つの予測膜貫通ドメイン（ａａ　１７７－１９６及び２０４－２２４）（２２）が抗原に埋もれてしまったためではないかと推測される。
【０２７８】
［００４０１］　４つのＭＡＤバインダーのみが正常にクローン化された。３つのブロッキング非バインダーはＭＡＤのＣ末端の半分（ａａ　２６０－３０５）にマッピングされ、この領域が血清中では露出しているがポドサイトでは露出しないことを示している。一方、４．１２Ｆ４と３．５Ｈ９（クローニングできなかったもの）はＭＡＤのＮ末端（２３５－２６０）にマッピングされたが、結合、ブロッキングともに陰性であり、このドメインはいずれの場合も埋もれている可能性があることを示唆している。このように、ポドサイトではＭＡＤ全体が埋もれているが、血清中ではＣ末端部分が露出している。
【０２７９】
［００４０２］　ほとんどのＳＲＡ－ＩＤバインダーは実際にはＭＡＤとＳＲＡ－ＩＤの間のリンカー領域（ａａ　３０６－３３９）にマッピングされ、９つだけがＳＲＡ－ＩＤを正しく認識し、そのうちの７つはＡＰＯＬ１－Ｇ２を認識せず（図２Ｃ、Ｄ）、実際、ごくＣ末端のペプチド（ａａ　３７６－３９８）にマッピングされた。結合もブロックもしなかった４．２９Ｃ４は、ペプチド３６４－３８５に結合しており、この領域は、そこでの予測コイルドコイルのとおりに埋もれている（２２）ことが示唆される。リンカードメイン抗体のうち、ＭＡＤ（ａａ２８４－３１３）に隣接するものは全て血清ＡＰＯＬ１のみを認識した。ａａ　３１４－３３３にマッピングされた３つの抗体は結合もブロックもできたが、２つの弱い／非結合ブロッカーはａａ　３２４－３３３にマッピングされた。このように、血清ＡＰＯＬ１では大部分のリンカー（ａａ３０３－３３０）が露出しているが、ポドサイトではａａ３０６－３１３がアクセスアクセス不可能である。しかし、ＳＲＡ－ＩＤのごくＣ末端は、血清と表面のＡＰＯＬ１のいずれにおいても容易にアクセス可能である。ＡＰＯＬ１の他の領域に対する抗体がないため、ＡＰＯＬ１の完全なトポロジーを自信を持って予測することはできないが、３つの予測膜貫通ドメイン領域は正しいと仮定する（２２）。ワーキングモデルは図９に示されている。
【０２８０】
［００４０３］　配列が得られた抗体のアミノ酸配列は、更に後述の配列表に記載されている。
【０２８１】
実施例１の参考文献
［００４０４］　１．Pays, E.; Vanhollebeke, B.; Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Nolan, D. P.; Perez-Morga, D., The trypanolytic factor of human serum. Nat Rev Microbiol 2006, 4 (6), 477-86.

【０２８２】
［００４０５］　２．Samanovic, M.; Molina-Portela, M. P.; Chessler, A. D.; Burleigh, B. A.; Raper, J., Trypanosome lytic factor, an antimicrobial high-density lipoprotein, ameliorates Leishmania infection. PLoS Pathog 2009, 5 (1), e1000276.
【０２８３】
［００４０６］　３．Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Poelvoorde, P.; Nolan, D. P.; Lins, L.; Van Den Abbeele, J.; Pays, A.; Tebabi, P.; Van Xong, H.; Jacquet, A.; Moguilevsky, N.; Dieu, M.; Kane, J. P.; De Baetselier, P.; Brasseur, R.; Pays, E., Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. Nature 2003, 422 (6927), 83-7.
【０２８４】
［００４０７］　４．Duchateau, P. N.; Pullinger, C. R.; Cho, M. H.; Eng, C.; Kane, J. P., Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. J Lipid Res 2001, 42 (4), 620-30.
【０２８５】
［００４０８］　５．Page, N. M.; Butlin, D. J.; Lomthaisong, K.; Lowry, P. J., The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. Genomics 2001, 74 (1), 71-8.
【０２８６】
［００４０９］　６．Hajduk, S. L.; Hager, K.; Esko, J. D., High-density lipoprotein-mediated lysis of trypanosomes. Parasitol Today 1992, 8 (3), 95-8.
【０２８７】
［００４１０］　７．Raper, J.; Fung, R.; Ghiso, J.; Nussenzweig, V.; Tomlinson, S., Characterization of a novel trypanosome lytic factor from human serum. Infect Immun 1999, 67 (4), 1910-6.
【０２８８】
［００４１１］　８．Hajduk, S. L.; Moore, D. R.; Vasudevacharya, J.; Siqueira, H.; Torri, A. F.; Tytler, E. M.; Esko, J. D., Lysis of Trypanosoma brucei by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. J Biol Chem 1989, 264 (9), 5210-7.
【０２８９】
［００４１２］　９．Bishop, J. R.; Shimamura, M.; Hajduk, S. L., Insight into the mechanism of trypanosome lytic factor-1 killing of Trypanosoma brucei brucei. Mol Biochem Parasitol 2001, 118 (1), 33-40.
【０２９０】
［００４１３］　１０．Drain, J.; Bishop, J. R.; Hajduk, S. L., Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to trypanosomes. J Biol Chem 2001, 276 (32), 30254-60.
【０２９１】
［００４１４］　１１．Oli, M. W.; Cotlin, L. F.; Shiflett, A. M.; Hajduk, S. L., Serum resistance-associated protein blocks lysosomal targeting of trypanosome lytic factor in Trypanosoma brucei. Eukaryot Cell 2006, 5 (1), 132-9.
【０２９２】
［００４１５］　１２．Perez-Morga, D.; Vanhollebeke, B.; Paturiaux-Hanocq, F.; Nolan, D. P.; Lins, L.; Homble, F.; Vanhamme, L.; Tebabi, P.; Pays, A.; Poelvoorde, P.; Jacquet, A.; Brasseur, R.; Pays, E., Apolipoprotein

L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. Science 2005, 309 (5733), 469-72.
【０２９３】
[００４１６] １３．Cooper, A.; Ilboudo, H.; Alibu, V. P.; Ravel, S.; Enyaru, J.; Weir, W.; Noyes, H.; Capewell, P.; Camara, M.; Milet, J.; Jamonneau, V.; Camara, O.; Matovu, E.; Bucheton, B.; MacLeod, A., APOL1 renal risk variants have contrasting resistance and susceptibility associations with African trypanosomiasis. Elife 2017, 6.
【０２９４】
[００４１７] １４．Tzur, S.; Rosset, S.; Shemer, R.; Yudkovsky, G.; Selig, S.; Tarekegn, A.; Bekele, E.; Bradman, N.; Wasser, W. G.; Behar, D. M.; Skorecki, K., Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. Hum Genet 2010, 128 (3), 345-50.
【０２９５】
[００４１８] １５．Genovese, G.; Friedman, D. J.; Ross, M. D.; Lecordier, L.; Uzureau, P.; Freedman, B. I.; Bowden, D. W.; Langefeld, C. D.; Oleksyk, T. K.; Uscinski Knob, A. L.; Bernhardy, A. J.; Hicks, P. J.; Nelson, G. W.; Vanhollebeke, B.; Winkler, C. A.; Kopp, J. B.; Pays, E.; Pollak, M. R., Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. Science 2010, 329 (5993), 841-5.
【０２９６】
[００４１９] １６．Freedman, B. I.; Limou, S.; Ma, L.; Kopp, J. B., APOL1-Associated Nephropathy: A Key Contributor to Racial Disparities in CKD. Am J Kidney Dis 2018, 72 (5S1), S8-S16.
【０２９７】
[００４２０] １７．Santoriello, D.; Husain, S. A.; De Serres, S. A.; Bomback, A. S.; Crew, R. J.; Vasilescu, E. R.; Serban, G.; Campenot, E. S.; Kiryluk, K.; Mohan, S.; Hawkins, G. A.; Hicks, P. J.; Cohen, D. J.; Radhakrishnan, J.; Stokes, M. B.; Markowitz, G. S.; Freedman, B. I.; D'Agati, V. D.; Batal, I., Donor APOL1 high-risk genotypes are associated with increased risk and inferior prognosis of de novo collapsing glomerulopathy in renal allografts. Kidney Int 2018, 94 (6), 1189-1198.
【０２９８】
[００４２１] １８．Freedman, B. I.; Pastan, S. O.; Israni, A. K.; Schladt, D.; Julian, B. A.; Gautreaux, M. D.; Hauptfeld, V.; Bray, R. A.; Gebel, H. M.; Kirk, A. D.; Gaston, R. S.; Rogers, J.; Farney, A. C.; Orlando, G.; Stratta, R. J.; Mohan, S.; Ma, L.; Langefeld, C. D.; Bowden, D. W.; Hicks, P. J.; Palmer, N. D.; Palanisamy, A.; Reeves-Daniel, A. M.; Brown, W. M.; Divers, J., APOL1 Genotype and Kidney Transplantation Outcomes From Deceased African American Donors. Transplantation 2016, 100 (1), 194-202.
【０２９９】
[００４２２] １９．Beckerman, P.; Bi-Karchin, J.; Park, A. S.; Qiu, C.; Dummer, P. D.; Soomro, I.; Boustany-Kari, C. M.; Pullen, S. S.; Miner, J. H.; Hu, C. A.; Rohacs, T.; Inoue, K.; Ishibe, S.; Saleem, M. A.; Palmer, M. B.; Cuervo, A. M.; Kopp, J. B.; Susztak, K., Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. Nat Med 2017, 23 (4), 429-438.
【０３００】

[００４２３] ２０．Aghajan, M.; Booten, S. L.; Althage, M.; Hart, C. E.; Ericsson, A.; Maxvall, I.; Ochaba, J.; Menschik-Lundin, A.; Hartleib, J.; Kuntz, S.; Gattis, D.; Ahlstrom, C.; Watt, A. T.; Engelhardt, J. A.; Monia, B. P.; Magnone, M. C.; Guo, S., Antisense oligonucleotide treatment ameliorates IFN-gamma-induced proteinuria in APOL1-transgenic mice. JCI Insight 2019, 4 (12).

【０３０１】

[００４２４] ２１．Bruno, J.; Pozzi, N.; Oliva, J.; Edwards, J. C., Apolipoprotein L1 confers pH-switchable ion permeability to phospholipid vesicles. J Biol Chem 2017, 292 (44), 18344-18353.

【０３０２】

[００４２５] ２２．Thomson, R.; Genovese, G.; Canon, C.; Kovacsics, D.; Higgins, M. K.; Carrington, M.; Winkler, C. A.; Kopp, J.; Rotimi, C.; Adeyemo, A.; Doumatey, A.; Ayodo, G.; Alper, S. L.; Pollak, M. R.; Friedman, D. J.; Raper, J., Evolution of the primate trypanolytic factor APOL1. Proc Natl Acad Sci U S A 2014, 111 (20), E2130-9.

【０３０３】

[００４２６] ２３．Chan, W. C.; White, P. D., Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach. Oxford University Press: New York, 2000; p xxiv, 346 p.

【０３０４】

[００４２７] ２４．Hazen, M.; Bhakta, S.; Vij, R.; Randle, S.; Kallop, D.; Chiang, V.; Hotzel, I.; Jaiswal, B. S.; Ervin, K. E.; Li, B.; Weimer, R. M.; Polakis, P.; Scheller, R. H.; Junutula, J. R.; Hongo, J. A., An improved and robust DNA immunization method to develop antibodies against extracellular loops of multi-transmembrane proteins. MAbs 2014, 6 (1), 95-107.

【０３０５】

[００４２８] ２５．Vij, R.; Lin, Z.; Schneider, K.; Seshasayee, D.; Koerber, J. T., Analysis of the effect of promoter type and skin pretreatment on antigen expression and antibody response after gene gun-based immunization. PLoS One 2018, 13 (6), e0197962.

【０３０６】

[００４２９] ２６．Lo, M., Kim, H. S., Tong, R. K., Bainbridge, T. W., Vernes, J. M., Zhang, Y., Lin, Y. L., Chung, S., Dennis, M. S., Zuchero, Y. J., Watts, R. J., Couch, J. A., Meng, Y. G., Atwal, J. K., Brezski, R. J., Spiess, C., and Ernst, J. A. (2017) Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. J Biol Chem 292, 3900-3908.

【０３０７】

[００４３０] ２７．Schlothauer, T., Herter, S., Koller, C. F., Grau-Richards, S., Steinhart, V., Spick, C., Kubbies, M., Klein, C., Umana, P., and Mossner, E. (2016) Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. Protein Eng Des Sel 29, 457-466

【０３０８】

[００４３１] ２８．Meerbrey, K. L.; Hu, G.; Kessler, J. D.; Roarty, K.; Li, M. Z.; Fang, J. E.; Herschkowitz, J. I.; Burrows, A. E.; Ciccia, A.; Sun, T.; Schmitt, E. M.; Bernardi, R. J.; Fu, X.; Bland, C. S.; Cooper, T. A.; Schiff, R.; Rosen, J. M.; Westbrook, T. F.; Elledge, S. J., The pINDUCER le

ntiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 2011, 108 (9), 3665-70.
【0309】
[00432] 29. 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., A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. J Am Soc Nephrol 2002, 13 (3), 630-8.
【0310】
[00433] 30. Raz, B.; Iten, M.; Grether-Buhler, Y.; Kaminsky, R.; Brun, R., The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (T.b. rhodesiense and T.b. gambiense) in vitro. Acta Trop 1997, 68 (2), 139-47.
【0311】
[00434] 31. Lan, X.; Jhaveri, A.; Cheng, K.; Wen, H.; Saleem, M. A.; Mathieson, P. W.; Mikulak, J.; Aviram, S.; Malhotra, A.; Skorecki, K.; Singhal, P. C., APOL1 risk variants enhance podocyte necrosis through compromising lysosomal membrane permeability. Am J Physiol Renal Physiol 2014, 307 (3), F326-36.
【0312】
[00435] 32. Thomson, R.; Finkelstein, A., Human trypanolytic factor APOL1 forms pH-gated cation-selective channels in planar lipid bilayers: relevance to trypanosome lysis. Proc Natl Acad Sci U S A 2015, 112 (9), 2894-9.
【0313】
[00436] 33. Olabisi, O. A.; Heneghan, J. F., APOL1 Nephrotoxicity: What Does Ion Transport Have to Do With It? Semin Nephrol 2017, 37 (6), 546-551.
【0314】
[00437] 34. Nichols, B.; Jog, P.; Lee, J. H.; Blackler, D.; Wilmot, M.; D'Agati, V.; Markowitz, G.; Kopp, J. B.; Alper, S. L.; Pollak, M. R.; Friedman, D. J., Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. Kidney Int 2015, 87 (2), 332-42.
【0315】
[00438] 35. Cooper, A.; Capewell, P.; Clucas, C.; Veitch, N.; Weir, W.; Thomson, R.; Raper, J.; MacLeod, A., A Primate APOL1 Variant That Kills Trypanosoma brucei gambiense. PLoS Negl Trop Dis 2016, 10 (8), e0004903.
【0316】
[00439] 36. Molina Portela, M. P.; Raper, J.; Tomlinson, S., An investigation into the mechanism of trypanosome lysis by human serum factors. Mol Biochem Parasitol 2000, 110 (2), 273-82.
【0317】
[00440] 37. Shiflett, A. M.; Bishop, J. R.; Pahwa, A.; Hajduk, S. L., Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. J Biol Chem 2005, 280 (38), 32578-85.
【0318】
[00441] 38. Thomson, R.; Samanovic, M.; Raper, J., Activity of trypanosome lytic factor: a novel component of innate immunity. Future

Microbiol 2009, 4 (7), 789-96.
【0319】
[00442] 39. Olabisi, O. A.; Zhang, J. Y.; VerPlank, L.; Zahler, N.; DiBartolo, S., 3rd; Heneghan, J. F.; Schlondorff, J. S.; Suh, J. H.; Yan, P.; Alper, S. L.; Friedman, D. J.; Pollak, M. R., APOL1 kidney disease risk variants cause cytotoxicity by depleting cellular potassium and inducing stress-activated protein kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 2016, 113 (4), 830-7.
【0320】
[00443] 40. Ma, L.; Divers, J.; Freedman, B. I., Mechanisms of Injury in APOL1-associated Kidney Disease. Transplantation 2019, 103 (3), 487-492.
【0321】
[00444] 41. 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.; Fink, 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.; Investigators, A. S.; Investigators, C. S., APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. N Engl J Med 2013, 369 (23), 2183-96.
【0322】
[00445] 42. O'Toole, J. F.; Schilling, W.; Kunze, D.; Madhavan, S. M.; Konieczkowski, M.; Gu, Y.; Luo, L.; Wu, Z.; Bruggeman, L. A.; Sedor, J. R., ApoL1 Overexpression Drives Variant-Independent Cytotoxicity. J Am Soc Nephrol 2018, 29 (3), 869-879.
【0323】
[00446] 43. Benham, C. D., Simple recipe for blocking ion channels. Nat Biotechnol 2005, 23 (10), 1234-5.
【0324】
[00447] 44. Wan, G.; Zhaorigetu, S.; Liu, Z.; Kaini, R.; Jiang, Z.; Hu, C. A., Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. J Biol Chem 2008, 283 (31), 21540-9.
【0325】
[00448] 45. Vanhollebeke, B.; Pays, E., The function of apolipoproteins L. Cell Mol Life Sci 2006, 63 (17), 1937-44.
【0326】
[00449] 46. Paul Paroutis, N. T., and; Grinstein, S., The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. american physiology society 2004, 19.
【0327】
[00450] 47. Sharma, A. K.; Friedman, D. J.; Pollak, M. R.; Alper, S. L., Structural characterization of the C-terminal coiled-coil domains of wild-type and kidney disease-associated mutants of apolipoprotein L1. FEBS J 2016, 283 (10), 1846-62.
【0328】
[00451] 48. Vanhollebeke, B.; Nielsen, M. J.; Watanabe, Y.; Truc, P.; Vanhamme, L.; Nakajima, K.; Moestrup, S. K.; Pays, E., Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum. Proc Natl Acad Sci U S A 2007, 104 (10), 4118-23.

【０３２９】

［００４５２］　４９．Hayek, S. S.; Koh, K. H.; Grams, M. E.; Wei, C.; Ko, Y. A.; Li, J.; Samelko, B.; Lee, H.; Dande, R. R.; Lee, H. W.; Hahm, E.; Peev, V.; Tracy, M.; Tardi, N. J.; Gupta, V.; Altintas, M. M.; Garborcauskas, G.; Stojanovic, N.; Winkler, C. A.; Lipkowitz, M. S.; Tin, A.; Inker, L. A.; Levey, A. S.; Zeier, M.; Freedman, B. I.; Kopp, J. B.; Skorecki, K.; Coresh, J.; Quyyumi, A. A.; Sever, S.; Reiser, J., A tripartite complex of suPAR, APOL1 risk variants and alphavbeta3 integrin on podocytes mediates chronic kidney disease. Nat Med 2017, 23 (8), 945-953.

【０３３０】

［００４５３］　５０．Davidson, W. S.; Silva, R. A.; Chantepie, S.; Lagor, W. R.; Chapman, M. J.; Kontush, A., Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009, 29 (6), 870-6.

【０３３１】

［００４５４］　５１．Verdery, R. B.; Benham, D. F.; Baldwin, H. L.; Goldberg, A. P.; Nichols, A. V., Measurement of normative HDL subfraction cholesterol levels by Gaussian summation analysis of gradient gels. J Lipid Res 1989, 30 (7), 1085-95.

【０３３２】

実施例２：アポリポタンパクＬ１特異的抗体は、ポドサイトの小胞体内部と形質膜上の内因性ＡＰＯＬ１を検出する。

［００４５５］　ＡＰＯＬ１－Ｇ１及びＧ２バリアントは、アフリカ系アメリカ人の慢性腎臓病に関連している。これらのバリアントの過剰発現は細胞を殺傷するが、様々なメカニズムが提案されており、それらは全て異なるコンパートメントが関与している。公開されている抗体のほとんどがＡＰＯＬ２と交差反応するため、内因性ＡＰＯＬ１の局在性は決定的に確立されてはいない。本明細書では、本発明者らは、ＡＰＯＬ１特異的抗体を生成し、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１が主にＥＲ内に存在し、細胞表面にもわずかに存在することを示している。これは、細胞傷害性のＥＲストレスモデル又は細胞表面陽イオンチャネルモデルを潜在的にサポートする。

【０３３３】

［００４５６］　アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）の遺伝子バリアントＧ１及びＧ２は、アフリカ系アメリカ人における、人種差のある慢性腎臓病の主な原因である。ＡＰＯＬ１バリアントの過剰発現による腎臓ポドサイトの細胞傷害性のメカニズムは複数提案されており、それぞれ異なる細胞内コンパートメントが関与している。これまでの免疫局在性研究はＡＰＯＬ２との交差反応を本発明者らが実証した過剰発現したタンパク質又は市販の抗体を利用していたため、内在性ポドサイトのＡＰＯＬ１がどのコンパートメントに存在するのか不明である。そこで、ＡＰＯＬ２との交差反応を本発明者らが実証する。アポリポタンパク質Ｌ１（ＡＰＯＬ１）の遺伝子バリアントＧ１及びＧ２は、アフリカ系アメリカ人における、人種差のある慢性腎臓病の主な原因である。ＡＰＯＬ１バリアントの過剰発現による腎臓ポドサイトの細胞傷害性のメカニズムは複数提案されており、それぞれ異なる細胞内コンパートメントが関与している。これまでの免疫局在性研究では過剰発現したタンパク質又は市販の抗体を利用していたため、内在性ポドサイトのＡＰＯＬ１がどのコンパートメントに存在するのか不明である。そこで、ＡＰＯＬ２との交差反応を本発明者らが実証する。

【０３３４】

［００４５７］　ＡＰＯＬ１は、ヒト腎臓のポドサイトと内皮に見られる。内在性ポドサイトとトランスフェクトされたＰＯＬ１アイソフォームｖＡ及びｖＢ１（及び少量のアイソフォームｖＣ）はいずれも小胞体の内腔面と細胞表面に局在するが、ミトコンドリア、エンドソーム、脂肪滴には局在しない。対照的に、ＡＰＯＬ２とＡＰＯＬ１のアイソフォ

ームｖＢ３及びｖＣは小胞体の細胞質面に局在し、そのため、細胞表面には存在しない。ＡＰＯＬ１ノックアウトポドサイトは染色がなく、染色特異性を証明している。誘導性ＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１及びＧ２によるノックアウトポドサイトの安定した再トランスフェクションは、バリアント間の局在性に違いを示さなかった。ＡＰＯＬ１はＥＲ及び形質膜内に見られ、ＡＰＯＬ１媒介性細胞傷害性の表面陽イオンチャネルモデル又は小胞体ストレスモデルを潜在的にサポートする。

【０３３５】

［００４５８］　末期腎疾患は、主に非糖尿病性腎疾患に関連するＡＰＯＬ１遺伝子（野生型はＧ０と呼ばれる）のリスクバリアントＧ１及びＧ２が原因であり、ヨーロッパ系アメリカ人とは異なる影響をアフリカ系アメリカ人に及ぼす。これらのＡＰＯＬ１腎症の治療薬を開発するには、まずＡＰＯＬ１の作用機序をよりよく理解する必要がある（参考文献５４－５５）。

【０３３６】

［００４５９］　エビデンスにより、循環ＡＰＯＬ１ではなく腎臓のポドサイトにおけるＡＰＯＬ１の発現が腎臓疾患の原因である可能性の高いことがサポートされている（５４－５８）。ＡＰＯＬ１のリスクバリアントのいずれかをｉｎ　ｖｉｔｒｏで過剰発現させると、ポドサイトを含む多くの細胞種で通常、Ｇ０よりも細胞傷害性が高くなる（５９－６２）。より説得力のあることに、ｉｎ　ｖｉｖｏで特にマウスポドサイトにおいて高レベルに誘導されたＡＰＯＬ１バリアントは、タンパク尿及びヒトの巣状分節性糸球体硬化症に似た糸球体病理を引き起こす（５９）。

【０３３７】

［００４６０］　ＡＰＯＬ１バリアント依存性細胞傷害性を説明するために、様々な推定メカニズムが提案されており、それらは全て異なる細胞内コンパートメントが関与している（５５）。これらには、小胞体（ＥＲ）ストレス；ミトコンドリア機能障害（６３－６４、７２）；細胞表面のｓｕＰＡＲ／インテグリン結合の増強（６５）；表面陽イオン放出チャネル活性（６２、６６）；コレステロールの蓄積（６７）及びエンドソーム成熟、オートファゴソームフラックス又はリソソーム透過性の欠陥（５９、６０、６２、６８、６９、７０）である。したがって、ＡＰＯＬ１は、ＥＲ（６３、７１、７２）、ミトコンドリア（６３、６４、７３）、脂肪滴（７４）、初期及び後期エンドソーム（５９、７３、７５）に、生化学的には形質膜（６６）に様々に免疫局在していた。但し、ほとんどの研究では過剰発現したＡＰＯＬ１を使用しており、これは正常に輸送できない可能性がある。また、抗体は関連するＡＰＯＬファミリーメンバーとの交差反応性について特性付けされていなかった。これらの抗体は、ヒト腎臓のポドサイト、内皮細胞及び近位尿細管の内因性ＡＰＯＬ１を染色したと報告されているが（７６、７７）、ＡＰＯＬ２も認識していることが本発明者らによって発見されたため、ＡＰＯＬ１が本当にそこで発現しているかどうかは疑問である。

【０３３８】

［００４６１］　ここで、本発明者らは、ＡＰＯＬ１に特異的な８０の抗体を免疫蛍光法で特徴付け、２つのＮ末端スプライスアイソフォームは細胞質にあるにもかかわらず、ＡＰＯＬ１は内皮細胞とポドサイトに、特にポドサイトのＥＲと形質膜に発現していることを実証している。このように、本発明者らのデータは、細胞傷害性のＥＲストレス又は表面陽イオンチャネルモデルを潜在的にサポートする。

【０３３９】

方法

細胞培養

［００４６２］　ヒト不死化ポドサイト（ＡＢ　８／１３）は、Ｍｏｉｎ　Ｓａｌｅｅｍ（８１）からライセンスを受けて入手したもので、３８℃で１４－１５日間分化させた後、ポドシンとシナプトポジンの免疫蛍光法で正常に染色されることは本発明者らにより定期的に確認されていたが、本発明者らの研究室での遺伝学的確認は行っていなかった。これらを、３３℃で、新鮮な成長培地（１０％ＦＢＳ（Ｓｅｒａｄｉｇｍ　ＩＸＬ９／０

６８０７／ＧＥＮ）、１％グルタミン（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、１％ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ　１５１４０－１２２）、１％インスリン、トランスフェリン、セレン（Ｇｉｂｃｏ　４１４００－０４５）を含むＲＰＭＩ）を週に３回供給して、成長させた。ＡＰＯＬ１　ＣＲＩＳＰＲノックアウトポドサイトについて、また、ドキシサイクリン誘導性ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１及びＧ２ポドサイト、並びにＣＨＯ安定体の生成については、実施例１に記載されるとおりである。同じ方法を用いて、各Ｎ末端アイソフォームの誘導性（スプライス不能）ｃＤＮＡを安定的にトランスフェクトしたｉＡＰＯＬ１ポドサイトを生成した（表５参照）。これらのポドサイトは、培地中にテトラサイクリンフリーＦＢＳと５μｇ／ｍｌのピューロマイシンを必要とする。

【０３４０】

［００４６３］　ＳＴＲ検証されたＣＯＳ７細胞をＧｅｎｅｎｔｅｃｈ社から入手し、高グルコース　ＤＭＥＭ、１０％ＦＢＳ、１％グルタミン、１％非必須アミノ酸（Ｓｉｇｍａ　Ｍ７１４５）で維持した。ＡＰＯＬ　ＤＮＡのトランスフェクション（表３に記載）は、８ウェルＬａｂＴｅｋＩＩ　スライドに０．９ｘ１０^{4}　ＣＯＳ７細胞／ウェルを２４時間プレーティングした後、ウェルあたり０．２５μｇのＤＮＡと予め混合した０．７μｌ　Ｆｕｇｅｎｅ　ＨＤ（Ｐｒｏｍｅｇａ　Ｅ２３１Ａ）を２日間加えることにより達成された。ＪＨＨ－１細胞は、実施例１と同様に培養された。

【０３４１】

ＡＰＯＬ１　ｃＤＮＡクローニング

［００４６４］　下記の表５にまとめられているように、利用可能な全てのＡＰＯＬ　ｃＤＮＡが得られた（ＡＰＯＬ５は利用できなかった）。示されている場合、Ｃ末端ｍｙｃ－ＦＬＡＧタグ（Ｏｒｉｇｅｎｅ；又はＡＰＯＬ４についてはＣ末端ｍｙｃのみ）を有する哺乳類発現ベクターへのサブクローニングは、ＥｃｏＲＩ及びＸｈｏＩ制限部位を用いて達成された。ＡＰＯＬ１　スプライスアイソフォームは全てタグ無しであった。全てのコンストラクトはサンガー法で検証された。

【０３４２】

市販の抗体

［００４６５］　市販の抗ＡＰＯＬ１抗体は、Ｓｉｇｍａ（ＨＰＡ０１８８８５、ロットＥ１０３９６３及びＥ１０５９００、ＩＦでは０．４μｇ／ｍｌ、ウェスタンでは２μｇ／ｍｌで使用）；及びＰｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ（１１４８６－２－ＡＰ、ロット０００４８４１２、ＩＦでは１μｇ／ｍｌ、ウェスタンでは０．４４μｇ／ｍｌで使用）のウサギポリクローナル抗体、並びにＥｐｉｔｏｍｉｃｓのウサギモノクローナルＥＰＲ２９０７（２）ロットＧＲ１４５１１０－２（ＩＦとウェスタンの両方で２μｇ／ｍｌで使用）であった。コンパートメントマーカー抗体は、ウサギ抗カルネキシン（Ａｂｃａｍ　Ａｂ２５５９５、０．２５μｇ／ｍｌ［当研究室でＧＦＰ－カルネキシンとの共局在性により検証され（データは示さず）、その後、Ａｂｃａｍによってカルネキシンノックアウト細胞にシグナルを与えないことが示された］）；ウサギ抗ＰＤＩ（プロテインジスルフィドイソメラーゼ；１：２００　Ｓｔｒｅｓｓｇｅｎ　ＳＰＡ－８９０［カルネキシンとの共局在性により検証］）；マウス抗トランスフェリン受容体Ｈ６８．４（１：２５０　Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１３－６８００［内在化Ａｌｅｘａ４８８－トランスフェリンリガンドとの共局在性により検証（データは示さず）］）；ウサギ抗ペリリピン２（Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈ　１５２９４－１－ＡＰ、ＩＦでは１．７４μｇ／ｍｌ、ウェスタンでは０．０８μｇ／ｍｌ［図３６で検証］）；マウス抗ペリリピン２クローンＡＤＦＰ－５（３．３μｇ／ｍｌ　Ｓｉｇｍａ　ＳＡＢ４２００４５２［図３６で検証］）；ヤギ抗ＥＥＡ１（１μｇ／ｍｌ　Ｃ１５、初期エンドソーム用のＳｃ－６４１４　ロットＫ１９０４［マウス抗ＥＥＡ１との共局在性により検証］］）；ウサギ抗ＬＡＭＰ１細胞質ドメイン（１μｇ／ｍｌ　Ｎｏｖｕｓ　ＮＢ１２０－１９２９４　ロットＭＦ１５９２６０；［マウス抗ＬＡＭＰ１との共局在性により検証］）；マウス抗マイトフュージン２クローン６Ａ８（Ａｂｃａｍ　Ａｂ５６８８９）１μｇ／ｍｌ；ウサギ抗ＦＡＣＬ４（Ａｂｃａｍ　Ａｂ１３７５２５）１μｇ／ｍｌ（両方ともミトコンドリアへの局在がＩＦにより確認）（

図４５Ｂ）；並びに次のマウスモノクローナル抗体（全てＢＤ　Ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ製）：カルネキシンクローン３７（２．５μｇ／ｍｌ　６１０５２３［ウサギ抗カルネキシンとカルネキシン－ＧＦＰの共局在性により検証］）；ＬＡＭＰ１　Ｈ４Ａ３（０．５μｇ／ｍｌ　５５５７９８［ＧＦＰ－ＬＡＭＰ２ａの共局在性により検証（参考文献１０１）］）；シトクロム　ｃ　６Ｈ２（２．５μｇ／ｍｌ　５５６４３２［当研究室によるミトコンドリア標的ＧＦＰの周囲により（１０１）及び他者によるＭｉｔｏＴｒａｃｋｅｒとの共局在性（参考文献１０２）により検証］）；マウス抗ＴＯＭ２０（６１２２７８　１：１０００、ミトコンドリア画分におけるその濃縮以外に検証されていない（図４０Ａ））；ＧＭ１３０クローン３５（１μｇ／ｍｌ　６１０８２３）；ｐ２３０／Ｇｏｌｇｉｎ－２４５（１μｇ／ｍｌ　６１１２８０［ＧＭ１３０への近接性により検証］）；及びＥＥＡ１（初期エンドソーム抗原１）クローン１４（１μｇ／ｍｌ　６１０４５７［ＥＧＦとトランスフェリンの５分パルスとのオーバーラップにより検証］］）であった。その他の抗体は、ｒａｂｍａｂ抗ｍｙｃ　７１Ｄ１０（１：２００　Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２２７８）、マウス抗ＦＬＡＧ　Ｍ２（１μｇ／ｍｌ　Ｓｉｇｍａ　Ｆ３１６５）、マウス抗ｍｙｃ　９Ｅ１０（２μｇ／ｍｌ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、Ｂ－アクチン－ＨＲＰ　１３Ｅ５（１：１０００　Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　５１２５）、マウス抗チューブリン１Ａ２（１：１０，０００　Ｓｉｇｍａ　Ｔ９０２８）、及びウサギ抗カルネキシン（ウェスタンブロットでは１：３０００　Ｓｔｒｅｓｓｇｅｎ　ＳＰＡ－８６０）であった。

【０３４３】

抗ＡＰＯＬ１マウスモノクローナル抗体生成

［００４６６］　マウスモノクローナル抗体を、上記実施例１に記載したように、ｈｉｓ$_6$－ＡＰＯＬ１（ＮＭ＿００３６６１のａａ　６１－３９８）に対して生成させた。最良の３５のマウスモノクローナル抗体を配列決定し、過去に記載されたように（１０３－１０４）エフェクターレスＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｐ３２９Ｇ（ＬＡＬＡＰＧ）変異を有するマウスＩｇＧ２ａ発現ベクターにクローニングし、２２のクローン化抗体がＡＰＯＬ１を正常に認識した。他の種との三重標識を可能にするために、いくつかの最良のクローン化抗体のＦａｂ領域を、ＣＨＯ細胞での発現とプロテインＡアフィニティークロマトグラフィーによる精製のためにウサギＩｇＧ及び／又はラットＩｇＧ２ｂ骨格にサブクローニングした。再フォーマットされたウサギ抗体中の対になっていないシステインは、残基８０のシステインへの変異によって対になった（ウサギ３．７Ｄ６ではＰ８０Ｃ、ウサギ３．１Ｃ１と３．１Ｃ７ではＡ８０Ｃ）。

【０３４４】

抗ＡＰＯＬ１ウサギモノクローナル（ｒａｂｍａｂ）抗体生成（方法＃５）

［００４６７］　免疫蛍光反応性を最大化するために４回目と５回目のブーストを固定抗原で行ったことを除いて、２羽のウサギに上記ｈｉｓ$_6$－ＡＰＯＬ１抗原を０．５ｍｇずつ５回免疫した（Ｌａｍｐｉｒｅ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓにて）。固定のために、１６％ストックのパラホルムアルデヒドを室温で２０分間、氷上で１０分間、１ｍｇのｈｉｓ$_6$－ＡＰＯＬ１に希釈し、最終的に３％にした。その後、ＡＰＯＬ１緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１％ＤＤＭ（ｎ－ドデシル－βＤ－マルトシド））、１０，０００Ｍ　ＷＣＯ膜（Ｐｉｅｒｃｅ）での透析によりＰＦＡを除去した。

【０３４５】

［００４６８］　ウサギモノクローナル抗体は、Ｂ細胞クローニング技術で、ＡＰＯＬ１免疫ウサギから生成された。末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、フィコール密度遠心分離後、ウサギ全血から単離された。このＰＢＭＣをＰＢＳで洗浄した後、ＦＡＣＳ緩衝液（２％ＦＣＳを含むＰＢＳ）に再懸濁させ、ＦＩＴＣ標識抗ウサギＩｇＧ（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ、ＢｉｏＲａｄ）で染色した。洗浄後、細胞をヨウ化プロピジウムを含むＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁させた。ＦＡＣＳＡｒｉａソーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）

を用いて、生きた単一ＩｇＧ陽性Ｂ細胞を９６ウェル培養プレートに選別した。Ｂ細胞をＢ細胞培養培地（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）で１週間培養した後、ＥＬＩＳＡで上清のＡＰＯＬ１結合をスクリーニングした。各ウェルのＢ細胞を１００μｌのＲＬＴ緩衝液（Ｑｉａｇｅｎ社、ドイツ、ヒルデン）で溶解し、分子クローニングまで保存するために直ちに－８０℃で凍結した。各ＥＬＩＳＡ陽性モノクローナル抗体の可変領域（ＶＨ及びＶＬ）を、過去に記載されたように（１０５）、抽出したｍＲＮＡから発現ベクターにクローニングされた。個々のウサギ抗体を１ｍｌのＥｘｐｉ２９３細胞で組換え発現させ、その後プロテインＡ型樹脂でハイスループットで精製した。ＩＦ陽性クローンをスケールアップ（３０ｍｌ）のために選択し、プロテインＡカラムで精製した後、サイズ排除クロマトグラフィーでタンパク質凝集体を除去した。

【０３４６】

［００４６９］　抗体は、メタノールプロトコールを用いてＡＰＯＬ１又はＡＰＯＬ２を一過性に発現するＣＯＳ細胞上で１μｇ／ｍｌで試験することにより免疫蛍光をスクリーニングし、陽性はＰＦＡ／Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で再試験した。抗体を感度でランク付けするために、より低発現のｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ安定体（実施例１参照）をＰＦＡ／サポニン法で染色した。最も強い数個を、ポドサイトの内因性ＡＰＯＬ１を染色するために使用した。

【０３４７】

ＲＴ－ＰＣＲ

［００４７０］　ミシガン大学の合意のもと、瞬間凍結された正常な死後ヒト腎臓を入手した（４７、５０、６２歳の女性３名、６２歳と６３歳の男性２名）。ＲＮｅａｓｙミニキット（Ｑｉａｇｅｎ社、カリフォルニア州バレンシア）を用いて組織又は細胞から全ＲＮＡを抽出した。ＲＮＡｓｅフリーのＤＮＡｓｅセット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて精製中にオンカラムゲノムＤＮＡ消化を行い、Ｈｉｇｈ　Ｃａｐａｃｉｔｙ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、カリフォルニア州フォスターシティ）を使用して付属のランダムヘキサマープライマーでｃＤＮＡ合成を行った。定量的ＰＣＲ反応は、ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ配列検出システム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でＡＰＯＬ特異的プローブ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、Ｔａｑｍａｎ解析により３回行った。本発明者らは、ＡＰＯＬファミリーのプローブ特異性を、全てのファミリーメンバーをコードするｃＤＮＡ上で検証した（図３０Ａ）（カタログ番号：Ｌ１はＨｓ１０６６２８０＿ｍ１；Ｌ２はＨｓ００６０３１４６＿ｍ１；Ｌ３はＨｓ００６００８９６＿ｍ１；Ｌ４はＨｓ００５４０９３０＿ｍ１；Ｌ５はＨｓ００２２９０５２＿ｍ１；及びＬ６はＨｓ００２２９０５１＿ｍ１）。また、様々なＡＰＯＬ１プローブのアイソフォーム特異性を図４９Ｃに示している。相対的ｍＲＮＡは、ＲＰＬ１９に正規化した２－Ｃｔ法を用いて計算された。データはＰＲＩＳＭ．ｖ７ソフトウェアを用いてプロットされた。

【０３４８】

Ｉｎ－ｓｉｔｕハイブリダイゼーション

［００４７１］　ＦＦＰＥ固定された正常な死後男性（４７歳と５９歳）のヒト腎を、ＭＴグループ（カリフォルニア州バンナイズ）の合意のもと、倫理委員会の承認とインフォームドコンセントを得て入手した。５μｍでスライド上に切り出した腎臓又は細胞ペレットをＬｅｉｃａ　ＢｏｎｄＲｘ自動染色装置にロードし、ベーキング及び脱脂を行った。スライドをＥＲ２で９５℃で１５分間、Ｌｅｉｃａ　Ｅｎｚｙｍｅで４０℃で１５分間前処理をした。プローブ（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ社製の全てのＲＮＡＳｃｏｐｅ（登録商標）ＬＳ　２．５プローブ）を４２℃で１２０分間ハイブリダイズした：ＡＰＯＬ１（Ｈｓ－ＡＰＯＬ１－０２－Ｃ２、カタログ＃５６９１６８－Ｃ２、ＮＭ＿００３６６１．３のｎｔ　７６８－１４３１、１０ｚｚ）；Ｈｓ－ＮＰＨＳ２（カタログ＃５５６５３８、ＮＭ＿０１４６２５．３のｎｔ２６８－１１７２、２０ｚｚ）；Ｈｓ－ＥＧＬＦ７（カタログ＃３１４００８、ＮＭ＿０１６２１５．４のｎｔ１４－１３５６、１４ｚｚ）。シグナルの検出には、ＲＮＡＳｃｏｐｅ　２．５　ＬＳ

Ｄｕｐｌｅｘ　Ｒｅａｇｅｎｔキット（カタログ＃２００５８３５）を使用した。本発明者らは、ＡＰＯＬ１プローブは、ＡＰＯＬ２と交差反応せず、ポドサイトの内因性ＡＰＯＬ１を検出できることを確認した（図２１Ｂ）。ＡＰＯＬ１プローブ（カタログ＃４１１５７８　ＮＭ＿００１１２６５４１．１のｎｔ　２－９０２）の初期バージョンはＡＰＯＬ２と交差反応したこと（そのため中止された）と、このプローブは糸球体内皮を染色した（データは示されていない）ことに留意されたい。切片を薄いマイヤーのヘマトキシリンで対比染色し、６０℃で１時間乾燥させ、Ｈｉｓｔｏｍｏｕｎｔでマウントした。

【０３４９】

免疫組織化学

［００４７２］　抗体スクリーニングのために、非トランスフェクトＣＨＯ細胞、ｉＡＰＯＬ１－Ｇ０　ＣＨＯ安定体（実施例１参照）、一過性にトランスフェクトしたＡＰＯＬ２　ＣＨＯ細胞、ＩＦＮｇ刺激を行わないＷＴポッドサイト及びＩＦＮｇ刺激を行ったＡＰＯＬ１　ＫＯポッドサイトを含むＦＦＰＥ細胞ペレットのミニアレイを作製した。細胞ペレットを作製するために、ＣＨＯ細胞の１５ｃｍディッシュ１０枚を、ディッシュあたり１２μｇのＡＰＯＬ２　ＤＮＡと共に４８時間リポフェクタミントランスフェクトしたか、又はドキシサイクリン誘導ｉＡＰＯＬ１－ＣＨＯ安定体を使用した。細胞を５ｍＭＥＤＴＡを含むＰＢＳ中で剥離し、ペレット化した後、標準的な方法でホルマリン固定及びパラフィン包埋（ＦＦＰＥ）した。ＡＰＯＬ１－Ｇ０　ＢＡＣトランスジェニックＣ５７ＢＬ／６マウス（ヒトＡＰＯＬ１プロモーター下、肝臓、腎臓及び肺でヒトと同様にＡＰＯＬ１を発現）の作製については、別途記載される（参考文献１０６も参照のこと）。全てのマウスハイブリドーマ上清とクローン化ｒａｂｍａｂを、ＤＡＫＯＴａｒｇｅｔ　Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ溶液とＡＢＣ－ＨＲＰ検出法を用い、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＡｕｔｏＳｔａｉｎｅｒで５μｇ／ｍｌでスクリーニングした。

【０３５０】

［００４７３］　ＩＨＣの最適化プロトコールを、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＡｕｔｏＳｔａｉｎｅｒで実施した。ＤＡＫＯ　Ｔａｒｇｅｔ　Ｒｅｔｒｉｅｖａｌ溶液で９９℃、２０分間の熱誘導抗原回収の後、一次抗ＡＰＯＬ１　ｒａｂｍａｂ　５．１７Ｄ１２を０．５μｇ／ｍｌで６０分間室温で、続いてビオチン化ロバ抗ラビット二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　７１１－０６６－１５２）を５μｇ／ｍｌで３０分間インキュベートし、その後Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－ＨＲＰで３０分間、ＴＳＡ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）で３分間の増幅工程を実施した。色素原はＤＡＢであった。６４－８９歳の女性２名と男性３名のＦＦＰＥ正常ヒト腎臓を、Ｆｏｌｉｏ社及びＣｕｒｅｌｉｎｅ社の合意のもとに入手した。

【０３５１】

免疫蛍光法

［００４７４］　細胞をＬａｂＴｅｋＩＩ（Ｎａｌｇｅ　Ｎｕｎｃ　１５４５３４）スライドにプレーティングし、７０－１００％コンフルエンシーで固定した。ｍＡｂスクリーニングのために、細胞を－２０℃メタノール（ＥＭＤ　ＭＸ０４８５－６）中で５分間固定／透過化した。他の全ての実験では、細胞を、３％パラホルムアルデヒドを含むＰＢＳ（ＥＭＳ　１５７１０）で室温で２０分間固定し、５０ｍＭ　ＮＨ４Ｃｌを含むＰＢＳで１０分間クエンチし、その後０．１％ＴＸ－１００を含むＰＢＳで４分間、又はサポニン緩衝液［０．４％サポニン（Ｓｉｇｍａ　Ｓ７９００）、１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ；Ｓｉｇｍａ　Ａ２１５３）、２％ウシ胎児血清（Ｓｅｒａｄｉｇｍ）を含むＰＢＳ］で１時間透過化した。一次抗体（４℃で滅菌保存）を、室温で１時間、トランスフェクト細胞でのスクリーニングのために１μｇ／ｍｌで、又は内因性ＡＰＯＬ１を検出するためにその後最適化された濃度でアプライした。二次抗体を、ＰＢＳ（メタノール又はＴＸ－１００プロトコールの場合）又はサポニン緩衝液（サポニンプロトコール）で３回１０分間洗浄後、１．８８μｇ／ｍｌで室温で１時アプライし、３回洗浄後、ＰｒｏＬｏｎｇ　Ｇｏｌｄ　ｗｉｔｈ　ＤＡＰＩ（４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール；Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｐ３６９３１）で１．５号カバーガラスの下にマウン

トした。二次抗体（５０％グリセロール中－２０℃で保存）である、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ社の全て高度に交差吸着されたロバＦ（ａｂ’）$_2$抗Ｈ＆Ｌには、Ａｌｅｘａ４８８抗マウス（７１５－５４６－１５０）、ラットに対して更に交差吸着されたＡｌｅｘａ４８８抗マウス（７１５－５４６－１５１）、Ａｌｅｘａ４８８抗ウサギ（７１１－５４６－１５２）、Ｃｙ３抗マウス（７１５－１６６－１５０）、Ｃｙ３抗ウサギ（７１１－１６６－１５２）、Ｃｙ３抗ウサギ（マウスと最小限の交差反応性、７１２－１６６－１５３）、Ｃｙ３抗ヤギ（７０５－１６６－１４７）、Ａｌｅｘａ６４７抗ウサギ（７１１－６０６－１５２）、Ｄｙ６４９抗ウサギ（７１２－４９６－１５３）、Ａｌｅｘａ６４７抗マウス（７１５－６０６－１５０又はウサギ抗体と共染色する場合は７１５－６０６－１５１）が含まれていた。ＥＲとミトコンドリアの三重標識には、アイソタイプ特異的マウス二次抗体：マウス４．１７Ａ５にはＡｌｅｘａ４８８抗ＩｇＧ２ａ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ａ２１１３１）、シトクロム ｃにはＡｌｅｘａ５５５抗ＩｇＧ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ａ２１１２７）を、カルネキシンにはＡｌｅｘａ６４９抗ウサギを使用した。代替的には、ラット４．１７Ａ５とＣｙ３抗ラットを使用した（図３８）。

【０３５２】

［００４７５］ 形質膜の選択的透過化のために、ジギトニンの濃度を、まず、細胞の前固定から遊離ＧＦＰが確実に浸出するようにすることによって最適化したが、内腔にＧＦＰが付いた、ＥＲ標的ＧＦＰ－カルネキシン（１０１）はＧＦＰ蛍光によってのみ検出でき、赤チャネルにおいて抗ＧＦＰ抗体は検出できなかった（データは示されていない）。ＣＯＳ細胞に対する最適濃度は０．００２５％（２０μＭ）で、ＴＸ－１００を含むＫＨＭ緩衝液（１１０ｍＭ酢酸カリウム、２０ｍＭ Ｈｅｐｅｓ ｐＨ７．４、２ｍＭ ＭｇＣｌ$_2$）（８４）の代わりに４分間アプライした。

【０３５３】

［００４７６］ ＣＯＳ細胞を、６０ｘ ＰｌａｎＡＰＯ ＮＡ １．４対物レンズ、標準のＤＡＰＩ／ＦＩＴＣ／Ｃｙ３／Ｃｙ５フィルターセット及びＳｌｉｄｅＢｏｏｋ（ｖ５．５）で管理されるＰｈｏｔｏＭｅｔｒｉｃｓ ＨＱ２カメラを備えたＡｘｉｏＭ２イメージングシステム（Ｚｅｉｓｓ）で画像化した。ポドサイト及びＣＨＯ細胞は、ＳｌｉｄｅＢｏｏｋ（ｖ６）で動作する、６３ｘ ＰｌａｎＡＰＯ Ｎ．Ａ． １．４オイル対物レンズと４０５、４８８、５６１及び６４０ｎｍレーザーを備えたスピニングディスク共焦点顕微鏡（３ｉ Ｗ、横河Ｗ１スピニングディスク付きＺｅｉｓｓ ＡｘｉｏＯｂｓｅｒｖｅｒ Ｍ１顕微鏡）を用いて画像化された。カメラはＨａｍａｍａｔｓｕ ＦＬＡＳＨ ４．０ ｓＣＭＯＳを使用した。

【０３５４】

電子顕微鏡法

［００４７７］ ｉＥＭの場合、Ｔ２５フラスコ内の１．４ｘ１０^6 ＨＥＫ－２９３細胞に、５．４μｇ ＡＰＯＬ１又はＡＰＯＬ２ ｃＤＮＡを含む１２μｌのＦｕｇｅｎｅ ６（Ｒｏｃｈｅ １１８１４４４３００１）をそれぞれ５０時間又は６５時間逆トランスフェクトした。ポドサイト及び一過性トランスフェクトＨＥＫ－２９３細胞を、４％パラホルムアルデヒドを含む０．１Ｍリン酸緩衝液（ＰＢ）（ｐＨ７．４）で室温で２時間、その後４℃で一晩固定し、且つ、それぞれ２％パラホルムアルデヒド、０．２％グルタルアルデヒドを含む０．１Ｍリン酸緩衝液（ＰＢ）（ｐＨ７．４）で室温で２時間固定した。固定は、１％ＰＦＡを含む０．１Ｍ ＰＢで、４℃で数日間続けられた。細胞を、掻き取り、ペレット化し、１２％ゼラチンに包埋し、２．３Ｍスクロースで凍防止し、アルミニウムピンに載せて液体窒素中で凍結した。超薄凍結切片を、－１２０℃で切断し、抗ＡＰＯＬ１抗体で、続いてプロテインＡ金粒子（１０ｎｍ）で染色した。定量化のために、ＡＰＯＬ１／２発現ＨＥＫ－２９３細胞及びポドサイトのランダム画像を作成した。抗体あたり少なくとも５０個の金粒子の位置は、次のうちのいずれかとしてスコア化された：（ｉ）ＯＭＦ：ＥＲ外膜面と細胞質ゾルでオーバーラップしているか若しくはＥＲ外膜面と１０ｎｍの金粒子表面の間の距離が１５ｎｍ以下の細胞質ゾル内にある、（ｉｉ）

ＩＭＦ：ＥＲ内膜面とＥＲ内腔でオーバーラップしているか若しくはＥＲ内膜面と金粒子表面の間の距離が１５ｎｍ以下の内腔にある、又は（ｉｉｉ）内腔：ＥＲ内腔内で、１０ｎｍ金粒子表面とＥＲ膜の最も近い内側表面の間の距離が１５ｎｍ以上である。２名の研究者が別々に定量化手順を実施した。ＥＲ上の金粒子のパーセントスコアを平均し、結果を各抗体の折れ線グラフとしてプロットした。

【０３５５】

フローサイトメトリー

［００４７８］　生細胞を氷上で１μｇ／ｍｌ　３．６Ｄ１２で１時間染色し、洗浄し、１μｇ／ｍｌ　Ａｌｅｘａ４８８抗マウス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ａ１１０２９）で検出した。フローサイトメトリーを実施例１と同様に行った。

【０３５６】

ウェスタンブロッティング

［００４７９］　細胞を、Ｓｅｅ　Ｂｌｕｅ　Ｐｌｕｓ２分子量マーカー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＬＣ５９２５）を用いて１０％、１２％、４－２０％のＴｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲルで、又はＰｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｐｌｕｓタンパク質Ｋａｌｅｉｄｏｓｃｏｐｅスコープマーカー（ＢｉｏＲａｄ＃　１６１０３７５）を用いてＭＯＰＳ緩衝液中、４－１２％　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル上で泳動させた以外は、実施例１と同様に天然ＲＩＰＡ（１％　ＮＰ－４０緩衝液）中で溶解した。最良の抗ＡＰＯＬ１抗体は、クローン化ウサギ３．１Ｃ１と３．７Ｄ６の混合物（それぞれ０．０５μｇ／ｍｌ）であった。

【０３５７】

ポドサイト分画

［００４８０］　ＩＦＮγ誘導ＷＴポドサイトの１５０×１５ｃｍディッシュをトリプシン処理で回収し、Ｔｅｆｌｏｎ　Ｐｏｔｔｅｒ－Ｅｌｖｅｈｊｅｍ　＃２２組織グラインダーを５０ストローク使用して１０ｍｌ（５×２ｍｌバッチ）のＩＢ$_{ｃｅｌｌｓ}$－１緩衝液（２２５ｍＭマンニトール、７５ｍＭスクロース、３０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｃｌ、０．１ｍＭ　ＥＧＴＡ、ｐＨ７．４）で手動でホモジナイズし、超音波処理し（Ｂｒａｎｓｏｎ　４５０　ｓｏｎｉｆｉｅｒで１０秒間３回、速度３．５）、Ｗｉｅｃｋｏｗｓｋｉら（１０７）のプロトコールに従って分画した。簡潔に言えば、１０，０００ｇのペレットからの粗ミトコンドリアを、９５，０００ｇで３０分間の３０％パーコール勾配での分画によりＭＡＭから分離した。一方、ＥＲは１００，０００ｇでの遠心分離によりミトコンドリア上清から回収した。各画分１０μｇ（ＢＣＡアッセイ、Ｐｉｅｒｃｅで判定）を４－２０％　Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅゲルにロードし、適切なコンパートメントマーカーでプローブした。

【０３５８】

結果

腎臓ポドサイトはＡＰＯＬ１、２及び６を発現する

［００４８１］　ＡＰＯＬ１は、ＡＰＯＬ１－ＡＰＯＬ６から構成されるヒトＡＰＯＬファミリーの唯一の分泌型メンバーであり（７８－８０）、ＡＰＯＬ２と最も近縁である（タンパク質同一性５３％、表３）。ＲＴ－ＰＣＲにより、ＡＰＯＬ１、２、３、６のｍＲＮＡは正常なヒト腎臓に発現しているが、ＡＰＯＬ４又は５のｍＲＮＡはそうではないことが確認された（図２１Ａ）（７８－８０）。二重ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）により、ＮＰＨＳ２と共局在するＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡをポドサイトに対して特定した（図２１Ｂ）が、形態学的にポドサイトに似たＮＰＨＳ２陰性細胞でもいくつかのシグナルが見られた。ＡＰＯＬ１と内皮ＥＧＦＬ７　ｍＲＮＡ又はＰＶＬＡＰタンパク質の二重ＩＳＨは、糸球体内皮細胞における共局在性を示さなかった。したがって、ＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡはこれらの細胞に存在しないか又は検出限界以下である。

ｃ）表３：ＡＰＯＬ遺伝子相同性とプラスミド源

APOL 遺伝子	C 末端ﾀｸﾞ	ﾍﾞｸﾀｰ	cDNA の供給源	ｱｸｾｯｼｮﾝ	%ID FLS*	対応する抗原 aa	ApoL 抗原との%ID	抗原との%類似性
APOL1	なし@	pCMV6-XL5	Origene SC109941	NM_003661# NP_003652	100	61-398	100	100
APOL2	なし@	pCMV6-XL4	Origene SC124549	NM_145637& NP_663612	53	1-337	61	65
APOL3.v2	Myc-FLAG	pCMV6-Entry	Origene RC208325	NM_014349 NP_663614	40	1-331	47	53
APOL4.v1	Myc	pReceiver-M09	Genecopoeia Z4913	NM_030643 NP_085146	36	24-348	39	43
APOL5	n/a	n/a	n/a	NP_085145	20	16-358 (433 のうち)	25	21
APOL6	Myc-FLAG	pCMV6-Entry	Origene RC208481	NM_030641 NP_085144	24	1-298 (343 のうち)	30	31

*略語：ＦＬＳ　全長配列；ＩＤ　同一性；ｎ／ａ　ＤＮＡクローン利用不可
#Ｎ末端ｈｉｓ$_6$タグを持つＡＰＯＬ１Ｇ０アイソフォームＡ（実際のｒｅｆｓｅｑ　ＮＭ＿００３６６１）のアミノ酸６１－２９８を含むＡＰＯＬ１（ｖ１）抗原（バキュロウイルスベクター中）を免疫化に使用。抗体がＩＦによりスクリーニングされたｐＣＭＶ６－ＸＬ５中のＯｒｉｇｅｎｅと称されるＮＭ＿００３６６１アイソフォームＡクローンのＤＮＡ配列決定により、それは実際にはＥ１５０Ｋ（ｒｓ２２３９７８５）、Ｍ２２８Ｉ（ｒｓ１３６１７５）、及びＲ２５５Ｋ（ｒｓ１３６１７６）（ｒｅｆ．１１０－１１２）の３つの共通ＳＮＰを含む配列ＢＣ１４３０３８１であることが判明した。
&配列決定されたＯｒｉｇｅｎｅ　ＡＰＯＬ２クローンは、予想されるＮＭ＿１４５６３７の配列からＩ２４５Ｖの変更（ｒｓ１３２７６０）を有する。
@また、ＥｃｏＲ１とＸｈｏ１サイトを用いたＰＣＲにより、ＡＰＯＬ３の代わりにＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２をｍｙｃ－ＦＬＡＧ／ｐＣＭＶ６－Ｅｎｔｒｙ（Ｃ末端でタグ付け）にサブクローニングした。
ｎ／ａ：ＡＰＯＬ５については市販のｃＤＮＡは見られなかったが、ＡＰＯＬ５は、試験した全ての抗体で陰性であったＡＰＯＬ６と近縁である。

【０３５９】

［００４８２］　分化した不死化ヒトポドサイト（８１）では、ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２のｍＲＮＡだけが検出され（図２１Ｃ）、予想通り、どちらもインターフェロンガンマ（ＩＦＮｇ）刺激で１０倍超増加した（６１）。ＡＰＯＬ３－５は検出されなかったが、ＡＰＯＬ６もＩＦＮｇ処理後に検出可能になった。未分化ポドサイトでも同様の傾向が見られたが、ＩＦＮｇによるＡＰＯＬ１の誘導はそれほど顕著ではなかった。ウェスタンブロッティングでは、ＡＰＯＬ２（３７ｋＤａ）がＡＰＯＬ１（４１ｋＤａ）よりも更に多いように見えたが、両者ともＩＦＮｇによって増加した（図２１Ｄ）。したがって、ポドサイトにおけるＡＰＯＬ１の特異的な免疫局在性には、ＡＰＯＬ２又はＡＰＯＬ６と非交差反応性の抗体が必要である。

【０３６０】

多くの抗ＡＰＯＬ１抗体がＡＰＯＬ２と交差反応する

［００４８３］　残念ながら、過去の報告（５９、７２、７３、７６、７７）で使用した３つの市販のウサギ抗体は全てＡＰＯＬ２と交差反応し（図２２Ａ－Ｂ）、Ｐｒｏｔｅｉｎｔｅｃｈポリクローナルは免疫蛍光法（ＩＦ）で更にＡＰＯＬ３（及び弱くＡＰＯＬ

４、図示せず）を認識する。そこで、本発明者らは、ＡＰＯＬ１特異的抗体を特定するために、ＡＰＯＬ１及びＡＰＯＬ２をトランスフェクトしたＣＯＳ細胞のＩＦにより、ＡＰＯＬ１（実施例１参照）に対する１３５のマウスモノクローナル抗体（ｍＡｂ）をスクリーニングした。ＡＰＯＬ１を検出した１０７のｍＡｂのうち４４は、ＡＰＯＬ２と交差反応した（データは示さず）。エピトープカバレッジを拡大するために、本発明者らはウサギで更に３５のモノクローナル抗体（ｒａｂｍａｂ）を作製し、そのうち２３がＡＰＯＬ１を免疫染色し、６つはＡＰＯＬ２も免疫染色した。ＡＰＯＬ２とのモノクローナル交差反応性が高い（５０／１３０　ＩＦ陽性＝３８％）ことは、この抗原の相同性が６１％しかないことから、予想外であった（表３）。

【０３６１】

［００４８４］　ＩＦに対して最も感度の高いＡＰＯＬ１特異的抗体は、ｒａｂｍａｂ５．１７Ｄ１２、ｍＡｂ４．１７Ａ５と３．７Ｄ６であった（図２２Ｃ）。ＭＡｂ　３．６Ｄ１２はより強かったが、ＡＰＯＬ２、３及び４と交差反応した（図２２Ｃと表４）。ウェスタンブロッティングにより、これらのＡＰＯＬの特異性、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１（ＷＴ）の検出に対する感度、並びにＡＰＯＬ１－Ｇ１及びＧ２の認識が確認された（図２２Ｄ）。４１ｋＤａのポドサイトバンドは、ＡＰＯＬ１ノックアウト（ＫＯ）ポドサイトに存在せず、抗体の特異性が確認された。

ｄ）表４：免疫蛍光による抗ＡＰＯＬ１抗体交差反応性

抗体	種*	ﾄﾞﾒｲﾝ$	APOL1	APOL2	APOL3	APOL4	APOL6
5.17D12	Rabmab	PFD	+++	−	−	−	−
3.7D6	ﾏｳｽ、ｳｻｷﾞ（P80C）、ﾗｯﾄ	PFD	+++	−	−	−	−
4.17A5	ﾏｳｽ、ﾗｯﾄ	PFD	++++	−	−	+	−
3.6D12	ﾏｳｽ	PFD	++++	+++	+	+	−
5.17H8	Rabmab	PFD	++++	++	±	±	−
3.5C10	ﾏｳｽ	PFD	++++	+++	+	+	−
3.3A8	ﾏｳｽ	MAD	+++	++	−	−	−
4.2C4	ﾏｳｽ	PFD	+++	#	−	−	−
3.6E10	ﾏｳｽ	SRA-IDﾘﾝｶｰ	+++	−	−	−	−
3.1C1	ﾏｳｽ、ｳｻｷﾞ（A80C）ﾗｯﾄ	SRA-IDﾘﾝｶｰ	++	−	−	−	−
3.1C7	ﾏｳｽ、ｳｻｷﾞ（A80C）ﾗｯﾄ	SRA-IDﾘﾝｶｰ	++	−	±	−	−
4.12E5	ﾏｳｽ	SRA-ID&	++	−	−	−	−
Sigma HPA018885	ｳｻｷﾞ	MAD-SRA-ID	++	+^	−	−	−
Epitomics EPR2907(2)	Rabmab	SRA-ID	++	++	−	−	−
Proteintech 11486-2-AP	ｳｻｷﾞ	PFD	++++	++++	++	±	−

*最初にリストされている種がオリジナルで、それ以降のものはサブクローニングされたものである。サブクローン化ウサギ抗体は、対になっていないシステインを避けるため、残基８０でシステインに変異させた。

$ドメインマッピングについては、Ｇｕｐｔａ　ｅｔ　ａｌ．を参照。ＰＦＤ　気孔形成ドメイン（ａａ　６０－２３５）；ＭＡＤ　膜アドレッシングドメイン（ａａ　２４０－３０３）；ＳＲＡ－ＩＤ　ＳＲＡ－相互作用ドメイン（ａａ　３０５－３９８、ＭＡＤ－ＳＲＡ－ＩＤリンカーを含む）。

#４．２Ｃ４は、ＰＦＡ／サポニンと免疫電子顕微鏡でＡＰＯＬ２と交差反応する（但しＰＦＡ／Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００ではしない、図３１Ａ－Ｂに示す）。

&４．１２Ｅ５はＦＡＣ又はウェスタンではＡＰＯＬ１－Ｇ２をあまりよく認識しない（ＩＦとＩＨＣではある程度認識するが（データは示さず））。

^シグマ抗体はメタノール固定ではなくＰＦＡ固定でのみＡＰＯＬ２と交差反応する。

＋＋＋＋　非常に強い；＋＋＋　強い；＋＋　中程度；＋　弱い±　非常に高い過剰発現体とのみ交差反応する；ｎ．ｄ．　未定。

【０３６２】

ＡＰＯＬ１特異的抗体により、ＡＰＯＬ１がポドサイトに（主にＥＲに限られて）存在することが明らかに

［００４８５］　免疫組織化学によってＡＰＯＬ１特異性についてスクリーニングされた１７０の抗体のうち、５．１７Ｄ１２が最良であった（図３２Ａ－Ｂ）。ヒト及びＡＰＯＬ１トランスジェニックマウスの腎臓において、５．１７Ｄ１２はポドサイト及び内皮細胞を染色したが、市販のポリクローナル抗体（図３２Ｃ）（７３、７６）とは異なり、近位尿細管の強い染色はなかった（図２３、図３２Ｂ）。肝臓の肝細胞も陽性であったが（図３３Ａ－Ｂ）、糸球体よりも弱かった。これらの類似したウェスタンブロットのシグ

ナル（７６）は、肝臓の肝細胞の割合が、腎臓の糸球体よりもはるかに多いことを反映していると推定される。

【０３６３】

［００４８６］　細胞内では、ＣＯＳ細胞内で一過性に発現したＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１及びＧ２は、核膜を含む小胞体（ＥＲ）にほぼ独占的に現れ、ＥＲに特異的なマーカーであるカルネキシンと共局在する全１３０のＩＦ陽性抗体を有していたが、他のコンパートメントには現れなかった（図３４－３７Ａ、データ示さず）。興味深いことに、ＡＰＯＬ２もシグナル配列がないにもかかわらず、カルネキシンと共局在した（図３４）。３つのＡＰＯＬ１バリアントは全て、安定にトランスフェクトされた誘導性ＡＰＯＬ１（「ｉＡＰＯＬ１」）ポドサイトにおいて同様に、ＥＲに局在しミトコンドリアには局在しなかった（図３８Ａ）。これは免疫電子顕微鏡（ｉＥＭ、図２４Ａ、２４Ｂ）で確認された。ＡＰＯＬ１は、核周囲領域のＩＦによって少数のミトコンドリアと部分的にオーバーラップしているように見えることがあるが、ミトコンドリアの５－２０％がＥＲに近接していることから（８２）、これは分解能の問題である可能性が高く、ＡＰＯＬ１、ＥＲ及びミトコンドリアの三重標識によって、ＡＰＯＬ１は、ＥＲとのオーバーラップを伴わないミトコンドリアでは決して見られないことが明らかになった（図３８Ｂ）。より説得力のあることは、ミトコンドリアは、陽性のＥＲ槽に隣接していても、ｉＥＭによって一貫してＡＰＯＬ１陰性であった（図３９Ａ－３９Ｄ）。細胞内分画はまた、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１はＥＲ及びミトコンドリア関連ＥＲ膜（ＭＡＭ）においては濃縮されているが（８３）、純粋なミトコンドリアには存在しないことも確証するものである（図４０Ａ）。ＭＡＭのＡＰＯＬ１　ｉＥＭは、ＡＰＯＬ１が主にＥＲ槽内にあり（図４０Ｂ－Ｄ）、ミトコンドリア又はこれらの小器官の間の空間にはないことを確認した。ｉＥＭはまた、ＩＦにより識別できない、ゴルジにおけるＡＰＯＬ１をいくらか検出できたが（図２４Ｃ）、他の細胞内小器官においては検出できなかった。これは、ＡＰＯＬ１が分泌型であることを示す。

【０３６４】

［００４８７］　重要なことに、ＥＲ局在性ＡＰＯＬ１が単なる過剰発現のアーチファクトではなかったことである。なぜなら、内因性ＡＰＯＬ１は、分化ポドサイト及び未分化ポドサイトの両方（図２４Ｄ及び図４１Ａ－Ｂ）とＪＨＨ－１（肝臓）細胞（図４２）とで同様にＥＲに局在していたためである。内因性ポドサイトＡＰＯＬ１は、ＩＦＮｇによるアップレギュレーション後に増加し、ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト及びゴルジ、エンドソーム、ミトコンドリア、脂肪滴などの他のコンパートメントには存在せず（図４３－４４及び３７Ｂ）、ＩＦによるＭＡＭマーカーとのわずかなオーバーラップを示すに過ぎなかった（図４５Ａ－Ｂ）。ＡＰＯＬ２交差反応性抗体はＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイトのＥＲをＷＴとほぼ同じくらい強く染色する。これは、実際にはＷＴシグナルのほとんどがＡＰＯＬ２を表すことを示している（図４６Ａ－Ｂ）。まとめると、内因性、一過性及び安定的に発現したＡＰＯＬ１は、調べた全ての細胞種でＥＲに限られているよう見える。

【０３６５】

ＡＰＯＬ１ではなく、ＡＰＯＬ２が、形質膜の細胞外表面に存在する

［００４８８］　これらの（透過化）細胞株のいずれにおいてもＩＦによって形質膜にあるＡＰＯＬ１を検出しなかったにもかかわらず、ほとんどの抗体は、非透過化ＷＴ（ＡＰＯＬ１－ＫＯではなく）ポドサイト及び安な細胞株のフローサイトメトリーによって表面ＡＰＯＬ１を認識した（実施例１）。ＡＰＯＬ２交差反応性３．６Ｄ１２も同様に、ＡＰＯＬ１　ＫＯポドサイト（ＡＰＯＬ２を保持）ではシフトしなかった。これは、ＡＰＯＬ２が細胞表面上に見られないことを示す（図２５Ａ）。非透過化ポドサイトの染色は、表面ＡＰＯＬ１が点状であり、高発現ＪＨＨ－１細胞及びｉＡＰＯＬ１－Ｇ０、Ｇ１、Ｇ２ポドサイトよりも斑点が少なくて暗かった（図２５Ｂ及び図４７Ａ－Ｂ）。透過化細胞ではるかに強いＥＲシグナルが表面シグナルを隠すため、表面ＡＰＯＬ１は全体のわずかな割合に過ぎない。更に、ｉＥＭによってポドサイト形質膜上に比較的少数の金粒子が見られた（図２５Ｃ）。

【０３６６】
ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２はＥＲ膜の両面に局在する
［００４８９］　細胞表面にはＡＰＯＬ１のみが見られたが、ＡＰＯＬ１とＡＰＯＬ２の両方がＥＲに局在しているように見えたため、ＡＰＯＬ２をトランスフェクトしたＣＯＳ細胞を、ＥＲ膜をインタクトなまま残して形質膜を選択的に透過化するジギトニンでの透過処理によって、ＡＰＯＬ２がＥＲの外側（細胞質側）の面に局在するかどうかを調べた（８４）（図２６Ａ）。４４のＡＰＯＬ２交差反応性ｍＡｂは全て、サポニン又はＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（全ての細胞膜を透過性にする）によるものと同様のジギトニンによるＥＲ染色パターンを示し、ＡＰＯＬ２が実際にＥＲの細胞質面にあることを示す（図２６Ｂ）。
【０３６７】
［００４９０］　一方、８０のＡＰＯＬ１特異的抗体は全て、ジギトニン透過化でのＥＲシグナルの代わりに核膜（高親和性の場合は、プラス形質膜）シグナルを与えた（図２６Ｂ）。これは、ＡＰＯＬ１がアクセス不可能であるために、（核膜と連続する）ＥＲ内腔の内側にある必要があることを示す。したがって、ＡＰＯＬ１の３つのドメインは全て内腔にあり、細胞質に突出したエピトープは１つもない。ｉＥＭの定量化により、ＡＰＯＬ１はｉＡＰＯＬ１ポドサイトのＥＲ内膜面に関連しており、内腔ＥＲマーカーＫＤＥＬのようにＥＲ内腔に可溶ではないことが明らかになった（図２６Ｃ、２６Ｄ）。ＡＰＯＬ１は、同様にトランスフェクトＨＥＫ－２９３細胞のＥＲ内膜と関連していた（図４８Ａ－４８Ｃ）が、ＡＰＯＬ２はよりＥＲ外膜に向かって分布しており、ジギトニンで観察された局在の違いをサポートする。
【０３６８】
［００４９１］　重要なことに、内因性ＡＰＯＬ１及びＡＰＯＬ２も、ジギトニン透過化ポドサイトにおいて、それぞれＥＲの内腔面及び細胞質面に存在していた（図４６Ａ－４６Ｂ）。このことから、交互にスプライシングされた細胞質ＡＰＯＬ１アイソフォーム（６１、８５）は、内腔にあるか検出限界以下であることが示唆された（下記参照）。したがって、ＡＰＯＬ及びＡＰＯＬ２は、それぞれＥＲ膜の内側及び外側の面に存在する。
【０３６９】
ＡＰＯＬ１アイソフォームは様々なＥＲトポロジーを有する
［００４９２］　ＡＰＯＬ１リスクバリアントは、Ｇ０よりも小胞ＳＮＡＲＥ　ＶＡＭＰ８にあまりよく結合せず、リスクバリアント病理の推定メカニズムとしてエンドソーム輸送の阻害をもたらすことが提案されている（７３）。但し、小胞ＳＮＡＲＥは全て細胞質側に配向しているのに対し、本発明者らは、ＡＰＯＬ１はそうではないことを上に明確に示した。注意点は、本発明者らが主要な参照アイソフォーム（ｖＡ又はｖ１）を検出した可能性が高いのに対し、ポドサイトのＩＦＮｇ刺激により、ＡＰＯＬ１の３のマイナースプライスバリアント（アイソフォームｖＢ１、ｖＢ３、及びｖＣ）（６１、８５）が検出可能になることである。Ｎ末端の違いにより、これらは、全てが分泌できるわけではなく、つまり細胞質にあり、ＶＡＭＰ８にアクセスできる可能性があるため、評価される必要があることを意味する（図４９Ａ－４９Ｃと表５）。本実施例では、わかりやすくするために、スプライスフォームを「アイソフォーム」、Ｇ１／Ｇ２リスクアレルを「バリアント」と呼ぶこととする。

ｅ）表５：ＡＰＯＬ１アイソフォーム情報及びシグナル配列予測

APOL1 ｱｲｿﾌｫｰﾑ	型	ﾍﾞｸﾀｰ/ 供給源	ｱｸｾｯｼｮﾝ	FLS* aa	iPSOR ｽｺｱ（ｶｯﾄｵﾌ= 0.953）&	ｼｸﾞﾅﾙ P-4.1 D ｽｺｱ（ｶｯﾄｵﾌ= 0.45）$	ｾｸﾚﾄｰﾑ P2.0 @	ss（aa）	予測成熟 MW（Da）	IFにより、内腔？Ψ
vA（v1）	RefSeq	pCMV6-XL5（Origene SC109941）	NM_003661# NP_003652	398	Yes（2.007）	Yes（0.853）	Yes	27	41,111（△ss）	Yes
vV1（v2）	+ ｴｸｿﾝ2	pcDNA3.1（GenScript）	NM_145343 NP_663318	414	No（-0.8）	No（0.36）	Yes	43	41,111（△ss）	Yes
vB3（v2-3）	+ ｴｸｿﾝ2 △ｴｸｿﾝ4	pcDNA3.1（GenScript）	KX192151# APY18924	396	No（-0.8）	No（0.22）	No	0	44,084	No
vC（v4）	△ｴｸｿﾝ4	pcDNA3.1（Genscript）	NM_001136541 NP_001130013	380	Yes（1.233）	Yes（0.467）	Yes	0又は21	42,140 39,831（△ss）	Yes & No

*略語：ＦＬＳ　全長配列；ａａ　アミノ酸；ｓｓ　シグナル配列；ＩＦ　免疫蛍光法。ＭＷ　分子量（緑は分泌型（シグナル配列を除去したもの、△ｓｓ）；赤は非分泌型）。
#ＤＮＡには、３つの共通ＳＮＰであるＥ１５０Ｋ（ｒｓ２２３９７８５）、Ｍ２２８Ｉ（ｒｓ１３６１７５）、Ｒ２５５Ｋ（ｒｓ１３６１７６）が含まれている。
&Ｎ末端シグナル配列の存在に関するｉＰＳＯＲＴ予測（６３）。０．９５３を超える値は、シグナル配列を持つと予測される（Ｙｅｓ）。このアルゴリズムはタンパク質の最初の３０ａａのみを考慮するため、ＡＰＯＬ１．ｖＢ１は、シグナル配列が４３ａａであるために誤って非分泌型と予測されることに注意。
$Ｎ末端シグナル配列に対するシグナルＰ－４．１予測（６４）。このアルゴリズムでは、タンパク質の最初の７０　ａａを評価する。
@哺乳類タンパク質の非古典的分泌のためのセクレトームＰ２．０ａ　－　ｙｅｓ又はｎｏは、古典的なシグナル配列の予測に対して与えられる警告を指す（６５）。
Ψ内腔（右側の列と図２７）は、タンパク質かジギトニンを用いたＩＦによって解読して、ＥＲ内腔にある（そしてＦＡＣＳでは形質膜上にはない）かどうかの結果であり、シグナル予測プログラムは部分的に正しかったがｖＢ１の異常に長い４３ａａシグナル配列を認識できず、ｖＣを分泌型と予測したこと示している。実際にはごく一部が内腔にあり、大部分は細胞質にある。

【０３７０】

［００４９３］　ＨＥＫ－２９３細胞で一過性に過剰発現させると、４種類全てのアイソフォームが培地に分泌されることが過去に示されている（８５）。しかし、この著者らが示唆したように（８５）、これは過剰発現アーチファクトである可能性がある。なぜなら、本発明者らも一過性にトランスフェクトされたＣＯＳ細胞では同じ結果が得られたが、安定した細胞株では得られなかったからである。各ＡＰＯＬ１アイソフォームを個別に発現するｉＡＰＯＬ１ポドサイト（全てＥＲに局在、図２７Ａ）において、（ジギトニン法で）内腔側に現れたｖＡ及びｖＢ１アイソフォームのみが、同等のレベルに誘導されたときに生細胞のＦＡＣＳによって細胞表面に大きなシフトを与えた（すなわち、分泌経路

に沿って輸送された；図２７Ｂ‐２７Ｄ）。対照的に、ＣＯＳトランジェントにおいて、そのシグナル配列が欠失した（△ｓｓ）ｖＡは、ジギトニンＩＦによって予想された逆のＥＲトポロジーを有するにもかかわらず、通常のｖＡと同様に細胞表面と培地に現れた（図５０Ａ－５１Ｃ）。したがって、培地に「分泌」されたＡＰＯＬは、おそらく、過去に示唆されたように、一過性に発現したときに過剰発現によって誘発された細胞破裂に少なくとも部分的に起因する（８５）。

【０３７１】

［００４９４］　ポドサイトにおける安定なＡＰＯＬ１．ｖＢ１のＥＲ内腔局在性は、ウェスタンブロットによるｖＡと同じサイズであり（図２７Ｄ）、このことは、これらの異なるシグナル配列が同じ部位で切断されていることを意味する。逆に、ｖＢ３はより大きく泳動し、シグナル切断がないこと（表５及び図５１Ｃ）とその細胞質にあることと一致する。下のバンドは、ｖＣと同様の細胞質分解産物である可能性がある。興味深いことに、ＡＰＯＬ１．ｖＣはＩＦによって主に細胞質に存在するが、同じ細胞内にある場合がある、わずかな内腔／細胞表面シグナルも示す（図２７Ｂの矢印）。

【０３７２】

［００４９５］　ＷＴポドサイトをウェスタンブロッティングし、どの内因性ＡＰＯＬ１アイソフォームが検出可能であるかを決定した。主要なバンドは予想通りｖＡのサイズであるが、より長い暴露により、ＩＦＮｇ処理後に独特のマイナーな上部バンドが明らかになり、このバンドはスプライスアイソフォームであればｖＢ３を表し得るのだが、実際にサイズも似ている（図２８及び表５）。ＲＴ－ＰＣＲにより、２つの細胞質アイソフォーム（ｖＢ３とｖＣ）は２つの内腔アイソフォームの３０分の１である（ｖＡとｖＢ１；図４９Ｃ））という過去の報告（６１、８５）を確認した。したがって、細胞質内因性ＡＰＯＬ１が検出できなかったことは驚くべきことではない。まとめると、ＡＰＯＬ１．ｖＡは内因性が優勢であり、ＥＲの内部に存在し、マイナーな細胞質バリアント（ｖＢ３とｖＣ）はエンドソームではなくＥＲの外面に局在する（図２７Ｂ、図５２Ａ－Ｂ）。

【０３７３】

結果の考察

［００４９６］　本発明者らは、ＡＰＯＬ１の局在を調べるために、複数のＡＰＯＬ１特異的抗体を特徴付けした。組織レベルでは、過去の報告（５９、７３、７６、７７、８６）と一致し、肝臓の肝細胞と腎臓のポドサイトにＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡとタンパク質を認めたが、それはエンドサイトーシスではなく生合成（分泌）であると考える。一方、近位尿細管ではＡＰＯＬ１タンパク質もｍＲＮＡも全く認められなかった。このことは、市販のポリクローナル抗体（７３、７７）による近位尿細管染色がＡＰＯＬ２の交差反応性であるか又は単に非特異的である可能性がある（図３２Ｃ）ことを示し、特異的抗体の必要性が強調されることになった。Ｍａら（７６）とは異なり、本発明者らは、糸球体内皮細胞においてＡＰＯＬ１　ｍＲＮＡを検出することができなかったが、このプローブの以前のバージョンはＡＰＯＬ２と交差反応した（データは示していない）。この違いが、本発明者らのより短いプローブの感度が低いためなのか、Ｍａのプローブが ＡＰＯＬ１特異的でなかったためなのかは不明である。しかし、過去に示されているように（７３、７７）、ＡＰＯＬ１タンパク質はＩＨＣによって糸球体内皮細胞及び内皮毛細血管に豊富に存在していた（図２３）ため、これらの細胞種では血液からエンドサイトーシスされている可能性がある。

【０３７４】

［００４９７］　細胞内では、主要な（参照）アイソフォームであるＡＰＯＬ１．ｖＡは一貫して（内因性、一過性及び安定発現）ＥＲ内に認められ、ごく一部（透過化細胞及び非透過化細胞の比較ＦＡＣＳで推定した２０％未満；図１４）がゴルジを経由して細胞表面に輸送された（図２９）。このことは、このタンパク質が完全なシグナル配列を持ち（７９、８５）、肝細胞から分泌され、循環ＨＤＬ粒子関連している（７１）ことから、予想されることではある。但し、不死化ポドサイトでは、おそらくＨＤＬ粒子産生専用の輸送機構（８７）がないため分泌型ＡＰＯＬ１は細胞表面に付着したままである。表面Ａ

ＰＯＬ１は細胞全体に点状に現れ、外因的に添加されたＡＰＯＬ１とは異なり、接着斑に限定されていなかった（６５）。これは、少なくともインテグリンの刺激がない状態ではインテグリンと複合体化していないことを示唆する。

【０３７５】

［００４９８］　トリパノソーマ（８８）及びｉｎ　ｖｉｔｒｏの脂質膜（８９－９０）においてはＡＰＯＬ１は酸性ｐＨでしか膜に挿入されないことから、本発明者らは、ＡＰＯＬ１は中性（９１）のＥＲ内腔に可溶であると予想した。ところが、定量的ｉＥＭにより、ＡＰＯＬ１．ｖＡは、一部は超音波処理により細胞質画分に放出されたものの、ＥＲ内膜上にあることが明らかになった（図４０Ａ）ことから、ホスファチジルイノシトールと末梢的に関連している（７０、７４）可能性が示唆された。本発明者らは、完全な膜統合（９２）が細胞表面に向かう途中でｐＨ≦６のゴルジで起こる（９１）可能性があると仮定している。ホスファチジルイノシトールは、ＥＲ４２の細胞質リーフレットに豊富に存在し、非分泌型ＡＰＯＬ１アイソフォーム（及びＡＰＯＬ２）が中性細胞質に可溶である代わりにＥＲ外膜に関連する理由を説明している可能性がある。

【０３７６】

［００４９９］　内在性ポドサイトＡＰＯＬ１又はトランスフェクトＡＰＯＬ１．ｖＡのＩＦでもｉＥＭでも、ＡＰＯＬ１を保持すると他者によって報告されている細胞内小器官であるミトコンドリア、脂肪滴又はエンドソーム（５９、６４、７３、７４）との著しいオーバーラップはなかった。このことは、より豊富なＡＰＯＬ及び／又は不適切な染色手順、エピトープタグ、トランスフェクションアーチファクト若しくは様々な細胞種がこれらの結果に寄与している可能性があることを示唆している。ＡＰＯＬ１は、最近、ミトコンドリアの取り込み機構（９４）に依存する粗ミトコンドリアペレットで発見された。本発明者らは、これらの「ミトコンドリア」が実際にはＭＡＭ（ミトコンドリアに密接に隣接するＥＲのサブドメイン（８３））ではないかと考えている。なぜなら、本発明者らの手でＭＡＭから精製したミトコンドリアには、検出可能なＡＰＯＬ１が含まれていないためである（図４０Ａ）。ＭＡＭのＡＰＯＬ１は、実際には、脂質合成とＥＲストレスシグナル伝達（８３）に関連するＥＲのサブドメインであるＥＲ槽（図４０Ｂ－Ｄ）内に存在する。ミトコンドリアの取り込み配列はＥＲではなく細胞質において認識されるため（９５）、内腔ＡＰＯＬ１．ｖＡとｖＢ１がＥＲ内腔からミトコンドリアに到達するとは予想されないであろう。したがって、ミトコンドリアの取り込み結果（９４）を内因性ＡＰＯＬ１で検証して、それが過剰発現アーチファクトでなかったことを確認することが重要になる。ＡＰＯＬ１－ＲＦＰ２３による脂肪滴の報告されているコーティングも、同様に本発明者らのデータと一致しない。これは、脂肪滴がＥＲ外膜から出芽する（９６）一方、タグなしＡＰＯＬ１は内膜上にあり（図４８）、カルネキシンと同様に脂肪滴に選別されなかった（図３７Ｂ）ためである。おそらく、Ｃ末端タグがＡＰＯＬ１の分布を変えている。

【０３７７】

［００５００］　過去にＥＲに局在したＧＦＰ－ＡＰＯＬ１（シグナル配列なし（Δｓｓ））は、シグナル配列に依存しないＥＲ標的化と解釈されていたが（６３）、本発明者らは、ＡＰＯＬ１　Δｓｓ（アイソフォームｖＢ３、ｖＣ及びＡＰＯＬ２も同様）がトポロジー的に異なり、内側ではなく外側のＥＲ膜と関連することを示す（図２９）。ポドサイトで検出可能な内因性細胞質ＡＰＯＬ１がないのは、これらのポドサイト（８１）が培養中にＡＰＯＬ１を失うためである可能性がある。細胞質アイソフォームｖＢ３及びｖＣは、特に炎症性サイトカインによってアップレギュレーションされた場合、ｉｎ　ｖｉｖｏで意味のあるレベルで発現する可能性がある（６１）。但し、安定に発現したｖＢ３とｖＣは、ＶＡＭＰ８陽性の初期エンドソーム又は分泌顆粒ではなく、ＥＲの外面に局在する（９７－９９）。ポドサイトＡＰＯＬ１の公開されているエンドソーム染色は、ジギトニンとＳｉｇｍａ抗体を用いて行われた（５９）ことに留意されたい。この条件では、ＡＰＯＬ２又は細胞質バリアントしか明らかにならないであろう（図４６Ａ）。いずれにしても、ＡＰＯＬ１媒介性細胞傷害性は、分泌型（エクソン４陽性）アイソフォーム（ｖＡ

及びｖＢ１）に限定されると報告されており（８５）、その場合、ＳＲＡ－ＩＤはＥＲ（図２６Ｂ）又は形質膜（実施例１）のいずれも越えて細胞質へ入ることはない。したがって、安定なＶＡＭＰ８結合を介したエンドソーム又はオートファゴソーム成熟不全（５９、７０、７３）は、間接的な又は一過性の効果は排除できないが、ＡＰＯＬ１－Ｇ１及びＧ２媒介細胞毒性の直接的なメカニズムではない可能性が高いというのが、本発明者らの主張である。

【０３７８】

［００５０１］　本発明者らの局在性データは、ＡＰＯＬ１バリアント媒介性細胞毒性について、ＥＲストレス（７２、１００）又は細胞表面陽イオンチャネルモデル（６２、６６）のいずれかを支持する。他の研究（６３、６４、７３）と一致して、バリアント間で差のある局在性はなかったため、バリアント効果の機能又は大きさはおそらく異なる。例えば、ＡＰＯＬ１が基底膜インテグリンと共局在するかどうか（６５）など、ＡＰＯＬ１がｉｎ　ｖｉｖｏでポドサイト内のどこに存在するかを決定することは重要であろう。「セカンドヒット」を受けたＡＰＯＬ１腎症患者の初代ポドサイトにおけるＡＰＯＬ１の細胞内局在性を調べ、ＡＰＯＬ１リスクバリアント腎臓でＡＰＯＬ１タンパク質がアップレギュレートされているかどうかを確認することも有益であろう。

【０３７９】

［００５０２］　まとめると、本発明者らは、内因性ポドサイトＡＰＯＬ１を検出するのに十分に感受性の最初のＡＰＯＬ１特異的な抗体を生成した。これらの抗体は、過去の研究を悩ませたＡＰＯＬ２結合からの干渉なしに、今後ＡＰＯＬ１局在性と相互作用パートナーの特定について研究する際の有用なツールとなるであろう。

【０３８０】

実施例２の参考文献

［００５０３］　５２．Genovese, G.; Friedman, D. J.; Ross, M. D.; Lecordier, L.; Uzureau, P.; Freedman, B. I.; Bowden, D. W.; Langefeld, C. D.; Oleksyk, T. K.; Uscinski Knob, A. L.; Bernhardy, A. J.; Hicks, P. J.; Nelson, G. W.; Vanhollebeke, B.; Winkler, C. A.; Kopp, J. B.; Pays, E.; Pollak, M. R., Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. Science 2010, 329 (5993), 841-5.

【０３８１】

［００５０４］　５３．Tzur, S.; Rosset, S.; Shemer, R.; Yudkovsky, G.; Selig, S.; Tarekegn, A.; Bekele, E.; Bradman, N.; Wasser, W. G.; Behar, D. M.; Skorecki, K., Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. Hum Genet 2010, 128 (3), 345-50.

【０３８２】

［００５０５］　５４．Heymann, J.; Winkler, C. A.; Hoek, M.; Susztak, K.; Kopp, J. B., Therapeutics for APOL1 nephropathies: putting out the fire in the podocyte. Nephrol Dial Transplant 2017, 32 (suppl_1), i65-i70.

【０３８３】

［００５０６］　５５．Kruzel-Davila, E.; Skorecki, K., Dilemmas and challenges in apolipoprotein L1 nephropathy research. Curr Opin Nephrol Hypertens 2019, 28 (1), 77-86.

【０３８４】

［００５０７］　５６．Kopp, J. B.; Heymann, J.; Winkler, C. A., APOL1 Renal Risk Variants: Fertile Soil for HIV-Associated Nephropathy. Semin Nephrol 2017, 37 (6), 514-519.

【０３８５】

［００５０８］　５７．Shukha, K.; Mueller, J. L.; Chung, R. T.; Curry, M. P.; Friedman, D. J.; Pollak, M. R.; Berg, A. H., Most ApoL1 Is Secreted b

y the Liver. J Am Soc Nephrol 2017, 28 (4), 1079-1083.
【０３８６】
［００５０９］　５８．Aghajan, M.; Booten, S. L.; Althage, M.; Hart, C. E.; Ericsson, A.; Maxvall, I.; Ochaba, J.; Menschik-Lundin, A.; Hartleib, J.; Kuntz, S.; Gattis, D.; Ahlstrom, C.; Watt, A. T.; Engelhardt, J. A.; Monia, B. P.; Magnone, M. C.; Guo, S., Antisense oligonucleotide treatment ameliorates IFN-gamma-induced proteinuria in APOL1-transgenic mice. JCI Insight 2019, 4 (12).
【０３８７】
［００５１０］　５９．Beckerman, P.; Bi-Karchin, J.; Park, A. S.; Qiu, C.; Dummer, P. D.; Soomro, I.; Boustany-Kari, C. M.; Pullen, S. S.; Miner, J. H.; Hu, C. A.; Rohacs, T.; Inoue, K.; Ishibe, S.; Saleem, M. A.; Palmer, M. B.; Cuervo, A. M.; Kopp, J. B.; Susztak, K., Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. Nat Med 2017, 23 (4), 429-438.
【０３８８】
［００５１１］　６０．Lan, X.; Jhaveri, A.; Cheng, K.; Wen, H.; Saleem, M. A.; Mathieson, P. W.; Mikulak, J.; Aviram, S.; Malhotra, A.; Skorecki, K.; Singhal, P. C., APOL1 risk variants enhance podocyte necrosis through compromising lysosomal membrane permeability. Am J Physiol Renal Physiol 2014, 307 (3), F326-36.
【０３８９】
［００５１２］　６１．Nichols, B.; Jog, P.; Lee, J. H.; Blackler, D.; Wilmot, M.; D'Agati, V.; Markowitz, G.; Kopp, J. B.; Alper, S. L.; Pollak, M. R.; Friedman, D. J., Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. Kidney Int 2015, 87 (2), 332-42.
【０３９０】
［００５１３］　６２．Olabisi, O. A.; Zhang, J. Y.; VerPlank, L.; Zahler, N.; DiBartolo, S., 3rd; Heneghan, J. F.; Schlondorff, J. S.; Suh, J. H.; Yan, P.; Alper, S. L.; Friedman, D. J.; Pollak, M. R., APOL1 kidney disease risk variants cause cytotoxicity by depleting cellular potassium and inducing stress-activated protein kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 2016, 113 (4), 830-7.
【０３９１】
［００５１４］　６３．Granado, D.; Muller, D.; Krausel, V.; Kruzel-Davila, E.; Schuberth, C.; Eschborn, M.; Wedlich-Soldner, R.; Skorecki, K.; Pavenstadt, H.; Michgehl, U.; Weide, T., Intracellular APOL1 Risk Variants Cause Cytotoxicity Accompanied by Energy Depletion. J Am Soc Nephrol 2017, 28 (11), 3227-3238.
【０３９２】
［００５１５］　６４．Ma, L.; Chou, J. W.; Snipes, J. A.; Bharadwaj, M. S.; Craddock, A. L.; Cheng, D.; Weckerle, A.; Petrovic, S.; Hicks, P. J.; Hemal, A. K.; Hawkins, G. A.; Miller, L. D.; Molina, A. J.; Langefeld, C. D.; Murea, M.; Parks, J. S.; Freedman, B. I., APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. J Am Soc Nephrol 2017, 28 (4), 1093-1105.
【０３９３】
［００５１６］　６５．Hayek, S. S.; Koh, K. H.; Grams, M. E.; Wei, C.; Ko, Y. A.; Li, J.; Samelko, B.; Lee, H.; Dande, R. R.; Lee, H. W.; Hahm, E.; Peev, V.; Tracy, M.; Tardi, N. J.; Gupta, V.; Altintas, M. M.; Garborcauskas, G.; Stojanovic, N.; Winkler, C. A.; Lipkowitz, M. S.; Tin, A.; Inker, L. A.;

Levey, A. S.; Zeier, M.; Freedman, B. I.; Kopp, J. B.; Skorecki, K.; Coresh, J.; Quyyumi, A. A.; Sever, S.; Reiser, J., A tripartite complex of suPAR, APOL1 risk variants and alphavbeta3 integrin on podocytes mediates chronic kidney disease. Nat Med 2017, 23 (8), 945-953.
【０３９４】
[００５１７] ６６．O'Toole, J. F.; Schilling, W.; Kunze, D.; Madhavan, S. M.; Konieczkowski, M.; Gu, Y.; Luo, L.; Wu, Z.; Bruggeman, L. A.; Sedor, J. R., ApoL1 Overexpression Drives Variant-Independent Cytotoxicity. J Am Soc Nephrol 2018, 29 (3), 869-879.
【０３９５】
[００５１８] ６７．Ryu, J. H.; Ge, M.; Merscher, S.; Rosenberg, A. Z.; Desante, M.; Roshanravan, H.; Okamoto, K.; Shin, M. K.; Hoek, M.; Fornoni, A.; Kopp, J. B., APOL1 renal risk variants promote cholesterol accumulation in tissues and cultured macrophages from APOL1 transgenic mice. PLoS One 2019, 14 (4), e0211559.
【０３９６】
[００５１９] ６８．Fu, Y.; Zhu, J. Y.; Richman, A.; Zhang, Y.; Xie, X.; Das, J. R.; Li, J.; Ray, P. E.; Han, Z., APOL1-G1 in Nephrocytes Induces Hypertrophy and Accelerates Cell Death. J Am Soc Nephrol 2017, 28 (4), 1106-1116.
【０３９７】
[００５２０] ６９．Kruzel-Davila, E.; Shemer, R.; Ofir, A.; Bavli-Kertselli, I.; Darlyuk-Saadon, I.; Oren-Giladi, P.; Wasser, W. G.; Magen, D.; Zaknoun, E.; Schuldiner, M.; Salzberg, A.; Kornitzer, D.; Marelja, Z.; Simons, M.; Skorecki, K., APOL1-Mediated Cell Injury Involves Disruption of Conserved Trafficking Processes. J Am Soc Nephrol 2017, 28 (4), 1117-1130.
【０３９８】
[００５２１] ７０．Wan, G.; Zhaorigetu, S.; Liu, Z.; Kaini, R.; Jiang, Z.; Hu, C. A., Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. J Biol Chem 2008, 283 (31), 21540-9.
【０３９９】
[００５２２] ７１．Cheng, D.; Weckerle, A.; Yu, Y.; Ma, L.; Zhu, X.; Murea, M.; Freedman, B. I.; Parks, J. S.; Shelness, G. S., Biogenesis and cytotoxicity of APOL1 renal risk variant proteins in hepatocytes and hepatoma cells. J Lipid Res 2015, 56 (8), 1583-93.
【０４００】
[００５２３] ７２．Wen, H.; Kumar, V.; Lan, X.; Shoshtari, S. S. M.; Eng, J. M.; Zhou, X.; Wang, F.; Wang, H.; Skorecki, K.; Xing, G.; Wu, G.; Luo, H.; Malhotra, A.; Singhal, P. C., APOL1 risk variants cause podocytes injury through enhancing endoplasmic reticulum stress. Biosci Rep 2018, 38 (4).
【０４０１】
[００５２４] ７３．Madhavan, S. M.; O'Toole, J. F.; Konieczkowski, M.; Barisoni, L.; Thomas, D. B.; Ganesan, S.; Bruggeman, L. A.; Buck, M.; Sedor, J. R., APOL1 variants change C-terminal conformational dynamics and binding to SNARE protein VAMP8. JCI Insight 2017, 2 (14).
【０４０２】
[００５２５] ７４．Chun, J.; Zhang, J. Y.; Wilkins, M. S.; Subramanian,

B.; Riella, C.; Magraner, J. M.; Alper, S. L.; Friedman, D. J.; Pollak, M. R., Recruitment of APOL1 kidney disease risk variants to lipid droplets attenuates cell toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 2019, 116 (9), 3712-3721.
【0403】
[00526] 75. Mikulak, J.; Oriolo, F.; Portale, F.; Tentorio, P.; Lan, X.; Saleem, M. A.; Skorecki, K.; Singhal, P. C.; Mavilio, D., Impact of APOL1 polymorphism and IL-1beta priming in the entry and persistence of HIV-1 in human podocytes. Retrovirology 2016, 13 (1), 63.
【0404】
[00527] 76. Ma, L.; Shelness, G. S.; Snipes, J. A.; Murea, M.; Antinozzi, P. A.; Cheng, D.; Saleem, M. A.; Satchell, S. C.; Banas, B.; Mathieson, P. W.; Kretzler, M.; Hemal, A. K.; Rudel, L. L.; Petrovic, S.; Weckerle, A.; Pollak, M. R.; Ross, M. D.; Parks, J. S.; Freedman, B. I., Localization of APOL1 Protein and mRNA in the Human Kidney: Nondiseased Tissue, Primary Cells, and Immortalized Cell Lines. Journal of the American Society of Nephrology 2014, 26 (2), 339-348.
【0405】
[00528] 77. Madhavan, S. M.; O'Toole, J. F.; Konieczkowski, M.; Ganesan, S.; Bruggeman, L. A.; Sedor, J. R., APOL1 localization in normal kidney and nondiabetic kidney disease. J Am Soc Nephrol 2011, 22 (11), 2119-28.
【0406】
[00529] 78. Duchateau, P. N.; Pullinger, C. R.; Cho, M. H.; Eng, C.; Kane, J. P., Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. J Lipid Res 2001, 42 (4), 620-30.
【0407】
[00530] 79. Monajemi, H.; Fontijn, R. D.; Pannekoek, H.; Horrevoets, A. J., The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. Genomics 2002, 79 (4), 539-46.
【0408】
[00531] 80. Page, N. M.; Butlin, D. J.; Lomthaisong, K.; Lowry, P. J., The human apolipoprotein L gene cluster: identification, classification, and sites of distribution. Genomics 2001, 74 (1), 71-8.
【0409】
[00532] 81. 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., A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. J Am Soc Nephrol 2002, 13 (3), 630-8.
【0410】
[00533] 82. Rizzuto, R.; Pinton, P.; Carrington, W.; Fay, F. S.; Fogarty, K. E.; Lifshitz, L. M.; Tuft, R. A.; Pozzan, T., Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca2+ responses. Science 1998, 280 (5370), 1763-6.
【0411】
[00534] 83. van Vliet, A. R.; Verfaillie, T.; Agostinis, P., New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. Biochim Biophys Acta 2014, 1843 (10), 2253-62.

【０４１２】
［００５３５］　８４．Lorenz, H.; Hailey, D. W.; Lippincott-Schwartz, J., Addressing membrane protein topology using the fluorescence protease protection (FPP) assay. Methods Mol Biol 2008, 440, 227-33.
【０４１３】
［００５３６］　８５．Khatua, A. K.; Cheatham, A. M.; Kruzel, E. D.; Singhal, P. C.; Skorecki, K.; Popik, W., Exon 4-encoded sequence is a major determinant of cytotoxicity of apolipoprotein L1. Am J Physiol Cell Physiol 2015, 309 (1), C22-37.
【０４１４】
［００５３７］　８６．Kotb, A. M.; Simon, O.; Blumenthal, A.; Vogelgesang, S.; Dombrowski, F.; Amann, K.; Zimmermann, U.; Endlich, K.; Endlich, N., Knockdown of ApoL1 in Zebrafish Larvae Affects the Glomerular Filtration Barrier and the Expression of Nephrin. PLoS One 2016, 11 (5), e0153768.
【０４１５】
［００５３８］　８７．Parks, J. S.; Chung, S.; Shelness, G. S., Hepatic ABC transporters and triglyceride metabolism. Curr Opin Lipidol 2012, 23 (3), 196-200.
【０４１６】
［００５３９］　８８．Pays, E.; Vanhollebeke, B.; Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Nolan, D. P.; Perez-Morga, D., The trypanolytic factor of human serum. Nat Rev Microbiol 2006, 4 (6), 477-86.
【０４１７】
［００５４０］　８９．Bruno, J.; Pozzi, N.; Oliva, J.; Edwards, J. C., Apolipoprotein L1 confers pH-switchable ion permeability to phospholipid vesicles. J Biol Chem 2017, 292 (44), 18344-18353.
【０４１８】
［００５４１］　９０．Thomson, R.; Finkelstein, A., Human trypanolytic factor APOL1 forms pH-gated cation-selective channels in planar lipid bilayers: relevance to trypanosome lysis. Proc Natl Acad Sci U S A 2015, 112 (9), 2894-9.
【０４１９】
［００５４２］　９１．Paroutis, P.; Touret, N.; Grinstein, S., The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. Physiology (Bethesda) 2004, 19, 207-15.
【０４２０】
［００５４３］　９２．Thomson, R.; Genovese, G.; Canon, C.; Kovacsics, D.; Higgins, M. K.; Carrington, M.; Winkler, C. A.; Kopp, J.; Rotimi, C.; Adeyemo, A.; Doumatey, A.; Ayodo, G.; Alper, S. L.; Pollak, M. R.; Friedman, D. J.; Raper, J., Evolution of the primate trypanolytic factor APOL1. Proc Natl Acad Sci U S A 2014, 111 (20), E2130-9.
【０４２１】
［００５４４］　９３．Di Paolo, G.; De Camilli, P., Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature 2006, 443 (7112), 651-7.
【０４２２】
［００５４５］　９４．Shah, S. S.; Lannon, H.; Dias, L.; Zhang, J. Y.; Alper, S. L.; Pollak, M. R.; Friedman, D. J., APOL1 Kidney Risk Variants Induce Cell Death via Mitochondrial Translocation and Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. J Am Soc Nephrol 2019, 30 (12),

2355-2368.
【0423】
[00546] 95. Neupert, W., Protein import into mitochondria. Annu Rev Biochem 1997, 66, 863-917.
【0424】
[00547] 96. Olzmann, J. A.; Carvalho, P., Dynamics and functions of lipid droplets. Nat Rev Mol Cell Biol 2019, 20 (3), 137-155.
【0425】
[00548] 97. Advani, R. J.; Bae, H. R.; Bock, J. B.; Chao, D. S.; Doung, Y. C.; Prekeris, R.; Yoo, J. S.; Scheller, R. H., Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. J Biol Chem 1998, 273 (17), 10317-24.
【0426】
[00549] 98. Behrendorff, N.; Dolai, S.; Hong, W.; Gaisano, H. Y.; Thorn, P., Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) selectively required for sequential granule-to-granule fusion. J Biol Chem 2011, 286 (34), 29627-34.
【0427】
[00550] 99. Wong, S. H.; Zhang, T.; Xu, Y.; Subramaniam, V. N.; Griffiths, G.; Hong, W., Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. Mol Biol Cell 1998, 9 (6), 1549-63.
【0428】
[00551] 100. Haque, S.; Patil, G.; Mishra, A.; Lan, X.; Popik, W.; Malhotra, A.; Skorecki, K.; Singhal, P. C., Effect of APOL1 disease risk variants on APOL1 gene product. Biosci Rep 2017, 37 (2).
【0429】
[00552] 101. Austin, C. D.; Wen, X.; Gazzard, L.; Nelson, C.; Scheller, R. H.; Scales, S. J., Oxidizing potential of endosomes and lysosomes limits intracellular cleavage of disulfide-based antibody-drug conjugates. Proc Natl Acad Sci U S A 2005, 102 (50), 17987-92.
【0430】
[00553] 102. Chandra, D.; Liu, J. W.; Tang, D. G., Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis. J Biol Chem 2002, 277 (52), 50842-54.
【0431】
[00554] 103. Lo, M.; Kim, H. S.; Tong, R. K.; Bainbridge, T. W.; Vernes, J. M.; Zhang, Y.; Lin, Y. L.; Chung, S.; Dennis, M. S.; Zuchero, Y. J.; Watts, R. J.; Couch, J. A.; Meng, Y. G.; Atwal, J. K.; Brezski, R. J.; Spiess, C.; Ernst, J. A., Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. J Biol Chem 2017, 292 (9), 3900-3908.
【0432】
[00555] 104. Schlothauer, T.; Herter, S.; Koller, C. F.; Grau-Richards, S.; Steinhart, V.; Spick, C.; Kubbies, M.; Klein, C.; Umana, P.; Mossner, E., Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. Protein Eng Des Sel 2016, 29 (10), 457-466.
【0433】

［００５５６］　１０５．Seeber, S.; Ros, F.; Thorey, I.; Tiefenthaler, G.; Kaluza, K.; Lifke, V.; Fischer, J. A.; Klostermann, S.; Endl, J.; Kopetzki, E.; Pashine, A.; Siewe, B.; Kaluza, B.; Platzer, J.; Offner, S., A robust high throughput platform to generate functional recombinant monoclonal antibodies using rabbit B cells from peripheral blood. PLoS One 2014, 9 (2), e86184.

【０４３４】

［００５５７］　１０６．Grant Wilson, D.; Foreman, O.; Peterson, A. S.; Wen, X.; Scales, S. J. Animal model for nephropathy and agents for treating the same. 2014.

【０４３５】

［００５５８］　１０７．Wieckowski, M. R.; Giorgi, C.; Lebiedzinska, M.; Duszynski, J.; Pinton, P., Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. Nat Protoc 2009, 4 (11), 1582-90.

【０４３６】

［００５５９］　１０８．Ohsaki, Y.; Maeda, T.; Fujimoto, T., Fixation and permeabilization protocol is critical for the immunolabeling of lipid droplet proteins. Histochem Cell Biol 2005, 124 (5), 445-52.

【０４３７】

［００５６０］　１０９．Yang, Y.; Yang, Q.; Yang, J.; Ma, Y.; Ding, G., Angiotensin II induces cholesterol accumulation and injury in podocytes. Sci Rep 2017, 7 (1), 10672.

【０４３８】

［００５６１］　１１０．Bannai, H.; Tamada, Y.; Maruyama, O.; Nakai, K.; Miyano, S., Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. Bioinformatics 2002, 18 (2), 298-305.

【０４３９】

［００５６２］　１１１．Petersen, T. N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H., SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 2011, 8 (10), 785-6.

【０４４０】

［００５６３］　１１２．Bendtsen, J. D.; Jensen, L. J.; Blom, N.; Von Heijne, G.; Brunak, S., Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Eng Des Sel 2004, 17 (4), 349-56.

【０４４１】

［００５６４］　上記発明は、理解を明瞭にするために説明及び例示としてある程度詳細に記載されてきたが、それら記載及び例示は本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用した全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりその全体が明示的に援用される。

ＩＶ．特定の配列の表

配列番号	説明	配列
1	ヒトAPOL1（リーダー配列あり）　G0型EMRバリアント　アクセッション番号.　NP003652	MEGAALLRVS VLCIWMSALF LGVGVRAEEA GARVQQNVPS GTDTGDPQSK PLGDWAAGTM DPESSIFIED AIKYFKEKVS TQNLLLLLTD NEAWNGFVAA AELPRNEADE LRKALDNLAR QMIMKDKNWH DKGQQYRNWF LKEFPRLKSE LEDNIRRLRA LADGVQKVHK GTTIANVVSG SLSISSGILT LVGMGLAPFT EGGSLVLLEP GMELGITAAL TGITSSTMDY GKKWWTQAQA HDLVIKSLDK LKEVREFLGE NISNFLSLAG NTYQLTRGIG KDIRALRRAR ANLQSVPHAS ASRPRVTEPI SAESGEQVER VNEPSILEMS RGVKLTDVAP VSFFLVLDVV YLVYESKHLH EGAKSETAEE LKKVAQELEE KLNILNNNYK ILQADQEL
2	ヒトAPOL1 リーダー配列なし - G0型EMRバリアント　NP003652	EA GARVQQNVPS GTDTGDPQSK PLGDWAAGTM DPESSIFIED AIKYFKEKVS TQNLLLLLTD NEAWNGFVAA AELPRNEADE LRKALDNLAR QMIMKDKNWH DKGQQYRNWF LKEFPRLKSE LEDNIRRLRA LADGVQKVHK GTTIANVVSG SLSISSGILT LVGMGLAPFT EGGSLVLLEP GMELGITAAL TGITSSTMDY GKKWWTQAQA HDLVIKSLDK LKEVREFLGE NISNFLSLAG NTYQLTRGIG KDIRALRRAR ANLQSVPHAS ASRPRVTEPI SAESGEQVER VNEPSILEMS RGVKLTDVAP VSFFLVLDVV YLVYESKHLH EGAKSETAEE LKKVAQELEE KLNILNNNYK ILQADQEL
3	3.6D12 VH CDR1	RCAMS
4	3.6D12 VH CDR2	AISRDSTYTYYSDSVKG
5	3.6D12 VH CDR3	QIDDYYVDALDY
6	3.6D12 VL CDR1	RASKIISKYLA
7	3.6D12 VL CDR2	SGFTLQS
8	3.6D12 VL CDR3	QQHNEYPLT
9	3.6D12 VH	EVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCTASGFTFSRCAMSWVRQTPEKRLEWVSAISRDSTYTYYSDSVKGRF TVSRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARQIDDYYVDALDYWGQGTSV
10	3.6D12 VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKIISKYLAWYQEKPGKTIKLLIYSGFTLQSGIPSRFSGSGSG TDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFGA
11	3.6D12 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAEVMLVESGGGLVRPGGSLKLSCTASGFTFSRCAMSWVRQTPEKRLEWVS AISRDSTYTYYSDSVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARQIDDYYVDALDYWGQGTSV TVSSASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
12	3.6D12 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKIISKYLAWYQEKPGKTIKLLIY SGFTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPLTFGAGTKLEIKRADAAPTVSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDE YERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
13	3.3B6 VH CDR1	SHWMQ
14	3.3B6 VH CDR2	AIYPGDGDTKFTQKFKD

配列番号	説明	配列
15	3.3B6 VH CDR3	NLYGYYFDY
16	3.3B6 VL CDR1	RSSTGAVTSGNFAN
17	3.3B6 VL CDR2	GADNRAP
18	3.3B6 VL CDR3	ALWYSDHWV
19	3.3B6 VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSHWMQWLKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTKFTQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLASEDSAVYYCARENLYGYYFDYWGQGTTL
20	3.3B6 VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTSGNFANWVQEKPDHLFTGLIGGADNRAPGVPARFSGSLIGDKAALIITGAQTEDEAIYFCALWYSDHWVFGG
21	3.3B6 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAQVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSHWMQWLKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTKFTQKFKDKATLTADKSSTTAYMQLSSLASEDSAVYYCARENLYGYYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
22	3.3B6 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTSGNFANWVQEKPDHLFTGLIGGADNRAPGVPARFSGSLIGDKAALIITGAQTEDEAIYFCALWYSDHWVFGGGTKLTVLGQPKSTPTLTVFPPSSEELKENKATLVCLISNFSPSGVTVAWKANGTPITQGVDTSNPTKEGNKFMASSFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDTVEKSLSRADCL
23	3.7D6 VH CDR1	NYGVN
24	3.7D6 VH CDR2	WINTNTGQTTYAEEFRG
25	3.7D6 VH CDR3	LIYDGDYISSDF
26	3.7D6 VL CDR1	GASENIYGALN
27	3.7D6 VL CDR2	GATNLAD
28	3.7D6 VL CDR3	QNALSMPYT
29	3.7D6 VH	QIQLVQSGPDLKKPGETVKISCRTSGYAFTNYGVNWVKQAPGKGLKWMGWINTNTGQTTYAEEFRGRFAISLETSASTAFLTISNLKNEDSATYFCARLIYDGDYISSDFWGQGTTL
30	3.7D6 VL	DIQMTQSPDSLSASVGETVTITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSRSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNALSMPYTFGG
31	3.7D6 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAQIQLVQSGPDLKKPGETVKISCRTSGYAFTNYGVNWVKQAPGKGLKWMGWINTNTGQTTYAEEFRGRFAISLETSASTAFLTISNLKNEDSATYFCARLIYDGDYISSDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
32	3.7D6 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQSPDSLSASVGETVTITCGASENIYGALNWYQRKQGKSPQLLIYGATNLADGMSSRFSGSRSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNALSMPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSI

配列番号	説明	配列
		FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
33	3.3A8 VH CDR1	NYEIH
34	3.3A8 VH CDR2	AIHPGNGVTAYNQMFKG
35	3.3A8 VH CDR3	NFDY
36	3.3A8 VL CDR1	RSSQSLTNSYGITYLS
37	3.3A8 VL CDR2	EISNRFS
38	3.3A8 VL CDR3	LQGTHQPFT
39	3.3A8 VH	QVQFQQSGAELVRPGASVKVTCKALGYTFSNYEIHWVRQPPVHGLEWIGAIHPGNGVTAYNQMFKGRATLAADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTENFDYWGQGTAL
40	3.3A8 VL	DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISCRSSQSLTNSYGITYLSWFLLKPGQSPQLLIYEISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGVYFCLQGTHQPFTFGA
41	3.3A8 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAQVQFQQSGAELVRPGASVKVTCKALGYTFSNYEIHWVRQPPVHGLEWIGAIHPGNGVTAYNQMFKGRATLAADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTENFDYWGQGTALTVSSASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
42	3.3A8 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISCRSSQSLTNSYGITYLSWFLLKPGQSPQLLIYEISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGVYFCLQGTHQPFTFGAGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
43	3.2C11 VH CDR1	DYEIH
44	3.2C11 VH CDR2	GIHPGNGGTAYNPKFKG
45	3.2C11 VH CDR3	WVDY
46	3.2C11 VL CDR1	RSSQSLVNRHGITYLS
47	3.2C11 VL CDR2	EISNRFS
48	3.2C11 VL CDR3	FQGTHQPFT
49	3.2C11 VH	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGGIHPGNGGTAYNPKFKGKATLTADTSSSTASMELSSLTSEDSAVYYCTDWVDYWGQGTTL
50	3.2C11 VL	DVVVTQTPLSLPVNFGDQVSISCRSSQSLVNRHGITYLSWYLHKPGQSPQLLIYEISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCFQGTHQPFTFGG
51	3.2C11 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGGIHPGNGGTAYNPKFKGKATLTADTSSSTASMELSSLTSEDSAVYYCTDWVDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSP

配列番号	説明	配列
		IVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNN KDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
52	3.2C11 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDVVVTQTPLSLPVNFGDQVSISCRSSQSLVNRHGITYLSWYLHKPGQSP QLLIYEISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCFQGTHQPFTFGGGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
53	3.1C1 VH CDR1	NYFIH
54	3.1C1 VH CDR2	WINPGNLNTKYTEEFKG
55	3.1C1 VH CDR3	GNPFVY
56	3.1C1 VL CDR1	KSSQSLLNSGNQKKYLT
57	3.1C1 VL CDR2	WTSTRDS
58	3.1C1 VL CDR3	QNDYSYPLT
59	3.1C1 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNYFIHWVKQRPGQGLEWIGWINPGNLNTKYTEEFKGKA TLTADKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYFCVNGNPFVYWGQGTLV
60	3.1C1 VL	DIVMTQSPSSLTVIAGEKVTLNCKSSQSLLNSGNQKKYLTWLQQKPGQPPKLLIYWTSTRDSGVPDRF TGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGA
61	3.1C1 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAQVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTNYFIHWVKQRPGQGLEWIG WINPGNLNTKYTEEFKGKATLTADKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYFCVNGNPFVYWGQGTLVTVSAAS TKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISL SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
62	3.1C1 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPSSLTVIAGEKVTLNCKSSQSLLNSGNQKKYLTWLQQKPGQP PKLLIYWTSTRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
63	3.1C7 VH CDR1	SYWMH
64	3.1C7 VH CDR2	AIYPGKSDIKYNQKFKD
65	3.1C7 VH CDR3	SIPFVY
66	3.1C7 VL CDR1	KSSQSLLNSENQKKYLT
67	3.1C7 VL CDR2	WTSTRYS
68	3.1C7 VL CDR3	QNDYSYPLT
69	3.1C7 VH	EVQLQQSGTVLSRPGASVKMSCKASGYTMTSYWMHWIKQRPGQGLEWIGAIYPGKSDIKYNQKFKDKA KLTAVTATSTAYMEINSLTNEDSAVYYCTNSIPFVYWGQGTLI

配列番号	説明	配列
70	3.1C7 VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSENQKKYLTWFQQKPGQPPKLLIYWTSTRYSGIPDRF TGSGSGTVFTLTISSVQADDLAVYYCQNDYSYPLTFGG
71	3.1C7 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAEVQLQQSGTVLSRPGASVKMSCKASGYTMTSYWMHWIKQRPGQGLEWIG AIYPGKSDIKYNQKFKDKAKLTAVTATSTAYMEINSLTNEDSAVYYCTNSIPFVYWGQGTLITVSAAS TKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISL SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV NNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
72	3.1C7 LC mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSENQKKYLTWFQQKPGQP PKLLIYWTSTRYSGIPDRFTGSGSGTVFTLTISSVQADDLAVYYCQNDYSYPLTFGGGTKLEIKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
73	3.4G10 VH CDR1	SGESWH
74	3.4G10 VH CDR2	FIHYSGSANYNPSLKS
75	3.4G10 VH CDR3	SVYNYDGAWFPY
76	3.4G10 VL CDR1	SASSSVSSSYLN
77	3.4G10 VL CDR2	RTSNLAS
78	3.4G10 VL CDR3	HQWSAYPPT
79	3.4G10 VH	DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGESWHWIRHFPGNELEWMGFIHYSGSANYNPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLLSVTTDDTATYYCARSVYNYDGAWFPYWGQGTLV
80	3.4G10 VL	QIVLTQSPVIMSASPGERVTLTCSASSSVSSSYLNWYQLKPGSSPKVWIYRTSNLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWSAYPPTFGG
81	3.4G10 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYADVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGESWHWIRHFPGNELEWM GFIHYSGSANYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLLSVTTDDTATYYCARSVYNYDGAWFPYWGQGTLV TVSAASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
82	3.4G10 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQIVLTQSPVIMSASPGERVTLTCSASSSVSSSYLNWYQLKPGSSPKVWI YRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASYFCHQWSAYPPTFGGGTKLEIKRADAAPTVS IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
83	3.6E10 VH CDR1	SYYLH
84	3.6E10 VH CDR2	YINPNTGYTEYTQNFKD
85	3.6E10 VH CDR3	GNPFVY
86	3.6E10 VL CDR1	RSSQSLLNSGNQKNYLT

配列番号	説明	配列
87	3.6E10 VL CDR2	WTSTRYS
88	3.6E10 VL CDR3	QNDYSYPLT
89	3.6E10 VH	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYIFTSYYLHWVKQRPGQGLEWIGYINPNTGYTEYTQNFKDRATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYFCVNGNPFVYWGQGTLV
90	3.6E10 VL	DIVMTQSPSSLTVTTGEKVTMTCRSSQSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWTSTRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGA
91	3.6E10 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYIFTSYYLHWVKQRPGQGLEWIGYINPNTGYTEYTQNFKDRATLTADKSSSTAYMQLTSLTSEDSAVYFCVNGNPFVYWGQGTLVTVSAASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
92	3.6E10 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPSSLTVTTGEKVTMTCRSSQSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWTSTRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
93	3.3F7 VH CDR1	TYGVH
94	3.3F7 VH CDR2	VIWRGGNTDYNAAFMS
95	3.3F7 VH CDR3	SSYGYHYTMDY
96	3.3F7 VL CDR1	KASQNVGTAVA
97	3.3F7 VL CDR2	WASTRHT
98	3.3F7 VL CDR3	QRYNNFPFT
99	3.3F7 VH	QVQLKQSGPSLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGGNTDYNAAFMSRLSITKDNSQSQVFFKMNSLQADDTAIYYCAKSSYGYHYTMDYWGHGTSV
100	3.3F7 VL	DIVVTQSHRFMSTSVGDRVIITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQRYNNFPFTFGS
101	3.3F7 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAQVQLKQSGPSLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGGNTDYNAAFMSRLSITKDNSQSQVFFKMNSLQADDTAIYYCAKSSYGYHYTMDYWGHGTSVTVSSASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
102	3.3F7 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVVTQSHRFMSTSVGDRVIITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQRYNNFPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
103	4.17A5 VH CDR1	NSWIN

配列番号	説明	配列
104	4.17A5 VH CDR2	RIYPGDGDTKYNGKFKG
105	4.17A5 VH CDR3	FPFGKYEGPGAMDY
106	4.17A5 VL CDR1	RASQDISSYLN
107	4.17A5 VL CDR2	YTSRLHS
108	4.17A5 VL CDR3	QQGNTLPYT
109	4.17A5 VH	QVQLQQSGPELLKPGASVKISCKGSGYAFSNSWINWVKLRPGQGLEWIGRIYPGDGDTKYNGKFKGKATLTADKSSSTAHMQLRSLTSVDSAVYFCARFPFGKYEGPGAMDYWGQGTSV
110	4.17A5 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG
111	4.17A5 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQSGPELLKPGASVKISCKGSGYAFSNSWINWVKLRPGQGLEWIGRIYPGDGDTKYNGKFKGKATLTADKSSSTAHMQLRSLTSVDSAVYFCARFPFGKYEGPGAMDYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
112	4.17A5 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
113	4.2C4 VH CDR1	DYVIS
114	4.2C4 VH CDR2	EMFPGSGTTYYTEKFRG
115	4.2C4 VH CDR3	GTTADY
116	4.2C4 VL CDR1	RASSSVNYMY
117	4.2C4 VL CDR2	YTSNLAP
118	4.2C4 VL CDR3	QQFTSSPYT
119	4.2C4 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEMFPGSGTTYYTEKFRGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGTTADYWGQGTTL
120	4.2C4 VL	ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYYTSNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGG
121	4.2C4 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEMFPGSGTTYYTEKFRGKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGTTADYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

配列番号	説明	配列
122	4.2C4 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNYMYWYQQKSDASPKLWIYY TSNLAPGVPARFSGSGSGNSYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEY ERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
123	4.12E5 VH CDR1	GYFMH
124	4.12E5 VH CDR2	YISCYNGASVYNQRFKG
125	4.12E5 VH CDR3	DVLRYPRYAVDY
126	4.12E5 VL CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN
127	4.12E5 VL CDR2	LVSNLDS
128	4.12E5 VL CDR3	WQGSHFPFT
129	4.12E5 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGKSLEWIGYISCYNGASVYNQRFKGKA TFTIDTSSSTAYMQFNSLTSEDSAVYYCARDVLRYPRYAVDYWGQGTSV
130	4.12E5 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSNLDSGVPARFT GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPFTFGS
131	4.12E5 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGKSLEWIG YISCYNGASVYNQRFKGKATFTIDTSSSTAYMQFNSLTSEDSAVYYCARDVLRYPRYAVDYWGQGTSV TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
132	4.12E5 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSP KRLIYLVSNLDSGVPARFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPFTFGSGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
133	4.11A10 VH CDR1	GYFMH
134	4.11A10 VH CDR2	YISCYNGVSVYNQRFKG
135	4.11A10 VH CDR3	DVLRYPRYAVDY
136	4.11A10 VL CDR1	KSSQSLLDSDGKTYLN
137	4.11A10 VL CDR2	LVSNLDS
138	4.11A10 VL CDR3	WQGSHFPFT
139	4.11A10 VH	EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGKSLEWIGYISCYNGVSVYNQRFKGKA TFTIDTSSSTAYMQFNSLTSEDSAVYYCARDVLRYPRYAVDYWGQGTSV
140	4.11A10 VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSNLDSGVPDRFT GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPFTFGS
141	4.11A10 HC	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSFTGYFMHWVKQSHGKSLEWIG YISCYNGVSVYNQRFKGKATFTIDTSSSTAYMQFNSLTSEDSAVYYCARDVLRYPRYAVDYWGQGTSV

配列番号	説明	配列
	LALAPG mIgG2a	TVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
142	4.11A10 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSP KRLIYLVSNLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGSHFPFTFGSGTKLEIKRADAA PTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
143	4.11H11 VH CDR1	VYTMN
144	4.11H11 VH CDR2	LINPYNGGTIYNRKFKG
145	4.11H11 VH CDR3	GALYRYEGAMDY
146	4.11H11 VL CDR1	RASSSVIYVH
147	4.11H11 VL CDR2	ATSNLAS
148	4.11H11 VL CDR3	QQWSSNPLT
149	4.11H11 VH	EVQVQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFIVYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTIYNRKFKGKA TLTVDKSSSTAYLELLSLTSEDSAVYYCARGALYRYEGAMDYWGQGTSVI
150	4.11H11 VL	QIVLSQFPAILSASPGEKVTMTCRASSSVIYVHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGT SHSLTISRLEAEDTATYYCQQWSSNPLTFGA
151	4.11H11 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQVQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFIVYTMNWVKQSHGKNLEWIG LINPYNGGTIYNRKFKGKATLTVDKSSSTAYLELLSLTSEDSAVYYCARGALYRYEGAMDYWGQGTSV IVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKD VLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGK EFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNG KTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
152	4.11H11 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQIVLSQFPAILSASPGEKVTMTCRASSSVIYVHWYQQKPGSSPKPWIYA TSNLASGVPARFSGSGSGTSHSLTISRLEAEDTATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEY ERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
153	4.29C4 VH CDR1	NYWMN
154	4.29C4 VH CDR2	MIHPSDSESRLSQRFKD
155	4.29C4 VH CDR3	LDY
156	4.29C4 VL CDR1	KSSQSLLKSSNQKNYLA
157	4.29C4 VL CDR2	FASTRES
158	4.29C4 VL CDR3	QQHYSAPLT

配列番号	説明	配列
159	4.29C4 VH	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFANYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSESRLSQRFKDKATLTVDKSSSTAYMQLNSPTSEDSAVYYCARLDYWGQGTSV
160	4.29C4 VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLKSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSAPLTFGA
161	4.29C4 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFANYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSESRLSQRFKDKATLTVDKSSSTAYMQLNSPTSEDSAVYYCARLDYWGQGTSVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
162	4.29C4 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLKSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSAPLTFGAGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
163	5.17D12 VH CDR1	SNYYMC
164	5.17D12 VH CDR2	CVYVGSGGSTYYASWAK
165	5.17D12 VH CDR3	DLSYAGDL
166	5.17D12 VL CDR1	QASESISSYLA
167	5.17D12 VL CDR2	GASNLAS
168	5.17D12 VL CDR3	QSAYYSNSGGHA
169	5.17D12 VH	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSSNYYMCWVRQAPGKGLEWIACVYVGSGGSTYYASWAKGRFTFSKTSSTTWTLQMTSLTAADTATYFCARDLSYAGDLWGPGTLVTVSS
170	5.17D12 VL	DPVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASESISSYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASNLASGVPSRFKGSGSGTEYTLTISDLECDDAATYYCQSAYYSNSGGHAFGGGTEVVVK
171	5.17D12 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSSNYYMCWVRQAPGKGLEWIACVYVGSGGSTYYASWAKGRFTFSKTSSTTWTLQMTSLTAADTATYFCARDLSYAGDLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
172	5.17D12 LC	MDMRAPTQLLGLLLLWLPGVICDPVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASESISSYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASNLASGVPSRFKGSGSGTEYTLTISDLECDDAATYYCQSAYYSNSGGHAFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
173	5.17H8 VH CDR1	SYAMG
174	5.17H8 VH CDR2	IISSSGSTHYASWA
175	5.17H8 VH CDR3	ARAGSTYYTGYYFNL

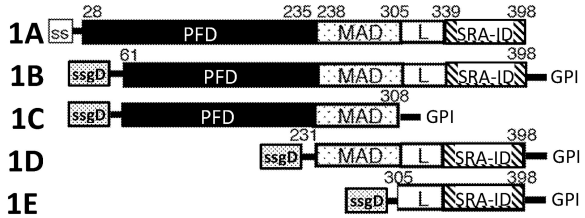
配列番号	説明	配列
176	5.17H8 VL CDR1	QASESIYSNLA
177	5.17H8 VL CDR2	GASTLES
178	5.17H8 VL CDR3	QSGYYGISAINNA
179	5.17H8 VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTHYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARARAGSTYYTGYYFNLWGQGTLVTVSS
180	5.17H8 VL	AIEMTQTASPVSAAVGGTVTINCQASESIYSNLAWYQQKPGQRPKLLIYGASTLESGVPSRFKGSGSGTEYTLTISDLECDDAATYYCQSGYYGISAINNAFGGGTEVVVK
181	5.17H8 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMGWVRQAPGKGLEWIGIISSSGSTHYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARARAGSTYYTGYYFNLWGQGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
182	5.17H8 LC	MDMRAPTQLLGLLLLWLPGVTFAIEMTQTASPVSAAVGGTVTINCQASESIYSNLAWYQQKPGQRPKLLIYGASTLESGVPSRFKGSGSGTEYTLTISDLECDDAATYYCQSGYYGISAINNAFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
183	5.11H2 VH CDR1	YNYWIY
184	5.11H2 VH CDR2	CINTGNSGITNYANWAK
185	5.11H2 VH CDR3	GGINSGDYMNL
186	5.11H2 VL CDR1	QASENIYRLLA
187	5.11H2 VL CDR2	DASTLAS
188	5.11H2 VL CDR3	QQAYSNSNIDNY
189	5.11H2 VH	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSYNYWIYWVRQAPGKGLEWIGCINTGNSGITNYANWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGGINSGDYMNLWGPGTLVTVSS
190	5.11H2 VL	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASENIYRLLAWYQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTVSGVQCDDAATYYCQQAYSNSNIDNYFGGGTEVVVK
191	5.11H2 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSYNYWIYWVRQAPGKGLEWIGCINTGNSGITNYANWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGGINSGDYMNLWGPGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
192	5.11H2 LC	MDMRAPTQLLGLLLLWLPGARCAYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASENIYRLLAWYQQKPGQAPKLLIYDASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTVSGVQCDDAATYYCQQAYSNSNIDNYFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

配列番号	説明	配列
193	5.14D6 VH CDR1	SKTIT
194	5.14D6 VH CDR2	FINTDGRAYYASWA
195	5.14D6 VH CDR3	TNL
196	5.14D6 VL CDR1	QASQSVYKNNYLA
197	5.14D6 VL CDR2	SVSTLDS
198	5.14D6 VL CDR3	LGSYDCSSADCAA
199	5.14D6 VH	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSKTITWVRQAPGKGLEWIGFINTDGRAYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRTNLWGQGTLVTVSS
200	5.14D6 VL	AQVLTQTSSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGQPPKRLIYSVSTLDSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSSADCAAFGGGTEVVVK
201	5.14D6 HC	METGLRWLLLVAVLKGVQCQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSKTITWVRQAPGKGLEWIGFINTDGRAYYASWAKGRFTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCGRTNLWGQGTLVTVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYNKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
202	5.14D6 LC	MDMRAPTQLLGLLLLWLPGATFAQVLTQTSSPVSAAVGSTVTINCQASQSVYKNNYLAWFQQKPGQPPKRLIYSVSTLDSGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCLGSYDCSSADCAAFGGGTEVVVKGDPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTTGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC
203	3.7F5 VH CDR1	DYNVF
204	3.7F5 VH CDR2	YIDPYNGATSYNQKFKD
205	3.7F5 VH CDR3	GTVRAFFDS
206	3.7F5 VL CDR1	KSSQSLLYRNDQINYLA
207	3.7F5 VL CDR2	WASTRES
208	3.7F5 VL CDR3	QQYYSYPPT
209	3.7F5 VH	EIHLQQSGPEVVQPGASLKVSCKASDYSFTDYNVFWVKQSHGKSLEWIAYIDPYNGATSYNQKFKDKATLTVDKSSSTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARGTVRAFFDSWGQGTTL
210	3.7F5 VL	DIVMSQSPSSLVVSVGEKVSLSCKSSQSLLYRNDQINYLAWYQQKPGQSPKLLIFWASTRESGVPVRFTGSGSGTDFTLNINTVKAEDLAVYYCQQYYSYPPTFGT
211	3.7F5 HC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGAYAEIHLQQSGPEVVQPGASLKVSCKASDYSFTDYNVFWVKQSHGKSLEWIAYIDPYNGATSYNQKFKDKATLTVDKSSSTAFMYLNSLTSEDSAVYYCARGTVRAFFDSWGQGTTLTVSSASTKGPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK

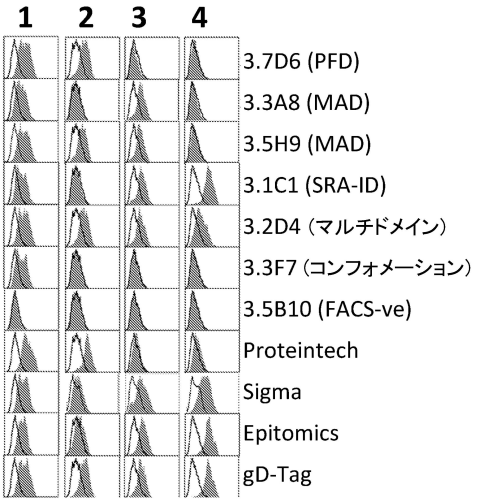
配列番号	説明	配列
		CKVNNKDLGAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
212	3.7F5 LC LALAPG mIgG2a	MGWSCIILFLVATATGVHSDIVMSQSPSSLVVSVGEKVSLSCKSSQSLLYRNDQINYLAWYQQKPGQS PKLLIFWASTRESGVPVRFTGSGSGTDFTLNINTVKAEDLAVYYCQQYYSYPPTFGTGTKLEIKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
213	ヒトAPOL1 KIKアイソタイプ G0型(シグナル配列なし)	EA GARVQQNVPS GTDTGDPQSK PLGDWAAGTM DPESSIFIED AIKYFKEKVS TQNLLLLLTD NEAWNGFVAA AELPRNEADE LRKALDNLAR QMIMKDKNWH DKGQQYRNWF LKEFPRLKSK LEDNIRRLRA LADGVQKVHK GTTIANVVSG SLSISSGILT LVGMGLAPFT EGGSLVLLEP GMELGITAAL TGITSSTIDY GKKWWTQAQA HDLVIKSLDK LKEVKEFLGE NISNFLSLAG NTYQLTRGIG KDIRALRRAR ANLQSVPHAS ASRPRVTEPI SAESGEQVER VNEPSILEMS RGVKLTDVAP VSFFLVLDVV YLVYESKHLH EGAKSETAEE LKKVAQELEE KLNILNNNYK ILQADQEL
214	ヒトAPOL1 EIKアイソタイプ G0型(シグナル配列なし)	EA GARVQQNVPS GTDTGDPQSK PLGDWAAGTM DPESSIFIED AIKYFKEKVS TQNLLLLLTD NEAWNGFVAA AELPRNEADE LRKALDNLAR QMIMKDKNWH DKGQQYRNWF LKEFPRLKSE LEDNIRRLRA LADGVQKVHK GTTIANVVSG SLSISSGILT LVGMGLAPFT EGGSLVLLEP GMELGITAAL TGITSSTIDY GKKWWTQAQA HDLVIKSLDK LKEVKEFLGE NISNFLSLAG NTYQLTRGIG KDIRALRRAR ANLQSVPHAS ASRPRVTEPI SAESGEQVER VNEPSILEMS RGVKLTDVAP VSFFLVLDVV YLVYESKHLH EGAKSETAEE LKKVAQELEE KLNILNNNYK ILQADQEL
215	ヒトAPOL1 EMRアイソタイプのG1バリアント(シグナル配列なし)	EA GARVQQNVPS GTDTGDPQSK PLGDWAAGTM DPESSIFIED AIKYFKEKVS TQNLLLLLTD NEAWNGFVAA AELPRNEADE LRKALDNLAR QMIMKDKNWH DKGQQYRNWF LKEFPRLKSE LEDNIRRLRA LADGVQKVHK GTTIANVVSG SLSISSGILT LVGMGLAPFT EGGSLVLLEP GMELGITAAL TGITSSTMDY GKKWWTQAQA HDLVIKSLDK LKEVREFLGE NISNFLSLAG NTYQLTRGIG KDIRALRRAR ANLQSVPHAS ASRPRVTEPI SAESGEQVER VNEPSILEMS RGVKLTDVAP VGFFLVLDVV YLVYESKHLH EGAKSETAEE LKKVAQELEE KLNMLNNNYK ILQADQEL
216	ヒトAPOL1 EMRアイソタイプのG2バリアント(シグナル配列なし)	EA GARVQQNVPS GTDTGDPQSK PLGDWAAGTM DPESSIFIED AIKYFKEKVS TQNLLLLLTD NEAWNGFVAA AELPRNEADE LRKALDNLAR QMIMKDKNWH DKGQQYRNWF LKEFPRLKSE LEDNIRRLRA LADGVQKVHK GTTIANVVSG SLSISSGILT LVGMGLAPFT EGGSLVLLEP GMELGITAAL TGITSSTMDY GKKWWTQAQA HDLVIKSLDK LKEVREFLGE NISNFLSLAG NTYQLTRGIG KDIRALRRAR ANLQSVPHAS ASRPRVTEPI SAESGEQVER VNEPSILEMS RGVKLTDVAP VSFFLVLDVV YLVYESKHLH EGAKSETAEE LKKVAQELEE KLNILNN__K ILQADQEL

【図面】

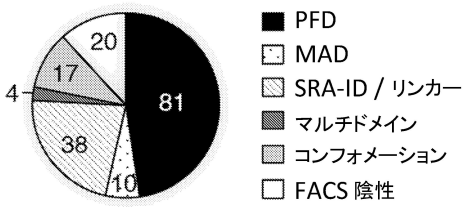
【図１Ａ－１Ｅ】



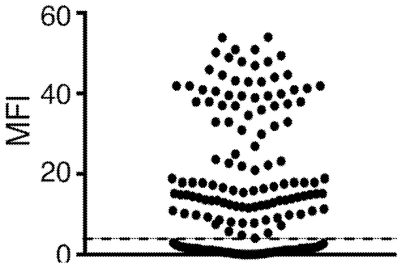
【図１Ｆ】



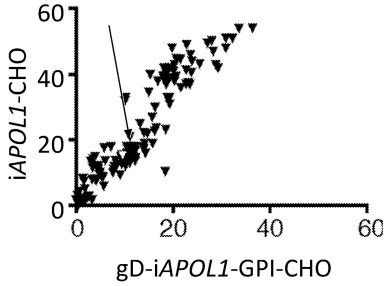
【図１Ｇ】



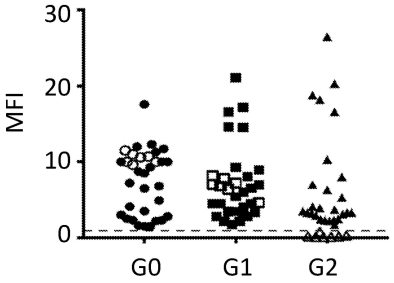
【図２Ａ】



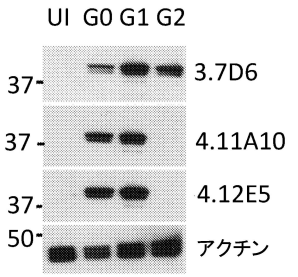
【図２Ｂ】



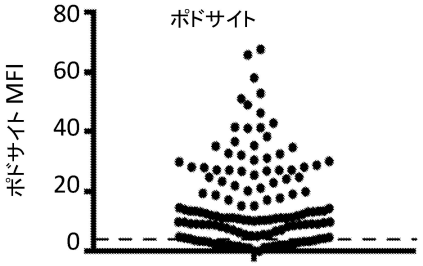
【図２Ｃ】



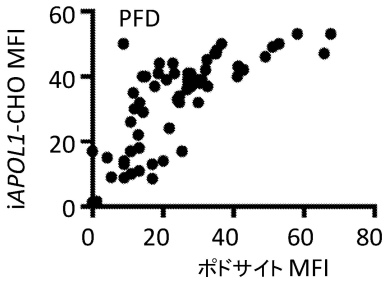
【図２Ｄ】



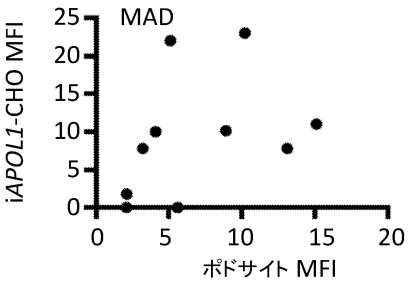
【図３Ａ】



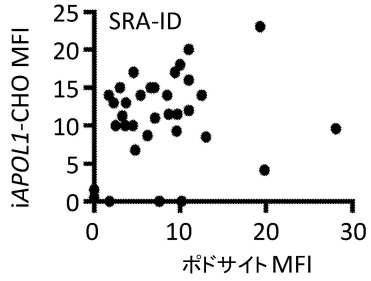
【図３Ｂ】



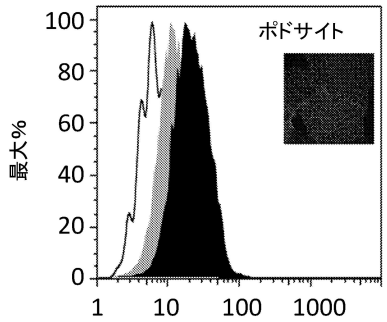
【図３Ｃ】



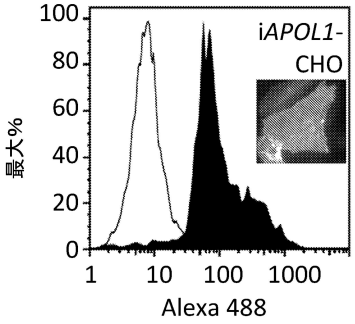
【図３Ｄ】



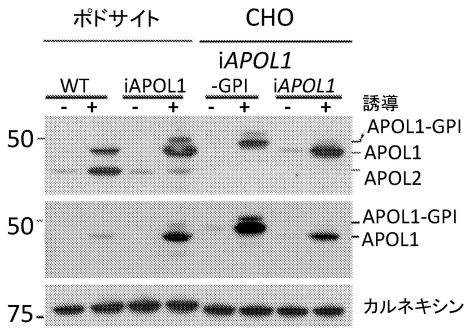
【図３Ｅ】



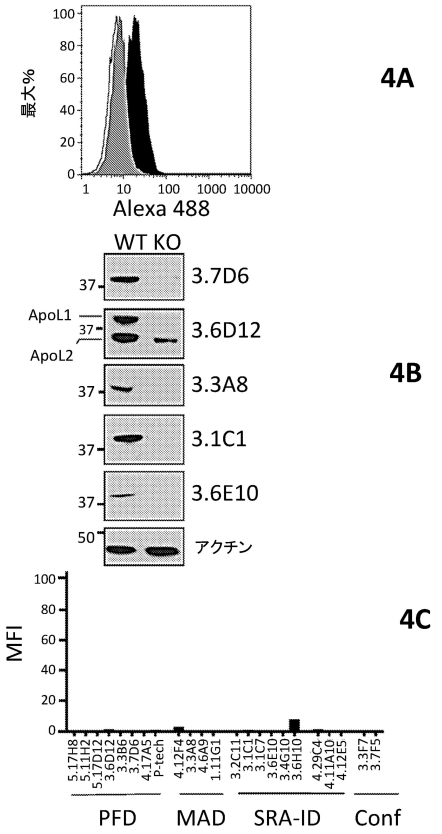
【図３Ｆ】



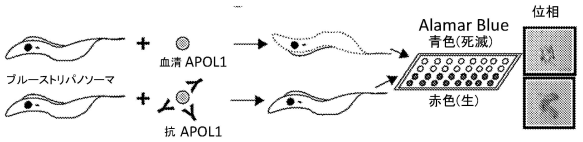
【図３Ｇ】



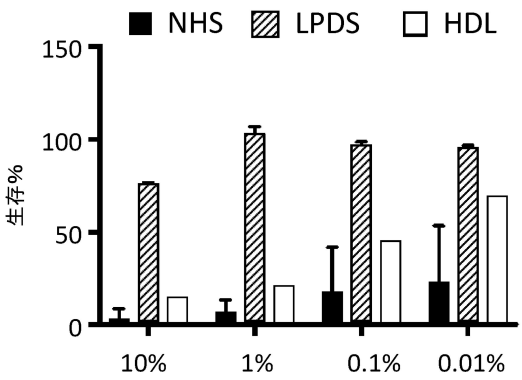
【図４Ａ－４Ｃ】



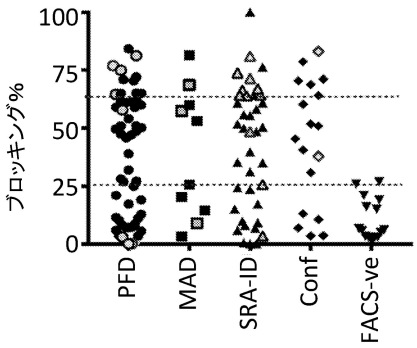
【図５Ａ】



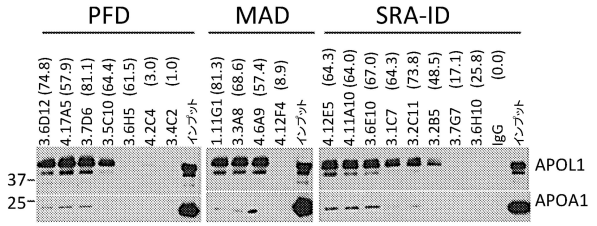
【図５Ｂ】



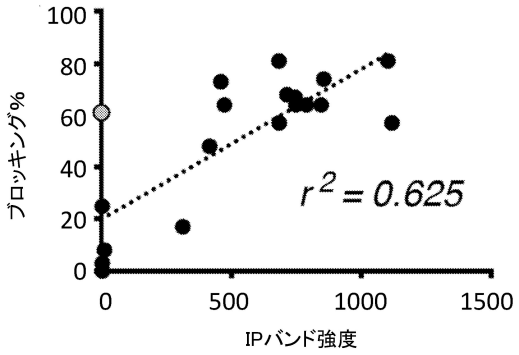
【図５Ｃ】



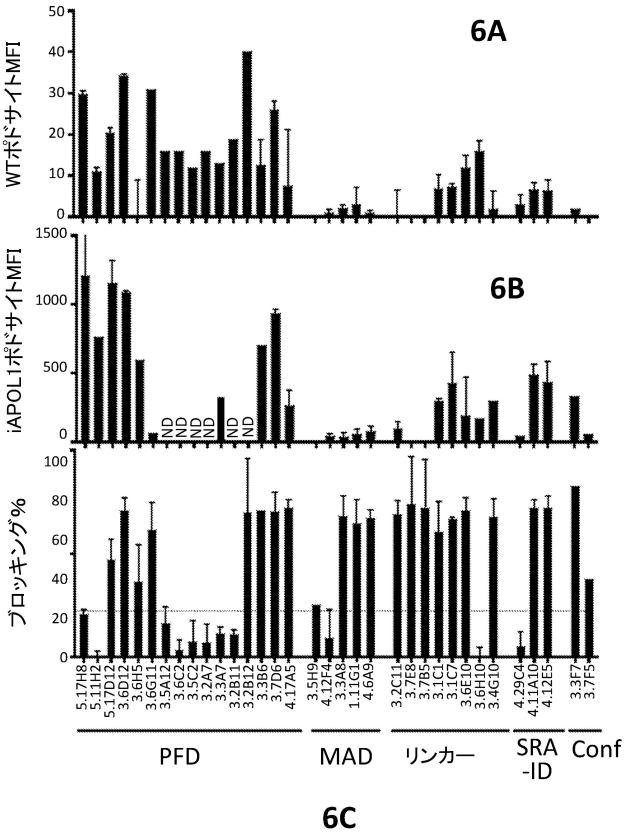
【図５Ｄ】



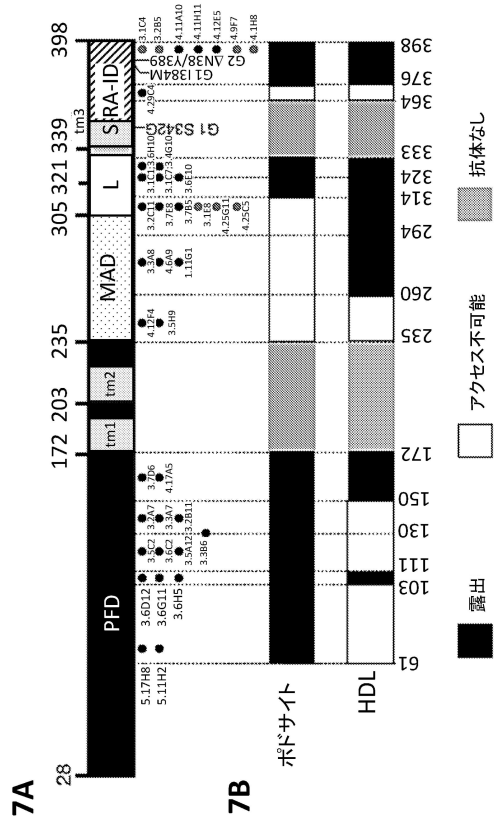
【図５Ｅ】



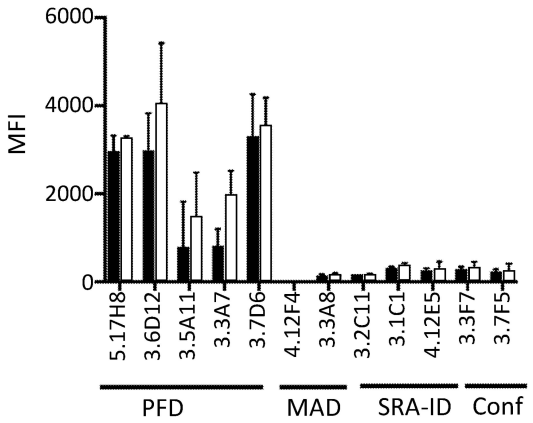
【図６Ａ－６Ｃ】



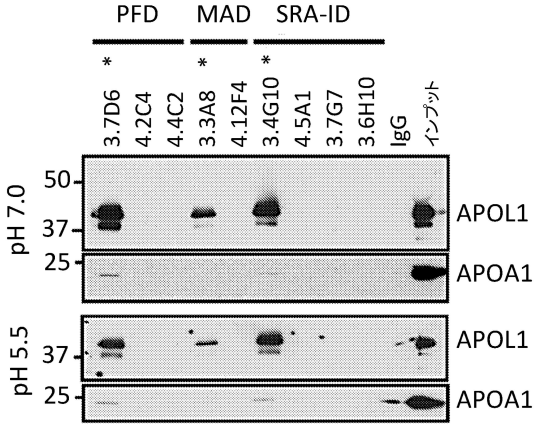
【図７Ａ－７Ｂ】



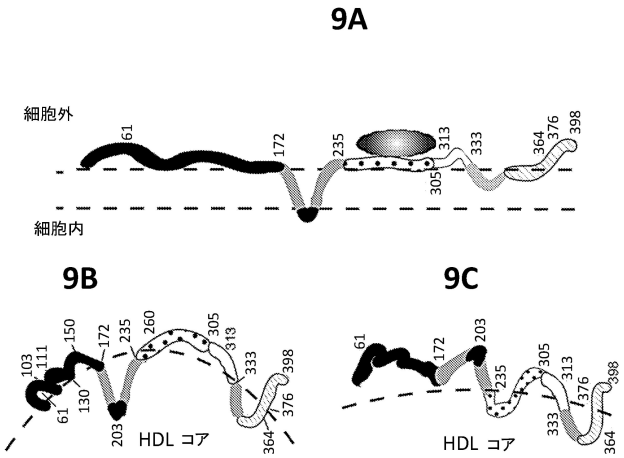
【図８Ａ】



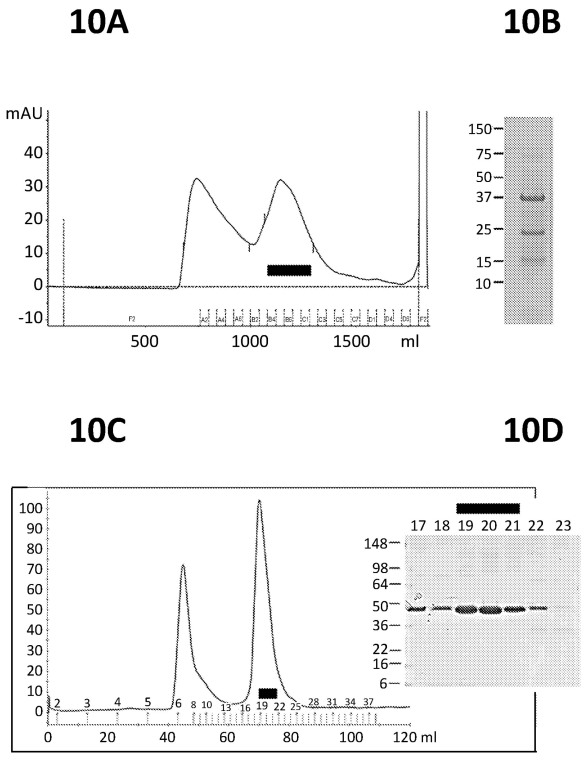
【図８Ｂ】



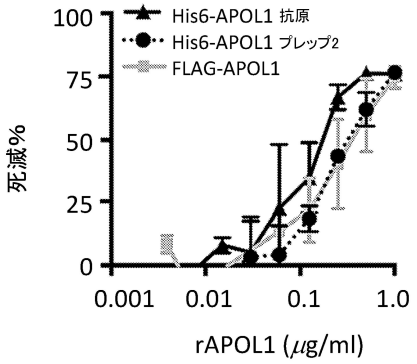
【図９Ａ－９Ｃ】



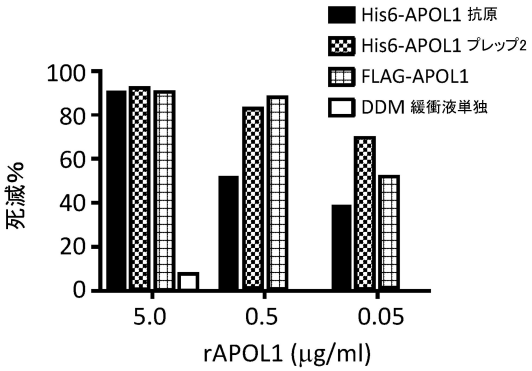
【図１０Ａ－１０Ｄ】



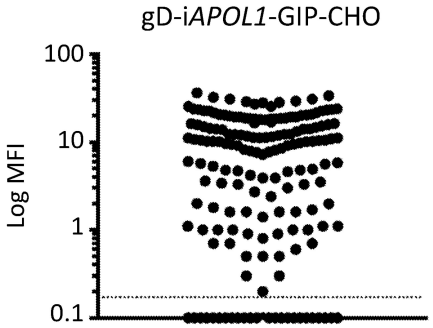
【図１０Ｅ】



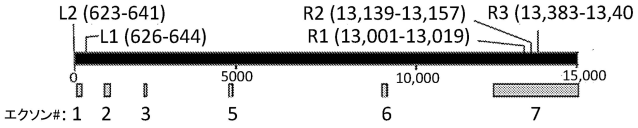
【図１０Ｆ】



【図１１】



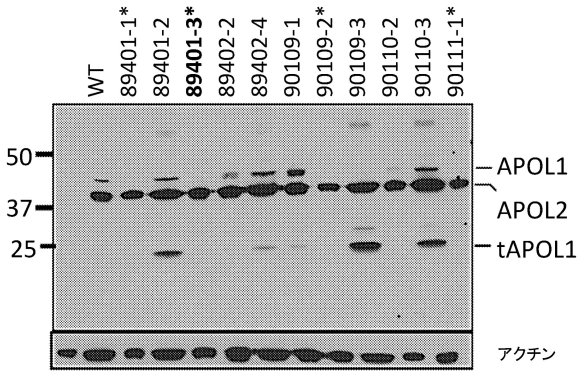
【図１２Ａ】



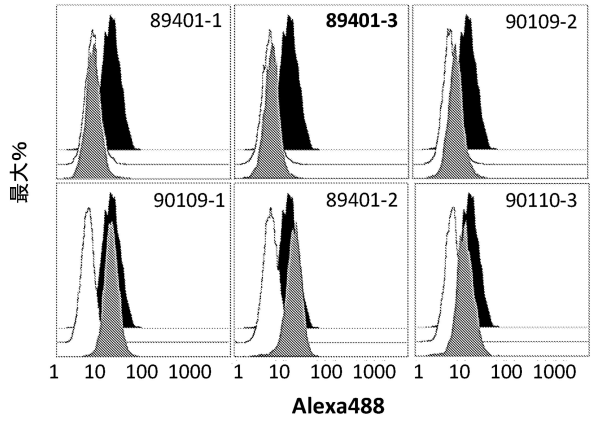
【図１２Ｂ】

gRNA #	gRNA 対
89401	L2, R3
89402	L2, R4
90109	L1, R2
90110	L1, R4
90111	L2, R2

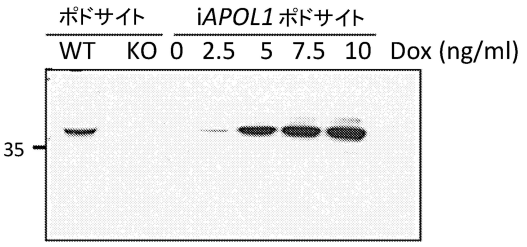
【図１２Ｃ】



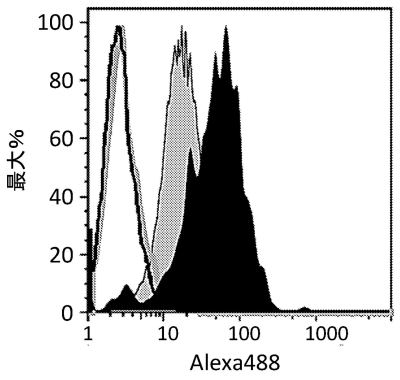
【図１２Ｄ】



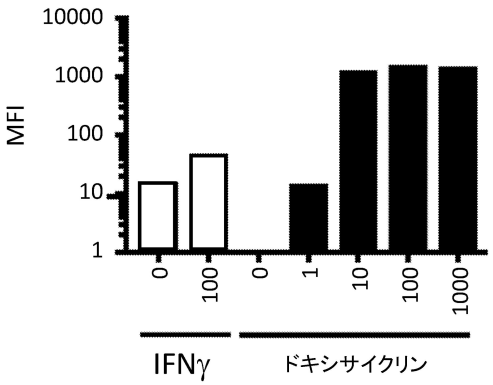
【図１３Ａ】



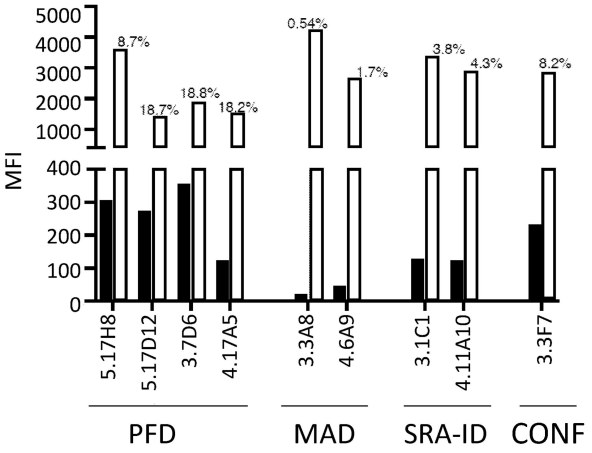
【図１３Ｂ】



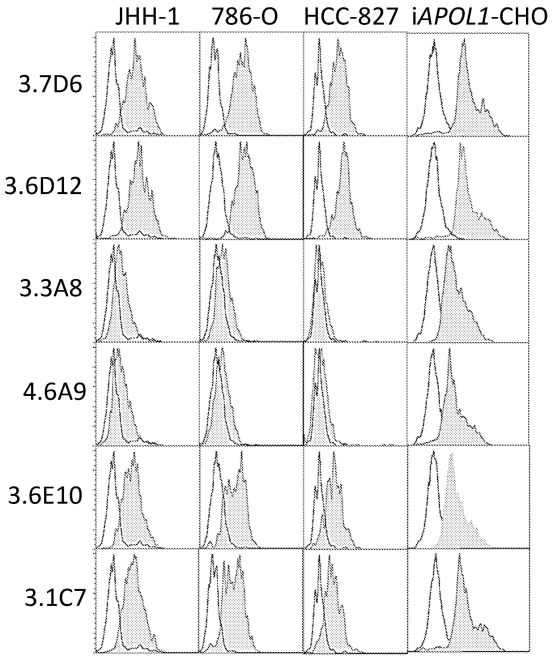
【図１３Ｃ】



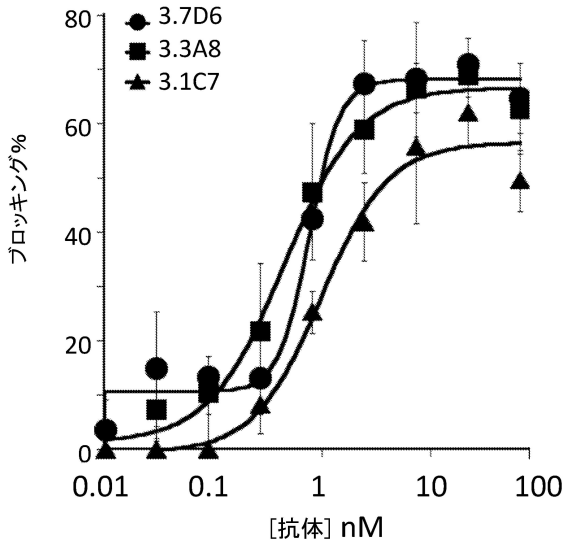
【図１４】



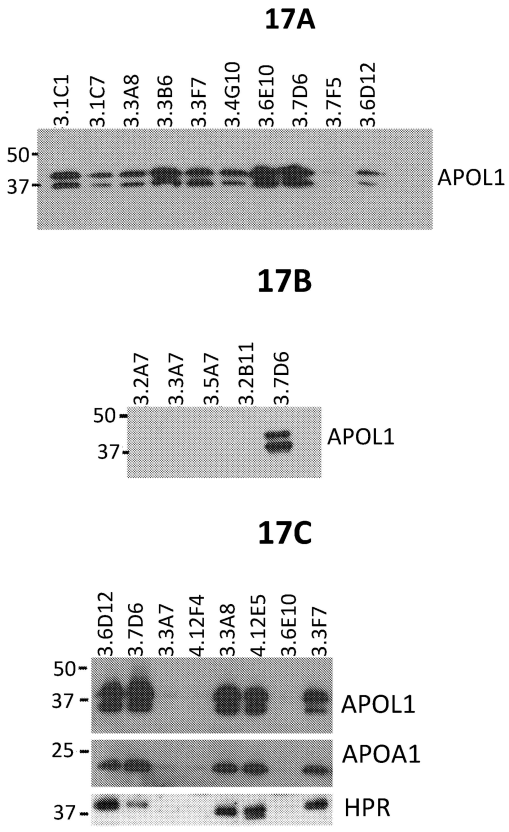
【図１５】



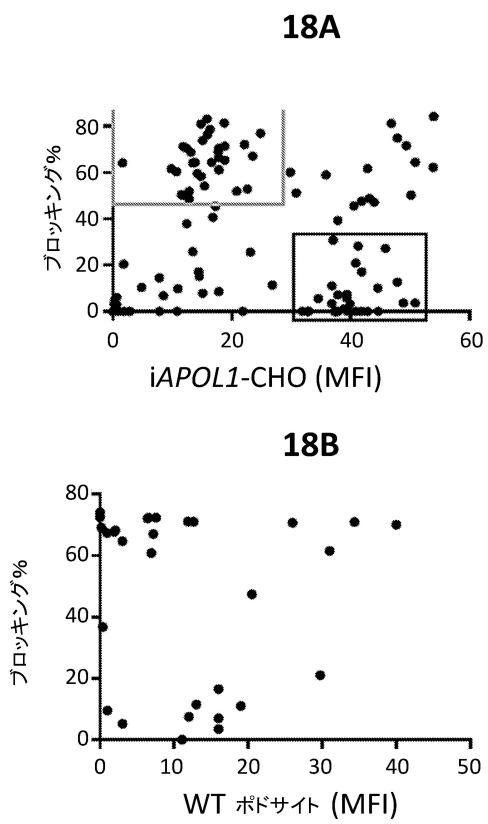
【図１６】



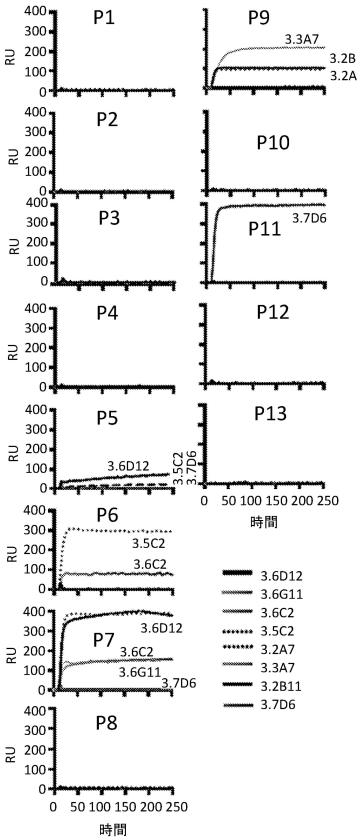
【図１７Ａ－１７Ｃ】



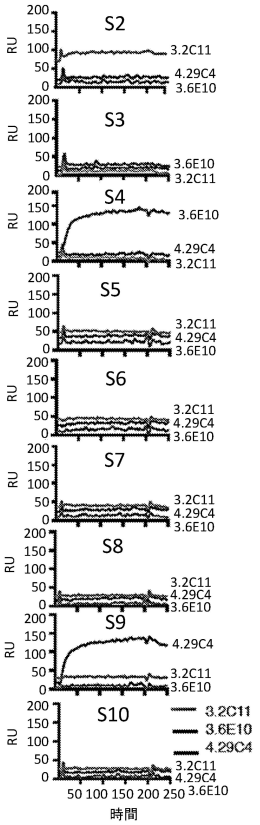
【図１８Ａ－１８Ｂ】



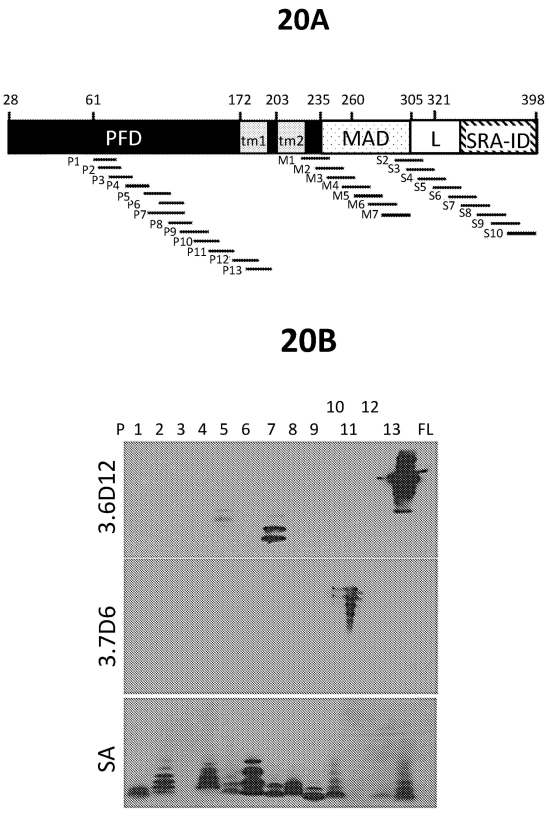
【図１９Ａ】



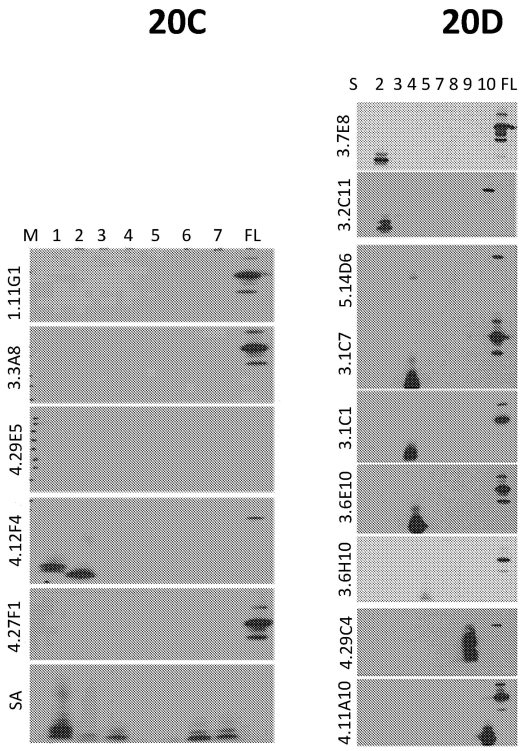
【図１９Ｂ】



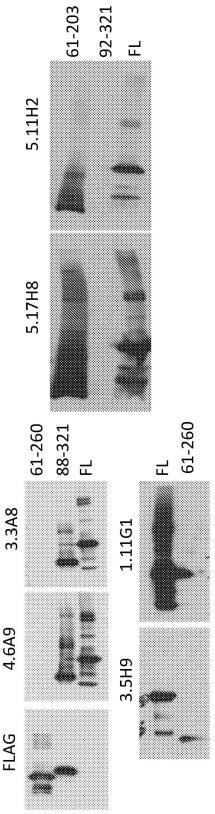
【図２０Ａ－２０Ｂ】



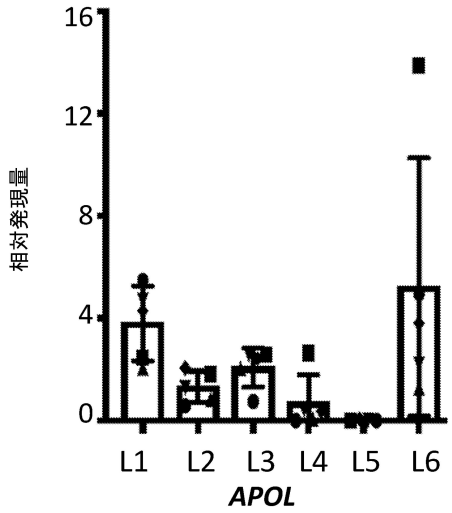
【図２０Ｃ－２０Ｄ】



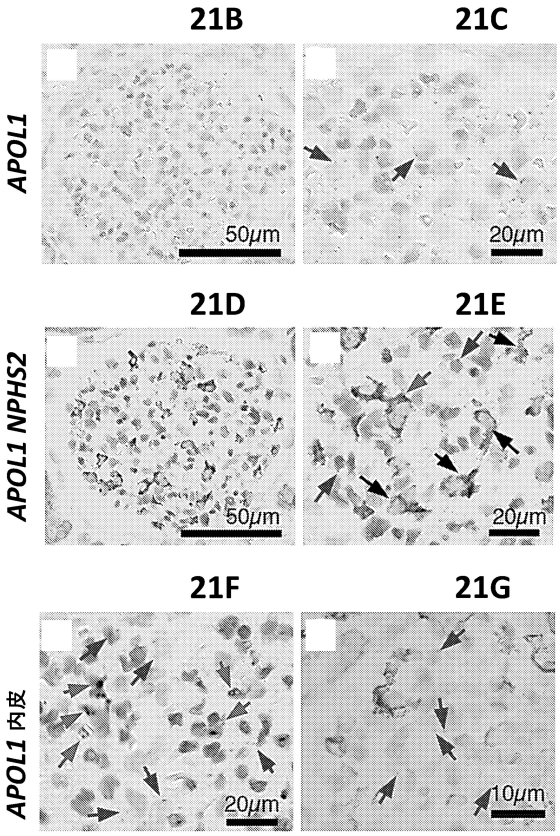
【図２０Ｅ】



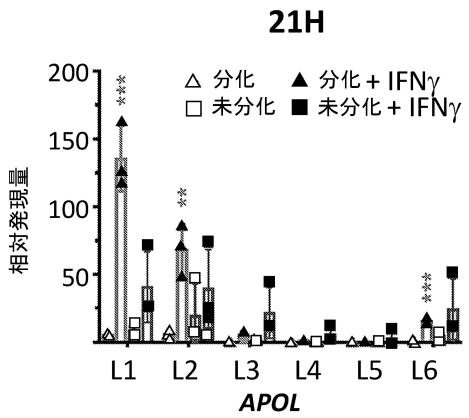
【図２１Ａ】



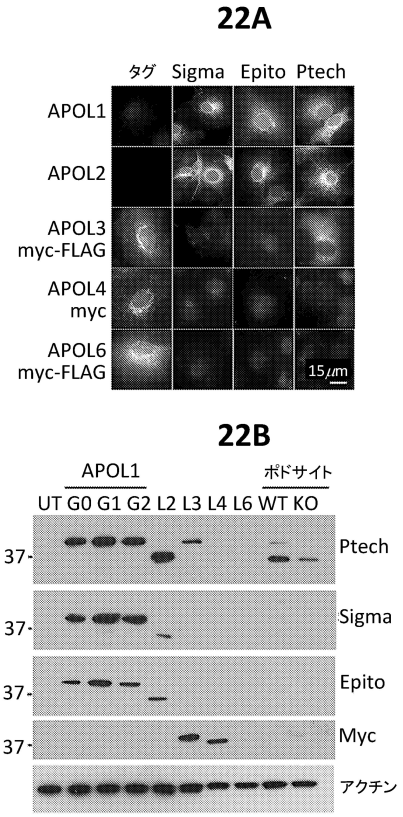
【図２１Ｂ－２１Ｇ】



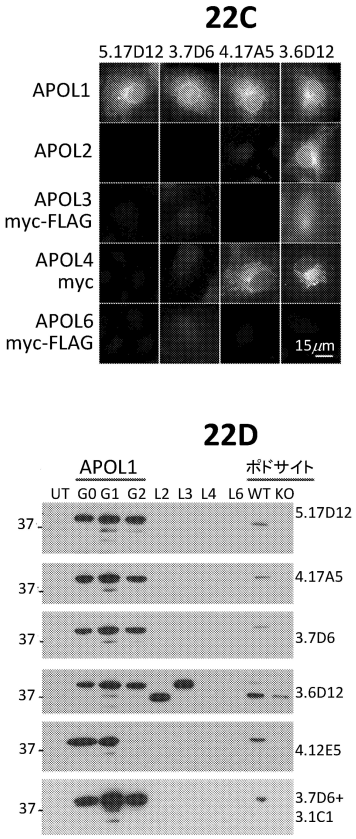
【図２１Ｈ－２１Ｉ】



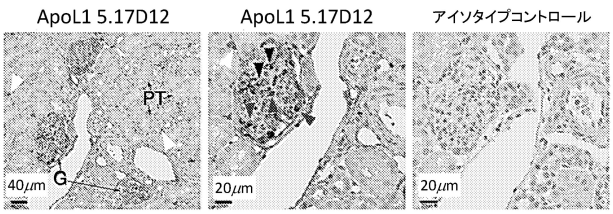
【図２２Ａ－２２Ｂ】



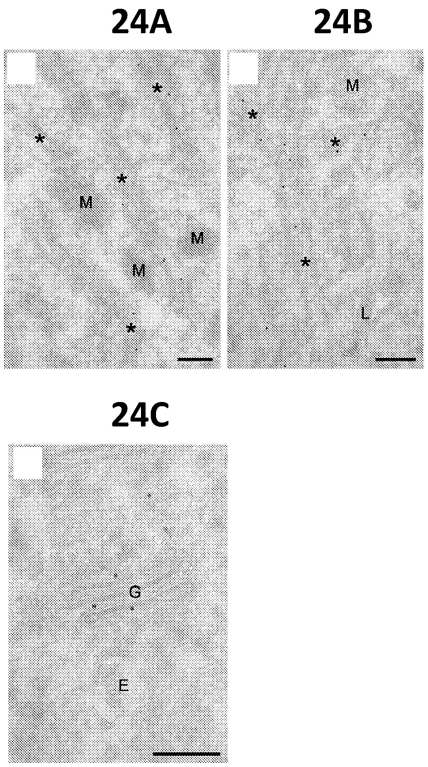
【図２２Ｃ－２２Ｄ】



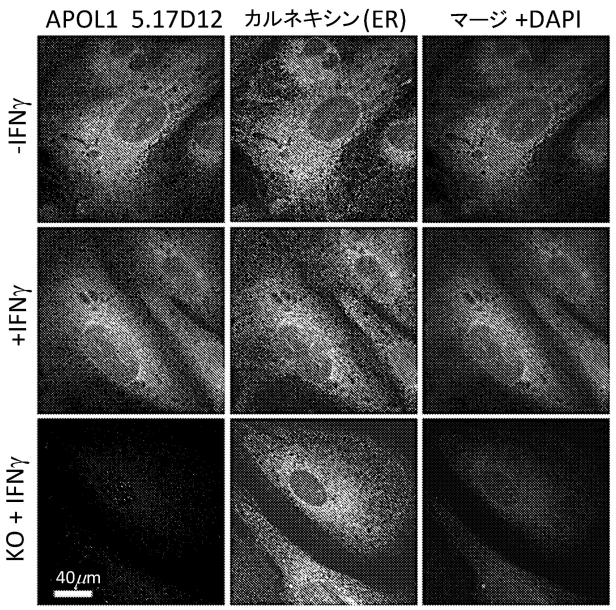
【図２３】



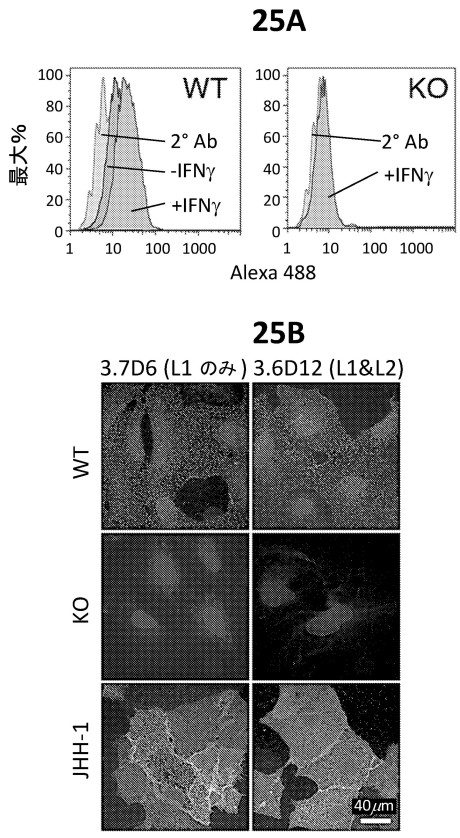
【図２４Ａ－２４Ｃ】



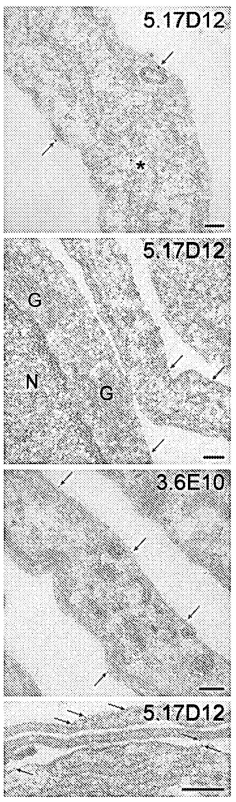
【図２４Ｄ】



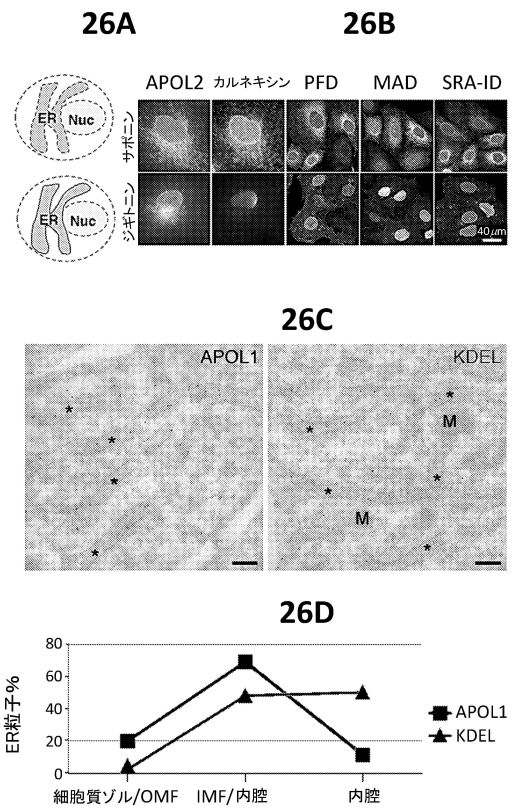
【図２５Ａ－２５Ｂ】



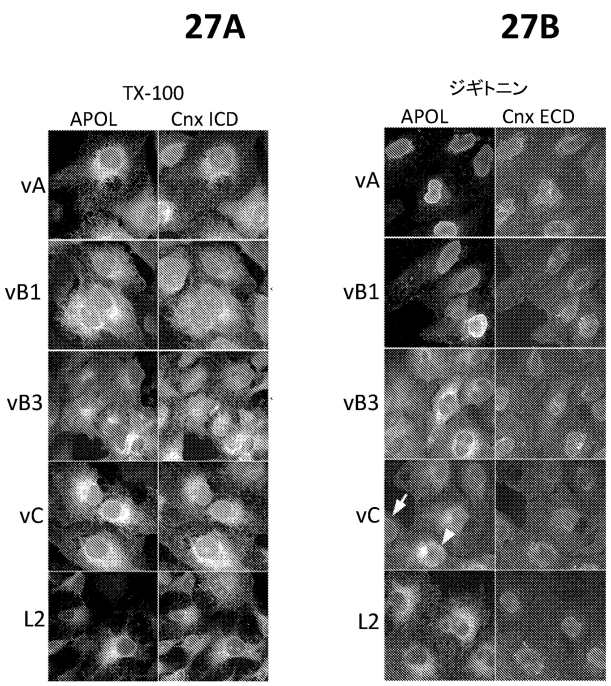
【図２５Ｃ】



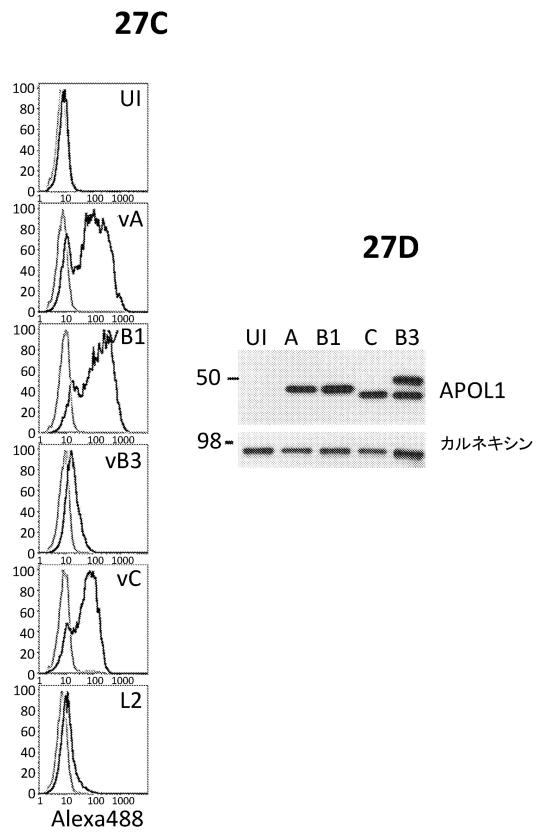
【図２６Ａ－２６Ｄ】



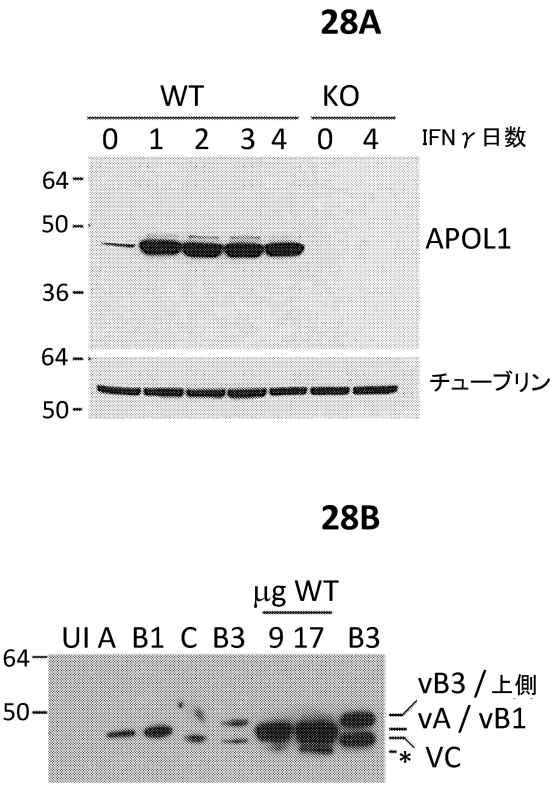
【図２７Ａ－２７Ｂ】



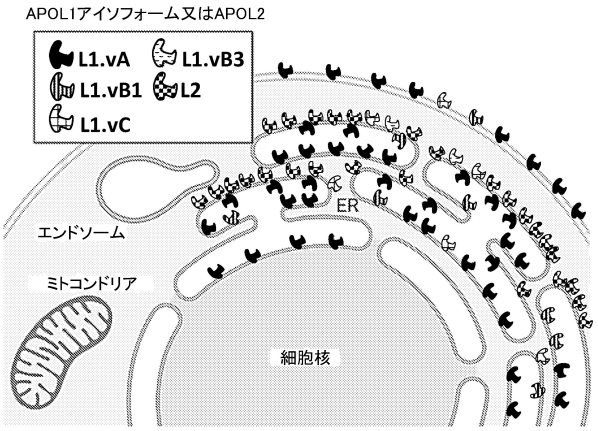
【図２７Ｃ－２７Ｄ】



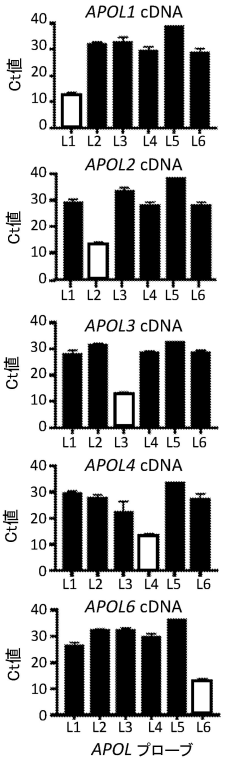
【図２８Ａ－２８Ｂ】



【図２９】

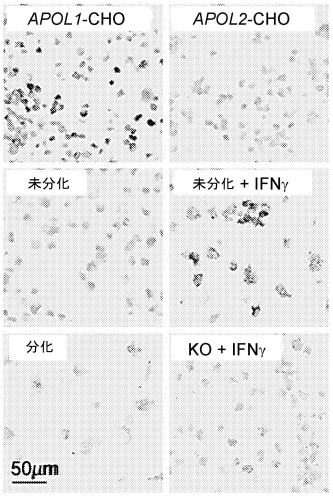


【図３０Ａ】

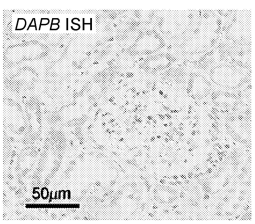


【図３０Ｂ－３０Ｃ】

30B

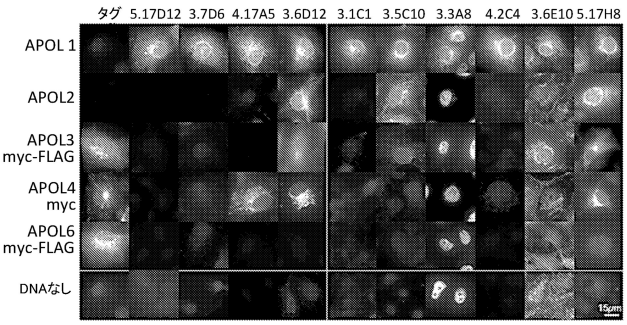


30C

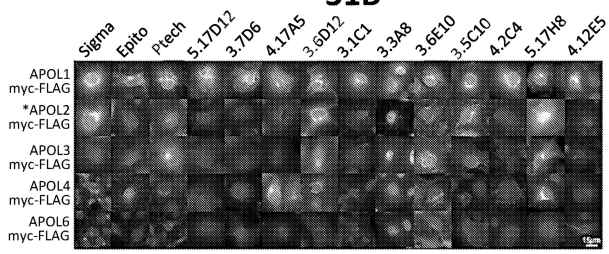


【図３１Ａ－３１Ｂ】

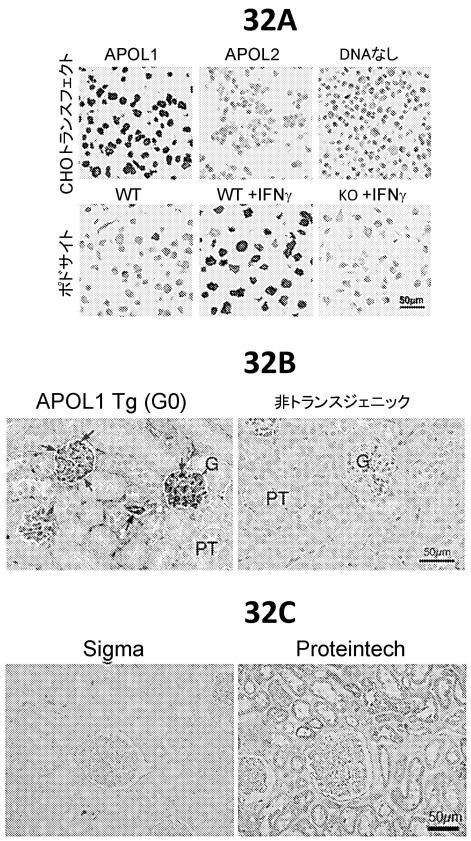
31A



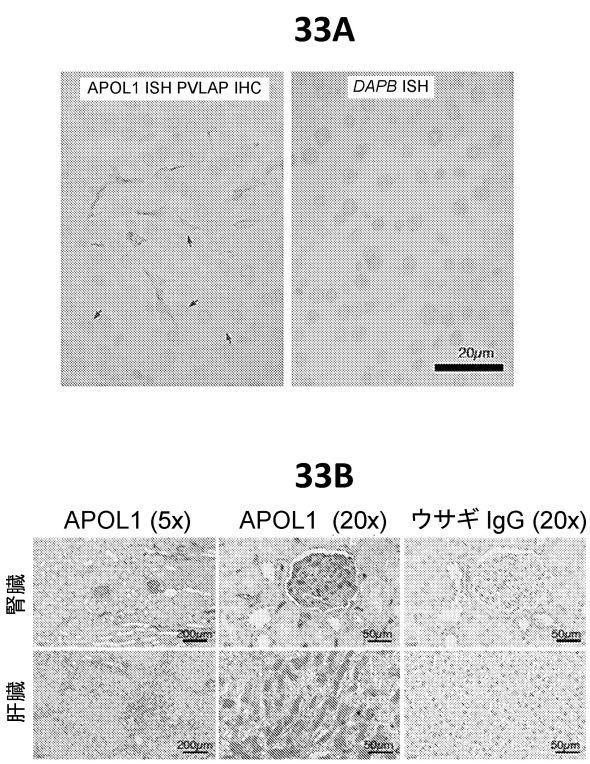
31B



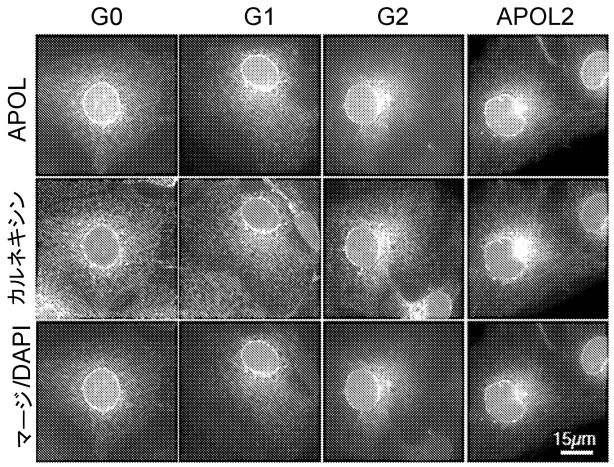
【図３２Ａ－３２Ｃ】



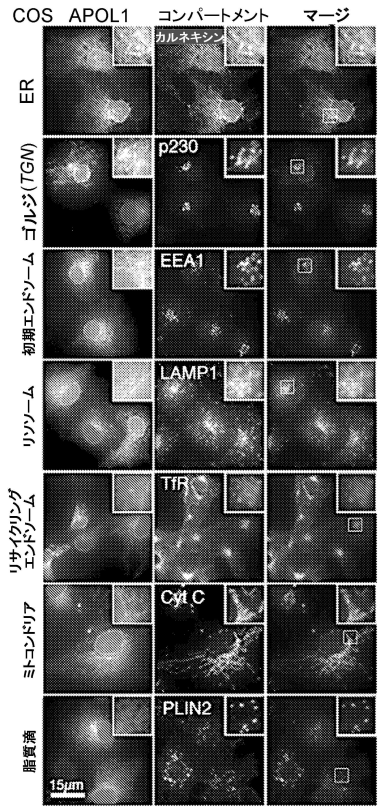
【図３３Ａ－３３Ｂ】



【図３４】

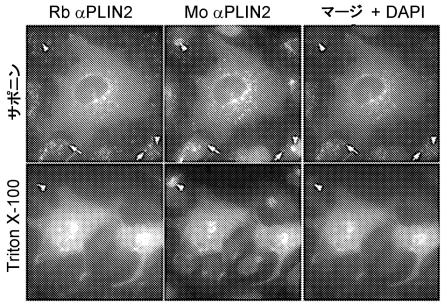


【図３５】

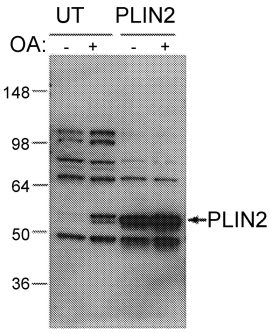


【図３６Ａ－３６Ｂ】

36A

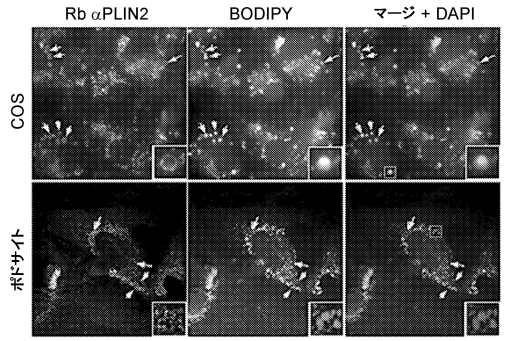


36B

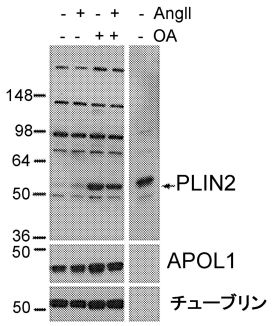


【図３６Ｃ－３６Ｄ】

36C

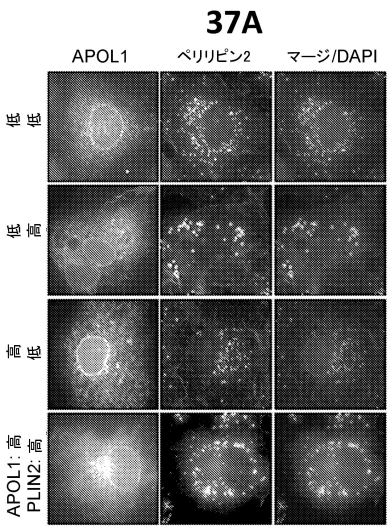


36D

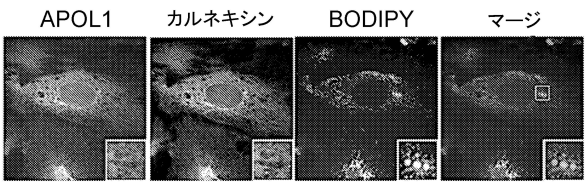


【図３７Ａ－３７Ｂ】

37A

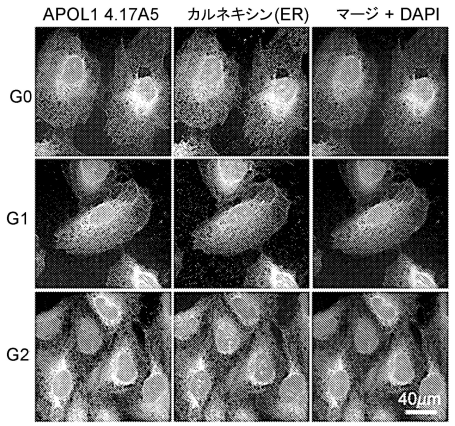


37B

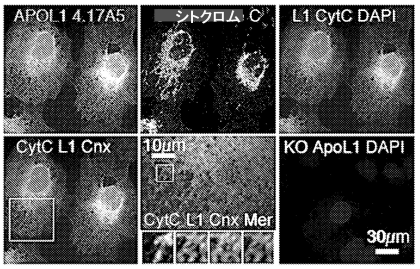


【図３８Ａ－３８Ｂ】

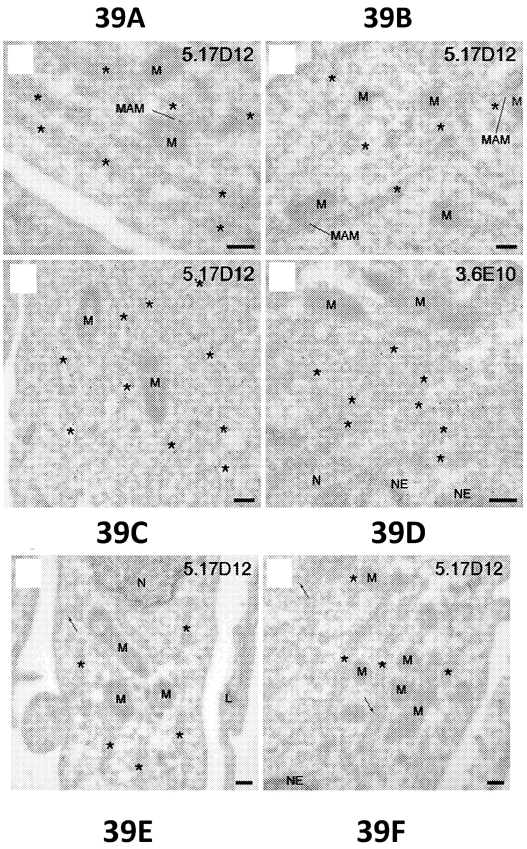
38A



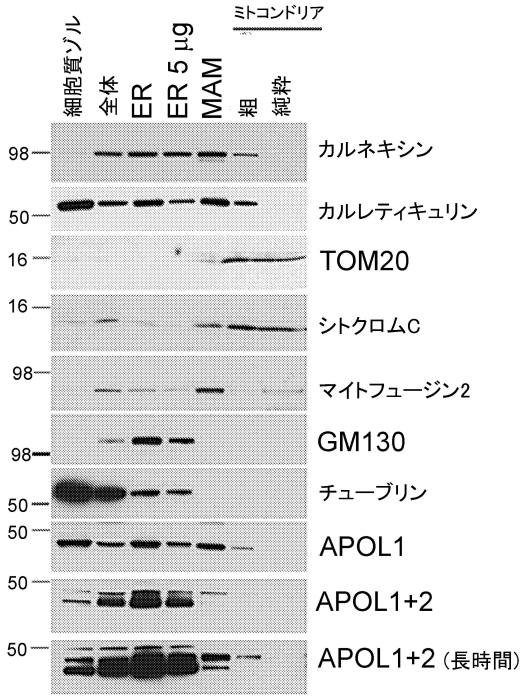
38B



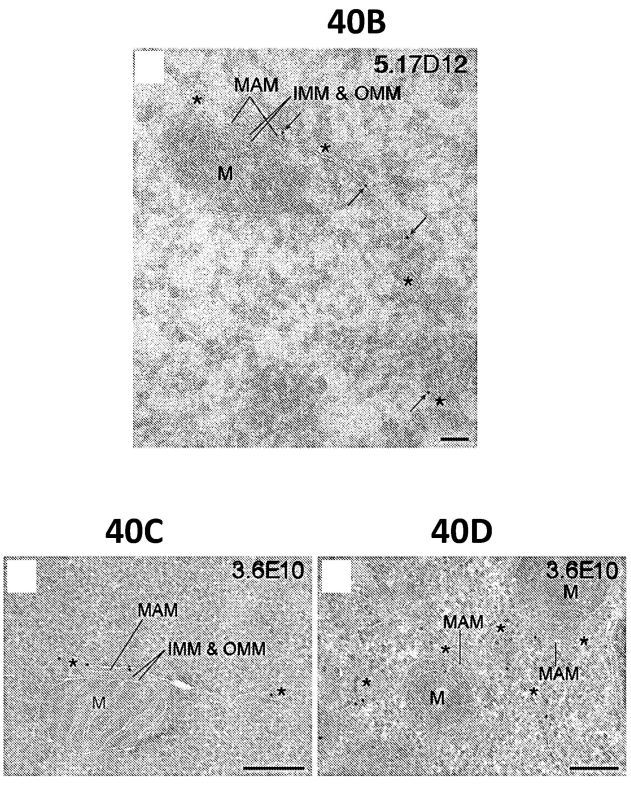
【図３９Ａ－３９Ｆ】



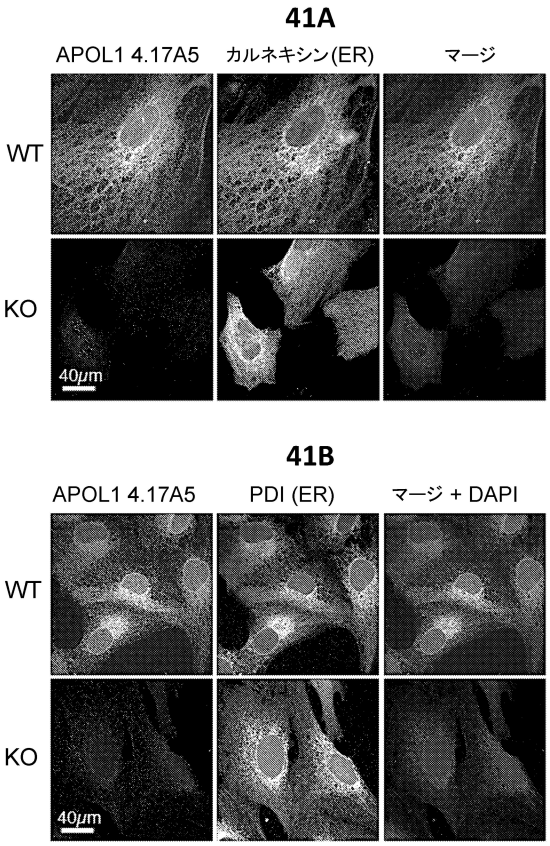
【図４０Ａ】



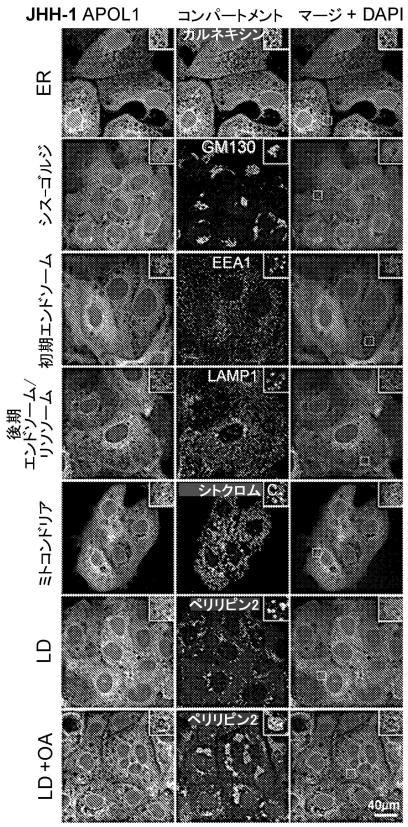
【図４０Ｂ－４０Ｄ】



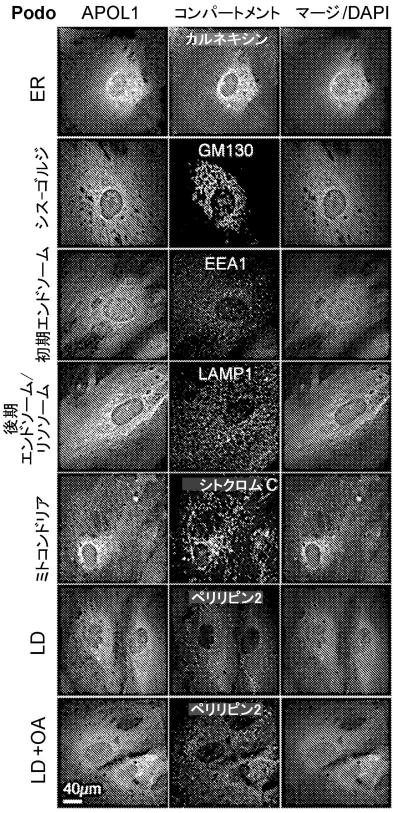
【図４１Ａ－４１Ｂ】



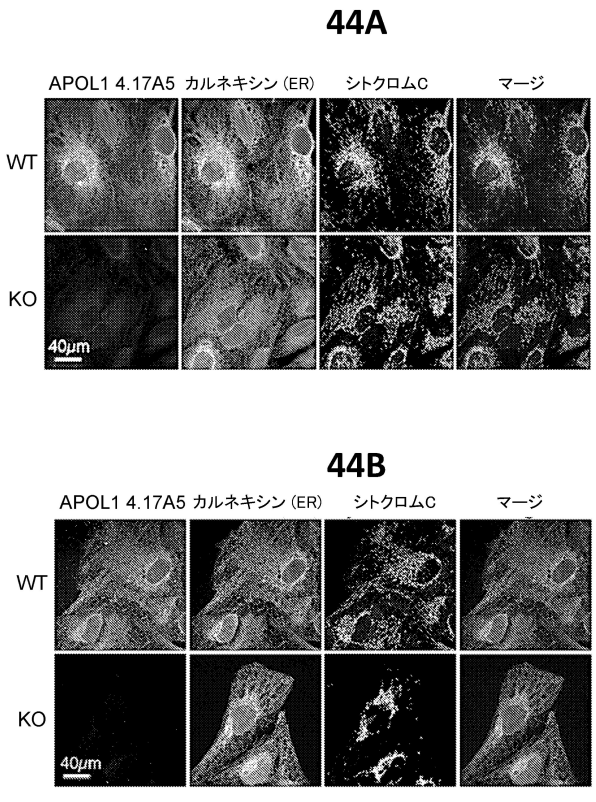
【図４２】



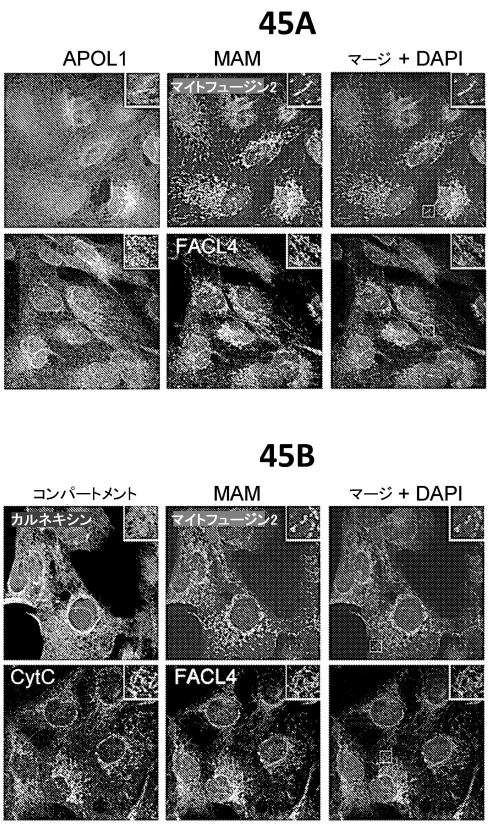
【図４３】



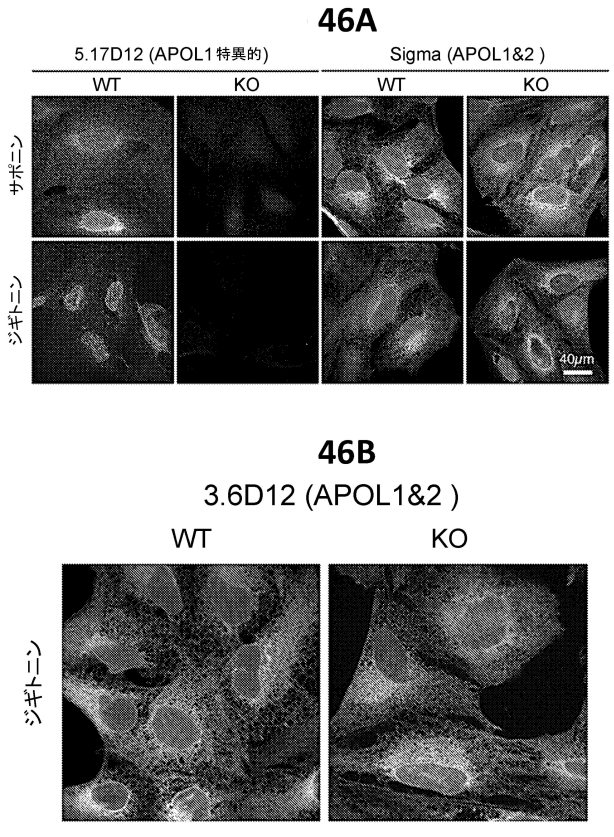
【図４４Ａ－４４Ｂ】



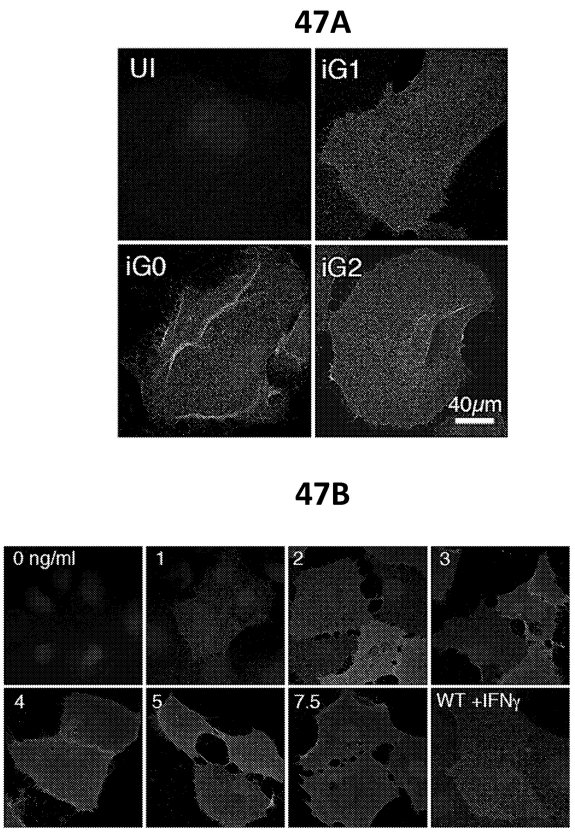
【図４５Ａ－４５Ｂ】



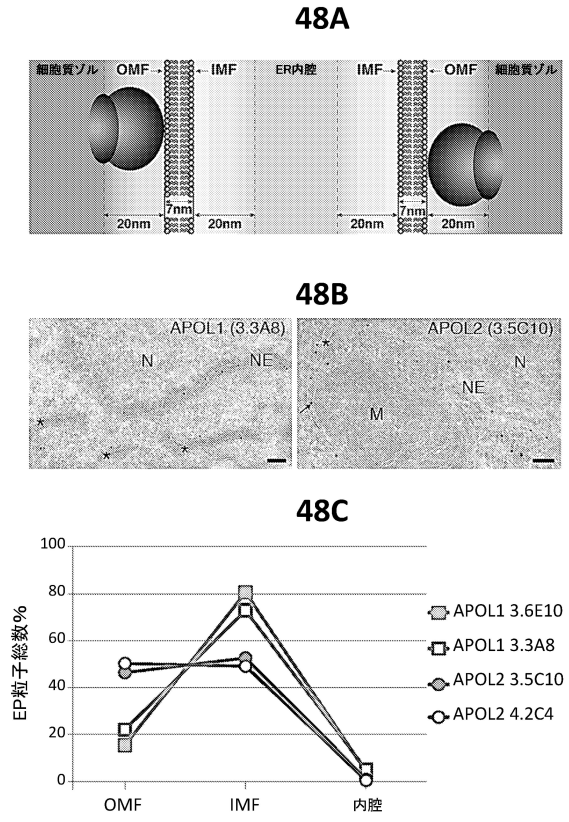
【図４６Ａ－４６Ｂ】



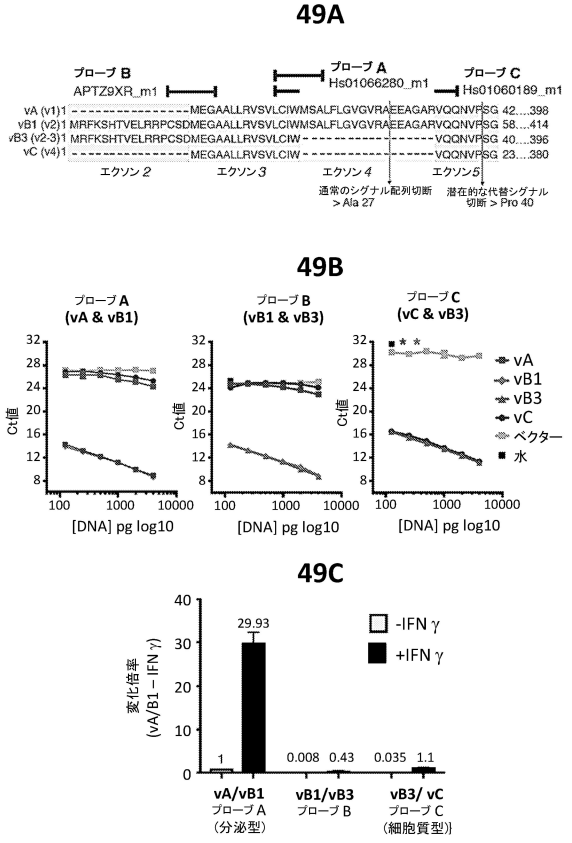
【図４７Ａ－４７Ｂ】



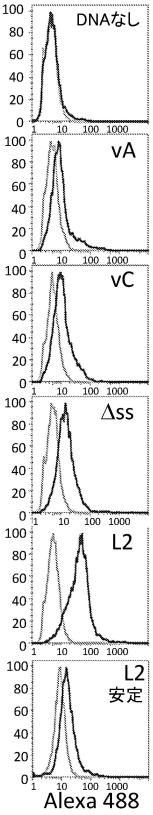
【図４８Ａ－４８Ｃ】



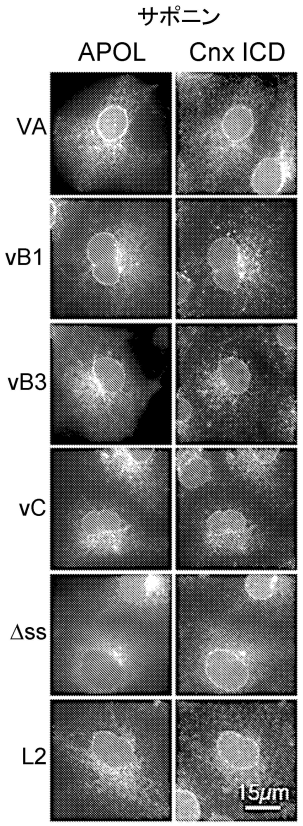
【図４９Ａ－４９Ｃ】



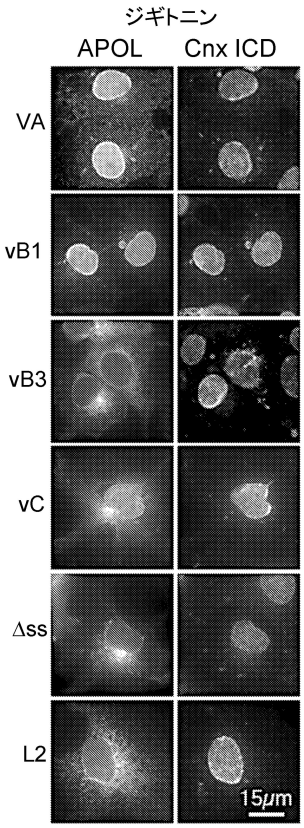
【図５０Ａ】



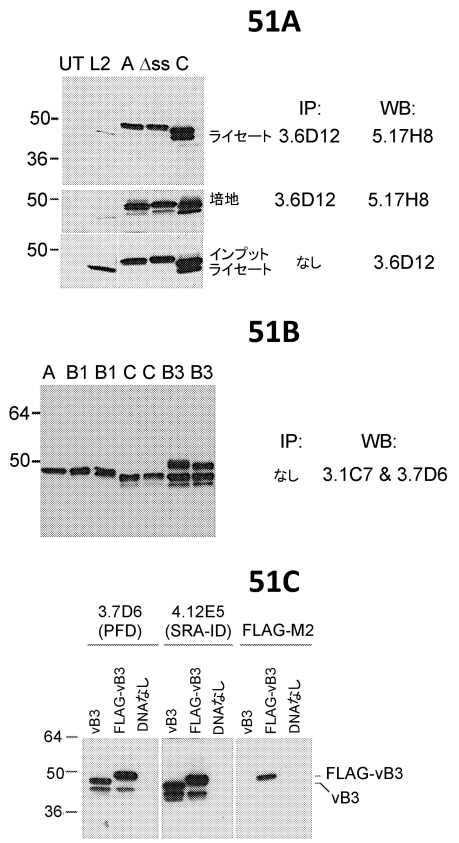
【図５０Ｂ】



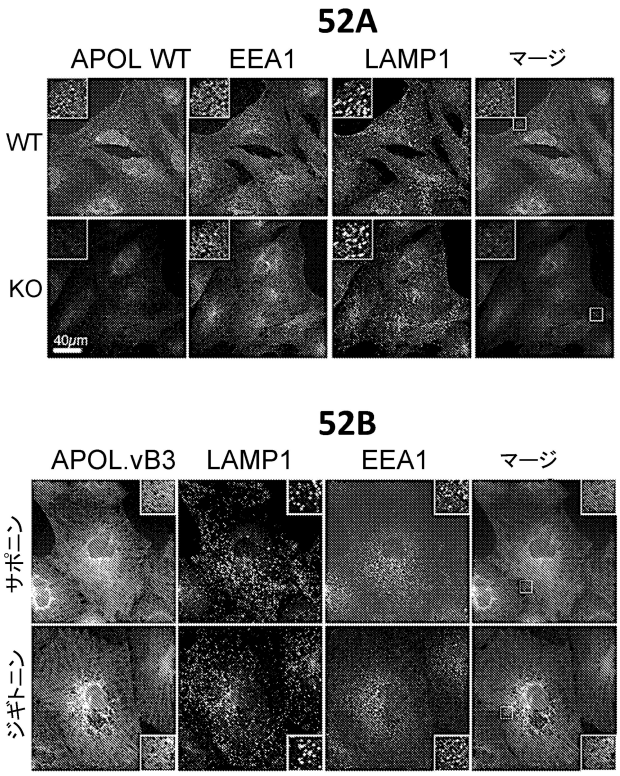
【図５０Ｃ】



【図５１Ａ－５１Ｃ】



【図５２Ａ－５２Ｂ】



【配列表】

<u>２０２３５０９３９０００００１．ａｐｐ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/066377

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P3/06 A61P13/12 C07K16/28 C07K16/18
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61P

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)
EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/077369 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 19 May 2016 (2016-05-19) examples 2,6 ----- -/--	1-7,10, 11, 17-31, 33-37

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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
2 July 2021	13/07/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Scheffzyk, Irmgard

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/066377

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WECKERLE ALLISON ET AL: "Characterization of circulating APOL1 protein complexes in African Americans", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, vol. 57, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 120-130, XP55792555, US ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/jlr.M063453 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689339/pdf/jlrM063453.pdf> the whole document -----	1-7,10, 11, 17-31, 33-37
Y	CHUN JUSTIN ET AL: "Recruitment of APOL1 kidney disease risk variants to lipid droplets attenuates cell toxicity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 116, no. 9, 7 February 2019 (2019-02-07), pages 3712-3721, XP55792526, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1820414116 Retrieved from the Internet: URL:https://www.pnas.org/content/pnas/116/9/3712.full.pdf> the whole document -----	1-7,10, 11, 17-31, 33-37
X,P	GUPTA NIDHI ET AL: "Domain-Specific Antibodies Reveal Differences in the Membrane Topologies of Apolipoprotein L1 in Serum and Podocytes", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, vol. 31, no. 9, 1 September 2020 (2020-09-01), pages 2065-2082, XP055792543, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2019080830 Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2019080830> the whole document -----	1-7,10, 11, 17-31, 33-37

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/066377

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/066377

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.:

1-7, 10, 11, 17-31, 33-37(all partially)

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2020/066377

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-7, 10, 11, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(a)

---

2. claims: 1-7, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(b)

---

3. claims: 1-7, 16-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(c)

---

4. claims: 1-7, 12, 13, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(d)

---

5. claims: 1-7, 12, 13, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(e)

---

6. claims: 1-7, 10, 11, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(f)

---

7. claims: 1-7, 10, 11, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(g)

---

8. claims: 1-7, 10, 11, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(h)

---

9. claims: 1-7, 10, 11, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(i)

---

10. claims: 1-7, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(j)

---

11. claims: 1-7, 16-31, 33-37(all partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(k)
---

12. claims: 1-7, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(l)
---

13. claims: 1-7, 10, 11, 14, 15, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(m)
---

14. claims: 1-7, 10, 11, 14, 15, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(n)
---

15. claims: 1-7, 10, 11, 14, 15, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(o)
---

16. claims: 1-7, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(p)
---

17. claims: 32(completely); 1-7, 16-31, 33-37(partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(q)
---

18. claims: 1-9, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(r)
---

19. claims: 1-9, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(s)
---

20. claims: 1-7, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(t)
---

21. claims: 1-7, 17-31, 33-37(all partially)

Antibody comprising the CDRs as defined in claim 1(u)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2020/066377

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016077369 A1	19-05-2016	CN 107105632 A	29-08-2017
		EP 3217787 A1	20-09-2017
		EP 3552488 A1	16-10-2019
		JP 2018500882 A	18-01-2018
		US 2017339928 A1	30-11-2017
		WO 2016077369 A1	19-05-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		4H045
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08		
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	47/68		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	L	
A61K	*39/44*	*(2006.01)*	A61K	39/395	C	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	39/395	Y	
			A61K	39/44		
			G01N	33/53	W	
			G01N	33/53	Y	

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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＥＦＬＯＮ

２．ＴＲＩＴＯＮ

レーン ４２１

(72)発明者 ピーターソン， アンドリュー スコット

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４１０７， サン フランシスコ， デ ハロ ストリート １１７７

Ｆターム（参考） 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C076 AA95 CC41 EE41 EE59 FF68

4C084 AA13 MA05 NA10 NA13 ZC80

4C085 AA13 AA14 AA16 AA19 AA22 AA25 AA37 BB31 BB36 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62

4H045 AA11 BA70 BA71 BA72 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26