



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107105632 A

(43)申请公布日 2017. 08. 29

(21)申请号 201580061115.4

(22)申请日 2015.11.10

(30)优先权数据

62/077,774 2014.11.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.05.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/059987 2015.11.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/077369 EN 2016.05.19

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 迪那·格兰特·威尔逊

奥迪德·福尔曼 安德鲁·彼得森

文晓晖 苏珊娜·J·斯凯尔斯

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁 程金山

(51)Int.Cl.

A01K 67/027(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

G01N 33/92(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

权利要求书2页 说明书48页

序列表23页 附图40页

(54)发明名称

肾病动物模型及其治疗剂

(57)摘要

提供了一种表达ApoL1的非人转基因动物以及一种用于制备它们的方法。还提供了一种用于鉴别能够减轻ApoL1介导的肾病的进展的药剂的方法。此外,提供了一种分离的抗体,其结合ApoL1的人变体。

1. 一种表达人ApoL1的非人转基因动物。
2. 根据权利要求1所述的非人转基因动物,其中所述非人转基因动物表达i) ApoL1的G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的G2变体 (SEQ ID NO:03), iv) ApoL1的G0变体和ApoL1的G1变体, v) ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体, vi) ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体, 或vii) ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。
3. 根据权利要求1所述的非人转基因动物,其中所述动物是啮齿动物。
4. 根据权利要求3所述的非人转基因动物,其中所述啮齿动物是小鼠。
5. 根据权利要求1所述的非人转基因动物,其中所述非人转基因动物患有肾病。
6. 根据权利要求5所述的非人转基因动物,其中所述肾病是HIV相关的肾病。
7. 根据权利要求5所述的非人转基因动物,其中所述肾病是多柔比星诱导的肾病。
8. 来自从根据权利要求1-7中的任一项所述的非人转基因动物的细胞或组织。
9. 一种确定药剂是否能够降低人ApoL1的血清浓度的方法,所述方法包括:
 - a) 测量根据权利要求1-7中的任一项所述的非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度;
 - b) 将所述药剂施用给所述非人转基因动物;和
 - c) 测量所述非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度;其中所述非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度的下降指示所述药剂能够降低人ApoL1的血清浓度。
10. 一种鉴别能够减轻肾病进展的药剂的方法,所述方法包括:
 - a) 在根据权利要求1-4中的任一项所述的非人转基因动物中诱导肾病;
 - b) 将所述药剂施用给所述非人转基因动物;和
 - c) 基于所述非人转基因动物的肾的病理学表型,评估肾病的进展;其中与未施用所述药剂的非人转基因动物相比更低发展的肾病将所述药剂鉴别为能够减轻肾病进展。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中通过施用多柔比星诱导所述肾病。
12. 根据权利要求10所述的方法,其中通过在所述非人转基因动物中表达含有人免疫缺陷病毒的一部分的转基因,诱导所述肾病。
13. 根据权利要求9-12中的任一项所述的方法,其中所述药剂结合i) ApoL1的人G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的人G0变体和ApoL1的人G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的人G0变体和ApoL1的人G2变体 (SEQ ID NO:03), 或iv) ApoL1的人G0变体、ApoL1的人G1变体和ApoL1的人G2变体。
14. 根据权利要求9-12中的任一项所述的方法,其中所述药剂是抗体。
15. 一种产生肾病的动物模型的方法,所述方法包括:在表达人ApoL1的非人转基因动物中诱导肾病。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述非人动物是根据权利要求1-4中的任一项所述的非人转基因动物。
17. 根据权利要求15所述的方法,其中通过在所述非人动物中表达含有人免疫缺陷病毒的一部分的转基因,诱导所述肾病。
18. 根据权利要求15所述的方法,其中通过施用多柔比星诱导所述肾病。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中以从15mg/kg至40mg/kg的浓度施用多柔比星。
20. 根据权利要求18所述的方法,其中以从20mg/kg至30mg/kg的浓度施用多柔比星。
21. 根据权利要求18所述的方法,其中以从24mg/kg至26mg/kg的浓度施用多柔比星。
22. 根据权利要求18所述的方法,其中以25mg/kg的浓度施用多柔比星。
23. 根据权利要求18所述的方法,其中以单次剂量施用多柔比星。
24. 根据权利要求18所述的方法,其中将多柔比星施用进尾静脉。
25. 根据权利要求18所述的方法,其中每天用皮下流体处理所述非人动物以防止脱水。
26. 一种分离的抗体,其结合ApoL1的人G0变体(SEQ ID NO:01)且结合ApoL1的人G1变体(SEQ ID NO:02)和ApoL1的人G2变体(SEQ ID NO:03)中的一个或两个。
27. 根据权利要求26所述的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。
28. 根据权利要求26所述的抗体,其中所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。
29. 根据权利要求26所述的抗体,其中所述抗体是全长IgG1抗体。
30. 根据权利要求26所述的抗体,其中所述抗体能够阻断ApoL1变体的多聚化。
31. 根据权利要求26所述的抗体,其中所述抗体能够降低人ApoL1的血清浓度。
32. 根据权利要求26所述的抗体,其中所述抗体能够减轻肾病的进展。
33. 根据权利要求32所述的抗体,其中所述肾病是ApoL1介导的肾病。
34. 根据权利要求33所述的抗体,其中所述ApoL1介导的肾病选自由以下组成的组:HIV相关的肾病、局灶性节段性肾小球硬化相关的肾病、镰状细胞肾病、与移植后同种异体移植物损失有关的肾病和狼疮肾炎相关的肾病。
35. 根据权利要求33所述的抗体,其中所述ApoL1介导的肾病是高血压有关的肾病。
36. 根据权利要求33所述的抗体,其中所述ApoL1介导的肾病是糖尿病性肾病。
37. 一种分离的核酸,其编码根据权利要求26-36中的任一项所述的抗体。
38. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求37所述的核酸。
39. 一种生产抗体的方法,所述方法包括培养根据权利要求38所述的宿主细胞从而生产所述抗体。
40. 一种药物制剂,其包含根据权利要求26-36中的任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。
41. 用作药物的根据权利要求26-36中的任一项所述的抗体。
42. 根据权利要求26-36中的任一项所述的抗体在制备药物中的用途。
43. 通过给个体施用根据权利要求26-36中的任一项所述的抗体来治疗患有肾病的个体的方法。
44. 一种减轻受试者中的肾病进展的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的根据权利要求26-36中的任一项所述的抗体。

肾病动物模型及其治疗剂

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2014年11月10日提交的美国临时申请号62/077,774的优先权权益,其通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII格式电子地提交,且特此通过引用整体并入。所述ASCII副本(创建于2015年11月10日)被命名为P32407W0_PCTSequenceListing.txt且具有52,874字节的大小。

技术领域

[0005] 本发明涉及肾病的非人转基因动物模型和用于鉴别治疗剂的方法。

背景技术

[0006] 载脂蛋白L1 (ApoL1) 是包括信号肽的6-基因家族中的唯一成员,且与载脂蛋白A1一起,归入高密度脂蛋白 (HDL) 颗粒的一个特别致密亚种 (HDL₃) 中 (Duchateau等人,1997)。ApoL1是针对非洲锥虫布鲁斯锥虫布鲁斯亚种 (*Trypanosoma brucei brucei*) (其为非洲昏睡病的成因) 的人先天性免疫应答的主要组分。锥虫的一个亚种,布鲁斯锥虫罗德西亚亚种 (*T.b.rhodesiense*) 对野生型ApoL1 (也被称作G0) 具有抗性。但是,ApoL1的两个独特等位基因 (被称作G1和G2) (它们在非洲染色体中常见,但是在欧洲染色体中不存在) 赋予对抗布鲁斯锥虫罗德西亚亚种感染的保护 (参见US 7,585,511、US 2012/0128682)。G1和G2等位基因也会增加发生肾病的风险,且变体与例如局灶性节段性肾小球硬化 (focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)、高血压有关的肾病 (Hypertension associated nephropathy, HTN) 和HIV有关的肾病 (HIV associated nephropathy, HIVAN) 相关 (参见US 2012/0195902、US 2012/0003644)。与高加索人相比,在非洲裔美国人中,FSGS更早发生,且更快4-5倍地发展成末期肾病 (ESRD) (Hsu等人,2003;Kopp等人,2011;Parsa等人,2013)。ApoL1变体与高7倍几率的“高血压属性的”ESRD (不论糖尿病状态) (Freedman等人,2010; Freedman等人,2011;Parsa等人,2013)、高17倍几率的特发性FSGS (Kopp等人,2011),和高29倍几率的HIV相关的肾病 (Kopp等人,2011) 相关。所述遗传关联是关于常见病的最强曾经报道之一,并为非裔美籍人相对于高加索人的更高肾病率提供了解释。这些疾病造成许多痛苦,并且在美国导致数百亿美元的支出。目前不可得到用于保护过滤器屏障功能和防止肾病的靶向疗法。

[0007] 因此,非常有利的和合乎需要的是,具有用于治疗这样的疾病的治疗剂。此外,适合用在将药剂鉴别为潜在治疗剂的方法中的肾病动物模型将是有价值的。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种表达ApoL1的非人转基因动物以及一种用于制备它们的方法。还提供了一种用于鉴别能够减轻ApoL1介导的肾病的进展的药剂的方法。此外,提供了一种

分离的抗体,其结合ApoL1的人变体。

[0009] 在一个方面,本发明提供了一种表达人ApoL1的非人转基因动物。在某些实施方案中,所述非人转基因动物表达i) ApoL1的G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的G2变体 (SEQ ID NO:03), iv) ApoL1的G0变体和ApoL1的G1变体, v) ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体, vi) ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体, 或vii) ApoL1的G0变体, ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。在某些实施方案中,所述动物是啮齿动物。在某些实施方案中,所述啮齿动物是小鼠。在某些实施方案中,所述非人转基因动物患有肾病。在某些实施方案中,所述肾病是HIV相关的肾病。在某些实施方案中,所述肾病是多柔比星诱导的肾病。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了从如本文中所述的非人转基因动物衍生出的细胞或组织。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了一种确定药剂是否能够降低人ApoL1的血清浓度的方法,所述方法包括以下步骤:测量非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度,将所述药剂施用给所述非人转基因动物,和测量所述非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度,其中所述非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度的下降指示,所述药剂能够降低人ApoL1的血清浓度。在某些实施方案中,所述非人转基因动物是表达人ApoL1的非人转基因动物。在某些实施方案中,所述非人转基因动物表达i) ApoL1的G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的G2变体 (SEQ ID NO:03), iv) ApoL1的G0变体和ApoL1的G1变体, v) ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体, vi) ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体, 或vii) ApoL1的G0变体, ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。在某些实施方案中,所述动物是啮齿动物。在某些实施方案中,所述啮齿动物是小鼠。在某些实施方案中,所述非人转基因动物患有肾病。在某些实施方案中,所述肾病是HIV相关的肾病。在某些实施方案中,所述肾病是多柔比星诱导的肾病。

[0012] 在另一个方面,本发明提供了一种鉴别能够减轻肾病进展的药剂的方法,所述方法包括以下步骤:在非人转基因动物中诱导肾病,将所述药剂施用给所述非人转基因动物,和基于所述非人转基因动物的肾的病理学表型评估肾病的进展(如在实施例中所述),其中与未施用所述药剂的非人转基因动物相比更低发展的肾病将所述药剂鉴别为能够减轻肾病进展。在某些实施方案中,所述非人转基因动物是表达人ApoL1的非人转基因动物。在某些实施方案中,所述非人转基因动物表达i) ApoL1的G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的G2变体 (SEQ ID NO:03), iv) ApoL1的G0变体和ApoL1的G1变体, v) ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体, vi) ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体, 或vii) ApoL1的G0变体, ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。在某些实施方案中,所述动物是啮齿动物。在某些实施方案中,所述啮齿动物是小鼠。在某些实施方案中,通过施用多柔比星诱导所述肾病。在某些实施方案中,通过在所述非人转基因动物中表达含有人免疫缺陷病毒的一部分的转基因,诱导所述肾病。在某些实施方案中,所述药剂结合i) ApoL1的人G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的人G0变体和ApoL1的人G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的人G0变体和ApoL1的人G2变体 (SEQ ID NO:03), 或iv) ApoL1的人G0变体, ApoL1的人G1变体和ApoL1的人G2变体。在某些实施方案中,所述药剂是抗体。

[0013] 在另一个方面,本发明提供了一种产生肾病的动物模型的方法,所述方法包括:在

表达人ApoL1的非人转基因动物中诱导肾病。在某些实施方案中,通过在所述非人动物中表达含有人免疫缺陷病毒的一部分的转基因,诱导所述肾病。在某些实施方案中,通过施用多柔比星诱导所述肾病。在某些实施方案中,以从15mg/kg至40mg/kg的浓度施用多柔比星。在某些实施方案中,以从20mg/kg至30mg/kg的浓度施用多柔比星。在某些实施方案中,以从24mg/kg至26mg/kg的浓度施用多柔比星。在某些实施方案中,以25mg/kg的浓度施用多柔比星。在某些实施方案中,以单次剂量施用多柔比星。在某些实施方案中,将多柔比星施用进尾静脉。在某些实施方案中,每天用皮下流体处理所述非人动物以防止脱水。在某些实施方案中,所述非人转基因动物表达i) ApoL1的G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的G2变体 (SEQ ID NO:03), iv) ApoL1的G0变体和ApoL1的G1变体, v) ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体, vi) ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体, 或vii) ApoL1的G0变体, ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。在某些实施方案中,所述动物是啮齿动物。在某些实施方案中,所述啮齿动物是小鼠。

[0014] 在另一个方面,本发明提供了一种分离的抗体,其结合ApoL1的人G0变体 (SEQ ID NO:01) 且结合ApoL1的人G1变体 (SEQ ID NO:02) 和ApoL1的人G2变体 (SEQ ID NO:03) 中的一个或两个。在某些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在某些实施方案中,所述抗体是全长IgG1抗体。在某些实施方案中,所述抗体能够阻断ApoL1变体的多聚化。在某些实施方案中,所述抗体能够降低人ApoL1的血清浓度。在某些实施方案中,所述抗体能够减轻肾病的进展。在某些实施方案中,所述肾病是ApoL1介导的肾病。在某些实施方案中,所述ApoL1介导的肾病选自:HIV相关的肾病、局灶性节段性肾小球硬化相关的肾病、镰状细胞肾病、与移植后同种异体移植物损失有关的肾病和狼疮肾炎相关的肾病。在某些实施方案中,所述ApoL1介导的肾病是高血压有关的肾病。在某些实施方案中,所述ApoL1介导的肾病是糖尿病性肾病。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了一种分离的核酸,其编码本文描述的抗体。在另一个方面,本发明提供了一种宿主细胞,其包含上述的核酸。在另一个方面,本发明提供了一种生产抗体的方法,所述方法包括培养上述宿主细胞从而生产所述抗体。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了一种药物制剂,其包含如本文中所述的抗体和药学上可接受的载体。在另一个方面,本发明提供了用作药物的如本文中所述的抗体。在另一个方面,本发明提供了本文描述的抗体在药物制备中的用途。在另一个方面,本发明提供了一种通过给个体施用本文描述的抗体来治疗患有肾病的个体的方法。在另一个方面,本发明提供了一种减轻受试者中的肾病进展的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的本文描述的抗体。

附图说明

[0017] 图1显示了ApoL1的G0变体 (图1A)、ApoL1的G1变体 (图1B) 和ApoL1的G2变体 (图1C) 的转基因的示意图。

[0018] 图2 (A-H) 表明,使用超速离心密度梯度,可以在主要脂蛋白种类的HDL3和VHDL级分中检测转基因小鼠中的血清学ApoL1的检测。缩写:VLDL是极低密度脂蛋白,IF是中间级分,HDL是高密度脂蛋白,VHDL是极高密度脂蛋白。

[0019] 图3解释了使用来自ApoL1的G0变体 (野生型) (图3A) 或ApoL1的G2变体 (图3B) 的血

清用于标准曲线,通过ELISA确定的转基因小鼠和人供体中的血清学ApoL1浓度。

[0020] 图4显示了通过定量PCR确定的肾、肝和肺中的ApoL1的表达(图4A,图4A')。使用多克隆抗体执行蛋白质印迹,所述多克隆抗体针对来自PBS灌注的小鼠的肝和肺的匀浆物上的ApoL1(图4B)。在CHO-1K细胞中使用ApoL1、ApoL2或对照瞬时转染的裂解物,使用兔多克隆抗体执行蛋白质印迹(图4C)。

[0021] 图5显示了未治疗的转基因的阴性小鼠和表达ApoL1的G0变体(野生型)和ApoL1的G2变体的小鼠中的尿蛋白值。

[0022] 图6解释了分别在第5-7天和第9-11天之前不同多柔比星剂量对尿蛋白的影响($n=3-5$ /基因型,且平均值是 $\pm$ SEM)。

[0023] 图7解释了向25mg/kg的多柔比星短暴露直到7天的影响(图7A, $n=3-6$ /用25mg/kg的多柔比星治疗的基因型,且平均值是 $\pm$ SEM,P-值表示具有相等方差的双尾t检验)。以下动物的苏木精-曙红染色的肾组织:用多柔比星治疗的转基因阴性动物(图7B),用PBS治疗的转基因阴性动物(图7C),表达ApoL1的G0变体(野生型)(图7D,图7E)或ApoL1的G2变体(图7F,图7G)的转基因小鼠。

[0024] 图8显示了21天以后多柔比星治疗的、表达ApoL1 G2变体的转基因小鼠的重量减轻($n=5$ /基因型,且平均值是 $\pm$ SEM,P-值表示具有相等方差的双尾t检验)。

[0025] 图9显示了用多柔比星治疗的、表达ApoL1的G2变体的小鼠中的蛋白尿。将白蛋白浓度归一化至肌酸酐水平($n=3-5$ /用25mg/kg的多柔比星(Adriamycin®)治疗的基因型,且平均值是 $\pm$ SEM,P-值表示具有相等方差的双尾t检验)。

[0026] 图10显示了以下小鼠中的足细胞在5000x的透射电子显微术图像:PBS治疗的小鼠(图10A),多柔比星治疗的转基因阴性小鼠(图10B),表达ApoL1的G0变体(图10C)和ApoL1的小鼠G2变体(图10D)的小鼠。进一步描述了多个足突(FP)和插入裂孔隔膜(箭头)。

[0027] 图11(A-T)显示了在分别用多柔比星或PBS治疗的转基因动物中处于不同放大率(5x、20x)和不同染色(H&E、PAS、Masson氏三色染料)的肾损伤的进展。

[0028] 图12(A-C)显示了在转基因动物中表达的ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体对多柔比星诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展的影响($n=9-10$ /基因型,平均值是 $\pm$ SEM,且p-值表示具有相等方差的双尾t检验)。

[0029] 图13(A-D)显示了在非转基因动物中通过腺病毒递送表达的ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体对多柔比星诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展的影响。相对于对照(表达触珠蛋白相关蛋白(HPR)的小鼠)显示了所述影响($n=6-8$ /基因型,平均值是 $\pm$ SEM,且p-值表示具有相等方差的双尾t检验,头盖骨(skull)和十字(cross bone)符号指示在研究结束之前死亡的动物)。

[0030] 图14显示了APOL1构建体的示意图。PFD:形成孔的结构域,MAD:膜定位的结构域,SRA-ID:血清抗性相关蛋白-相互作用结构域,GPI:糖基磷脂酰肌醇锚,gD:单纯疱疹病毒糖蛋白D锚。

[0031] 图15描绘了在表达ApoL1的G0变体(黑色)、ApoL1的G1变体(灰色)或ApoL1的G2变体(带阴影线)的CHO细胞上通过FACS分析的抗-ApoL1抗体的交叉反应性。在1 μ g/ml浓度使用抗体。作为阳性对照,使用商购可得的多克隆抗体,其非特异性地结合载脂蛋白L家族的超过一种成员。在y轴上绘制平均荧光强度(MFI)。

[0032] 图16显示了溶锥虫活性的体外阻断的结果。在有1%正常人血清(NHS)存在下将在小鼠中制备的单克隆抗-APOL1抗体加给布鲁斯锥虫布鲁斯亚种20小时。以荧光活性(由于基于刃天青的染料(阿拉玛蓝)的存在)的方式测量活锥虫的数目。将阻断活性归一化至无抗体对照并绘制为活锥虫的百分比。

具体实施方式

[0033] 除非另外定义,否则在本文中使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。Singleton等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology第2版,J.Wiley&Sons (New York,N.Y.1994) 和March,Advanced Organic Chemistry Reactions,Mechanisms and Structure第4版,John Wiley&Sons (New York,N.Y.1992) 给本领域技术人员提供了在本申请中使用的许多术语的一般指导。

[0034] I. 定义

[0035] 为了解释本说明书的目的,以下定义将适用且在适当时,以单数形式使用的术语也包括复数形式,反之亦然。在下述的任何定义与通过引用并入本文的任何文件冲突的情况下,以下述的任何定义为准。

[0036] 在本说明书和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。因而,例如,对“一种蛋白”或一种“抗体”的提及分别包括多种蛋白或抗体;对“一个细胞”的提及包括多个细胞等。

[0037] 术语“ApoL1”或“人ApoL1”表示人载脂蛋白L1,即作为包括信号肽的6-基因家族中的唯一成员的多肽。在人群中存在三种不同变体,即ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。ApoL1的G0变体表示具有SEQ ID NO:01的氨基酸序列的野生型人ApoL1蛋白(在本文中也称作“野生型”)。ApoL1的G1变体表示具有SEQ ID NO:02的氨基酸序列的、具有两个氨基酸置换(S342G,I384M)的人ApoL1蛋白的变体。ApoL1的G2变体表示具有SEQ ID NO:03的氨基酸序列的、具有两个氨基酸缺失(N388和Y389)的人ApoL1蛋白的变体。

[0038] 术语“检测”在本文中以最宽的含义用于包括靶分子的定性和/或定量测量,即检测包括仅仅鉴别靶分子在样品中的存在以及确定样品中的靶分子的水平。

[0039] 本文中使用的术语“多柔比星”表示具有CAS编号23214-92-8的化学化合物。多柔比星在本文中也称作Adriamycin®或ADR。

[0040] 本文中使用的术语“肾病”表示其中发生肾损伤的生理状况,所述肾损伤破坏它的适当地调节血液和尿中的溶质浓度的能力。这可以通过许多方法(通常包括血清肌酐浓度、尿蛋白浓度、尿蛋白与肌酐比率)或通过使用示踪化合物(诸如邻苯二甲酸酯)来评估。肾病经常归类为明显不同的临床状况,例如局灶性节段性肾小球硬化、HIV感染、镰状细胞贫血、移植后同种异体移植物损失、高血压、狼疮肾炎、糖尿病和非糖尿病慢性肾脏疾病。肾病还可以在组织学上归类为以选自以下一种或多种的病理学变化为特征:肾小球大小、小叶或粘附力、簇的纤维化、Bowman氏胶囊的纤维化、膨胀、毛细血管变窄、基膜增厚、在Bowman氏空间中的蛋白、增加的细胞构成(肾小球系膜的或内皮的)、白细胞浸润、毛细血管栓、小管-萎缩、坏死、空泡和透明微滴变化、基膜增厚、膨胀、腔中的炎症细胞和脱落物(cast)、间质组织-纤维化、水肿、急性和慢性白细胞浸润、微动脉-纤维化、血栓形成、透明变化和变窄。

[0041] 本文中使用的术语“ApoL1介导的肾病”表示如上定义的肾病,其中Apo L1的G0变体、Apo L1的G1变体和Apo L1的G2变体中的一种或多种的存在会增加肾病的进展。

[0042] 术语“标记”或“可检测标记”表示可以与要检测或定量的物质(例如,抗体)连接的任何化学基团或部分。通常,标记是适合用于物质的灵敏检测或定量的可检测标记。可检测标记的例子包括、但不限于:发光标记,例如,荧光的、磷光的、化学发光的、生物发光的和电化学发光的标记,放射性标记,酶,颗粒,磁性物质,电活性物质等。可替换地,可检测标记可以通过参与特异性结合反应发出它存在的信号。这样的标记的例子包括半抗原、抗体、生物素、抗生蛋白链菌素、his-标签、次氨基三乙酸、谷胱甘肽S-转移酶、谷胱甘肽等。

[0043] 术语“多肽”和“蛋白”在本文中互换地用于表示任意长度的氨基酸的聚合物。聚合物可以是直链的或支链的,它可以包含经修饰的氨基酸,且它可以被非氨基酸中断。该术语也包括已经天然地或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任意其它操作或修饰,诸如与标记组分缀合。在该定义内还包括,例如,含有一个或多个氨基酸类似物(包括、例如,非天然的氨基酸等)以及本领域已知的其它修饰的多肽。本文中使用的术语“多肽”和“蛋白”具体地包括抗体。

[0044] “纯化的”多肽(例如,抗体或免疫粘附素)是指,所述多肽已经增加纯度,使得它的存在形式比它在它的天然环境中或/或在实验室条件下最初合成和/或扩增时更纯。纯度是一个相对术语,且不一定是指绝对纯度。

[0045] “结合”目标抗原的抗体是这样的抗体:其以足够的亲和力结合抗原,使得所述抗体可用作治疗剂或测定试剂,例如,用作捕获抗体或用作检测抗体。通常,这样的抗体不会与其它抗原显著地交叉反应。术语“结合X的抗体”和“抗-X抗体”应当具有相同的含义(其中X是目标抗原(例如蛋白)的名称)。结果,术语“结合ApoL1的抗体”可以在本文中“抗-ApoL1抗体”可互换地使用。

[0046] 就多肽与靶分子的结合而言,术语“特异性结合”或“特异性地结合”特定多肽或特定多肽靶标上的表位或对其“具有特异性”是指,可测量地不同于非特异性相互作用的结合。可以测量特异性结合,例如,通过确定靶分子的结合相对于对照分子的结合,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。

[0047] “亲和力”表示分子(例如,抗体)的单个结合位点和它的结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指出,否则本文中使用的“结合亲和力”表示反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对它的配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(Kd)表示。通过本领域已知的常见方法(包括本文描述的那些),可以测量亲和力。

[0048] 本文中的术语“抗体”以最宽的含义使用,且包括多种抗体结构,包括、但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的抗原结合活性。

[0049] 抗体是具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子,都基于免疫球蛋白折叠。例如,IgG抗体具有两个“重”链和两个“轻”链,它们通过二硫键键合以形成功能性抗体。每个重链和轻链自身包含“恒定的”(C)和“可变的”(V)区域。V区域决定抗体的抗原结合特异性,且C区域在与免疫效应物的非抗原特异性相互作用中提供结构支持和功能。抗体或抗体的抗原结合片段的抗原结合特异性是抗体的特异性地结合特定抗原的能力。

[0050] 抗体的抗原结合特异性取决于可变或V区域的结构特征。术语“可变”表示这样的事实：可变结构域的某些部分在抗体之间存在广泛的序列差异，并被用在每种特定抗体对它的特定抗原的结合和特异性中。但是，变异性并不均匀地分布在抗体的可变结构域中。它集中在轻链和重链可变结构域内的被称作高变区的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分被称作框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR，主要采用 β -折叠构型，通过三个高变区连接，这形成 β -折叠结构的环连接，且在某些情况下，形成 β -折叠结构的组成部分。在每个链中的高变区由FR保持紧密靠在一起，且与来自其它链的高变区一起，促进抗体的抗原结合位点的形成 (参见Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。所述恒定结构域直接参与抗体与抗原的结合，但是表现出多种效应子功能，诸如所述抗体在抗体依赖性的细胞的细胞毒性 (ADCC) 中的参与。

[0051] 术语“高变区”当在本文中使用时表示负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。所述高变区可以包含来自“互补性决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如，在 V_L 中约残基24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 周围，和在 V_H 中约31-35B (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3) 周围 (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基 (例如在 V_L 中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3)，和在 V_H 中的残基26-32 (H1)、52A-55 (H2) 和96-101 (H3) (Chothia和Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。

[0052] “框架”或“FR”残基是除了在本文中定义的高变区残基以外的那些可变结构域残基。

[0053] “抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选地包含其抗原结合区域。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段；双体；串联的双体 (taDb)、直链抗体 (例如，美国专利号5,641,870，实施例2；Zapata等人, Protein Eng. 8 (10):1057-1062 (1995))；一臂抗体，单个可变结构域抗体，微体，单链抗体分子；从抗体片段形成的多特异性抗体 (例如，包括、但不限于，Db-Fc、taDb-Fc、taDb-CH3、(scFv) 4-Fc、二-scFv、双-scFv或串联的 (双、三)-scFv)；和双特异性的T-细胞衔接物 (BiTE)。

[0054] 抗体的木瓜蛋白酶消化会产生两个相同的抗原结合片段 (被称作“Fab”片段，各自具有单个抗原结合位点) 和一个残余的“Fc”片段 (其名称反映了它的容易结晶的能力)。胃蛋白酶处理会产生具有两个抗原结合位点且仍然能够交联抗原的 $F(ab')_2$ 片段。

[0055] “Fv”是含有完全抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密地非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。正是在该构型，每个可变结构域的三个高变区相互作用以限定 V_H - V_L 二聚体的表面上的抗原结合位点。共同地，所述六个高变区给抗体赋予抗原结合特异性。但是，甚至单个可变结构域 (或Fv的一半，其仅包含三个对抗原特异性的高变区) 具有识别和结合抗原的能力，尽管在比整个结合位点更低的亲和力。

[0056] 所述Fab片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域 (CH1)。Fab'片段与Fab片段的差别在于几个残基在重链CH1结构域的羧基端处的添加，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在本文中为Fab'命名，其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有至少一个游离巯基。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初生产为Fab'片段对，所述Fab'片段之间具有较

链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0057] 基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”分配至两个明显不同的种类(被称作kappa (κ) 和lambda (λ))之一。

[0058] 取决于它们的重链的恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体分配至不同的种类。存在五大类完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且这些中的几个可以进一步细分成亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。与抗体的不同种类对应的重链恒定结构域分别被称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0059] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。在某些实施方案中,所述Fv多肽还包含在V_H和V_L结构域之间的多肽接头,其使scFv能够形成对于抗原结合而言期望的结构。关于scFv的综述,参见Plückthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, 第269-315页(1994)。

[0060] 术语“双体”表示具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含在相同多肽链(V_H-V_L)中与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)。通过使用因为太短而不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对并建立两个抗原结合位点。双体更完整地描述在,例如,EP 404,097;WO 93/11161;和 Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)中。

[0061] 术语“多特异性抗体”以最宽的含义使用,且具体地涵盖具有多肽特异性的抗体。这样的多特异性抗体包括、但不限于:包含重链可变结构域(V_H)和轻链可变结构域(V_L)的抗体,其中V_HV_L单元具有多肽特异性;具有两个或更多个V_L和V_H结构域的抗体,其中每个V_HV_L单元结合不同的表位;具有两个或更多个单个可变结构域的抗体,其中每个单个可变结构域结合不同的表位;全长抗体;抗体片段诸如Fab、Fv、dsFv、scFv;双体,双特异性的双体,三体,三功能性抗体,已经共价地或非共价地连接的抗体片段。“多肽特异性”表示特异性地结合相同或不同靶标上的两个或更多个不同表位的能力。“单特异性的”表示仅结合一个表位的能力。根据一个实施方案,所述多特异性抗体是以5 μ M至0.001pM、3 μ M至0.001pM、1 μ M至0.001pM、0.5 μ M至0.001pM、或0.1 μ M至0.001pM的亲和力结合每种表位的IgG抗体。

[0062] 表述“单结构域抗体”(sdAb)或“单个可变结构域(SVD)抗体”通常表示其中单个可变结构域(V_H或V_L)可以赋予抗原结合的抗体。换言之,所述单个可变结构域不需要与另一个可变结构域相互作用才能识别靶抗原。单结构域抗体的例子包括从骆驼科(美洲驼和骆驼)和软骨鱼(例如,铰口鲨)衍生出的那些以及通过重组方法从人类和小鼠抗体衍生出的那些(*Nature* (1989) 341:544-546; *Dev Comp Immunol* (2006) 30:43-56; *Trend Biochem Sci* (2001) 26:230-235; *Trends Biotechnol* (2003):21:484-490;WO 2005/035572;WO 03/035694; *Febs Lett* (1994) 339:285-290;WO00/29004;WO 02/051870)。

[0063] 本文中使用的术语“单克隆抗体”表示从基本上均匀的抗体群体得到的抗体,即,构成所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,但是在单克隆抗体的生产过程中可能产生的可能变体除外,这样的变体通常以微量存在。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相比,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性以外,所述单克隆抗体是有利的,因为它们未被其它免疫球蛋白污染。修饰词“单克隆的”指示所述抗体得自基本上同源的抗体群体的特征,并且不应解释为需要通过任

何特定方法生产所述抗体。例如,要根据本文提供的方法使用的单克隆抗体可以通过 Kohler 等人, *Nature* 256:495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法制备,或可以通过重组 DNA 方法制备(参见,例如,美国专利号 4,816,567)。使用例如在 Clackson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991) 和 Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 中描述的技术,也可以从噬菌体抗体文库分离“单克隆抗体”。

[0064] 本文中的单克隆抗体特异性地包括“嵌合的”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而所述链的其余部分与源自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,以及这样的抗体的片段,只要它们表现出期望的生物活性(美国专利号 4,816,567; Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。本文中的目标嵌合抗体包括“灵长类源化的”抗体,其包含从非人灵长类动物(例如旧大陆猴,诸如狒狒、恒河猴或食蟹猴)衍生出的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列(美国专利号 5,693,780)。

[0065] 为了本文中的目的,“完整抗体”是包含重和轻可变结构域以及 Fc 区的抗体。所述恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。优选地,所述完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0066] “天然抗体”经常是约 150,000 道尔顿的杂四聚体糖蛋白,由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成。每个轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每个重链和轻链还具有规则分布的链内二硫键。每个重链具有在一端的可变结构域(V_H),继之以许多恒定结构域。每个轻链具有在一端的可变结构域(V_L)和在它的另一端的恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一个恒定结构域对齐,且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基形成轻链和重链可变结构域之间的界面。

[0067] “裸抗体”是没有与异源分子(诸如检测部分或标记)缀合的抗体(如本文中定义)。

[0068] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”互换使用,且表示其中已经引入了外源核酸的细胞,包括这样的细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,其包括原代转化的细胞和由其来源的后代(不考虑传代数)。后代在核酸内容物方面可以与亲本细胞不完全相同,但是可以含有突变。针对最初转化的细胞筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变体后代被包括在本文中。

[0069] “分离的”核酸表示已经与它的天然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中包含的核酸分子,但是所述核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0070] 术语“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的参与所述抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为 V_H 和 V_L)通常具有类似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见,例如,Kindt 等人, *Kuby Immunology*, 第 6 版, W. H. Freeman and Co., 第 91 页 (2007))。单个 V_H 或 V_L 结构域可能足以赋予抗原-结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域分离,以分别筛选互补 V_L 或 V_H 结构域的文库。参见,例如,Portolano 等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clackson 等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0071] 本文中使用的术语“载体”表示能够扩增与其连接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制的核酸结构的载体以及整合进它已经引入其中的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。这样的载体在本文被称为“表达载体”。

[0072] 本文中对“约”值或参数的提及包括(和描述)指向该值或参数本身的变化。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0073] II. 动物模型、组合物和方法

[0074] A. 肾病的动物模型

[0075] 本文提供了肾病的动物模型。由于ApoL1仅存在于人类、非洲绿猴和大猩猩中,我们建立了基于转基因动物的动物模型。建立后,所述非人动物仅表达G0、G1或G2中的任一种。但是,通过使所述动物杂交,可能制备表达三种变体的组合的转基因动物。因而,在一个方面,在本文中提供了表达人ApoL1的非人转基因动物。在某些实施方案中,所述非人转基因动物表达i) ApoL1的G0变体(SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的G1变体(SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的G2变体(SEQ ID NO:03), iv) ApoL1的G0变体和ApoL1的G1变体, v) ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体, vi) ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体, 或vii) ApoL1的G0变体, ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。在某些实施方案中,所述非人转基因动物是啮齿动物。在某些实施方案中,所述非人转基因动物选自小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、狗、猫、猪、母牛和山羊。在某些实施方案中,所述非人转基因动物是小鼠。为了提供肾病的模型,所述动物表达ApoL1,且在非人转基因动物中诱导肾病。因此,在某些实施方案中,所述人转基因动物患有肾病。存在不同的在非人转基因动物中诱导肾病的方法。一种可能性是,除了ApoL1以外,还在非人转基因动物中表达含有人免疫缺陷病毒(HIV)的一部分的转基因。表达HIV转基因会导致急性肾病的发展。在一个特定实施方案中,所述肾病因此是HIV相关的肾病。在非人转基因动物中诱导肾病的另一种可能性是通过化学暴露。多柔比星经常在人类中用作化学疗法中的药物。但是,还已知所述物质会在动物中诱导肾病。因此,在一个特定实施方案中,本文描述的肾病是多柔比星诱导的肾病。

[0076] 在另一个方面,本说明书是指从上述的非人转基因动物衍生出的细胞或组织。

[0077] 如本文证实的,循环ApoL1(包括ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体)可以介导肾病的进展。因此,减轻ApoL1介导的肾病的进展的一种可能性是除去循环ApoL1。通过抗体与ApoL1的结合,可以增加ApoL1的清除,从而导致降低的ApoL1的血清浓度,并从而导致减弱的对ApoL1介导的肾病的进展的影响。因而,在一个方面,提供了确定药剂是否能够降低人ApoL1的血清浓度的方法,所述方法包括下述步骤:测量本文描述的非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度,将所述药剂施用给所述非人转基因动物,和测量所述非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度,其中所述非人转基因动物中的人ApoL1的血清浓度的下降指示,所述药剂能够降低人ApoL1的血清浓度。

[0078] 可替换地,药剂(诸如抗体)与ApoL1的结合可以导致ApoL1的灭活,即抗体-ApoL1-复合物不可具有与单独的ApoL1相比相同的生理效应,由此减弱对ApoL1介导的肾病的进展的影响。另一种可能性是,结合的抗体可以阻止ApoL1的多聚化并减弱对ApoL1介导的肾病的进展的影响。

[0079] 因此,通过基于所述非人转基因动物的肾的病理学表型评估药剂对ApoL1介导的

肾病的进展的影响,鉴别能够减轻ApoL1介导的肾病的进展的药剂将是有利的。因而,在另一个方面,提供了一种鉴别能够减轻ApoL1介导的肾病的进展的药剂的方法,所述方法包括以下步骤:在如本文公开的非人转基因动物中诱导肾病,将所述药剂施用给所述非人转基因动物,和基于所述非人转基因动物的肾的病理学表型评估ApoL1介导的肾病的进展,其中与未施用所述药剂的非人转基因动物相比更低发展的ApoL1介导的肾病将所述药剂鉴别为能够减轻ApoL1介导的肾病的进展。如已提及的,存在不同的在非人转基因动物中建立肾病的方法。在一个实施方案中,通过施用多柔比星来诱导肾病。在另一个实施方案中,通过在所述非人转基因动物中表达含有人免疫缺陷病毒的一部分的转基因来诱导肾病。药剂的减轻ApoL1介导的肾病的进展的能力可以是基于它与人ApoL1的一种或多种变体的结合。在一个特定实施方案中,所述药剂结合i) ApoL1的人G0变体 (SEQ ID NO:01), ii) ApoL1的人G0变体和ApoL1的人G1变体 (SEQ ID NO:02), iii) ApoL1的人G0变体和ApoL1的人G2变体 (SEQ ID NO:03), 或iv) ApoL1的人G0变体, ApoL1的人G1变体和ApoL1的人G2变体。在一个特定实施方案中,所述药剂是抗体。在一个特定实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在一个特定实施方案中,所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一个特定实施方案中,所述抗体是全长IgG1抗体。

[0080] 此外,本文提供了一种用于产生肾病的动物模型的方法。因而,在一个方面,提供了一种产生肾病的动物模型的方法,所述方法包括:在表达人ApoL1的非人转基因动物中诱导肾病。在一个特定实施方案中,所述非人动物是如上文中所述的非人转基因动物。在一个特定实施方案中,通过在所述非人动物中表达含有人免疫缺陷病毒的一部分的转基因来诱导肾病。在一个特定实施方案中,通过施用多柔比星来诱导肾病。在一个特定实施方案中,以从10mg/kg至50mg/kg的浓度施用多柔比星。在一个特定实施方案中,以从15mg/kg至40mg/kg的浓度施用多柔比星。在一个特定实施方案中,以从20mg/kg至30mg/kg的浓度施用多柔比星。在一个特定实施方案中,以从24mg/kg至26mg/kg的浓度施用多柔比星。在一个特定实施方案中,以至少25mg/kg的浓度施用多柔比星。在一个特定实施方案中,以25mg/kg的浓度施用多柔比星。测量mg/kg表示施用的多柔比星的质量(mg)/动物的体重的质量(kg)。在一个特定实施方案中,以多次剂量施用多柔比星。在一个特定实施方案中,以单次剂量施用多柔比星。在一个特定实施方案中,静脉内施用多柔比星。在一个特定实施方案中,将多柔比星施用进尾静脉。

[0081] 用多柔比星处理动物会导致脱水。因而,在一个特定实施方案中,每天用皮下流体处理非人动物以防止脱水。在一个特定实施方案中,以0.5-5ml的体积施用皮下流体。在一个特定实施方案中,以1-4ml的体积施用皮下流体。在一个特定实施方案中,以1.5-3ml的体积施用皮下流体。在一个特定实施方案中,以2ml的体积施用皮下流体。在一个特定实施方案中,所述皮下流体是含乳酸盐的林格氏溶液。

[0082] B. 示例性的抗-ApoL1抗体

[0083] 为了减轻ApoL1介导的肾病的进展,制备了结合ApoL1的抗体。因而,在一个方面,提供了一种分离的抗体,其结合ApoL1的人G0变体 (SEQ ID NO:01) 且结合ApoL1的人G1变体 (SEQ ID NO:02) 和ApoL1的人G2变体 (SEQ ID NO:03) 中的一个或两个。在一个特定实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。在一个特定实施方案中,所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一个特定实施方案中,所述抗体是全长IgG1抗体。在一个特定实施方案中,所

述抗体能够阻断ApoL1变体的多聚化。在一个特定实施方案中,所述抗体能够降低人ApoL1的血清浓度。在一个特定实施方案中,所述抗体能够减轻肾病的进展。在一个特定实施方案中,所述肾病是ApoL1介导的肾病。在一个特定实施方案中,所述ApoL1介导的肾病选自:HIV相关的肾病、局灶性节段性肾小球硬化相关的肾病、镰状细胞肾病、与移植后同种异体移植物损失有关的肾病和狼疮肾炎相关的肾病。在某些实施方案中,所述ApoL1介导的肾病是高血压有关的肾病。在某些实施方案中,所述ApoL1介导的肾病是糖尿病性肾病。

[0084] 此外,在一个方面,提供了一种分离的核酸,其编码如本文中所述的抗体。在另一个方面,提供了一种宿主细胞,其包含如上所述的核酸。在另一个方面,提供了一种生产抗体的方法,所述方法包括培养上述的宿主细胞从而生产所述抗体。此外,在一个方面,提供了药物制剂,其包含如本文中所述的抗体和药学上可接受的载体。此外,在一个方面,提供了用作药物的如本文中所述的抗体。此外,在一个方面,提供了如本文中所述的抗体在药物制备中的用途。此外,在一个方面,提供了一种通过给个体施用本文描述的抗体来治疗患有肾病的个体的方法。此外,在一个方面,提供了一种减轻受试者中的肾病进展的方法,所述方法包括给所述受试者施用有效量的本文描述的抗体。

[0085] 在本发明的另一个方面,根据以上实施方案中的任一个的抗-ApoL1抗体是单克隆抗体,包括嵌合的、人源化的或人的抗体。在一个实施方案中,抗-ApoL1抗体是抗体片段,例如,Fv、Fab、Fab'、scFv、双体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,所述抗体是全长抗体,例如,完整的IgG1抗体或如本文中定义的其它抗体类型或同种型。

[0086] 在另一个方面,根据以上实施方案中的任一个的抗-ApoL1抗体可以包含在下面部分1-7中所述的任意特征(单一或组合):

[0087] 1. 抗体亲和力

[0088] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如从 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如,从 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0089] 在一个实施方案中,通过放射性地标记的抗原结合测定(RIA)测量Kd。在一个实施方案中,用目标抗体的Fab形式和它的抗原执行RIA。例如,如下测量Fab对抗原的溶液结合亲和力:在有未标记的抗原的滴定系列存在下使Fab与最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡,然后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定的条件,将MICROTITER®多孔平板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,并随后用在PBS中的2% (w/v) 牛血清白蛋白在室温(大约23°C)封闭2-5小时。在非吸附平板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与目标Fab的系列稀释物混合(例如,与抗-VEGF抗体Fab-12的评估一致,见Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997))。然后将目标Fab温育过夜;但是,所述温育可以持续较长时段(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获平板用于在室温温育(例如,1小时)。然后将溶液除去,并将平板用0.1%聚山梨酯20(TWEEN-20®)在PBS中的溶液洗涤8次。当平板已经干燥时,加入150 μl /孔的闪烁剂(MICROSCINT-20™;Packard),并将平板在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用在竞争性结合测定中。

[0090] 根据另一个实施方案,使用BIACORE[®]表面等离子体共振测定测量K_d。例如,使用BIACORE[®]-2000或BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 的测定在25℃用固定化的抗原CM5芯片以约10个应答单位(RU)进行。在一个实施方案中,根据供应商的说明书,将羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)用N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化。将抗原用10mM醋酸钠(pH 4.8)稀释至5μg/ml(约0.2μM),随后以5μl/分钟的流速注射以实现偶联的蛋白的大约10个应答单位(RU)。注射抗原以后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量,将在具有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20[™])表面活性剂(PBST)的PBS(PBST)中的Fab的两倍系列稀释物(0.78nM至500nM)在25℃以大约25μL/min的流速注射。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE[®]评价软件3.2版),通过同时拟合结合和解离传感图(sensorgram),计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_d)计算为比率k_{off}/k_{on}。参见,例如,Chen等人,J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子体共振测定确定结合速率超过10⁶M⁻¹s⁻¹,那么可以使用荧光淬灭技术确定结合速率,所述荧光淬灭技术在有递增抗原浓度存在下在25℃测量在PBS(pH 7.2)中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少,所述抗原浓度在光谱仪(诸如配备止流阀(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCO[™]分光光度计(ThermoSpectronic)中测量。

[0091] 2. 抗体片段

[0092] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括、但不限于:Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下面描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat. Med. 9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见,例如,Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg和Moore编, (Springer-Verlag, New York), 第269-315页(1994);也参见WO 93/16185;和美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含结合补救受体的表位残基且具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0093] 双体是具有两个抗原结合位点(其可以是二价或双特异性的)的抗体片段。参见,例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat. Med. 9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)。三体和四体也描述在Hudson等人,Nat. Med. 9:129-134(2003)中。

[0094] 单结构域抗体是这样的抗体片段:其包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或者轻链可变结构域的全部或部分。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见,例如,美国专利号6,248,516 B1)。

[0095] 可以通过多种技术制备抗体片段,所述技术包括、但不限于,如本文中所述的完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)的生产。

[0096] 3. 嵌合抗体和人源化抗体

[0097] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述在,例如,美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))中。在一个实施例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,从小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类

动物诸如猴衍生出的可变区)和人恒定区。在另一个实施例中,嵌合抗体是“类别转换的”抗体,其中所述类或亚类已经从亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0098] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对于人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含这样的—个或多个可变结构域:其中HVR例如CDR(或其部分)源自非人抗体并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地也包含人恒定区的至少一部分。在某些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基置换为来自非人抗体(例如,从其衍生出HVR残基的抗体)的相应残基,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0099] 人源化抗体和制造它们的方法综述在,例如,Almagro和Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008),且进一步描述在,例如,Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen等人, *Proc.Nat'l Acad.Sci.USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利号5,821,337,7,527,791,6,982,321和7,087,409; Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述了特异性决定区(SDR)移植); Padlan, *Mol.Immunol.*28:489-498 (1991) (描述了“表面重建”); Dall'Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述了“FR改组”); 和Osborn等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 和Klimka等人, *Br.J.Cancer*,83:252-260 (2000) (描述了用于FR改组的“指导选择”方案)。

[0100] 可以用于人源化的人框架区包括、但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见,例如,Sims等人, *J.Immunol.*151:2296 (1993)); 从轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生出的框架区(参见,例如,Carter等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:4285 (1992); 和Presta等人, *J.Immunol.*,151:2623 (1993)); 人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson, *Front.Biosci.*13:1619-1633 (2008)); 和从筛选FR文库来源的框架区(参见,例如,Baca等人, *J.Biol.Chem.*272:10678-10684 (1997) 和Rosok等人, *J.Biol.Chem.*271:22611-22618 (1996))。

[0101] 4.人抗体

[0102] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术生产人抗体。人抗体通常描述在van Dijk和van de Winkel, *Curr.Opin.Pharmacol.*5:368-74 (2001) 和Lonberg, *Curr.Opin.Immunol.*20:450-459 (2008)。

[0103] 可以通过将免疫原施用给转基因动物来制备人抗体,所述转基因动物已经经过修饰以响应于抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这样的动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座或其在染色体外存在或随机整合进动物的染色体中。在这样的转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已经被灭活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg, *Nat.Biotech.*23:1117-1125 (2005)。也参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584; 描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429; 描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870; 和描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自这类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0104] 还可以通过基于杂交瘤的方法制备人抗体。已经描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor, *J.Immunol.*,133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*,第51-

63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 和Boerner等人, J. Immunol., 147:86 (1991))。在Li等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) 中也描述了通过人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体。另外的方法包括例如在以下文献中描述的那些方法: 美国专利号7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系生产单克隆人IgM抗体) 和Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4):265-268 (2006) (描述了人-人杂交瘤)。在Vollmers和Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3):927-937 (2005) 以及Vollmers和Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3):185-91 (2005) 中也描述了人杂交瘤技术 (Trioma技术)。

[0105] 通过分离选自人-来源的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列, 也可以产生人抗体。这样的可变结构域序列随后可以与期望的人恒定结构域组合。下文描述了用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0106] 5. 文库来源的抗体

[0107] 通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体, 可以分离本发明的抗体。例如, 本领域已知用于产生噬菌体展示文库并对这类文库筛选拥有期望的结合特征的抗体的多种方法。这类方法综述在, 例如, Hoogenboom等人, Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001), 且进一步描述在, 例如, McCafferty等人, Nature 348:552-554; Clackson等人, Nature 352:624-628 (1991); Marks等人, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Marks和Bradbury, Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等人, J. Mol. Biol. 338 (2):299-310 (2004); Lee等人, J. Mol. Biol. 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (34):12467-12472 (2004); 和Lee等人, J. Immunol. Methods 284 (1-2):119-132 (2004)。

[0108] 在某些噬菌体展示法中, VH和VL基因的组库分别通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆并且在噬菌体文库中随机地重组, 其随后可以针对抗原结合噬菌体进行筛选, 如在Winter等人, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体通常展示抗体片段, 作为单链Fv (scFv) 片段或作为Fab片段。来自免疫过的来源的文库会提供针对免疫原的高亲和力抗体, 无需构建杂交瘤。可替换地, 可以 (例如, 从人) 克隆原初库以在没有任何免疫接种的情况下提供针对广泛类型的非自身抗原以及自身抗原的抗体的单一来源, 如Griffiths等人, EMBOJ, 12:725-734 (1993) 所述。最后, 通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段并使用含有随机序列以编码高度可变的CDR3区并实现体外重排的PCR引物, 也可以合成地产生原初文库, 如Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0109] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被认为是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0110] 6. 多特异性抗体

[0111] 在某些实施方案中, 本文提供的抗体是多特异性抗体, 例如, 双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 所述结合特异性之一是针对ApoL1, 且另一个是针对任意其它抗原。在一个特定实施方案中, 所

述结合特异性之一是针对ApoL1,且第二个结合特异性触发含有ApoL1的HDL颗粒的胞吞作用。在某些实施方案中,双特异性抗体可以结合ApoL1的两个不同表位。双特异性抗体可以被制备为全长抗体或抗体片段。

[0112] 用于制备多特异性抗体的技术包括、但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983)),WO 93/08829,和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991)),和“凸起-进入-孔洞”工程改造(参见,例如,美国专利号5,731,168)。也可以通过以下方式制备多特异性抗体:工程改造静电操纵效应应用于制备抗体Fc-异源二聚体分子(WO 2009/089004A1);交联两个或更多个抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,980,和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等人,J. Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双体”技术以制备双特异性抗体片段(参见,例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));和使用单链Fv(sFv)二聚体(参见,例如,Gruber等人,J. Immunol.,152:5368(1994));以及制备三特异性抗体,如在例如Tutt等人.J. Immunol.147:60(1991)中所述。

[0113] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的经工程改造的抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibodies)”(参见,例如,US 2006/0025576A1)。

[0114] 本文中的抗体或片段还包括“双效FAb”或“DAF”,其包含结合ApoL1以及另一种不同抗原的抗原结合位点(参见,例如,US 2008/0069820)。

[0115] 7. 抗体变体

[0116] 在某些实施方案中,预见到本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能合乎需要的是,改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成,可以制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如,从抗体的氨基酸序列删除残基和/或将残基插入所述氨基酸序列中和/或置换所述氨基酸序列内的残基。可以制备缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体,前提条件是,所述最终构建体具有期望的特征,例如,抗原结合。

[0117] a) 置换变体、插入变体和缺失变体

[0118] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目标位点包括HVR和FR。在表1中在“优选置换”的标题下显示了保守置换。在表1中在“示例性置换”的标题下提供了更实质性变化,并且参考氨基酸侧链类别在下面进一步描述。可以将氨基酸置换引入目标抗体中并且针对期望的活性(例如,保留的/改善的抗原结合、降低的免疫原性、或改善的ADCC或CDC)来筛选产物。

[0119] 表1

	原始残基	示例性置换	优选置换
[0120]	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val

[0121]

原始残基	示例性置换	优选置换
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; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; 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; 正亮氨酸	Leu

[0122] 氨基酸可以根据共同的侧链特性分组：

[0123] (1) 疏水的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0124] (2) 中性亲水的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0125] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0126] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0127] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0128] (6) 芳族的：Trp、Tyr、Phe。

[0129] 非保守置换需要将这些分类之一的成员交换为另一个分类的成员。

[0130] 一类置换变体涉及置换亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体在某些生物学特性上具有修饰(例如,改善)(例如,增加的亲和力、降低的免疫原性),和/或具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。一种示例性的置换变体是亲和力成熟的抗体,所述抗体可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文描述的那些)方便地产生。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示和针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0131] 可以在HVR中做出改变(例如,置换),例如,以改善抗体亲和力。这类改变可以在HVR“热点”(即,在体细胞成熟过程中以高频率经历突变的密码子所编码的残基(参见,例如,Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)),和/或接触抗原的残基中做出,并对得到的变体VH或VL试验结合亲和力。通过构建次级文库并从中重新选择而实现的亲和力成熟已经描述在,例如,Hoogenboom等人, *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人,编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如,易出错的PCR、链改组或寡核苷酸-指导的诱变)的任一种,将多样性引入所选择用于成熟的可变基因中。随后建立次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR-指导的方案,其中将几个HVR残基(例如,一次4-6个残基)随机化。可以特别地鉴定参与抗原结合的HVR残基,例如,使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0132] 在某些实施方案中,置换、插入或缺失可以出现在一个或多个HVR内部,只要这类改变不实质上降低抗体的结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出不实质上降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文中提供的保守置换)。这类改变可以例如在HVR的抗原接触残基的外部。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR未改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0133] 一种用于鉴定可以被靶向以便诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在这种方法中,鉴定一个残基或靶残基组(例如,带电荷残基诸如arg、asp、his、lys和glu),并且用中性的或带负电荷的氨基酸(例如,丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对初始置换显示出功能敏感性的氨基酸位置处引入其它置换。可替换地或额外地,可以使用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以靶向或消除这类接触残基和邻近残基作为置换候选物。可以筛选变体以确定它们是否含有期望的特性。

[0134] 氨基酸序列插入包括长度在从1个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合体,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N-端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-或C-端与酶(例如针对ADEPT的酶)或增加所述抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0135] b) 糖基化变体

[0136] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以增加或减少抗体被糖基化的程度。通过改变氨基酸序列从而建立或移除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现对抗体添加或删除糖基化位点。

[0137] 在抗体包含Fc区的情况下,可以改变与之连接的碳水化合物。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双天线寡糖,所述寡糖通常借助N-键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人.TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及与双天线寡糖结构的“茎部”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中,可以修饰本发明的抗体中的寡糖以便建立具有某些改善的特性的抗体变体。

[0138] 在一个实施方案中,提供具有碳水化合物结构的抗体变体,所述碳水化合物结构缺少与Fc区(直接地或间接地)连接的岩藻糖。例如,这类抗体中岩藻糖的量可以是1%-80%、1%-65%、5%-65%或20%-40%。通过以下方式确定岩藻糖的量:相对于如通过MALDI-TOF质谱法(例如,如WO 2008/077546中所述)所测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和,计算糖链内在Asn297处的岩藻糖的平均量。Asn297表示位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);但是,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可以位于位置297的上游或下游约±3个氨基酸附近,即,在位置294和300之间。这样的岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。与“去岩藻糖基化的”或“岩藻糖-缺陷型”抗体变体相关的出版物的例子包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人.J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人.Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够生产去岩藻糖基化抗体的细胞系的例子包括蛋白岩藻糖基化缺陷型的Lec13 CHO细胞(Ripka等人.Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,特别在实施例11),和敲除的细胞系,诸如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人.Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0139] 还可以为抗体变体提供双分的寡糖,例如,其中与抗体的Fc区连接的双天线寡糖由GlcNAc对分。这样的抗体变体可以具有减少的岩藻糖化和/或改善的ADCC功能。这样的抗体变体的例子例如描述在WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)。还提供了具有与Fc区连接的、在寡糖中的至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。这样的抗体变体例如描述在WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)。

[0140] c) Fc区变体

[0141] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此产生Fc区变体。该Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述人Fc区序列包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如,置换)。

[0142] 在某些实施方案中,本发明预见到具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为下述应用的合乎需要的候选物:其中抗体的体内半衰期是重要的,

而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以实施体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以实施Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞(NK细胞)仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) 的第464页上的表3中总结了造血细胞上的FcR表达。评估目标分子的ADCC活性的体外测定的非限制性例子描述在美国专利号5,500,362(参见,例如Hellstrom, I.等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))和Hellstrom, I等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337(参见Bruggemann, M.等人, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))中。可替换地,可以采用非放射性测定方法(参见,例如,用于流式细胞计量术的ACTITM非放射性的细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; 和CytoTox96[®]非放射性的细胞毒性测定(Promega, Madison, WI))。用于这样的测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可替换地或额外地,可以在体内评估目标分子的ADCC活性,例如,在动物模型中,诸如在Clynes等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998) 公开的动物模型中。也可以实施C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q且因此缺少CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定(参见,例如, Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 和Cragg, M. S. 和M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。也可以使用本领域已知的方法执行FcRn结合和体内清除率/半衰期确定(参见,例如, Petkova, S. B. 等人, *Int'l. Immunol.* 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0143] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的置换的那些(美国专利号6,737,056)。这样的Fc突变体包括具有在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个位置处的置换的Fc突变体,包括将残基265和297置换成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0144] 描述了具有改善的或减少的与FcR的结合的某些抗体变体。参见,例如,美国专利号6,737,056; WO 2004/056312, 和Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001)。

[0145] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有改善ADCC的一个或多个氨基酸置换(例如,在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处的置换)的Fc区。

[0146] 在某些实施方案中,在Fc区中做出改变,其导致改变的(即,提高的或减少的)C1q结合和/或补体依赖性的细胞毒性(CDC),例如,如在美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) 中所述。

[0147] 在US2005/0014934A1 (Hinton等人.) 中描述了具有增加的半衰期和提高的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体,所述新生儿Fc受体负责母亲IgG向胎儿的转移(Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 和Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。那些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区,所述置换改善Fc区与FcRn的结合。这样的Fc变体包括在一个或多个Fc区残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434处具有置换的那些,例如,Fc区残基434的置换(美国专利号7,371,826)。

[0148] 关于Fc区变体的其它例子,也参见Duncan&Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 美

国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0149] d) 半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0150] 在某些实施方案中,可能合乎需要的是,建立半胱氨酸工程改造的抗体,例如,“硫代MAb”,其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中,置换的残基出现在抗体的可到达位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,由此使反应性巯基位于抗体的可到达位点处并且可以用于将抗体缀合至其它部分(诸如药物部分或接头-药物部分)以产生免疫缀合物,如本文中进一步所述。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸置换以下残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可以如例如美国专利号7,521,541中所述产生半胱氨酸工程改造的抗体。

[0151] e) 抗体衍生物

[0152] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知的且容易得到的额外非蛋白性部分。适合用于衍生化抗体的部分包括、但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括、但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、亚乙基/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇同聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如,丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。由于它在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点。所述聚合物可以具有任何分子量,并可以是分枝或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数目可以变动,并且如果连接超过一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可以基于以下考虑事项确定:包括、但不限于待改善的抗体的特定特性或功能,抗体衍生物是否将用在确定条件下的疗法中等。

[0153] 在另一个实施方案中,提供了抗体和非蛋白性部分的缀合物,所述非蛋白性部分可以通过暴露于辐射而选择性地加热。在一个实施方案中,非蛋白性部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。所述辐射可以具有任何波长,并包括、但不限于这样的波长:其不伤害普通细胞,但是其将非蛋白性部分加热至杀伤在抗体-非蛋白性部分附近的细胞的温度。

[0154] B. 重组方法和组合物

[0155] 使用重组方法和组合物(例如,如在美国专利号4,816,567中所述),可以生产抗体。在一个实施方案中,提供了分离的核酸,其编码本文描述的抗-ApoL1抗体。所述核酸可以编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和/或包含所述抗体的VH的氨基酸序列(例如,所述抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供了一种或多种包含所述核酸的载体(例如,表达载体)。在另一个实施方案中,提供了包含所述核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包含以下载体(例如,已经用以下载体转化):(1)包含特定核酸的载体,所述核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列和包含所述抗体的VH的氨基酸序列,或(2)第一载体和第二载体,所述第一载体包含特定核酸,所述核酸编码包含所述抗体的VL的氨基酸序列,所述第二载体包含特定核酸,所述核酸编码包含所述抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述宿主细胞是真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了一种制备抗-ApoL1抗体的方法,其中所述方法包括在适合表达所述抗体的条件下培养如上所述的包含编码所述抗体的核酸的宿

主细胞,和任选地,从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0156] 为了重组生产抗-ApoL1抗体,将编码抗体(例如,如上所述)的核酸分离,并将其插入到一种或多种载体中用以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法容易地对这样的核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0157] 适用于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文中所述的原核和真核细胞。例如,抗体可以在细菌中制备,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(也参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达)。在表达后,抗体可以分离自可溶级分中的细菌细胞糊,并且可以被进一步纯化。

[0158] 除了原核生物以外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已经被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而导致具有部分地或完全地人糖基化模式的抗体的生产。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004),和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0159] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞的生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴别出众多可以与昆虫细胞结合使用的杆状病毒菌株,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0160] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中生产抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0161] 脊椎动物细胞也可以用作宿主。例如,适合悬浮培养的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它例子是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,其描述在例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利细胞(TM4细胞,其描述在例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,其描述在例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中;MRC 5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适合用于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0162] C. 测定

[0163] 通过本领域已知的各种测定,可以针对它们的物理/化学性能和/或生物活性鉴别、筛选或表征本文中提供的本文提供的抗-ApoL1抗体。

[0164] 1. 结合测定和其它测定

[0165] 在一个方面,针对它的抗原结合活性试验本发明的抗体,例如,通过已知方法诸如ELISA、蛋白质印迹等,或竞争锥虫血清抗性抗原(SRA)结合。在另一个方面,可以使用竞争

测定来鉴别与如本文中所述的抗体竞争结合ApoL1的抗体。在某些实施方案中,这样的竞争抗体会结合被如本文中所述的抗体结合的相同表位(例如,直链或构象表位)。用于描绘抗体所结合的表位的详细示例性方法提供在Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ)中。

[0166] 在一种示例性的竞争测定中,将固定化的ApoL1在溶液中温育,所述溶液包含结合至ApoL1(例如,如本文中所述的抗体)的第一种标记的抗体和第二种未标记的抗体,所述第二种未标记的抗体针对它的与第一抗体竞争结合ApoL1的能力进行了试验。所述第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化的ApoL1在包含第一种标记的抗体、但是不包含第二种未标记的抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与ApoL1结合的条件下温育以后,将多余的未结合的抗体除去,并测量与固定化的ApoL1结合的标记的量。如果试验样品中与固定化的ApoL1结合的标记的量相对于对照样品大幅下降,那么指示,第二抗体与第一抗体竞争对ApoL1的结合。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:ALaboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0167] 2. 活性测定

[0168] 在一个方面,提供了用于鉴别具有生物活性的其抗-ApoL1抗体的测定。生物活性可以包括,例如,结合ApoL1,由此降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展。还提供了具有这样的体内和/或体外生物活性的抗体。

[0169] 在某些实施方案中,针对这样的生物活性试验了本发明的抗体。在某些实施方案中,针对降低ApoL1的溶锥虫活性的抗体进行筛选。在某些实施方案中,针对降低ApoL1在足细胞毒性体外模型中的毒性的抗体进行筛选。在某些实施方案中,如在实施例所述使用测定。

[0170] D. 药物制剂

[0171] 通过将具有期望纯度的这类抗体与一种或多种任选的药学上可接受的载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980))组合,以低压冻干制剂或水溶液的形式制备如本文中所述的抗-ApoL1抗体的药物制剂。药学上可接受的载体在采用的剂量和浓度对接受者而言通常是无毒的,且包括、但不限于:缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖类、二糖类和其它碳水化合物类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂诸如EDTA;糖类诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的抗衡离子诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。示例性的药学上可接受的载体在本文中还包括间质(interstitial)药物分散剂,诸如可溶性的中性活性的透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性的PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX[®],Baxter International,Inc.)。包括rHuPH20在内的某些示例性sHASEGP和使用方法描述在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0172] 示例性的低压冻干的抗体制剂描述在美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括在美国专利号6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后者制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0173] 本文中的制剂还可以含有正在治疗的特定适应症需要的超过一种活性成分,优选地具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些。例如,可能合乎需要的是,进一步提供护理标准。这样的活性成分适当地以对于预期目的而言有效的量联合存在。

[0174] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(分别例如,羟基甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊剂)中或在大乳剂中。这样的技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)。

[0175] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质呈成形制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。

[0176] 要用于体内施用的制剂通常是无菌的。可以容易地实现无菌度,例如,通过穿过无菌过滤膜过滤。

[0177] E. 治疗方法和组合物

[0178] 本文中提供的任何抗-ApoL1抗体可以用在治疗方法中。

[0179] 在一个方面,提供了用作药物的抗-ApoL1抗体。在其它方面,提供了用于治疗肾病的抗-ApoL1抗体。在某些实施方案中,提供了用在治疗方法中的抗-ApoL1抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗患有肾病的个体的方法中的抗-ApoL1抗体,所述方法包括给所述个体施用有效量的抗-ApoL1抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下所述。在其它实施方案中,本发明提供了用于降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展的抗-ApoL1抗体。在某些实施方案中,本发明提供了用于在个体中降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展的方法中的抗-ApoL1抗体,所述方法包括给所述个体施用有效量的抗-ApoL1抗体以降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展。根据以上实施方案中的任一个的“个体”优选地是人。

[0180] 在另一个方面,本发明提供了抗-ApoL1抗体在药物的制造或制备中的用途。在一个实施方案中,所述药物是用于治疗肾病。在另一个实施方案中,所述药物是用于治疗肾病的方法中,所述方法包括给患有肾病的个体施用有效量的药物。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如下所述。在另一个实施方案中,所述药物是用于降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展。在另一个实施方案中,所述药物是用于在个体中降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展的方法中,所述方法包括给所述个体施用有效量的药物以降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展。根据以上实施方案中的任一个的“个体”可以是人。

[0181] 在另一个方面,本发明提供了一种用于治疗肾病的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给患有肾病的个体施用有效量的抗-ApoL1抗体。在一个这样的实施方案中,所述方法还包括给所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,如下所述。根据以上实施方案中的任一个的“个体”可以是人。

[0182] 在另一个方面,本发明提供了一种在个体中降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展的方法。在一个实施方案中,所述方法包括给所述个体施用有效量的抗-ApoL1抗体以降低ApoL1的血清浓度和/或减轻ApoL1介导的肾病的进展。在一个实施方案中,“个体”是人。

[0183] 在另一个方面,本发明提供了包含本文中提供的任何抗-ApoL1抗体的药物制剂,例如,用在任何以上治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含本文中提供的任何抗-ApoL1抗体和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文中提供的任何抗-ApoL1抗体和至少一种另外的治疗剂,例如,如下所述。

[0184] 本发明的抗体可以单独地或与其它药剂组合地用在疗法中。例如,本发明的抗体可以与至少一种另外的治疗剂共同施用。

[0185] 上面指出的这样的联合治疗包括组合施用(其中将两种或更多种治疗剂包括在相同制剂或单独制剂中)和分开施用,在后一种情况下,本发明的抗体的施用可以发生在另外的治疗剂或试剂的施用之前、同时和/或之后。在一个实施方案中,抗-ApoL1抗体的施用和另外的治疗剂的施用发生在彼此的约1个月内,或在约1、2或3个周内,或在约1、2、3、4、5或6天内。

[0186] 本发明的抗体(和任何另外的治疗剂)可以通过任意合适的方式施用,包括胃肠外、肺内和鼻内施用,并且,如果需要局部治疗,病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。定量给药可以通过任意适当的途径,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分地取决于施用是否是短暂的或长期的。各种定量给药计划包括但不限于在不同时间点单次或多次施用,推注施用,并且在本文中预见到脉冲输注。

[0187] 以与良好医学实践一致的方式,配制、定量给药和施用本发明的抗体。在该背景下考虑的因素包括正在治疗的特定障碍、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、障碍的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用调度和医学从业人员已知的其它因素。抗体不需要、但任选地与一种或多种当前用于预防或治疗讨论的障碍的药剂一起使用。这样的其它药剂的有效量取决于存在于所述制剂中的抗体的量,障碍或治疗的类型,和上文讨论的其它因素。这些通常以相同剂量并且以本文所述的施用途径使用,或以本文所述的剂量的约1至99%、或以经验上/临床上确定为合适的任意剂量和任意途径使用。

[0188] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体(当单独地或与一种或多种其它另外的治疗剂联合使用时)的适当剂量将取决于要治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体是否为了预防或治疗目的、以前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的判断。适当地将抗体一次性地或在一系列治疗中施用给患者。取决于疾病的类型和严重程度,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如,0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是用于施用给患者的最初候选剂量,例如,不论通过一次或多次单独施用,还是通过连续输注。一个典型的日剂量可能是在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内,取决于上面提及的因素。对于在几天或更长时间内的重复施用,取决于病症,所述治疗通常持续至发生疾病症状的期望抑制。抗体的一种示例性剂量是在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因而,可以将一剂或多剂约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任意组合)施用给患者。可以间歇地(例如,每周或每3周)施用这样的剂量(例如,使得患者接受约2至约20、或例如约6剂抗体)。可以施用最初的较高负荷剂量,继之以一个或多个较低剂量。通过常规技术和测定容

易地监测该治疗的进展。

[0189] 应当理解,使用本发明的免疫缀合物替代抗-ApoL1抗体或者与抗-ApoL1抗体组合,可以实现任何以上制剂或治疗方法。

[0190] F. 制成品

[0191] 在发明的另一方面,提供了制成品,其含有用于治疗、预防和/或诊断上文所述的障碍的材料。所述制成品包含容器和贴在容器上或与容器结合的标签或包装说明书。合适的容器包括,例如,瓶子、管形瓶、注射器、静脉内溶液袋等。容器可以由多种材料制成,例如玻璃或塑料。所述容器容纳单独的组合物或与另一种可有效地治疗、预防和/或诊断病症的组合物组合的组合物,且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的瓶子)。组合物内的至少一种活性剂是本发明的抗体。所述标签或包装说明书指示,所述组合物用于治疗选择的病症。此外,制成品可以包含(a)具有包含在其中的组合物的第一容器,其中所述组合物包含本发明的抗体;和(b)具有包含在其中的组合物的第二容器,其中所述组合物包含另一种细胞毒性治疗剂或其它的治疗剂。本发明的该实施方案中的制成品还可以包含包装说明书,所述包装说明书指示所述组合物可以用于治疗特定病症。可替换地,或另外,制品可以进一步包含第二(或第三)容器,所述容器包含药学上可接受的缓冲液,诸如抑制细菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、含乳酸盐的林格氏溶液和右旋糖溶液。制品可以进一步包含从商业和用户观点看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0192] 应当理解,任何以上制成品可以包括本发明的免疫缀合物替代抗-ApoL1抗体或与抗-ApoL1抗体组合。

[0193] 实施例

[0194] 下面是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解,鉴于上文提供的一般描述,可以实施多种其它的实施方案。

[0195] 伦理

[0196] 根据Genentech Institutional Animal Care and Use Committee (Genentech动物实验管理小组)批准的方案操作所有动物。将小鼠群体维持在Genentech的隔离设施中,符合加利福尼亚州动物护理的法律和伦理标准。

[0197] 实施例1:APOL1转基因小鼠的制备和基因分型

[0198] 为了鉴别载脂蛋白L1 (ApoL1) 在肾脏疾病进展中的作用,我们使用含有人ApoL1基因的细菌人工染色体(BAC)的44kb部分来制备三个系列的转基因小鼠,其表达ApoL1的G0变体以及两种常见序列变体(G1,G2),所述两种常见序列变体提供对锥虫感染的抗性和增加非洲人群中的肾脏疾病风险(Kao等人,2008;Kopp等人,2008)。

[0199] 转基因的制备

[0200] 使用确立的重组方法和galK正和反选择(基本上如在Warming等人,Nucleic Acids Res 2005,v33,e36中所述),修饰含有人APOL1基因(RP11-826P13)的BAC(细菌人工染色体)。转化进SW102大肠杆菌中以后和在每个修饰步骤以后,使用SpeI-消化的BAC微量制备DNA通过指纹法表征BAC DNA。由Blue Heron Biotech/OriGene合成用于阳性和阴性选择的两步盒。每个盒在所述修饰的每一侧上具有约200bp的同源性。将所述盒设计成允许使用EcoRI和SpeI/BamHI位点插入galK选择标志物以制备阳性选择盒用于BAC修饰和用于随

后无缝除去galK(使用BfuAI Type II限制),随后自我连接以制备反选择盒用于BAC修饰。通过NotI消化使靶向盒从pUC载体主链释放。在该工作中使用的两个盒的序列被包括在表2中(AscI、NotI、EcoRI、BamHI、SpeI和BfUI的识别序列(II型酶的上或下链)标有下划线;在G1盒中,编码两个G1突变(S342G和I384M)的DNA变化以粗体显示)。

[0201] G2突变是氨基酸N388和Y389(碱基对AATTAT)的缺失。G1突变由两个置换S342G和I384M(分别是AGC至GGC和ATT至ATG)组成。从BAC除去galK盒以后,使用重组法将APOL1 BAC的经修饰的基因组区域恢复(亚克隆)进pBR322中,得到44kb转基因。另外,通过从未修饰的APOL1 BAC恢复来制备对照转基因(野生型)。使用确立的方法,将转基因通过NotI消化进行线性化,纯化,并显微注射进来自C57BL/6N小鼠品系的合子中以制备转基因动物。ApoL1野生型、G1和G2的转基因的示意图分别描绘在图1的A-C中。将小鼠维持在C57BL/6背景上。

[0202] 表2

[0203]

名称	序列
G0 变体 ApoL1 (SEQ ID No:01)	<pre> megaallrvsvlciwmsalfilgvgvraeeagarvqgnvpsgtdtgdpgs kplgdwaagtm dpessifiedaiky fkekvstqnl1111tdneawngfv aaaelp rneadelrkaldnlarqmimkdknwhdkggqyrnwflkefprl kselednirrlraladgvqkvhkgttianvvsgslsissgiltlvmggl apfteggslvllep gmelgitaaltgitsstmdygkkwwtqaqahdlvi ksldklkevreflgenisnflslagntyqltrgigkdiralrraranlq svphasasrprvte pisaesgeqvervnepsilemsrgvklt dvapvsf flvldvvylyveskhlhegaksetaeelkkvageleeklnilnnnykil qadqel </pre>
G1 变体 ApoL1 (SEQ ID No:02)	<pre> megaallrvsvlciwmsalfilgvgvraeeagarvqgnvpsgtdtgdpgs kplgdwaagtm dpessifiedaiky fkekvstqnl1111tdneawngfv aaaelp rneadelrkaldnlarqmimkdknwhdkggqyrnwflkefprl kselednirrlraladgvqkvhkgttianvvsgslsissgiltlvmggl apfteggslvllep gmelgitaaltgitsstmdygkkwwtqaqahdlvi ksldklkevreflgenisnflslagntyqltrgigkdiralrraranlq svphasasrprvte pisaesgeqvervnepsilemsrgvklt dvapvgf flvldvvylyveskhlhegaksetaeelkkvageleeklnmlnnnykil qadqel </pre>

[0204]

G2 变体 ApoL1 (SEQ ID No:03)	megaallrvsvlciwmsalfilgvgvraeeagarvqgnvpsgtddtgdpps kplgdwaagtmdepessifiedaikyfkekvstqnl11111tdneawngfv aaaelprneadelrkaldnlarqmimkdknwhdkgqqrnwf1kefprl kselednirrlraladgvqkvhkgttianvvsqslsissgiltlvmgml apfteggslvlllepamelgitaaltgitsstmdygkkwvtqaqahdlvi ksldklikevreflgenisnflslagntyqltrgigkdiralrraranlq svphasasrprvtepisaesgeqvervnepsilemsrgvkltdvapvsf flvldvvylyveskhilhegaksetaeelkkvaqeleeeklnilnnkilqa dqel
ApoL1 G1 盒 (SEQ ID No:04)	<u>gcggccgctcacacgaggcatfgggaaggacatccgtgcctcagacgagccaga</u> gccaatcttcagtcagtaccgcatgcctcagcctcacgccccgggtcactgagccaa tctcagctgaaagcgggtgaacaggtggagagggtaatagaaccagcatcctggaaa tgagcagaggagtcagctcacggatgtggccctgtaggtctcttctgtgtctggat gtagtctacctctgtgacgaatcaaagcacttacatgagggggcaaagaatgcaggtg <u>aattcaataaactcggcggatccacctgcattccaaagtcagagacagctgaggagct</u> gaagaaggtggctcaggagctggaggagaagctaaacatgtctcaacaataattataa gattctgcaggcggaccaagaactgtgaccacagggcagggcagccaccaggaga gatatgcctggcagggggcaggacaaaatgcaacttttttttctgagacagagtct tgctctgtcgccaagttggagtgaatggtgcgatctcagctcactgcaagctctgcctc <u>ccgtgttgcggccgc</u>
ApoL1 G2 盒 (SEQ ID No:05)	<u>gcggccgcttaatagaaccagcatcctggaaatgagcagaggagtcagctcacgg</u> atgtggccctgtgaagcttcttctgtgtctggatgtagtctacctcgtgtacgaatcaaag cacttacatgagggggcaaagtcagagacagctgaggagctgaagaaggtggctca ggagctggaggagaagctaaacattctcaacaataagactgtgcaggtgaattcggat <u>ccattaaaactagctacctgcattcaagattctgcaggcggaccaagaactgtgaccaca</u> gggcagggcagccaccaggagagatatgcctggcagggggcaggacaaaatgca aacittttttttctgagacagagtctgtctctgtcgccaagttggagtgaatggtgcga tctcagctcactgcaagctctgcctcccgtgtcaagcgattctcctggcggccgc
恢复的寡物 1 (SEQ ID No:06)	tagtctgtccagggccccctggccgcagacaaatgtacagacacggctggcggc <u>ccgatacgcgagcgaacgtgaa</u>
恢复的寡物 2 (SEQ ID No:07)	gtcagtggcaggtcttcttgagctcagaaaggttaggtaactagttcagggccgcgc ttagacgtcaggtggcact

[0205] 小鼠的基因分型

[0206] 通过标准PCR或Taqman分析,执行ApoL1转基因小鼠的基因分型。ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体的基因分型使用标准的PCR和针对ApoL1的引物(正向5'-TTTCTGTGCTGGATGTAG-3'(SEQ ID No:08)和反向5'-ATATCTCTCCTGGTGGCT-3'(SEQ ID No:09))以及针对Taci的内部对照(正向5'-TGGGTGTCAGGTTCTTGCTTCAGC-3'(SEQ ID No:10)和反向5'-CAGTGGATGCGCGCAGGAC-3'(SEQ ID No:11))。反应条件是94℃、4min,随后是30个在

94℃保持60s(变性)、在55℃保持30s(退火)和在72℃保持1min(延伸)的循环。使用Type-it Fast SNP PCR主混合物(Qiagen PN 206042)、0.5μM每种引物和0.15μM探针(Applied Biosystems),将tagman测定用于ApoL1的G1变体。ApoL1使用正向引物5'-TGAGCAGAGGAGTCAAG-3'(SEQ ID No:12),反向引物5'-TGTGGTCACAGTTCTTG-3'(SEQ ID No:13),和探针5'-6FAM-AGCTAAACATGCTCAAC-NFQ-MGB-3'(SEQ ID No:14)。针对Apo的阳性对照使用正向引物5'-CACGTGGGCTCCAGCATT-3'(SEQ ID No:15),反向引物5'-TCACCAGTCATTTCTGCCTTTG-3'(SEQ ID No:16),和探针5'-VIC-CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA-3'(SEQ ID No:17)。反应条件是94℃、4min,随后是35个94℃、60s(变性)、55℃、30s(退火)和72℃、1min(延伸)的循环。在AB7900(Applied Biosystems)上读出使用FAM和VIC探针的终点PCR以从簇图辨别等位基因。

[0207] 实施例2:转基因小鼠和人类中的血清学ApoL1的分析

[0208] 用于从血清分级分离主要脂蛋白种类的超速离心密度梯度

[0209] 根据McPherson,等人(McPherson等人,2007),制备具有1.006、1.019、1.063和1.24g/ml的密度的KBr/NaCl溶液。所有盐溶液含有0.1%NaN₃和0.04%EDTA。用Densito 30PX密度计(Mettler Toledo)在25℃确认密度。通过将0.923g KBr加入0.284ml血清和2.556ml H₂O中至3ml的终体积,制备具有1.21g/ml的密度的经稀释的血清溶液。制备梯度柱并根据Chapman MJ等人使用蠕动泵(Chapman等人,1981)填充。在Beckman SW41Ti转子上在40,000rpm在15℃执行离心>48h。将级分用蠕动泵收集在1ml体积中,并然后在Tris缓冲液(0.04%EDTA,5mM Tris和50mM NaCl,pH 7.4)中在4℃透析过夜。对于蛋白质印迹,将5ml每种级分加载到4-20%Tris-甘氨酸凝胶上,用对ApoL1(Proteintech 11486-2-AP)、ApoA1(Rockland 600-101-196)和IgG(GE NA931V)特异性的抗体探测。使用ECL prime(GE Healthcare)检测免疫反应性。

[0210] ApoL1 ELISM

[0211] 如下开发ApoL1夹心ELISA:在碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(1.59g Na₂CO₃,2.93g NaHCO₃,在水中,定量至1L)中在4℃将0.5μg/ml的抗-ApoL1多克隆抗体(Proteintech 11486-2-AP)包被在Maxisorp®板(Thermo Fisher Scientific,464718)上过夜。将包被的板用5%的奶在含有0.05%吐温20的Tris-缓冲盐水中的溶液封闭。为了制备测定标准曲线,将纯化的ApoL1蛋白(在OD₂₈₀测量其浓度)在魔术缓冲液(0.5%BSA,0.05%吐温20,5mM EDTA pH 8,0.25%CHAPS,0.2%BgG,15ppm Proclin在PBS中)中稀释,并掺入10%小鼠血清(Invitrogen,10410)。随后执行4倍系列稀释以产生从10μg/ml至0.153ng/ml范围的标准曲线。将实验性血清样品在魔术缓冲液中1:10稀释。将预包被的和预封闭的板依次与以下物质一起温育:标准曲线或实验样品,0.5μg/ml的针对ApoL1的G0变体的生物素化抗体(其使用含有人APOL1异形体1的氨基酸61-398的重组融合蛋白(在Genentech制备和纯化)在兔中产生),和过氧化物缀合的抗生蛋白链菌素(GE,RPN4401V)的1:10,000稀释物。在每个温育步骤之间将所述板在405™微量培养板洗涤器(Biotek)上使用含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲盐水洗涤。使用比色测量BioFX®TMB底物(Surmodics,TMBS 1000-01)检测ApoL1,用1M磷酸停止,并在SpectraMax250分光光度计(Molecular Devices)上读出。

[0212] 在分级分离研究和ELISA中对比转基因小鼠和人中的血清学ApoL1

[0213] 为了确定转基因小鼠中的血清学ApoL1是否与HDL颗粒相关(类似于人ApoL1),我

们使用上述的超速离心密度梯度方法从人血清分级分离了主要脂蛋白种类(图2A)并将它们与转基因血清进行了对比(图2E)。我们发现,如从人血清预见到的(Chapman等人,1981;Davidson等人,2009),ApoA1精确地分级分离,从而指示所述方法较好地工作。它主要作为HDL3存在于带IV和IF-c(级分7、8和9)中;较低水平作为HDL2存在于带III(级分6)中;大量作为VHDL存在于IF-d(级分9和10)中;且ApoA1与游离蛋白诸如IgG一起沉淀(级分11和12)(图2C,D)。人血清中的ApoL1存在于ApoA1所在的级分子集中。少量作为HDL3存在于带IV和IF-c(级分8和9)中,而大量作为VHDL存在于IF-d和带V(级分9和10)中以及与游离蛋白一起存在于带V和沉淀(级分11,12)中(图2B,D)。与人载脂蛋白相一致,来自转基因小鼠血清的ApoA1作为HDL2和HDL3存在于带III和IV(级分6、7、8和9)中,而相对较小量作为VHDL存在于IF-d(级分10)中,和与未结合的蛋白诸如IgG一起(级分12)(图2G,H)。转基因小鼠中的ApoL1主要作为HDL3(级分8和9)和VHDL(IF-d,级分10)存在于带IV中,而相对较小量是在含有未脂质化的蛋白的带V(级分11)中,在ApoL1的G0变体和ApoL1的G2变体中是类似的(图2F)。来自两个转基因系的ApoL1和ApoA1类似地分级分离。

[0214] 为了确定我们的转基因小鼠系是否表达与人类类似的ApoL1浓度,使用如上所述内部开发的特异性夹心ELISA,定量转基因小鼠中的循环ApoL1水平并与人血清学ApoL1进行对比。我们将来自非洲裔美国人供体的人血清与表达ApoL1的G0变体或ApoL1的G2变体的小鼠以及转基因阴性同胞仔对照进行对比。尽管其他人报道了在386–15,743ng/ml范围内的循环ApoL1浓度(Duchateau等人,2000;Page等人,2006),但是我们发现表达ApoL1的G0变体的动物的血清中的ApoL1是53–70ng/ml(± 10),表达G2变体的动物中的浓度是93–117(± 14),且人血清中的ApoL1是99–125(± 32)。每种血清的范围显示在图3中,并反映了含有ApoL1的G0变体(图3A)或ApoL1的G2变体(图3B)的标准曲线的用途。总之,我们发现,转基因小鼠中的血清学ApoL1在分级分离研究和ELISA中与人ApoL1类似地表现。

[0215] 实施例3:转基因小鼠中的ApoL1的表达

[0216] 定量PCR

[0217] 从成年小鼠器官提取总RNA(RNeasy kit,Qiagen),并包括DNA酶处理(Qiagen)。使用RT-PCR试剂盒(High Capacity cDNA Reverse Transcription;Applied Biosystems)执行RT-PCR,并使用购自Applied Biosystems的引物/探针集合针对ApoL1和mGapdH执行定量PCR。

[0218] 蛋白质印迹

[0219] 按照生产商的说明书使用FuGene6(Roche)和针对ApoL1(DNA370081,NM_003661)和ApoL2(DNA369843,NM_145637)的cDNA(Origene)执行CHO.K1细胞的瞬时转染。将细胞用PBS快速地冲洗,并立即在RIPA缓冲液+蛋白酶抑制剂混合液中裂解。对于灌注的组织裂解物,将小鼠用0.1–0.2ml IP/20–30g体重的赛拉嗪(1mg/ml)和氯胺酮(100mg/ml)的混合液麻醉,并通过心脏灌注40ml磷酸盐缓冲盐水。将肝和肺取出,切成1-mm³块,在HBSS中匀浆化,沉淀,并在RIPA缓冲液+蛋白酶抑制剂混合液中裂解。使用双金鸡宁酸(BCA)试剂(Pierce)确定蛋白浓度。给每个泳道加载30 μ g足细胞或组织匀浆物、15 μ g过表达的裂解物和0.1 μ l ApoL1转基因小鼠血清或人血清,并使用4–20%Tris-甘氨酸或4–12%Bis-Tris十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶通过电泳进行分离。将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Invitrogen)。将印迹在5%的奶在PBS(含有0.05%吐温-20)中的溶液封闭,然后用ApoL1

抗体(1:500的Sigma-Aldrich HPA018885,或1 μ g/ml的Proteintech 11486-2AP)探测。如下检测信号:用辣根过氧化物酶-缀合的第二抗体对第一抗体化学发光检测,随后用ECL-prime试剂(GE)显影。

[0220] 足细胞培养和分化

[0221] 从University of Bristol(Bristol,UK)得到有条件地永生化的人SV40^{tsA58T}/hTERT足细胞细胞系。将未分化的足细胞在33 $^{\circ}$ C保持在补充了10%FBS(Sigma)和胰岛素-转铁蛋白-硒(Invitrogen)的RPMI-1640培养基中进行增殖。如在Saleem等人(Saleem等人,2002)中所述实现足细胞分化,基本上将40-60%汇合的未分化的足细胞热转换至37 $^{\circ}$ C,并将它们维持另外14天,每周更换培养基3次。

[0222] 使用定量PCR和蛋白质印迹分析确定ApoL1表达

[0223] 为了确定表达ApoL1的转基因小鼠是否具有与人类类似的基因表达模式,我们如上所述在几个据报道高度表达ApoL1的器官(即肾、肺和肝)(Genecards, www.genecards.org)上执行定量PCR。我们的数据指示,在转基因小鼠中的表达与人表达模式相一致。在全肾中存在相对低的表达,在肝(相对于肾88倍)和肺(相对于肾10倍)中具有最大表达(图4A,A')。来自小鼠(用PBS灌注以除去循环ApoL1)的肺和肝裂解物的蛋白质印迹分析(如上所述)表明,表达的蛋白与基因表达数据相关。使用多克隆抗体(Proteintech, 11486-2AP)检测ApoL1,所述多克隆抗体使用含有人APOL1异形体1的N-端238个氨基酸的重组融合蛋白在兔中产生(图4B)。使用兔多克隆抗体(Sigma,HPA018885)在未分化的或分化的人培养的足细胞中和在来自表达ApoL1的G0变体的转基因小鼠的血清中检测ApoL1。在CHO-1K细胞中的ApoL1、ApoL2或对照瞬时转染的裂解物指示,用Sigma抗体检测到ApoL1和ApoL2(图4C)。

[0224] 实施例4:

[0225] 化学物诱导的肾病

[0226] 得到体重为20-25g且年龄为8-12周的雄性小鼠。经由每只未麻醉的小鼠的尾静脉注射多柔比星(再悬浮于温热的PBS中至0.5mg/ml;Sigma D1515)一次。给年龄匹配的雄性小鼠注射相同体积的磷酸盐缓冲盐水。将所有对照和实验小鼠单个地圈养,并每天供给2ml含乳酸盐的林格氏溶液(Baxter)。每周从来自每只动物的自发地排泄的尿评估蛋白尿。使用小鼠白蛋白作为标准品(Innovative Research)通过酶联免疫吸附测定(ELISA)测量尿白蛋白,并归一化至通过比色测量测定(Enzo Life Sciences)测量的肌酸酐。在第21天,将动物称重,安乐死,并将肾收获用于组织学。

[0227] 免疫组织化学分析

[0228] 对于所有组织学分析,将小鼠通过CO₂吸入处死,将肾立即解剖,通过浸渍在4%的低聚甲醛在PBS中的溶液中进行固定,在矢向上切割,并处理用于石蜡切片。按照标准方案在3 μ m切片上执行退化的苏木精和伊红(H&E)染色。

[0229] 透射电子显微术(TEM)

[0230] 将组织在1/2-强度Karnovsky氏固定剂(2%低聚甲醛和2.5%戊二醛在0.1M二甲基胍酸钠缓冲液中,pH 7.2)中固定,在相同缓冲液中洗涤,并在1%四氧化锇水溶液中后固定1h。然后将样品通过一系列乙醇和随后的环氧丙烷脱水,并包埋在Eponate 12(Ted Pella)中。将薄片在切片机(Ultracut E;Reichert)上切片,用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染

色,并在显微镜(CM12;Philips)中检查。用可收缩的数字照相机(MultiScan;Gatan)捕获图像。

[0231] ApoL1加速小鼠模型中的肾脏疾病的进展

[0232] 单独的ApoL1表达不会诱导进展至末期肾病(ESRD)。在25周龄之前,在表达ApoL1的G0变体或ApoL1的G2变体的转基因小鼠中的尿蛋白水平是正常的,且白蛋白与肌酸酐之比落到5的值以下(将白蛋白浓度归一化至肌酸酐水平; $n=3-9$ /基因型,且平均值是 $\pm$ SEM;图5)。多柔比星诱导的肾病是充分确立的慢性肾脏疾病的啮齿动物模型,其特征足于细胞损伤和随后的肾小球硬化、小管间质性炎症和纤维化(Lee和Harris,2011)。因此,我们在如上所述的我们的转基因模型中化学诱导了肾病。在一系列初步实验中,我们通过在8-12周龄的C57BL/6小鼠中的单次尾静脉注射施用了多柔比星。12或15mg/kg体重的剂量对尿蛋白没有影响(白蛋白与肌酸酐之比范围为5-15)(图6),且肾组织学在多柔比星治疗的小鼠和用PBS治疗的同胞仔对照中是不能辨别的(数据未显示)。20mg/kg的中间剂量在第11天之前诱导蛋白尿,但是ApoL1的存在没有影响(图6)。

[0233] 单次注射25mg/kg的多柔比星以后,在用多柔比星治疗的所有小鼠中尿蛋白在第2天之前突然升高,但是在基因型之间没有显著差异(图7A)。苏木精-曙红染色的肾组织指示可变的肾病表型。用多柔比星(图7B)或PBS(图7C)治疗的转基因阴性动物是不能辨别的且不会表现出肾病。但是,表达ApoL1的G0变体(图7D)或ApoL1的G2变体(图7F,G)的转基因小鼠表现出肾小管扩张、肾小管坏死、蛋白性脱落物(cast)和肾小管细胞萎缩。但是,并非所有转基因阳性小鼠表现出肾病(图7E),也没有观察到对肾小球的任何明显损伤。在这些研究中,我们观察到在治疗组中和特别在ApoL1表达阳性的那些中显著的重量减轻和死亡。

[0234] 由于减少的水合和血流可以导致更快速的肾衰退和过早死亡,我们在另外每天施用皮下流体的同时重复了较高剂量的多柔比星。这允许所有小鼠存活直到第21天研究结束时。在研究结束时,与ApoL1的G0变体转基因小鼠(10%)或转基因阴性动物(11%)相比,用多柔比星治疗的小鼠具有17%的显著重量减轻(图8)。在第11天在表达G2变体的转基因小鼠中尿白蛋白也显著升高,具有6609的平均白蛋白与肌酸酐之比,比转基因阴性小鼠高5.2倍($p=0.002$)。蛋白尿在第18天在这些小鼠中保持较高,具有6146的平均白蛋白与肌酸酐之比,比治疗的转基因阴性动物高3.9倍($p=0.02$)。尿白蛋白在多柔比星治疗的表达ApoL1的G0变体的转基因小鼠中没有明显更高,但值是多柔比星治疗的转基因阴性动物和表达G2变体的小鼠之间的中间值(表达ApoL1的G0变体的转基因小鼠中的平均白蛋白与肌酸酐之比在第11天是2768和在第18天是2880)。PBS治疗的对照保持正常(图9)。此外,TEM分析揭示了PBS治疗的小鼠中足细胞向规则分布的足突的确立,而用多柔比星治疗的动物表现出足细胞足突消失,这是蛋白尿性肾小球疾病的不变特征(图10)。如上所述执行TEM分析。

[0235] 为了评估升高的尿白蛋白值是否与多柔比星治疗的肾中的组织病理学相关,将小鼠在多柔比星治疗以后第21天取下,并用苏木精和伊红(H&E)、过碘酸-希夫(PAS)和Masson氏三色染料染色。定性地,苏木精-曙红将蛋白和细胞核染色,PAS将基膜染色,而三色将间质性纤维化和基膜染色。尽管所有多柔比星治疗的动物表现出一些病变,但是基因型之间的差异是在病变的严重程度和分布上,而不是在病变本身,并且表达ApoL1的G0变体的多柔比星治疗的转基因小鼠表现出转基因阴性和ApoL1 G2转基因小鼠的中间病理学表型。苏木精-曙红染色的肾的低放大率图像表现出相对于PBS治疗的小鼠的分级损伤进展(图11A),

在非转基因小鼠中的损伤是最小量(图11B),在表达ApoL1的G0变体的转基因小鼠中是中等(图11C),且在表达ApoL1的G2变体的转基因小鼠中是最严重的(图11D),在方案中,在第0天静脉内递送单次剂量的多柔比星,在第21天取下,并每天施用皮下流体以防止脱水(图11E)。用H&E(图11F-J)、过碘酸-希夫染料(图11K-O)和Masson氏三色染料(图11P-S)染色的多柔比星治疗的肾的较高放大率证实,与正常的肾小球(图11F、K、P)相比,多柔比星治疗的动物呈现FSGS(图11G-J,L-O,Q-S)。Bowman氏空间被扩张并填充蛋白性流体(图11H,星);存在主要由淋巴细胞构成的轻度小管间质性浸润(图11I,白色asterix);蛋白积累在扩张的近侧小管中(图11O,十字);且在近侧上皮细胞的细胞质中存在透明(蛋白)微滴的积累(图11O,黑色箭头)。病理学评分表明,与转基因阴性对照或表达ApoL1的G0变体的小鼠相比($p=0.03$),在表达ApoL1 G2的多柔比星治疗的小鼠中存在显著更大的损伤($p=0.00034$)(图11T)。

[0236] 在所有多柔比星治疗的小鼠中,蛋白性流体存在并扩大Bowman氏空间。存在局灶性节段性肾小球硬化,其不定地影响全肾内的肾小球簇。近侧小管扩张并填充蛋白性流体和蛋白脱落物(casts),且近侧上皮细胞的细胞质填充蛋白小球。在遍布肾的多个病灶中,存在主要由淋巴细胞构成的轻度小管间质性浸润。应用下述分级系统来确定肾的病理学表型,以便评估ApoL1介导的肾病的进展。在0-4量表上分级肾的四种主要结构。0代表正常且4代表严重变化。对于每只动物检查至少10个肾小球。总分级是基于所有变化的一般印象,并考虑受影响的适当结构在整个切片中的比例。如下为每个组分分级变化:

[0237] 1. 肾小球-大小、小叶、粘附力、簇的纤维化、Bowman氏胶囊的纤维化、膨胀、毛细血管变窄、基膜增厚、在Bowman氏空间中的蛋白、增加的细胞构成(肾小球系膜的或内皮的)、白细胞浸润、毛细管血栓

[0238] 2. 小管-萎缩、坏死、空泡和透明微滴变化、基膜增厚、膨胀、炎症细胞和腔中的脱落物(casts)

[0239] 3. 间质组织-纤维化、水肿、急性和慢性白细胞浸润

[0240] 4. 微动脉-纤维化、血栓形成、透明变化和变窄

[0241] 用较大的动物组群执行一个单独的研究。在第0天静脉内(IV)递送单次剂量的多柔比星,在第28天取下,并每天施用皮下流体以防止脱水(图12A)。归一化至肌酸酐水平的尿白蛋白在ApoL1 G2变体中升高,且与转基因的阴性对照相比($p=0.05$,图12B)。与表达ApoL1的G0变体的小鼠的升高的尿白蛋白值和疾病进展有关的组织病理学是表达ApoL1的G2变体的小鼠的中间值,且与转基因的阴性对照进行对比。病理学评分指示,与转基因的阴性对照相比,在多柔比星治疗的表达ApoL1的G0变体($p=0.003$)或ApoL1的G2变体($p=0.0005$)的小鼠中存在显著更大的损伤(图12C)。与以前的研究相一致,尿白蛋白在表达ApoL1的G2变体的转基因小鼠中在第18天显著升高,具有5964的平均白蛋白与肌酸酐之比,比转基因阴性小鼠高2倍($p=0.05$)。尽管尿蛋白尿的升高在表达ApoL1的G0变体的小鼠中与非转基因动物相比不是显著的,在28-天研究结束时的病理学评分指示与转基因阴性动物相比疾病的显著进展,其为转基因阴性动物和表达ApoL1的G2变体的转基因小鼠的中间值。

[0242] 实施例5:ApoL1腺病毒递送

[0243] 使用腺病毒表达ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体。Vector

BioLabs将ApoL1变体克隆进腺病毒载体中,生产,并滴定。在每只小鼠中在D(-) 2和D14通过尾静脉注射用 1×10^8 Pfu (在无菌PBS中调至100 μ l) 实现腺病毒递送。如上所述在D0执行多柔比星诱导的肾病(参见实施例4)。每天施用皮下流体以防止脱水,在第D11和D18收集尿并在第28天取下(图13A)。归一化至肌酸酐水平的尿白蛋白在ApoL1的G0变体($p=0.05$)和G1($p=0.03$)变体中显著升高,且与转基因的阴性对照相比(图13B)。与升高的尿白蛋白值和病理学评分相关的组织病理学揭示,与转基因的阴性对照相比,在表达ApoL1的G0变体($p=0.004$)、ApoL1的G1变体($p=0.000085$)和ApoL1的G2变体($p=0.03$)的小鼠中观察到显著更大的损伤(图13C)。ApoL1的水平在大多数注射了腺病毒构建体的小鼠中较高。在尿分析和病理学评分中仅包括在第一次注射以后表达ApoL1的动物(图13D)。相对于作为对照的表达触珠蛋白相关蛋白(HPR)的小鼠显示了ApoL1变体的作用。HPR是对人类特异性的血清分泌型蛋白,且通常不在小鼠中表达。总之,ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体递送的ApoL1向肝的腺病毒表达证实,ApoL1的血清学表达会加速肾脏疾病的进展。

[0244] 实施例6:制备识别ApoL1的抗体

[0245] 通过任何标准杂交瘤方法,包括、但不限于,给小鼠或仓鼠注射重组ApoL1蛋白(G0、G1和G2),产生针对G0、G1和G2变体的单克隆抗体。另外,对小鼠进行在合适递送载体(pCAGGS)中编码ApoL1或它的G1和G2变体的DNA序列的流体动力学递送。

[0246] 如下所述执行抗体筛选。在原始抗原上使用标准的ELISA选择阳性杂交瘤。因此,将包被了ApoL1 G0、G1或G2(具有N-端his或FLAG表位标签的氨基酸D61-L398)的Maxisorp®平板封闭,结合至杂交瘤上清液并用HRP—缀合的抗-小鼠检测。

[0247] 然后,执行SRA(血清抗性相关的蛋白)封闭ELISA,以鉴别阻止ApoL1的SRA-相互作用结构域与SRA的结合的抗体,因为该亮氨酸拉链区域也可能介导与其它仍然有待鉴别的蛋白的结合以介导肾机能障碍。对于封闭ELISA,将ApoL1-FLAG包被的平板封闭,并与预结合至抗体上清液的SRA-his一起温育。用HRP—缀合的抗-his标签抗体和TMB底物检测在有SRA-his(即非-SRA-ID封闭抗体)存在下的任何抗体结合。

[0248] 随后,使用人血清的ApoA1-ApoL1夹心ELISA鉴别能够识别血清的HDL颗粒内的ApoL1的抗体。为此目的,将Maxisorp®平板用多克隆山羊抗-ApoA1抗体包被,封闭,并在不含去污剂的缓冲液(以维持HDL颗粒完整性)中与人血清一起温育以捕获HDL颗粒。然后将抗-ApoL1单克隆温育,并用HRP抗-小鼠检测任何结合的抗体。如果必要的话,可以在人ApoL1 G1和/或G2血清上进一步试验阳性抗体。

[0249] 接着,通过标准交叉-封闭ELISA执行表位结合。为此目的,可以使用任何标准方法,诸如第一抗体与重组ApoL1的结合,随后与生物素化的第二抗体一起温育,并用抗生物素-链霉亲和素-HRP检测以确定哪些抗体竞争相同的ApoL1表位。

[0250] 对于表位作图,将在它们的表面上稳定地表达可诱导的ApoL1或其片段(通过C-端工程改造的糖基磷脂酰肌醇锚)的CHO细胞与杂交瘤上清液一起温育,随后与Alexa647抗-小鼠一起温育,以鉴别它们结合哪些结构域。使用ApoL1(具有N-端单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)表位标签,包括它的信号序列和C-端糖基磷脂酰肌醇锚以将它锚定至细胞表面)慢病毒制备以多西环素可诱导的方式稳定地表达ApoL1 G0、G1或G2全长或结构域片段的CHO细胞从而克服毒性问题。使用下述构建体:全长=D610-L398;形成孔的结构域+膜定位的结构域=氨基酸D61-E308;膜定位的结构域+SRA-相互作用结构域=G231-L398;仅SRA-ID=

R305-L398。

[0251] 关于ApoL1活性的基于细胞的测定包括以下：

[0252] a) 膜电位测定，其使用多西环素-可诱导的表达TRPC6的、用卡巴胆碱刺激的稳定293细胞。在有抗-ApoL1抗体存在下测定ApoL1的任何作用（在有或没有podocin表达存在下）以鉴别抑制ApoL1对TRPC6信号传递的作用的任一种。

[0253] b) 在有抗-ApoL1抗体存在下测定重组ApoL1对人永生化的足细胞的肌动蛋白细胞骨架（Alexa鬼笔环肽染色）的任何作用以确定任一种是否抑制ApoL1的作用。

[0254] c) 腺病毒表达的ApoL1（特别是G1变体）破坏人永生化的足细胞的溶酶体完整性，如使用胞饮细胞染料（荧光黄CH）和酸示踪剂Lysotracker Red所评估的。理想地，使用来自被感染的足细胞的条件培养基从而使与抗-ApoL1抗体一起的预温育能够鉴别抑制对溶酶体的作用的任一种。

[0255] 在体内效力模型中试验了针对不同结构域的潜在候选抗体，即针对它们在ApoL1（G0、G1和G2）转基因小鼠中抑制ApoL1增强的多柔比星诱导的蛋白尿的能力。在体内试验了来自不同表位的候选抗体，优选阻断SRA结合或基于细胞的测定之一的那些。如上所述给表达ApoL1的G0变体、ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体的转基因小鼠施用多柔比星以诱导肾病，如通过蛋白尿（尿中增加的白蛋白：肌酐比率）所评估的。如本文证实的，ApoL1的G0变体与非转基因小鼠相比增加蛋白尿，且ApoL1的G2变体具有甚至更大的作用。监测针对ApoL1的抗体逆转这种ApoL1介导的蛋白尿增加的能力。

[0256] 用于体内活性的PD标志物还包括监测血清ApoL1水平以确定含有ApoL1的HDL颗粒是否被消除。因此，使用本文描述的ApoL1转基因小鼠模型，在抗体施用以后在适当的间隔抽取血液用于通过夹心ELISA评估ApoL1水平以确定ApoL1是否从循环中消除。将兔多克隆ApoL1包被在平板上，封闭，并在有去污剂存在下与小鼠血清一起温育，并用针对非竞争表位的生物素化的兔多克隆ApoL1检测。用抗生蛋白链菌素-HRP检测结合，并与重组ApoL1标准品进行对比以确定相对血清水平。

[0257] 尽管为了清楚理解的目的已经通过具体说明和实施例对前述发明进行了比较详细的描述，但是所述描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容明确地通过引用以它们的整体并入。

[0258] 实施例7：制备和表征ApoL1抗体

[0259] Ribi佐剂来自Sigma（目录号6322），完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂（CFA/IFA）来自Becton Dickinson（BD，目录号231141/263910），在Toll Like受体（TLR）-混合液中使用的佐剂是来自Invivogen（目录号tlrl-1826-1）的CpG、来自Invivogen（目录号tlrl-r848）的R848、来自Invivogen（目录号vac-pic）的聚I:C和来自Sigma（目录号L6895）的单磷酸脂质A（MPL），ClonaCell-HY培养基B（目录号03802）、培养基C（目录号03803）、培养基D（目录号03804）和培养基E（目录号03805）来自StemCell Technologies。用于电融合的Cytofusion Medium C（目录号LCM-C）来自Cyto Pulse Sciences。山羊抗-小鼠IgG Fc辣根过氧化物酶缀合的抗体来自Sigma（目录号A2554）。3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）电导率单组分HRP微孔底物（目录号TMBW-1000-01）和TMB终止试剂（目录号BSTP-1000-01）来自BioRx Laboratories。

[0260] 体内免疫接种

[0261] 关于流体动力学尾静脉注射 (HTV) 免疫接种, 通过尾静脉注射以 2.0ml 的总体积在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中用与 1 μ g GM-CSF 混合的 50 μ g/小鼠的 ApoL1 G1 或 G2 DNA 构建体 (在下面表 3 中描绘的序列) 免疫 BALB/c 小鼠。每 2 周执行注射, 共 6 次注射。

[0262] 关于蛋白免疫接种, 取决于佐剂, 每只小鼠用 10 或 50 μ g/注射的重组人 ApoL1 G0 (氨基酸 D61-L398) 免疫 BALB/c 小鼠。关于 Ribi 佐剂 (Sigma) 和 TLR-混合液佐剂 (10 μ g CpG+10 μ g 聚 I:C+20 μ g R848+50 μ g MPL), 可替换地腹膜内地 (IP)、皮下地 (SC) 或在尾巴根部 (BOT) 以 3-4 天间隔注射在 100 μ l 佐剂/小鼠中的共 10 μ g 抗原, 共 16 次注射。关于 CFA/IFA 佐剂, 每 2 周腹膜内地 (IP) 注射在 100 μ l 佐剂/小鼠中的 50 μ g 抗原, 共 7 次增强。最终的融合前 (pre-fusion) 注射以后 3 天, 收获来自小鼠脾和淋巴结的淋巴细胞。

[0263] 融合和 ELISA 筛选

[0264] 使用 Cyto Pulse CEEF-50 设备 (Cyto Pulse Sciences) 使分离的小鼠淋巴细胞与 PU-1 骨髓瘤细胞 (美国典型培养物保藏中心) 融合。用 Cytofusion Medium C 洗涤 2 次以后, 将分离的淋巴细胞和 PU-1 细胞以 1:1 比率混合, 并然后以 1000 万个细胞/ml 再悬浮在 Cytofusion Medium C 中。根据生产商的说明书执行电融合。将融合的细胞在 7% CO₂ 培养箱中在 ClonaCell-HY Medium C 中在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日, 将融合的细胞离心, 并然后再悬浮于 10ml ClonaCell-HY Medium C 中, 并然后与 90ml 基于甲基纤维素的 ClonaCell-HY Medium D 一起轻轻混合。将细胞铺板在 Omni 盘 (目录号 10026, Nunc) 中, 并允许在 7% CO₂ 培养箱中在 37 $^{\circ}$ C 生长。温育 6-7 天以后, 用 ClonePix FL (Genetix, 英国) 挑取单个杂交瘤克隆并转移进含有 200 μ l/孔的 ClonaCell-HY Medium E 的 96-孔细胞培养板 (#353075, Becton Dickinson) 中。培养 6-7 天以后, 通过 ELISA 筛选杂交瘤上清液。还将针对 ApoL1 G0 的所有 ELISA 阳性克隆的上清液收集用于流式细胞计量术测定。

[0265] 如下执行 ELISA 测定。以 100 μ l/孔的终体积用在 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 中的 1 μ g/ml 的 ApoL1 G0、G1 或 G2 在 4 $^{\circ}$ C 包被 96-孔微量滴定 ELISA 平板 (Greiner, 德国) 过夜。用洗涤缓冲液 (0.05% 的吐温 20 在 PBS 中的溶液, Sigma) 洗涤 3 次以后, 将平板用 200 μ l 含有 BSA 的 ELISA 测定稀释剂封闭。加入 100 μ l 培养的上清液或稀释的纯化的 mAb 并在室温温育 1 小时。将平板洗涤 3 次并与 HRP 缀合的山羊抗-小鼠 IgG Fc 一起温育 1 小时。洗涤 3 次以后, 通过以 100 μ l/孔的终体积加入 TMB 底物 (BioFX Laboratories, MD, USA) 5min, 检测结合的 HRP。通过加入 100 μ l/孔的停止试剂 (BioFX, Laboratories, MD, USA), 停止反应。在 Sunrise Tecan 平板读数器上检测 OD₆₃₀。

[0266] mAb 纯化和同种型确定

[0267] 通过蛋白 A 亲和色谱法纯化杂交瘤上清液, 然后无菌过滤 (0.2 μ m 孔径, Nalge Nunc International, NY, USA) 并在 4 $^{\circ}$ C 在 PBS 中保存。在功能测定中进一步试验之前, 通过 ELISA 证实纯化的 mAb 与 APOL1 的结合。

[0268] 通过小鼠单克隆抗体同种型确定试剂盒 (Roche Diagnostics), 确定纯化的 mAb 的同种型。

[0269] 细胞系和构建体

[0270] 全长 APOL1 蛋白可以细分成 4 个结构域 (图 14): 信号序列, 1-27 氨基酸 (aa), 形成孔的结构域 (PFD), 60-235 氨基酸, 膜定位的结构域 (MAD), 240-303 氨基酸, 和 SRA-相互作用结构域 (SRA-ID), 339-398 氨基酸 (图 14A)。由于 APOL1 过表达经常是有毒的, 通过病毒感染制

备稳定的多西环素-可诱导的表达APOL1的CHO细胞。为了模仿生理学上分泌的APOL1,制备了表达并分泌全长ApoL1的G0变体(野生型)或ApoL1的G1变体或ApoL1的G2变体的CHO细胞。

[0271] 由于不确定这些细胞是否可用于通过流式细胞计量术(FACS)评估抗体结合(由于APOL1分泌),还制备了表达锚定GPI的APOL1的细胞(图14B)以确保所述蛋白的细胞表面表达,尽管可能以不同于天然APOL1的构象。另外,锚定GPI的构建体具有被gD(HSV糖蛋白D)表位标签(和HSV信号序列)替代的APOL1的前60个氨基酸(其不存在于其它ApoL家族成员中且不是ApoL1活性所必需的)以证实表达和实现抗体结合的标准化。此外,为了通过FACS将抗体映射至三个APOL1结构域(PFD、MAD或SRA-ID),还制备了仅表达APOL1结构域中的一个或两个(通过GPI锚附着于细胞表面,具有在N-端处的gD)的CHO细胞(图14C-E)。

[0272] 如下制备细胞系。通过定位诱变(全长和截短)制备ApoL1的G0变体(WT,异形体a, NM_003661.3)、ApoL1的G1变体(S342G, I384M)和ApoL1的G2变体(Δ N388, Y389)的APOL1构建体,并使用pENTR Directional TOP0克隆试剂盒(K2400-20)亚克隆进Gateway进入载体中。制备非锚定GPI的和单纯疱疹病毒糖蛋白D锚(gD)-标记的和锚定GPI的构建体,并使用Gateway LR II重组亚克隆进多西环素-可诱导的慢病毒表达质粒pInducer20中。通过DNA测序验证构建体并用于使用pInducer系统制备编码全长或截短的ApoL1的慢病毒。为了制备稳定的可诱导的表达ApoL1的CHO细胞,将慢病毒接种到CHO细胞上,培养72h,并然后使用G418选择。定期通过ELISA估计培养基中的病毒P24蛋白直到它不再是可检测的。在实验分析之前,用5 μ g/ml的多西环素诱导ApoL1的表达48h。

[0273] 流式细胞计量术

[0274] 通过FACS分析19种单克隆抗-APOL1抗体对全长ApoL1的G0变体(野生型)、ApoL1的G1变体或ApoL1的G2变体的结合以估计交叉反应性。所有抗体结合ApoL1的G0变体以及结合ApoL1的G1变体和ApoL1的G2变体二者,如平均荧光强度(MFI)所指示的(图15)。

[0275] 为了映射每种抗体的结合结构域,在表达ApoL1的G0变体的截短形式的细胞上执行FACS分析。在制备的19种抗-APOL1抗体中,12种是PFD-特异性的,1种是MAD-特异性的,5种是SRA-ID特异性的,且1种被视作证实敏感的结合剂,即它结合非直线表位。

[0276] 如下文中所述执行流式细胞计量术分析。将用5 μ g/ml多西环素诱导48h的ApoL1-CHO细胞用在PBS中的5mM EDTA收获,用CHO培养基洗涤(在G6-SR离心机中在1200rpm旋转10分钟),并在PBS中再次洗涤。将大约 0.5×10^5 细胞/样品与1 μ g/mL的在PBS中的抗体一起在冰上温育60分钟。然后将细胞如上通过离心进行收集,用FACS缓冲液(PBS+3%胎牛血清)洗涤3次,并然后再悬浮,并与2 μ g/mL的在PBS中的Alexa Fluor®488-缀合的山羊抗-小鼠/抗兔(H+L) IgG一起在冰上温育60分钟。然后将细胞如上洗涤并再悬浮于含有碘化丙啶(PI)的PBS中,并使用荧光激活细胞分选术(FACS)流式细胞计(FACSCalibur™, BD Biosciences)分析。测量每个样品的平均荧光强度(MFI)。使用FlowJo软件(v8.4.5)分析数据。然后在从单独的第二抗体减轻背景信号以后,将MFI输出进MS Excel中并绘图。

[0277] 锥虫测定

[0278] 基于以下假设产生基于锥虫的功能测定:ApoL1介导的肾脏疾病进展机制可能与APOL1的裂解锥虫的能力有关。布鲁斯锥虫布鲁斯亚种是被APOL1裂解的锥虫的人血清敏感物种。因此,针对它们的阻断APOL1介导的正常人血清(NHS)的裂解的能力筛选了本文描述的单克隆抗-APOL1抗体。在有1%NHS存在下以细胞生存力的方式测量了阻断活性。抗-

ApoL1抗体在该测定中在1 μ g/ml的浓度具有从28%至49%范围内的阻断活性(图16)。

[0279] 如下所述执行锥虫测定。在来自ATCC的适当允许下得到布鲁斯锥虫布鲁斯亚种(Lister 427 VSG 221)并在改进的HMI-9培养基(ATCC#PRA-383)中培养,每周传代至少3次。不允许锥虫生长至完全汇合以确保它们保持在增殖而不是矮胖形式。关于阻断测定,在96孔透明板中在有或没有1.0 μ g/ml抗-ApoL1抗体存在下将大约0.5 $\times 10^5$ 布鲁斯锥虫布鲁斯亚种与1%正常人血清(NHS)一起在37℃温育20h。随后,加入10 μ l AlamarBlue®(Invitrogen目录号DAL1025)并在4-6小时以后在530激发/590发射在荧光计中读出细胞生存力。使用SoftmaxPro分析数据。将相对荧光单位(RFU)值输出进MS Excel中用于绘图。

[0280] 表3

[0281]

名称	序列
来自开放读码框的 ApoL1 G0 DNA 序列 (SEQ ID No:18)	atggaggaggagctgctttgctgagagtctctgtcctctgcatctggatgagtgcaactttcc ttggtgtgggagtgagggcagaggaagctggagcagggtgcaacaaaacgttcca agtgggacagatactggagatcctcaagtaagccctcggtagctgggctgctggc accatggaccagagagcagtatctttattgaggatgccattaaagtatttcaaggaaaa gtgagcacacagaatctgctactcctgctgactgataatgaggcctggaacggattcgt ggctgctgctgaactgccaggaatgaggcagatgagctccgtaaaagctctggacaa ccttgcaagacaaatgatcatgaaagacaaaaactggcacgataaaggccagcagta cagaaactggtttctgaaagagtttctcctcggtgaaaagtaagcttgaggataacataag aaggctccgtgcccttgagatggggttcagaagggtccacaaaggcaccaccatcgc caatgtggtgtctggctctcagcatttctctggcactcctgacctcgtcggcatgggt ctggcacccttcacagaggaggcagccttgactcttggaacctgggatggagtgg gaatcacagcagctttgaccgggattaccagtagtaccatagactacggaaagaagtg gtggacacaagcccaagcccacgacctggcatcaaaagccttgacaaattgaagga gggtgaaggagttttgggtgagaaatataccaactttcttcttagctggcaatactacc aactcacacgaggcattgggaaggacatccgtgccctcagacgagccagagccaat cttcagtcagtaccgcatgcctcagcctcagcggggggtcactgagccaatctcag ctgaaagcgggtgaacaggtggagagagtaataaaccagcctcctggaaatgagca gaggagtcaagctcacggatgtggccctgtgaagcttcttctgtgctggatgtagtct acctgtgtacgaatcaaagcacttacatgagggggcgaagtcagagacagctgagg agctgaagaagggtgctcaggagctggaggagaagctaaacatttcaacaataatta taagattctgcaggcggaccaagaactg
ApoL1 G0 DNA 构建体的整 个序列 (SEQ ID No:19)	gtcgacattgattattgactagttattaatagtaataaattacgggggtcattagttcatagcc catatatggagttccggttacataacttacggtaaatggcccgcttgctgaccgccc aacgacccccgccaltgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagg gactttccattgacgtcaatgggtggagttattacgglaaactgccacttggcagta tcaagtgtatcatatgccagtagcggccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccg cctggcattatgccagtagacgttattgggacttctacttggcagtagcatctacgt attagtcacgctattaccatggctgaggtgagcccccacgttctgcttactctccccatc tccccccctccccaccccccaattttgtattatttttttaattattttgtgcagcgatggg ggcggggggggggggggggggggcgccgaggggggggggggggggggggggagggg ggg tccgaaagtctctttatggcaggcggcgccggcgggggggggggggggggggggggg ggcgg cgccgctctgagccggccggccggggggggggggggggggggggggggggggggggg

[0283]

ctccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctcccttgggcgcctcccc
 gcctggacttcgagctcggtagcatcagccctcgaactgtcccttagtgccagccatct
 gttgtttgccccctccccgtgcttccctgacctgggaagggtgccactcccactgtccttt
 cctaataaaatgaggaaattgcatcgactgtctgagtaggtgtcattctattctgggggg
 tgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcccagctttg
 tcccttttagtgagggttaattgcgcgttggcgtaatcatggtcatagctgttctctgtgt
 gaaattgtatccgctaattcactcctcagggtgcagggtgcctatcagaagggtgtgtgt
 ggtgtggccaatgccctggctcacaataaccactgagatcttttccctctgccaaaaatt
 atggggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaggaaatttatftt
 cattgcaatagtgtgttggaaatttttgtgtctctcactcgggaaggacatatgggagggca
 aatcatttaaacatcagaatgagfatttggtttagagtttggcaacatatgcccatatgtct
 ggctgccatgaacaaagggttggctataaagggtcatcagtatatgaaacagccccct
 gctgtccattcctattccatagaaaagccttgacttgagggttagattttttatatttggttt
 gtttattttttttaaactcctaaaatttcttacctgtttactagccagatttttctct
 ctctgactactcccagtcatagtctgctctcttcttcttggagatccctcgactgcag
 cccaagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctctgtgtgaattgttatccgctcaca
 attccacacaacatacagcgcgggaagcataaagtgtaaaacctgggggtgcctaatga
 gtgagctaaactcaattaattgcgttgcgctcactgcccgctttccagtcgggaacactg
 tctgtccagcgggaaccgatctcaattagtcagcaaccatagtcgccgccctaaactcc
 gccatccccgccctaactcggcccagttcggccattctcggccccatggtgtactaa
 tttttttttatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtgtg
 aggaggtcttttggaggcctaggctttgcaaaaagctaactgtttattgcagettataa
 tggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttctactgcatt
 ctagtgtgtgttgcacaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggaaccgctgcattaatg
 aalcggccaacgcgcggggagaggcgggttgcgtattgggcgctctccgcttctcgc
 ctactgactcgtgcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtc
 aggcggtatatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgag
 caaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggtgtgtggcgttttcc
 ataggctcgcggccctgacgagcatcacaataacgacgctcaagtcagaggtggc
 gaaaccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctgggaagctccctctgtgcg
 ctctctgttccgacctgcggttaccggatacctgtccgcttctcctcctcgggaag
 cgtggcgcttctcatagctcagctgttagglatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcc
 aagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgcagcgtcgccttatccggta
 actatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgactatcggcactggcagcagccact
 ggtaacaggattagcagagcgaggatgttagggcgtgtctacagagttcttgaaagtgt
 ggctaaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgtcgtctgtgaagcca
 gttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaaccacgctggtag
 cgggtgttttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaag
 atectttgatcttttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaaactcacgttaaggga
 ttttggctatgagattataaaaaaggatcttaccctagatccttttaattaaaaatgaagt
 tfaaatcaatcctaagfatatagagtaaaacttgggtctgacagttaccaatgcttaacagt
 gaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttccatccatagttgcctgactccccgtct
 gtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccg
 cgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagg
 gccgagcgcagaaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagctatfaattgttgc
 cgggaagctagaglaagtagtccagttatagtttgcgcaacgttgttgcattgtct
 acaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggtaggttctcattcagctccggttccaa
 cgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgcgcaaaaagcgggttagctccttcgg
 tctccgagctgtgtcagaagtaagttggccgaggttatactcatggttatggcagc
 actgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgaciggtgagtactc
 aaccaagtcatctgagaatagtgtatcgggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaa

[illegible]

[0285]

gggccgcctcgggcccgggagggctcgggggaggggcgcggcggccccggga
 gcgccggcggtgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgctttatgttaatcgt
 gcgagagggcgaggacttcttgcctaaatctgtcggagccgaaatctggga
 ggcgcgcgcgaacccctctagcgggcgcggggcgaagcggtgcggcgccggca
 ggaaggaaatggcggggaggccttcgtcgtcgcgcgcgcgcgccttctc
 cctctccagcctcggggtgtcgcggggggacggctgccttcgggggggacggg
 gcagggcggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagagcctctgtaacc
 atgttcattgccttcttcttctacagctcctgggcaacgtgctgtgtgtgtctca
 tcattttggcaaaagacttcggtaccgcgggcccgggacccacatggaggagctgct
 ttgctgagagtctctgtcctctgcactctggatgagtgacatttcttctgtgtgggagtga
 gggcgagaggagctggagcgagggtgcaacaaacgttccaagtgggacagatact
 ggagatcctcaaagtaagccctcgggtgactggcgtgctggcaccatggaccagag
 agcagtatcttattgaggatgccattagtaattcaaggaaaaagtgcacacagaat
 ctgctactcctgctgactgataatgaggcctggaacggattcgtggcgtgctgaact
 gccaggaatgaggcagatgagctcgttaaagctcggacaacctgcgaagacaat
 gatcatgaaagacaaaactggcacgataaaggccagcagtaagaaactggttctg
 aaagagtctcctcgggtgaaaagtaagcttgaggataacataagaagctcgtgccct
 tgcagatgggggtcagaaggctccaaaaggcaccaccatcgccaatgtggtgtctgg
 ctctctcagcatttctctggcatcctgaccctcgtcggcatgggtctggcaccttcac
 agagggaggcagccttgactcttggaaacctgggatggagtgggaalcacagcagc
 ttgaccgggattaccagtagtaccatagactacggaaagaagtgggtggacacaagcc
 caagcccagcagctggtcatcaaaaaccttgacaaattgaaggagggtgaaggagtttt
 gggtgagaacatatacaacttcttcttagctggcaatacttacaactcacagagg
 cattgggaaggacatcgtgccctcagacgagccagagccaatcttcagtcagtaacc
 gcatgcctcagcctcagcgcgcgcgggtcactgagccaatctcagctgaaagcggtga
 acaggtggagagagttaataaccagcctcgtgaaatgagcagaggagtcagct
 cacggatgtggccctgtaggcttcttctgtgtgtggtgtgtctacctcgtgtacgaa
 tcaagcacttacatgaggggggcaagtcagagacagctgaggagctgaagaaggt
 ggctcaggagctggaggagaagctaaacatgctcaacaataattataagattctgcag
 gcggaccaagaactgtgagggaattcgtgagcggcgcatgatcagctggatgcac
 gatcacgcgtaccgggtcgtcaggtaccgatgaatagctaaggctgagggcgaggt
 aagtataaggttacagacaggttaaggagaccaatagaaactggccttctcagaga
 cagagaagactcttgcgttctgataggcacctattggttactgacatccactttgcct
 tctctcacaggtgtcgacaataacctctggattacaaaattgtgaagattgactggt
 attcttaaciatgttctcctttacgtatgtggatagctgctttaaattgcttgcacatgc
 tattcttccgtatggcttcttctctctctctcttataaatcctggtgtgtctcttataga
 ggagtgtgtggccgtgtcaggaacgtggcgtggtgtgcactgtgttctgacgcaa
 cccccactggttggggcatggccaccacctgtcagccttccgggacttctgcttcc
 cctccclattgccacggcggaactcagcgcgcctgacctgcccgtgtgtgacagg
 ggctcggctgttgggcaactgacaattccgtgtgtgtgtcggggaagctgacgtcttct
 catggctgtcgcctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcc
 ctccggccctcaatccagcggaaccttctcccgccgtgctgcggcctctgcgcct
 ctccgcgtcttctgccttgcctcagacgagtcggatctccttggggcgctctccc
 gcttggaactcagctcgttacgatcagcctcactgtgcttctagttgccacatct
 gttgttgccttccccctgcttcttgcacctggaagggtgccactccactgcttct
 cctaataaaatgaggaaatgcatcgatgtctgagtaggtgtcattcttcttggggg
 tggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcccagcttctg
 tccctttagtgagggttaattgcgcgttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgt
 gaaattgtatccgctaattcactctcaggtgcaggctgctatcagaagggtgtgtgt
 ggtgtggcaatgccctggctcacaataaccactgagatcttcttccctctgcacaaaat
 atggggacatcatgaagcccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttattt

[0286]

	cattgcaatagtggttggaatttttgtgtctctcactcggaggacatatgggagggca aatcafttaaaccatcagaatgagtatttggtaggttggcaacatatgcccatatgct ggctgccatgaacaaagggtggctataaagggtcatcagtatatgaaacagccccct gctgtccattccttattccatagaaaagccttgacttgaggtagattttttatatttgttt gtgtattttttctttaacatccctaaaattttcttacctgtttactagccagattttctct ctctgactactcccagtcatagetgtccctcttcttctttaggagatccctegacctgcag cccaagcttggcgtaatcatggctatagctgttctctgtgtgaaattgttatccgtcaca attccacacaacatacagccggagcataaagtgtaaagcctgggtgcctaataga gtgagctaactcacattaattgcgttgcgtcactgcccgtttccagtcgggaacctg tcgtgccagcgggaaccgcactcaattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactcc gcccattcccggccctaaactccggccagttccggccattctcggccccatggctgactaa ttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtatgtg aggaggctttttggaggcctaaggctttgcaaaaagctaactgtttattgcagctfataa tggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcaactgcatt ctagtgtgtgtgtgtccaaactcatcaatgtatcttatacatgtctggaaccgctgcattaatg aatcggccaacgcgcggggagaggcgggttggctattggggcgtctctccgttctctg ctcactgactcgtcgtcgtcgtcgttggctggtggcgagcgggtatcagctcactcaa aggcggtaatcaggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgag caaaaggccagcaaaaggccagggaaccgtaaaaaggcggctgtgctggcgttttcc ataggctcggccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtcagagggtggc gaaaccggacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcg ctctctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgctttctcccttcgggaag cgtggcgtttctcatagctcagctgtgtaggtatctcagttcgtgtaggtcgttcgtcc aagctgggtgtgtgacgaacccccgttcagcccgaccgtgcgcttatccggt aactatcgtcttgagtcacacccggtaagacacgacttatgccactggcagcagcca ctggtaacaggattagcagagcgggtatgtaggcgggtgtacagagttcttgaaagt gtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtagtctgctgctgtgaagc cagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaacaaaccaccgctggt agcgggtgggtttttgttgcagcagcagattacggcgcaaaaaaaggatctcaaga agatectttgatctttctacgggggtctgacgtcagtggaacgaaaactcacgttaagg gatttggctatgagattatcaaaaaggatcttcaactagatccttttaattaaaaatgaa gttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctgacagttacaaatgttaatca gtgaggcacctatctcagcgtatctgtctatctcgttccatagttgccgactccccgtc gtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgatac cgcgagacccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccggaa gggcccagcgcagaaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagcttattattgtt gccgggaagctagagtaagtgttgcagtaatagtttggcgcaacgttgttgccattg ctacaggcatcgtgtgtcagctcgtcgtttgtatggcttcattcagctccgggtccca acgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcgggttagctccttcg gtctccgatcgttgcagaaagtgtggcgcagtggttatcactcatggttatggcag cactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtact caaccaagtcattctgagaataggtatgcggcgaccgagttgctcttgcggggtca atacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtctcatattggaaaacg ttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgalgtaac cactcgtgcacccaactgalcttcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagca aaaacagggaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgtt gaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagc ggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcgcacatttccc gaaaagtgccacctgg
来自开放读码框的 ApoL1 G2 DNA 序列 (SEQ ID No:22)	atggaggaggagctgcttctgtgagagttctgtcctctgcactctggatgagtgcaactttcc ttggtgtgggagtgagggcagagggaagctggagcagggtgcaacaaacgttcca

[0288]

ttgctgagagtctctgtcctctgcatctggatgagtgacatttcttgggtgtgggagtga
 gggcagagggaagctggagcgaggggtgcaacaaacgttccaaagtgggacagatact
 ggagatctcctaaagtaagccctcggtgactgggctgctggcaccatggaccagag
 agcagtatctttattgaggatgccattaaagtattcaaggaaaaagtggagcacacagaat
 ctgctactcctgctgactgataatgaggcctggaacggattcgtggctgctgctgaact
 gccaggaatgaggcagatgagctccgtaaagctctggacaaccttgcaagacaaat
 gatcatgaaagacaaaactggcacgataaaggccagcagtagaagaaactggttctg
 aaagagtctcctcggtgaaaagtaagctgaggataacataagaaggctccgtgacct
 tgcagatggggttcagaaggccacaaaggcaccaccatcgccaatgtggtgtctgg
 ctctctcagcatttctctggcactcgaacctcgtcgcatgggtctggcacccttcac
 agaggggagggcagccttgactcttggaaacctgggatggagtgggaatcacagcagc
 ttgaccgggattaccagtagtaccatagactacggaaagaagtgggtggacacaagcc
 caagcccacgacctggatcaaaaagccttgacaaattgaaggagggtgaaggagtttt
 ggggtgagaacatataccttcttctcttagctggcaattacttccaaactcacacagg
 cattgggaaggacatccgtgacctcagacgagccagagccaatcttcagtcagttacc
 gcatgctcagccctcacgcccccggtgactgagccaatctcagctgaaagcggtga
 acaggtggagagaggttaataaagccagcactctggaaatgagcagagggtcaagct
 cagggatgtggccctgtaagcttcttctgtgctggatgtatgtactcctggtacgaa
 tcaaaagcatttacatgagggggcaaaagtcagagacagctgaggagctgaagaaggt
 ggctcaggagctggaggagaaagctaaacattcacaataagattctgcaggcggga
 ccaagaactgtgaggggaattcgtgagcggccgcatgacagctggatgcatgatca
 cgcgtaccgggtgctcaggtaccgatgaatagctaaaggtcagggccgaggttaagta
 tcaaggttacaagacaggttaagggagaccaatagaagctgggctgtgcagacagag
 aagactcttgcttctgtagggcacctattgggtctactgacatccacttgccttctctc
 cacaggtgtcgacaatcaacctctggattacaaaattgtgaagattgactggattctt
 aactatgttgcctctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattg
 ctcccgatggctttcatttctcctctgtataaatctggtgtgctgctctttatgaggag
 ttgtggcccggtgtagggcaacgtggcggtgtgactgtgttctgacgcaacccc
 caetgggtggggcattgccaccactgtagctccttccgggacttctgcttcccccctc
 cctattgccacggcggaatcctcgcgcctgacctgcccgtgctggacaggggctc
 ggctgtgggcactgacaattccgtgtgtgtcgggggaagctgacgtcttccatgg
 ctgctcgctgtgtgccacctggattctgcggggacgtccttctgctacgtccctcg
 gccctcaatccagggaccttcttcccgggcctgctgcgggtctgaggcctcttcc
 gcgtcttcccttccctcagacgagtcggatctcccttggggccgctcccccgcctg
 gacttcgagctcggtacgacagcctcgaactgtgcttctagtggcagccatctgtgtt
 tgccctcccccgtgcttcttgacctggaagggtgacactccactgtccttctaat
 aaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggg
 tggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcccagcttcttgcct
 ttagtgagggttaattgcgcgttggcgtaatacatggatagctgttctgtgtgaatt
 gttatccgctaattcactcctcaggtgcaggctgcctatcagaagggtgggtgctgtgtg
 gccaatgccctggctcacaataaccactgagatcttttccctctgccaaaattatggg
 gacatcatgaagccccctgagcatctgacttctggctaaataaggaaatttatttcatg
 aatagtgtgttgaatttttgtgtctcactcgggaaggacatatgggagggcaaatcat
 ttaaacatcagaatgagatttgggttagagtttggcaacatatgccatagctggtgtg
 ccatgaacaaagggtggctataaagggtcatcagtatatgaacagccccctgctgtc
 cattccttattccatagaaaagccttgacttgagggttagattttttatattttgtgtt
 ttttctttaacatccctaaaatttcttacctgtttactagccagatttttctctctctg
 actactccagctatagctgtccctcttctcttattggagatccctcgaactgcagcccaa
 gcttggcgtaatacatggtcatagctgttctgtgtgaattgttatccgctcacaattcca
 cacaacatacagccgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatgagtggc
 taactcacatfaattgctgtgctcactgcccgttccagtcgggaaacctgtcgtgc

[0289]

	cagcggaaccgcatctcaattagtcagcaaccatagtcceggcccctaactecgccc cccggcccctaactcggcccagttcggcccattctcggcccattggtgactaattttt atttatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtatgaggag gctttttggaggcctaggttttgcaaaaagctaacttggttattgcagcttataatggtta caaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagt gtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggaaccgctgcattaatgaatcg gccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgctcttcgcttctcgctc tgactcgtgcgctcggctcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaggcg gtaatacgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaa ggccagcaaaaaggccagggaaccgtaaaaaggccggttgcgtggcgttttccatagg ctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaac ccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgtctc ctgttccgacctgcccgttacccgataacctgtccgcttctccttcgggaagcgtgg cggtttctcatagctcagcgtgtaggtatctcagttcgggttaggtcgttcgtccaagct gggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaaccgctgcgccttatccggtaactat cgtcttgagtcacacccggtaagacacgactatcgccactggcagcagccactggta acaggattagcagagcgagggtatgtagggcggtgctacagagttcttgaagtggggcc taactacggctacactagaagaacagtatttggatctcgcctctgctgaagccagttac cttcgaaaaagagtgtgtagctcttgatcggcaaaacaaaccacgctggttagcggt gggtttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcct ttgatctttctacggggctgcagctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttgg tcagagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaatfaaaatgaagtttaaat caatctaaaglatatagtaaaacttgggtgacagttaccatgtttaatcagtgaggc acctatctcagcgatctgtctatttcgttcacatagttgectgactccccgtcgtgtaga taactacgatacgggagggccttaccatctggcccagtgctgcaatgataccgcgaga cccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccga gcgcagaagtggctcctgcaacttaccgctccatccagctatfaattgttgcggga agctagagtaagtgttcgccagitaatagtttgcgcaacggtgttgcattgctacagg catcgtggtgtcacgctcgttgggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatca aggcgagttacatgatccccatgttgcgcaaaaagcgggttagctccttcggctcctc gatcgttgcagaagtaagtggcgcgagtggtatcactcatggttatggcagcactgca taattctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtagtactcaacca agtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgg gataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcctcattggaaaacgttctc gggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagtgtaaccactcg tgcacccaactgatcttcagcatctttactttaccagcggttctgggtgagcaaaaaca ggaaggcaaaatgcgcgcaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaataact catactcttcttttcaatattatgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatac atatttgaatgtatttagaaaaataaacaataagggggtccgcgcacattccccgaaaa gtgccacctgg
用于蛋白免疫接种的 ApoL1 G0 氨基酸序列 (SEQ ID No:24)	mhshhhhhgenlyfqgsdpessifiedaikyfkekvtqnlllltdneawnfva elprneadelrkaldnlarqmimkdknwhdkgqyrnwflkefprlkselndirr lraladgvkvhkggtianvvsqslsissgiltvvgmglapfteggslvlepgmelgi taaltgitsstmdyggkwwtqaqahdlviksldklkevreflgenisnflslagntyq ltrgigkdiralrranlqsvphasasrprvtepisasgeqvervnepsilemsrgv kltdvapvsfflvdvvylyveskhlhegaksetaelkkvaqeelkniinnnyki lqadqelgns

[0290] 参考文献

[0291] Chapman, M. J., Goldstein, S., Lagrange, D., Laplaud, P. M., 1981. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major

lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 22,339–358.

[0292] Davidson, W.S., Silva, R.A., Chantepie, S., Lagor, W.R., Chapman, M.J., Kontush, A., 2009. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29,870–876.

[0293] Duchateau, P.N., Movsesyan, I., Yamashita, S., Sakai, N., Hirano, K., Schoenhaus, S.A., O'Connor-Keams, P.M., Spencer, S.J., Jaffe, R.B., Redberg, R.F., Ishida, B.Y., Matsuzawa, Y., Kane, J.P., Malloy, M.J., 2000. Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *J Lipid Res* 41,1231–1236.

[0294] Duchateau, P.N., Pullinger, C.R., Orellana, R.E., Kunitake, S.T., Naya-Vigne, J., O'Connor, P.M., Malloy, M.J., Kane, J.P., 1997. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *The Journal of biological chemistry* 272,25576–25582.

[0295] Freedman, B.I., Kopp, J.B., Langefeld, C.D., Genovese, G., Friedman, D.J., Nelson, G.W., Winkler, C.A., Bowden, D.W., Pollak, M.R., 2010. The apolipoprotein L1 (APOL1) gene and nondiabetic nephropathy in African Americans. *J Am Soc Nephrol* 21,1422–1426.

[0296] Freedman, B.I., Langefeld, C.D., Lu, L., Divers, J., Comeau, M.E., Kopp, J.B., Winkler, C.A., Nelson, G.W., Johnson, R.C., Palmer, N.D., Hicks, P.J., Bostrom, M.A., Cooke, J.N., McDonough, C.W., Bowden, D.W., 2011. Differential effects of MYH9 and APOL1 risk variants on FRMD3 Association with Diabetic ESRD in African Americans. *PLoS Genet* 7,e1002150.

[0297] Hsu, C.Y., Lin, F., Vittinghoff, E., Shlipak, M.G., 2003. Racial differences in the progression from chronic renal insufficiency to end-stage renal disease in the United States. *J Am Soc Nephrol* 14,2902–2907.

[0298] Kao, W.H., Klag, M.J., Meoni, L.A., Reich, D., Berthier-Schaad, Y., Li, M., Coresh, J., Patterson, N., Tandon, A., Powe, N.R., Fink, N.E., Sadler, J.H., Weir, M.R., Abboud, H.E., Adler, S.G., Divers, J., Iyengar, S.K., Freedman, B.I., Kimmel, P.L., Knowler, W.C., Kohn, O.F., Kramp, K., Leehey, D.J., Nicholas, S.B., Pahl, M.V., Schelling, J.R., Sedor, J.R., Thomley-Brown, D., Winkler, C.A., Smith, M.W., Parekh, R.S., 2008. MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nature genetics* 40,1185–1192.

[0299] Kopp, J.B., Nelson, G.W., Sampath, K., Johnson, R.C., Genovese, G., An, P., Friedman, D., Briggs, W., Dart, R., Korbet, S., Mokrzycki, M.H., Kimmel, P.L., Limou, S., Ahuja, T.S., Berns, J.S., Fryc, J., Simon, E.E., Smith, M.C., Trachtman, H., Michel, D.M., Schelling, J.R., Vlahov, D., Pollak, M., Winkler, C.A., 2011. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc*

Nephrol 22,2129–2137.

[0300] Kopp, J.B., Smith, M.W., Nelson, G.W., Johnson, R.C., Freedman, B.I., Bowden, D.W., Oleksyk, T., McKenzie, L.M., Kajiyama, H., Ahuja, T.S., Berns, J.S., Briggs, W., Cho, M.E., Dart, R.A., Kimmel, P.L., Korbet, S.M., Michel, D.M., Mokrzycki, M.H., Schelling, J.R., Simon, E., Trachtman, H., Vlahov, D., Winkler, C.A., 2008. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nature genetics* 40,1175–1184.

[0301] Lee, V.W., Harris, D.C., 2011. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)* 16,30–38.

[0302] Madhavan, S.M., O'Toole, J.F., Konieczkowski, M., Ganesan, S., Bruggeman, L.A., Sedor, J.R., 2011. APOL1 localization in normal kidney and nondiabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22,2119–2128.

[0303] McPherson, P.A., Young, I.S., McKibben, B., McEneny, J., 2007. High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation. *J Lipid Res* 48,86–95.

[0304] Page, N.M., Olano-Martin, E., Lanaway, C., Turner, R., Minihane, A.M., 2006. Polymorphisms in the Apolipoprotein L1 gene and their effects on blood lipid and glucose levels in middle age males. *Genes Nutr* 1,133–135.

[0305] 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., 2013. APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. *N Engl J Med* 369,2183–2196.

[0306] Saleem, M.A., O'Hare, M.J., Reiser, J., Coward, R.J., Inward, C.D., Farren, T., Xing, C.Y., Ni, L., Mathieson, P.W., Mundel, P., 2002. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 13,630–638.

序列表

<110> 健泰科生物技术公司等

<120> 肾病动物模型及其治疗剂

<130> P32407-W0

<140>

<141>

<150> 62/077,774

<151> 2014-11-10

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 398

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 1

```

Met Glu Gly Ala Ala Leu Leu Arg Val Ser Val Leu Cys Ile Trp Met
1           5           10           15
Ser Ala Leu Phe Leu Gly Val Gly Val Arg Ala Glu Glu Ala Gly Ala
20          25          30
Arg Val Gln Gln Asn Val Pro Ser Gly Thr Asp Thr Gly Asp Pro Gln
35          40          45
Ser Lys Pro Leu Gly Asp Trp Ala Ala Gly Thr Met Asp Pro Glu Ser
50          55          60
Ser Ile Phe Ile Glu Asp Ala Ile Lys Tyr Phe Lys Glu Lys Val Ser
65          70          75          80
Thr Gln Asn Leu Leu Leu Leu Thr Asp Asn Glu Ala Trp Asn Gly
85          90          95
Phe Val Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ala Asp Glu Leu Arg
100         105         110
Lys Ala Leu Asp Asn Leu Ala Arg Gln Met Ile Met Lys Asp Lys Asn
115        120        125
Trp His Asp Lys Gly Gln Gln Tyr Arg Asn Trp Phe Leu Lys Glu Phe
130        135        140
Pro Arg Leu Lys Ser Glu Leu Glu Asp Asn Ile Arg Arg Leu Arg Ala

```

145	150	155	160
Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val His Lys Gly Thr Thr Ile Ala Asn			
	165	170	175
Val Val Ser Gly Ser Leu Ser Ile Ser Ser Gly Ile Leu Thr Leu Val			
	180	185	190
Gly Met Gly Leu Ala Pro Phe Thr Glu Gly Gly Ser Leu Val Leu Leu			
	195	200	205
Glu Pro Gly Met Glu Leu Gly Ile Thr Ala Ala Leu Thr Gly Ile Thr			
	210	215	220
Ser Ser Thr Met Asp Tyr Gly Lys Lys Trp Trp Thr Gln Ala Gln Ala			
225	230	235	240
His Asp Leu Val Ile Lys Ser Leu Asp Lys Leu Lys Glu Val Arg Glu			
	245	250	255
Phe Leu Gly Glu Asn Ile Ser Asn Phe Leu Ser Leu Ala Gly Asn Thr			
	260	265	270
Tyr Gln Leu Thr Arg Gly Ile Gly Lys Asp Ile Arg Ala Leu Arg Arg			
	275	280	285
Ala Arg Ala Asn Leu Gln Ser Val Pro His Ala Ser Ala Ser Arg Pro			
	290	295	300
Arg Val Thr Glu Pro Ile Ser Ala Glu Ser Gly Glu Gln Val Glu Arg			
305	310	315	320
Val Asn Glu Pro Ser Ile Leu Glu Met Ser Arg Gly Val Lys Leu Thr			
	325	330	335
Asp Val Ala Pro Val Ser Phe Phe Leu Val Leu Asp Val Val Tyr Leu			
	340	345	350
Val Tyr Glu Ser Lys His Leu His Glu Gly Ala Lys Ser Glu Thr Ala			
	355	360	365
Glu Glu Leu Lys Lys Val Ala Gln Glu Leu Glu Glu Lys Leu Asn Ile			
	370	375	380
Leu Asn Asn Asn Tyr Lys Ile Leu Gln Ala Asp Gln Glu Leu			
385	390	395	
<210> 2			
<211> 398			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"			

<400> 2

Met	Glu	Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Arg	Val	Ser	Val	Leu	Cys	Ile	Trp	Met
1				5					10					15	
Ser	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Val	Gly	Val	Arg	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala
				20					25					30	
Arg	Val	Gln	Gln	Asn	Val	Pro	Ser	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	Asp	Pro	Gln
				35					40					45	
Ser	Lys	Pro	Leu	Gly	Asp	Trp	Ala	Ala	Gly	Thr	Met	Asp	Pro	Glu	Ser
				50					55					60	
Ser	Ile	Phe	Ile	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys	Tyr	Phe	Lys	Glu	Lys	Val	Ser
65					70					75					80
Thr	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asp	Asn	Glu	Ala	Trp	Asn	Gly
					85					90					95
Phe	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Arg	Asn	Glu	Ala	Asp	Glu	Leu	Arg
					100					105					110
Lys	Ala	Leu	Asp	Asn	Leu	Ala	Arg	Gln	Met	Ile	Met	Lys	Asp	Lys	Asn
					115					120					125
Trp	His	Asp	Lys	Gly	Gln	Gln	Tyr	Arg	Asn	Trp	Phe	Leu	Lys	Glu	Phe
										135					140
Pro	Arg	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Asn	Ile	Arg	Arg	Leu	Arg	Ala
145										150					160
Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Gln	Lys	Val	His	Lys	Gly	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn
										165					170
Val	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Val
										180					185
Gly	Met	Gly	Leu	Ala	Pro	Phe	Thr	Glu	Gly	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu
															190
										195					200
Glu	Pro	Gly	Met	Glu	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Leu	Thr	Gly	Ile	Thr
															210
										215					220
Ser	Ser	Thr	Met	Asp	Tyr	Gly	Lys	Lys	Trp	Trp	Thr	Gln	Ala	Gln	Ala
225															230
										235					240
His	Asp	Leu	Val	Ile	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	Glu	Val	Arg	Glu
															245
										250					255
Phe	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Leu	Ala	Gly	Asn	Thr
															260
										265					270
Tyr	Gln	Leu	Thr	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Asp	Ile	Arg	Ala	Leu	Arg	Arg
															275
										280					285
Ala	Arg	Ala	Asn	Leu	Gln	Ser	Val	Pro	His	Ala	Ser	Ala	Ser	Arg	Pro
															290
										295					300

Arg Val Thr Glu Pro Ile Ser Ala Glu Ser Gly Glu Gln Val Glu Arg
 305 310 315 320
 Val Asn Glu Pro Ser Ile Leu Glu Met Ser Arg Gly Val Lys Leu Thr
 325 330 335
 Asp Val Ala Pro Val Gly Phe Phe Leu Val Leu Asp Val Val Tyr Leu
 340 345 350
 Val Tyr Glu Ser Lys His Leu His Glu Gly Ala Lys Ser Glu Thr Ala
 355 360 365
 Glu Glu Leu Lys Lys Val Ala Gln Glu Leu Glu Glu Lys Leu Asn Met
 370 375 380
 Leu Asn Asn Asn Tyr Lys Ile Leu Gln Ala Asp Gln Glu Leu
 385 390 395

<210> 3

<211> 396

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
 多肽"

<400> 3

Met Glu Gly Ala Ala Leu Leu Arg Val Ser Val Leu Cys Ile Trp Met
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Phe Leu Gly Val Gly Val Arg Ala Glu Glu Ala Gly Ala
 20 25 30
 Arg Val Gln Gln Asn Val Pro Ser Gly Thr Asp Thr Gly Asp Pro Gln
 35 40 45
 Ser Lys Pro Leu Gly Asp Trp Ala Ala Gly Thr Met Asp Pro Glu Ser
 50 55 60
 Ser Ile Phe Ile Glu Asp Ala Ile Lys Tyr Phe Lys Glu Lys Val Ser
 65 70 75 80
 Thr Gln Asn Leu Leu Leu Leu Thr Asp Asn Glu Ala Trp Asn Gly
 85 90 95
 Phe Val Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Asn Glu Ala Asp Glu Leu Arg
 100 105 110
 Lys Ala Leu Asp Asn Leu Ala Arg Gln Met Ile Met Lys Asp Lys Asn
 115 120 125
 Trp His Asp Lys Gly Gln Gln Tyr Arg Asn Trp Phe Leu Lys Glu Phe
 130 135 140

Pro Arg Leu Lys Ser Glu Leu Glu Asp Asn Ile Arg Arg Leu Arg Ala			
145	150	155	160
Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val His Lys Gly Thr Thr Ile Ala Asn			
	165	170	175
Val Val Ser Gly Ser Leu Ser Ile Ser Ser Gly Ile Leu Thr Leu Val			
	180	185	190
Gly Met Gly Leu Ala Pro Phe Thr Glu Gly Gly Ser Leu Val Leu Leu			
	195	200	205
Glu Pro Gly Met Glu Leu Gly Ile Thr Ala Ala Leu Thr Gly Ile Thr			
	210	215	220
Ser Ser Thr Met Asp Tyr Gly Lys Lys Trp Trp Thr Gln Ala Gln Ala			
225	230	235	240
His Asp Leu Val Ile Lys Ser Leu Asp Lys Leu Lys Glu Val Arg Glu			
	245	250	255
Phe Leu Gly Glu Asn Ile Ser Asn Phe Leu Ser Leu Ala Gly Asn Thr			
	260	265	270
Tyr Gln Leu Thr Arg Gly Ile Gly Lys Asp Ile Arg Ala Leu Arg Arg			
	275	280	285
Ala Arg Ala Asn Leu Gln Ser Val Pro His Ala Ser Ala Ser Arg Pro			
	290	295	300
Arg Val Thr Glu Pro Ile Ser Ala Glu Ser Gly Glu Gln Val Glu Arg			
305	310	315	320
Val Asn Glu Pro Ser Ile Leu Glu Met Ser Arg Gly Val Lys Leu Thr			
	325	330	335
Asp Val Ala Pro Val Ser Phe Phe Leu Val Leu Asp Val Val Tyr Leu			
	340	345	350
Val Tyr Glu Ser Lys His Leu His Glu Gly Ala Lys Ser Glu Thr Ala			
	355	360	365
Glu Glu Leu Lys Lys Val Ala Gln Glu Leu Glu Glu Lys Leu Asn Ile			
	370	375	380
Leu Asn Asn Lys Ile Leu Gln Ala Asp Gln Glu Leu			
385	390	395	

<210> 4

<211> 593

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的

多核苷酸”

<400> 4

```
gcggccgctc acacgaggca ttgggaagga catccgtgcc ctcagacgag ccagagccaa 60
tcttcagtca gtaccgcatg cctcagcctc acgcccccg gtcactgagc caatctcagc 120
tgaaagcggg gaacagggtg agagggttaa tgaaccagc atcctggaaa tgagcagagg 180
agtcaagctc acggatgtgg cccctgtagg cttctttctt gtgctggatg tagtctacct 240
cgtgtacgaa tcaaagcact tacatgaggg ggcaaagaat gcaggtgaat tcaataaact 300
cggcggatcc acctgcattc caaagtcaga gacagctgag gagctgaaga aggtggctca 360
ggagctggag gagaagctaa acatgctcaa caataattat aagattctgc aggcggaaca 420
agaactgtga ccacagggca gggcagccac caggagagat atgcctggca ggggccagga 480
caaaatgcaa actttttttt ttttctgaga cagagtcttg ctctgtcgcc aagttggagt 540
gcaatggtgc gatctcagct cactgcaage tctgcctccc gtgttgccgc cgc 593
```

<210> 5

<211> 464

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述:合成的

多核苷酸”

<400> 5

```
gcggccgctt aatgaacca gcatcctgga aatgagcaga ggagtcaagc tcacggatgt 60
ggccccctgta agcttcttctc ttgtgctgga tgtagtctac ctcgtgtacg aatcaaagca 120
cttacatgag ggggcaaagt cagagacagc tgaggagctg aagaagggtg ctcaggagct 180
ggaggagaag ctaaacattc tcaacaataa gactgtgcag gtgaattcgg atccattaaa 240
actagtacct gcattcaaga ttctgcaggc ggaccaagaa ctgtgaccac agggcagggc 300
agccaccagg agagatatgc ctggcagggg ccaggacaaa atgcaaactt tttttttttt 360
ctgagacaga gtcttgctct gtcgccaagt tggagtgcaa tgggtgcgatc tcagctcact 420
gcaagctctg cctcccgtgt tcaagcgatt ctctggcgg ccgc 464
```

<210> 6

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述:合成的

寡核苷酸”

<400> 6

```
tagtcctgtc cagggccccc tggccgcaga caaatgtctac agacacggct ggcgcgccga 60
```

tacgcgagcg aacgtgaa 78

<210> 7

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"

<400> 7

gtcagtgga ggtctttctt gagtcagaa aggttaggta actagttcag gcggccgcct 60
tagacgtcag gtggcact 78

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的引物"

<400> 8

tttcttgtgc tggatgtag 19

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的引物"

<400> 9

atatctctcc tggtaggct 18

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的

引物”

<400> 10

tgggtgtcag gttcttgctt cagc 24

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述:合成的

引物”

<400> 11

cagtggatgc gcgcaggac 19

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述:合成的

引物”

<400> 12

tgagcagagg agtcaag 17

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=”人工序列的描述:合成的

引物”

<400> 13

tgtggtcaca gttcttg 17

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
探针"

<400> 14

agctaaacat gctcaac 17

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
引物"

<400> 15

cacgtgggct ccagcatt 18

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
引物"

<400> 16

tcaccagtca tttctgcctt tg 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
探针"

<400> 17

ccaatggtcg ggcactgctc aa 22

<210> 18

<211> 1194

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
多核苷酸"

<400> 18

```
atggagggag ctgctttgct gagagtctct gtcctctgca tctggatgag tgcacttttc 60
cttggtgtgg gagtgagggc agaggaagct ggagcgaggg tgcaacaaaa cgttccaagt 120
gggacagata ctggagatcc tcaaagtaag cccctcgggtg actgggctgc tggcaccatg 180
gacccagaga gcagtatctt tattgaggat gccattaagt atttcaagga aaaagtgagc 240
acacagaatc tgctactcct gctgactgat aatgaggcct ggaacggatt cgtggctgct 300
gctgaactgc ccaggaatga ggcagatgag ctccgtaaag ctctggacaa ccttgcaaga 360
caaatgatca tgaaagacaa aaactggcac gataaaggcc agcagtacag aaactggttt 420
ctgaaagagt ttccctcggtt gaaaagtaag cttgaggata acataagaag gctccgtgcc 480
cttgacagatg gggttcagaa ggtccacaaa ggcaccacca tcgccaatgt ggtgtctggc 540
tctctcagca ttccctctgg catcctgacc ctgctcgga tgggtctggc acccttcaca 600
gagggaggca gccttgact cttggaacct gggatggagt tgggaatcac agcagctttg 660
accgggatta ccagtagtac catagactac ggaaagaagt ggtggacaca agcccaagcc 720
cacgacctgg tcatcaaaag ccttgacaaa ttgaaggagg tgaaggagtt tttgggtgag 780
aacatatcca actttctttc cttagctggc aatacttacc aactcacacg aggcattggg 840
aaggacatcc gtgccctcag acgagccaga gccaatcttc agtcagtacc gcatgcctca 900
gcctcacgcc cccgggtcac tgagccaatc tcagctgaaa gcggtgaaca ggtggagaga 960
gttaatgaac ccagcatcct ggaaatgagc agaggagtca agctcacgga tgtggccctt 1020
gtaagcttct ttcttgtgct ggatgtagtc tacctcgtgt acgaatcaaa gcattacat 1080
gagggggcaa agtcagagac agctgaggag ctgaagaagg tggctcagga gctggaggag 1140
aagctaaaca ttctcaacaa taattataag attctgcagg cggaccaaga actg 1194
```

<210> 19

<211> 7154

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的
多核苷酸"

<400> 19

```
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
gccatataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
```

tattagtcac cgctattacc atggctcgagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca 420
tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta ttttgtgcag 480
cgatggggggc gggggggggg gggggggcgcg cgccaggcgg ggccggggcgg ggcgaggggc 540
ggggcgggggc gaggcggaga ggtgcggcggc cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt 600
ttccttttat ggccgagcggc cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg 660
cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgccgcc tcgcgccgcc 720
cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggcccttctc 780
ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg 840
aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg gagcggctcg gggggtgcgt 900
gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgcgcgct gcggctccgc gctgccccgc ggctgtgagc 960
gctgcggggc cgccgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcggccg 1020
ggggcggtgc ccgcgggtgc ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcgggggtg 1080
tgtgcgtggg ggggtgagca ggggtgtgtg gcgcgtcggt cgggctgcaa cccccctgc 1140
acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggtctcggg tgcggggctc cgtacggggc 1200
gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcgcca ggtgggggtg ccgggcgggg 1260
cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg cgccggcccc cggagcgccg 1320
gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg 1380
cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgccgccgca 1440
ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcgccgg caggaaggaa atgggcgggg 1500
agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc tctccagcct cggggctgtc 1560
cgcgggggga cggctgcctt cggggggggc ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 1620
tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttcttt ttctacagc 1680
tcctgggcaa cgtgctggtt gttgtgctgt ctcatcattt tggcaaagac ttcggtaccg 1740
cgggccccgg atccaccatg gagggagctg ctttgtgag agtctctgtc ctctgcatct 1800
ggatgagtgc acttttcctt ggtgtgggag tgagggcaga ggaagctgga gcgagggtgc 1860
aacaaaacgt tccaagtggg acagatactg gagatcctca aagtaagccc ctcggtgact 1920
gggctgctgg caccatggac ccagagagca gtatctttat tgaggatgcc attaagtatt 1980
tcaaggaaaa agtgagcaca cagaatctgc tactcctgct gactgataat gaggcctgga 2040
acggattcgt ggctgctgct gaactgccc ggaatgagge agatgagctc cgtaaagctc 2100
tggaacaact tgcaagacaa atgatcatga aagacaaaaa ctggcacgat aaaggccagc 2160
agtacagaaa ctggtttctg aaagagtttc ctcggttgaa aagtaagctt gaggataaca 2220
taagaaggct ccgtgccctt gcagatgggg ttccagaagg ccacaaagge accaccatcg 2280
ccaatgtggt gtctggctct ctcagcattt cctctggcat cctgaccctc gtcggcatgg 2340
gtctggcacc cttcacagag ggaggcagcc ttgtactctt ggaacctggg atggagttgg 2400
gaatcacagc agctttgacc gggattacca gtagtaccat agactacgga aagaagtgg 2460
ggacacaagc ccaagccac gacctggtca tcaaaagcct tgacaaattg aaggaggtga 2520
aggagttttt gggtgagaac atatccaact ttctttcctt agctggcaat acttaccac 2580
tcacacgagg cattgggaag gacatccgtg ccctcagacg agccagagcc aatcttcagt 2640
cagtaccgca tgcctcagcc tcacgcccc gggtcactga gccaatctca gctgaaagcg 2700

gtgaacaggt ggagagagtt aatgaaccca gcatcctgga aatgagcaga ggagtcaagc 2760
 tcacggatgt ggccccgtga agcttctttc ttgtgctgga ttagtcttac ctctgtgtacg 2820
 aatcaaagca cttacatgag ggggcaaagt cagagacagc tgaggagctg aagaaggtgg 2880
 ctccaggagct ggaggagaag ctaaaccattc tcaacaataa ttataagatt ctgcaggcgg 2940
 accaagaact gtgagggaat tcgtgagcgg ccgcatgac agctggatgc atcgatcacg 3000
 cgtaccggtg ctccagggtac cgatgaatag ctaaggctga ggccgcagggt aagtatcaag 3060
 gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggct tgtcgagaca gagaagactc 3120
 ttgcgtttct gataggcacc tattggtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca 3180
 ggtgtcgaca atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac 3240
 tatgttgctc cttttacgct atgtggatac gctgctttta tgcctttgta tcatgctatt 3300
 gcttcccgtg tggttttcat tttctctctc ttgtataaat cctggttgcg gtctctttat 3360
 gaggagtgtt ggccccgtgt caggcaacgt ggctgtgtgt gactgtgtt tgctgacgca 3420
 acccccactg gttggggcat tgccaccacc tgccagctcc tttccgggac tttcgtttc 3480
 cccctcccta ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg 3540
 gctcggtgtt tgggactga caattccgtg gtgttgctcg ggaagctgac gtcctttcca 3600
 tggctgctcg cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct 3660
 tcggccctca atccagcggc cttccttcc cgccgctgc tgccggtctt gcggcctctt 3720
 ccgcgtcttc gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgct 3780
 ggacttcgag ctccgtacga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg 3840
 tttgcccctc ccccgctgct tccttgacc tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct 3900
 aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg 3960
 ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcccagct tttgttccct 4020
 ttagtgaggg ttaattgcgc gcttgccgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 4080
 ttgttatccg ctaattcact cctcagggtc aggctgccta tcagaaggtg gtggctgggtg 4140
 tggccaatgc cctggctcac aaataccact gagatctttt tccctctgcc aaaaattatg 4200
 gggacatcat gaagccccct gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca 4260
 ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa 4320
 atcattttaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc 4380
 tggctgccat gaacaaaggt tggtataaaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg 4440
 ctgtccattc cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagattttt tttatatattt 4500
 gttttgtgtt atttttttct ttaacatccc taaaattttc cttacatgtt ttactagcca 4560
 gatttttcct cctctcctga ctactcccag tcatagctgt cctctttctc ttatggagat 4620
 ccctcgacct gcagcccaag cttggcgtaa tcatggctcat agctgtttcc tgtgtgaaat 4680
 tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 4740
 ggtgccta at gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 4800
 tcgggaaacc tgtcgtgcca gcggaaccgc atctcaatta gtcagcaacc atagtccegc 4860
 ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgcccctg 4920
 gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgagggcgc ctccgctctt gagctattcc 4980
 agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagcta acttgtttat 5040

```

tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 5100
tttttactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg 5160
gaaccgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc 5220
tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtc cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 5280
tcagctcact caaaggcggc aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 5340
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 5400
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 5460
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 5520
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 5580
agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc 5640
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt 5700
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtgaag cagcacttat cggcactggc agcagccact 5760
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtag 5820
cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 5880
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg 5940
ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 6000
ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg 6060
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 6120
aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt 6180
gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgctc 6240
gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg 6300
cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 6360
gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 6420
gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 6480
ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 6540
tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct 6600
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 6660
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 6720
accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 6780
cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 6840
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 6900
cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 6960
acaggaaggc aaaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 7020
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 7080
tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 7140
aaagtgccac ctgg 7154

```

<210> 20

<211> 1194

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多核苷酸"

<400> 20

```
atggagggag ctgctttgct gagagtctct gtccctctgca tctggatgag tgcacttttc 60
cttggtgtgg gagtgagggc agaggaagct ggagcgaggg tgcaacaaaa cgttccaagt 120
gggacagata ctggagatcc tcaaagtaag cccctcggtg actgggctgc tggcaccatg 180
gacccagaga gcagtatctt tattgaggat gccattaagt atttcaagga aaaagtgagc 240
acacagaatc tgctactcct gctgactgat aatgaggcct ggaacggatt cgtggctgct 300
gctgaactgc ccaggaatga ggagatgag ctccgtaaag ctctggacaa ccttgcaaga 360
caaatgatca tgaaagacaa aaactggcac gataaaggcc agcagtacag aaactggttt 420
ctgaaagagt ttccctcggtt gaaaagtaag cttgaggata acataagaag gctccgtgcc 480
cttgagatg gggttcagaa ggtccacaaa ggcaccacca tcgccaatgt ggtgtctggc 540
tctctcagca tttcctctgg catcctgacc ctgctcgga tgggtctggc acccttcaca 600
gagggaggca gccttgact cttggaacct gggatggagt tgggaatcac agcagctttg 660
accgggatta ccagtagtac catagactac ggaaagaagt ggtggacaca agcccaagcc 720
cacgacctgg tcatcaaaag ccttgacaaa ttgaaggagg tgaaggagtt tttgggtgag 780
aacatatcca actttctttc cttagctggc aatacttacc aactcacacg aggcatgtgg 840
aaggacatcc gtgccctcag acgagccaga gccaatcttc agtcagtacc gcatgcctca 900
gcctcacgcc cccgggtcac tgagccaatc tcagctgaaa gcggtgaaca ggtggagaga 960
gttaatgaac ccagcatcct ggaaatgagc agaggagtca agctcacgga tgtggccctt 1020
gtaggcttct ttcttgtgct ggatgtagtc tacctcgtgt acgaatcaaa gcattacat 1080
gagggggcaa agtcagagac agctgaggag ctgaagaagg tggctcagga gctggaggag 1140
aagctaaaca tgctcaacaa taattataag attctgcagg cggaccaaga actg 1194
```

<210> 21

<211> 7154

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多核苷酸"

<400> 21

```
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtea ttagttcata 60
gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggtta aactgcccac ttggcagtac 240
```

```

atcaagtgtgta tcatatgccca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggccccg 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca 420
tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta ttttgtgcag 480
cgatggggggc gggggggggg gggggggcgcg cgccaggcgg ggcgggggcg ggcgaggggc 540
ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt 600
ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg 660
cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgccgcc tcgcgccgcc 720
cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtagg cgggcgggac ggcccttctc 780
ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg 840
aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtcgggggg gagcggtcgc gggggtgcgt 900
gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgccgcgt gcggctccgc gctgcccggc ggctgtgagc 960
gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcgcccg 1020
ggggcggtgc cccgcggtgc ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcgggggtg 1080
tgtgcgtggg ggggtgagca ggggtgtggt gcgcgtcggt cgggctgcaa cccccctgc 1140
acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggtctcggg tgcggggctc cgtacggggc 1200
gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcgcca ggtgggggtg ccgggcgggg 1260
cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg cggcggcccc cggagcgccg 1320
gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg 1380
cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgccgccgca 1440
ccccctctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcgccgg caggaaggaa atgggcgggg 1500
agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc tctccagcct cggggctgtc 1560
cgcgggggga cggtgcctt cggggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 1620
tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttcttt ttcctacagc 1680
tcctgggcaa cgtgctggtt gttgtgctgt ctcatcattt tggcaaagac ttcggtaccg 1740
cgggccccgg atccaccatg gagggagctg ctttgctgag agtctctgtc ctctgcatct 1800
ggatgagtgc acttttcctt ggtgtgggag tgagggcaga ggaagctgga gcgagggtgc 1860
aacaaaacgt tccaagtggg acagatactg gagatcctca aagtaagccc ctcggtgact 1920
gggctgctgg caccatggac ccagagagca gtatctttat tgaggatgcc attaagtatt 1980
tcaaggaaaa agtgagcaca cagaatctgc tactctgct gactgataat gaggcctgga 2040
acggattcgt ggctgctgct gaactgccc ggaatgagge agatgagctc cgtaaagctc 2100
tggaacaact tgcaagacaa atgatcatga aagacaaaaa ctggcacgat aaaggccagc 2160
agtacagaaa ctggtttctg aaagagtttc ctcggttgaa aagtaagctt gaggataaca 2220
taagaaggct ccgtgccctt gcagatgggg ttccagaagg ccacaaaggc accaccatcg 2280
ccaatgtggt gtctggctct ctcagcattt cctctggcat cctgaccctc gtcggcatgg 2340
gtctggcacc cttcacagag ggaggcagcc ttgtactctt ggaacctggg atggagttgg 2400
gaatcacagc agctttgacc gggattacca gtagtaccat agactacgga aagaagtgg 2460
ggacacaagc ccaagccac gacctgtca tcaaaagcct tgacaaattg aaggaggtga 2520
aggagttttt gggtgagaac atatccaact ttctttcctt agctggcaat acttaccac 2580

```

tcacacgagg cattgggaag gacatccgtg ccctcagacg agccagagcc aatcttcagt 2640
 cagtaccgca tgcctcagcc tcacgcccc gggtcactga gccaatctca gctgaaagcg 2700
 gtgaacaggt ggagagagtt aatgaacca gcatcctgga aatgagcaga ggagtcaagc 2760
 tcacggatgt ggccccgtga ggcttctttc ttgtgctgga tgtagtctac ctcgtgtacg 2820
 aatcaaagca cttacatgag ggggcaaagt cagagacagc tgaggagctg aagaaggtgg 2880
 ctcaggagct ggaggagaag ctaaaccatgc tcaacaataa ttataagatt ctgcaggcgg 2940
 accaagaact gtgagggaat tcgtgagcgg ccgcatgac agctggatgc atcgatcacg 3000
 cgtaccggtg ctcgaggtag cgatgaatag ctaaggctga ggccgcaggt aagtatcaag 3060
 gttacaagac aggtttaagg agaccaatag aaactgggct tgtcgagaca gagaagactc 3120
 ttgcgtttct gataggcacc tattggtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca 3180
 ggtgtcgaca atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac 3240
 tatgttgctc cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcttttgta tcatgctatt 3300
 gcttcccgtg ttgctttcat tttctctcc ttgtataaat cctggttgcg gtctctttat 3360
 gaggagtgt ggccccgtgt caggcaacgt ggctgtgtgt gcactgtgtt tgctgacgca 3420
 acccccactg gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgtttc 3480
 cccctcccta ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg 3540
 gctcggtgt tgggactga caattccgtg gtgttgctcg ggaagctgac gtcctttcca 3600
 ttgctgctcg cctgtgtgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct 3660
 tcggccctca atccagcga ccttcttcc cgcgccctgc tgccggtct ggcgcctctt 3720
 ccgcgtcttc gccttcgcc tcagacgagt cggatctccc tttgggccc ctecccgct 3780
 ggacttcgag ctcggtacga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg 3840
 tttgcccctc ccccgctgc tcttgaccc tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct 3900
 aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg 3960
 ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcccagct tttgttcct 4020
 ttagtgaggg ttaattgcgc gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 4080
 ttgttatccg ctaattcact cctcaggtgc aggctgccta tcagaaggtg gtggctggtg 4140
 tggccaatgc cctggctcac aaataccact gagatctttt tccctctgcc aaaaattatg 4200
 gggacatcat gaagccccct gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca 4260
 ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa 4320
 atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc 4380
 tggctgccat gaacaaaggt ttgctataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg 4440
 ctgtccattc cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagattttt tttatatttt 4500
 gttttgtgtt atttttttct ttaacatccc taaaatttct cttacatgtt ttactagcca 4560
 gatttttcct cctctcctga ctactcccag tcatagctgt cctcttctc ttatggagat 4620
 ccctcgacct gcagcccaag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat 4680
 tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 4740
 ggtgcctaat gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 4800
 tcgggaaacc tgtcgtgcca gcggaaccgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccg 4860
 ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgcccctg 4920

gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc 4980
 agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagcta acttgtttat 5040
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 5100
 tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg 5160
 gaaccgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc 5220
 tcttcgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 5280
 tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 5340
 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 5400
 tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 5460
 tggcgaaacc cgacaggact ataaaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 5520
 cgctctcctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgcttttct cccttcggga 5580
 agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttegggtgta ggtcgttcgc 5640
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcageccg accgctgcgc cttatccggt 5700
 aactatcgtc ttgagtccaa cccggttaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact 5760
 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtagg 5820
 cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 5880
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 5940
 ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 6000
 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 6060
 gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 6120
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt 6180
 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg actccccgctc 6240
 gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataccg 6300
 cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 6360
 gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 6420
 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 6480
 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 6540
 tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct 6600
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 6660
 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 6720
 accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 6780
 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 6840
 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 6900
 cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 6960
 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 7020
 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 7080
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 7140
 aaagtgccac ctgg 7154

<210> 22

<211> 1188

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多核苷酸"

<400> 22

```
atggaggagg ctgctttgct gagagtctct gtctctctgca tctggatgag tgcacttttc 60
cttggtgtgg gaggtagggc agaggaagct ggagcgaggg tgcaacaaaa cgttccaagt 120
gggacagata ctggagatcc tcaaagtaag cccctcggtg actgggctgc tggcaccatg 180
gacccagaga gcagtatctt tattgaggat gccattaagt atttcaagga aaaagtgagc 240
acacagaatc tgctactcct gctgactgat aatgaggcct ggaacggatt cgtggctgct 300
gctgaactgc ccaggaatga ggcagatgag ctccgtaaag ctctggacaa ccttgcaaga 360
caaatgatca tgaaagacaa aaactggcac gataaaggcc agcagtacag aaactggttt 420
ctgaaagagt ttctctcggtt gaaaagtaag cttgaggata acataagaag gctccgtgcc 480
cttgcatgatg gggttcagaa ggtccacaaa ggcaccacca tcgccaatgt ggtgtctggc 540
tctctcagca ttctctctgg catcctgacc ctctctcgga tgggtctggc acccttcaca 600
gagggaggca gccttgact cttggaacct gggatggagt tgggaatcac agcagctttg 660
accgggatta ccagtagtac catagactac ggaaagaagt ggtggacaca agcccaagcc 720
cacgacctgg tcatcaaaag ccttgacaaa ttgaaggagg tgaaggagtt tttgggtgag 780
aacatatcca actttctttc cttagctggc aatacttacc aactcacacg aggcattggg 840
aaggacatcc gtgccctcag acgagccaga gccaatcttc agtcagtacc gcatgcctca 900
gcctcacgcc cccgggtcac tgagccaatc tcagctgaaa gcggtgaaca ggtggagaga 960
gttaatgaac ccagcatcct ggaaatgagc agaggagtca agctcacgga tgtggcccct 1020
gtaagcttct ttcttgctgt ggatgtagtc tacctcgtgt acgaatcaaa gcattacat 1080
gagggggcaa agtcagagac agctgaggag ctgaagaagg tggctcagga gctggaggag 1140
aagctaaaca ttctcaacaa taagattctg caggcggacc aagaactg 1188
```

<210> 23

<211> 7148

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多核苷酸"

<400> 23

```
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc 120
```

ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240
 atcaagtgtat tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc 300
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
 tattagtcat cgctattacc atggctcagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca 420
 tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta ttttgtgcag 480
 cgatggggggc gggggggggg gggggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc 540
 ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcggc ctccgaaagt 600
 ttcccttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg 660
 cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgccgcc tcgcgccgcc 720
 cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcggggc ggcccttctc 780
 ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg 840
 aaagccttga ggggctccgg gagggccett tgtgcggggg gagcggctcg gggggtgcgt 900
 gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgcgcgt gcggtccgc gctgcccgcc ggctgtgagc 960
 gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcggccg 1020
 ggggcgggtgc cccgcgggtgc ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcgggggtg 1080
 tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcggt cgggctgcaa cccccctgc 1140
 accccccctc ccgagttgct gagcacggcc cggtctcggg tgcggggctc cgtacggggc 1200
 gtggcgcggg gctcgccgtg ccgggcgggg ggtggcgcca ggtgggggtg ccgggcgggg 1260
 cggggccgcc tcgggccggg gagggctcgg gggaggggcg cggcggcccc cggagcgccg 1320
 gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg 1380
 cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgccgccgca 1440
 cccccctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcgccgg caggaaggaa atgggcgggg 1500
 agggccttcg tgcgtcgccg cgccgccgtc cccttctccc tctccagcct cggggctgtc 1560
 cgcgggggga cggctgcctt cggggggggc ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 1620
 tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc cttcttcttt ttcctacagc 1680
 tcctgggcaa cgtgctggtt gttgtgctgt ctcatcattt tggcaaagac ttcggtaccg 1740
 cgggcccggg atccaccatg gagggagctg ctttgcgtgag agtctctgtc ctctgcatct 1800
 ggatgagtgc acttttcctt ggtgtgggag tgagggcaga ggaagctgga gcgaggggtg 1860
 aacaaaacgt tccaagtggg acagatactg gagatcctca aagtaagccc ctcggtgact 1920
 gggctgctgg caccatggac ccagagagca gtatctttat tgaggatgcc attaatgatt 1980
 tcaaggaaaa agtgagcaca cagaatctgc tactctgct gactgataat gaggcctgga 2040
 acggattcgt ggctgctgct gaactgccc ggaatgagge agatgagctc cgtaaagctc 2100
 tggacaacct tgcaagacaa atgatcatga aagacaaaaa ctggcacgat aaaggccagc 2160
 agtacagaaa ctggtttctg aaagagtttc ctcggttgaa aagtaagctt gaggataaca 2220
 taagaaggct ccgtgccctt gcagatgggg ttcagaaggt ccacaaagge accaccatcg 2280
 ccaatgtggt gtctggctct ctcagcattt cctctggcat cctgaccctc gtcggcatgg 2340
 gtctggcacc cttcacagag ggaggcagcc ttgtactctt ggaacctggg atggagttgg 2400
 gaatcacagc agctttgacc gggattacca gtagtaccat agactacgga aagaagtgg 2460

```

ggacacaagc ccaagccac gacctgtca tcaaaagcct tgacaaattg aaggaggtga 2520
aggagttttt ggggtgagaac atatccaact ttctttcett agctggcaat acttaccaac 2580
tcacacgagg cattgggaag gacatccgtg ccctcagacg agccagagcc aatcttcagt 2640
cagtaccgca tgcctcagcc tcacgcccc gggtcactga gccaatctca gctgaaagcg 2700
gtgaacaggt ggagagagtt aatgaacca gcatacctgga aatgagcaga ggagtcaagc 2760
tcacggatgt ggccccgtga agctttcttc ttgtgctgga tgtagtctac ctcgtgtacg 2820
aatcaaagca cttacatgag ggggcaaagt cagagacagc tgaggagctg aagaaggtgg 2880
ctcaggagct ggaggagaag ctaaacattc tcaacaataa gattctgcag gcggaccaag 2940
aactgtgagg gaattcgtga gcggccgcat gatcagctgg atgcatgat cacgcgtacc 3000
gggtgctcgag gtaccgatga atagctaagg tcgaggccgc aggtaatat caaggttaca 3060
agacaggttt aaggagacca atagaaactg ggcttgtcga gacagagaag actcttgcgt 3120
ttctgatagg cacctattgg tcttactgac atccacttg cttttctctc cacaggtgtc 3180
gacaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt 3240
gtccctttta cgctatgtgg atacgtgtt ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc 3300
cgtatggctt tcattttctc ctcttgtat aaatcctggt tgctgtctct ttatgaggag 3360
ttgtggcccc ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgactg tgtttgctga cgcaaccccc 3420
actggttggg gcattgccac cacctgtcag ctctttccg ggactttcgc tttccccctc 3480
cctattgcca cggcggaact catcgccgc tgcttgcgc gctgctggac aggggctcgg 3540
ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaagc tgacgtcctt tccatggctg 3600
ctgcctgtg ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt cccttcggcc 3660
ctcaatccag cggaccttcc tttccgcggc ctgctgccg ctctgcggcc tttcccgct 3720
cttcgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcctggactt 3780
cgagctcggg acgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc 3840
cctcccccggt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa 3900
atgaggaaat tgcatacgc tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg 3960
ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagccc agcttttgtt ccctttagt 4020
agggttaatt gcgcgcttgg cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt gaaattgtta 4080
tccgctaatt cactcctcag gtgcaggctg cctatcagaa ggtggtggct ggtgtggcca 4140
atgccctggc tcacaaatac cactgagatc ttttccctc tgccaaaaat tatggggaca 4200
tcataagacc ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttcatgcaa 4260
tagtgtgttg gaattttttg tgtctctcac tcggaaggac atatgggagg gcaaatcatt 4320
taaaacatca gaatgagtat ttggtttaga gtttggcaac atatgccc atgctggctg 4380
ccatgaacaa aggttggcta taaagaggtc atcagtatat gaaacagccc cctgctgtcc 4440
attccttatt ccatagaaaa gccttgactt gaggttagat tttttttata ttttgttttg 4500
tgttatTTTT ttctttaaca tccctaaaat tttccttaca tgttttacta gccagatttt 4560
tcctcctctc ctgactactc ccagtcatag ctgtccctct tctcttatgg agatccctcg 4620
acctgcagcc caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 4680
ccgtcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc 4740
taatgagtga gctaactcac attaatgtcg ttgcgtcac tgcccgttt ccagtcggga 4800

```

```

aacctgtcgt gccagcggaa ccgcatctca attagtcage aaccatagtc ccgcccctaa 4860
ctccgcccata cccgccccta actccgcccga gtcccgcccga ttctccgccc catggctgac 4920
taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt 4980
agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct tttgcaaaaa gctaacttgt ttattgcagc 5040
ttataatggg tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag catttttttc 5100
actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggaaccg 5160
ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 5220
gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 5280
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 5340
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 5400
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 5460
aaccgcacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 5520
cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc gggaagcgtg 5580
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 5640
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgt gcgccttate cggtaactat 5700
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 5760
aggattagca gagcgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 5820
tacggctaca ctagaagaac agtatttgggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 5880
ggaaaaagag ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 5940
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 6000
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gttaagggtat tttggtcatg 6060
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 6120
atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 6180
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 6240
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagt ctgcaatgat accgcgagac 6300
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 6360
agaagtgggt ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 6420
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 6480
gtgggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggtt tcatcagct ccggttccca acgatcaagg 6540
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagegggta gctccttcgg tcctccgatc 6600
gttgtcagaa gtaagttggc cgagtggtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat 6660
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 6720
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 6780
aataccgcgc cacatagcag aacttttaaaa gtgtcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 6840
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 6900
cccaactgat cttcagcatc ttttaacttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 6960
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataaag gcgacacgga aatgttgaat actcactc 7020
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 7080
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagt 7140

```

ccacctgg 7148

<210> 24

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 24

Met	His	His	His	His	His	His	Gly	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Ser	Ser	Ile	Phe	Ile	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys	Tyr	Phe	Lys
			20					25					30		
Glu	Lys	Val	Ser	Thr	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Asp	Asn	Glu
		35					40					45			
Ala	Trp	Asn	Gly	Phe	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Arg	Asn	Glu	Ala
		50				55					60				
Asp	Glu	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	Asp	Asn	Leu	Ala	Arg	Gln	Met	Ile	Met
65				70					75					80	
Lys	Asp	Lys	Asn	Trp	His	Asp	Lys	Gly	Gln	Gln	Tyr	Arg	Asn	Trp	Phe
			85					90					95		
Leu	Lys	Glu	Phe	Pro	Arg	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Asp	Asn	Ile	Arg
			100					105					110		
Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Gln	Lys	Val	His	Lys	Gly	Thr
			115				120					125			
Thr	Ile	Ala	Asn	Val	Val	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile
			130				135				140				
Leu	Thr	Leu	Val	Gly	Met	Gly	Leu	Ala	Pro	Phe	Thr	Glu	Gly	Gly	Ser
145				150					155					160	
Leu	Val	Leu	Leu	Glu	Pro	Gly	Met	Glu	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Leu
			165						170				175		
Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Thr	Met	Asp	Tyr	Gly	Lys	Lys	Trp	Trp	Thr
			180					185					190		
Gln	Ala	Gln	Ala	His	Asp	Leu	Val	Ile	Lys	Ser	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys
			195				200					205			
Glu	Val	Arg	Glu	Phe	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Ser	Asn	Phe	Leu	Ser	Leu
		210				215				220					
Ala	Gly	Asn	Thr	Tyr	Gln	Leu	Thr	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Asp	Ile	Arg

225	230	235	240
Ala Leu Arg Arg Ala Arg Ala Asn Leu Gln Ser Val Pro His Ala Ser			
	245	250	255
Ala Ser Arg Pro Arg Val Thr Glu Pro Ile Ser Ala Glu Ser Gly Glu			
	260	265	270
Gln Val Glu Arg Val Asn Glu Pro Ser Ile Leu Glu Met Ser Arg Gly			
	275	280	285
Val Lys Leu Thr Asp Val Ala Pro Val Ser Phe Phe Leu Val Leu Asp			
290	295	300	
Val Val Tyr Leu Val Tyr Glu Ser Lys His Leu His Glu Gly Ala Lys			
305	310	315	320
Ser Glu Thr Ala Glu Glu Leu Lys Lys Val Ala Gln Glu Leu Glu Glu			
	325	330	335
Lys Leu Asn Ile Leu Asn Asn Asn Tyr Lys Ile Leu Gln Ala Asp Gln			
	340	345	350
Glu Leu Gly Asn Ser			
355			

ApoL1 野生型、G1 和 G2 的转基因的示意图

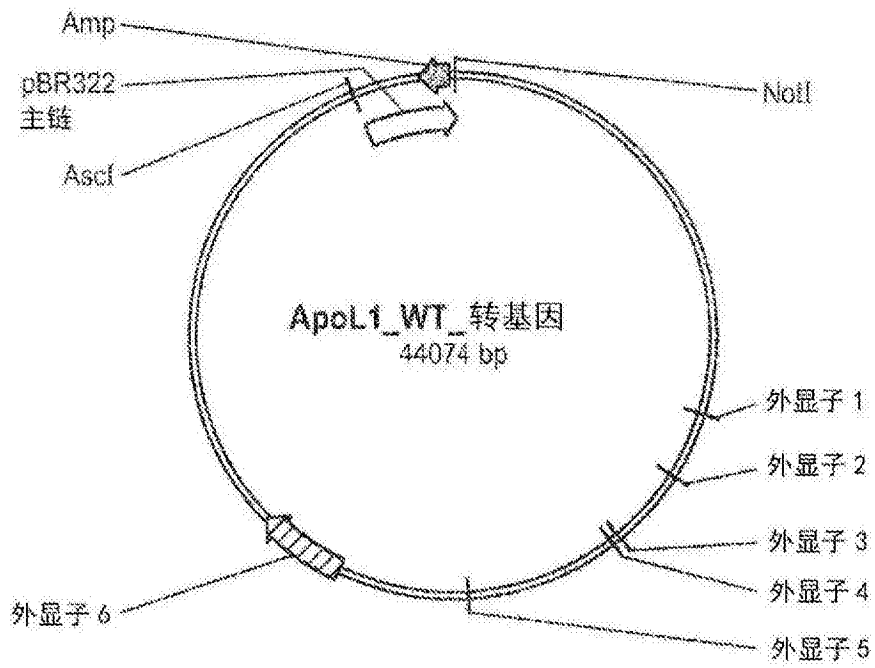


图1A

ApoL1 野生型、G1 和 G2 的转基因的示意图

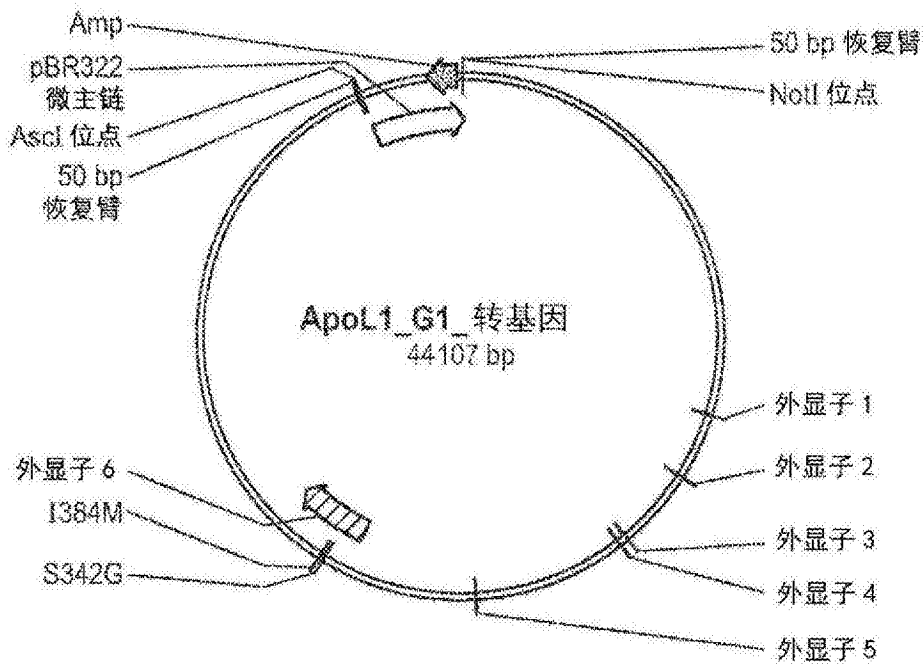


图1B

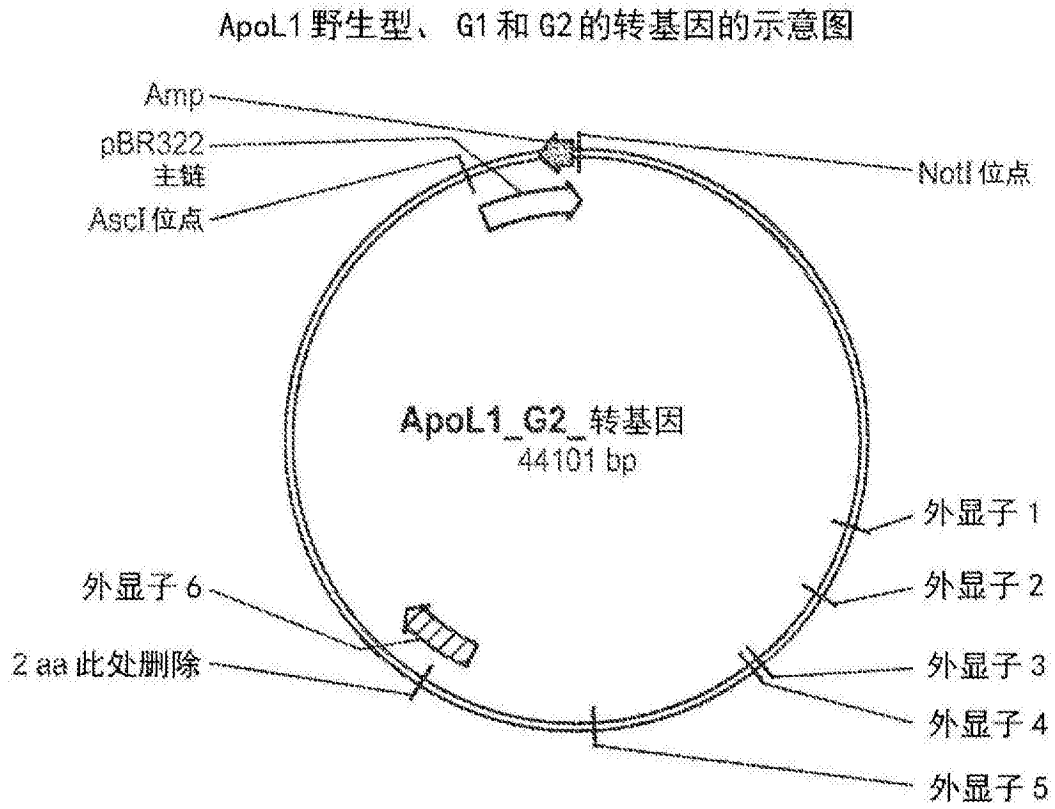


图1C

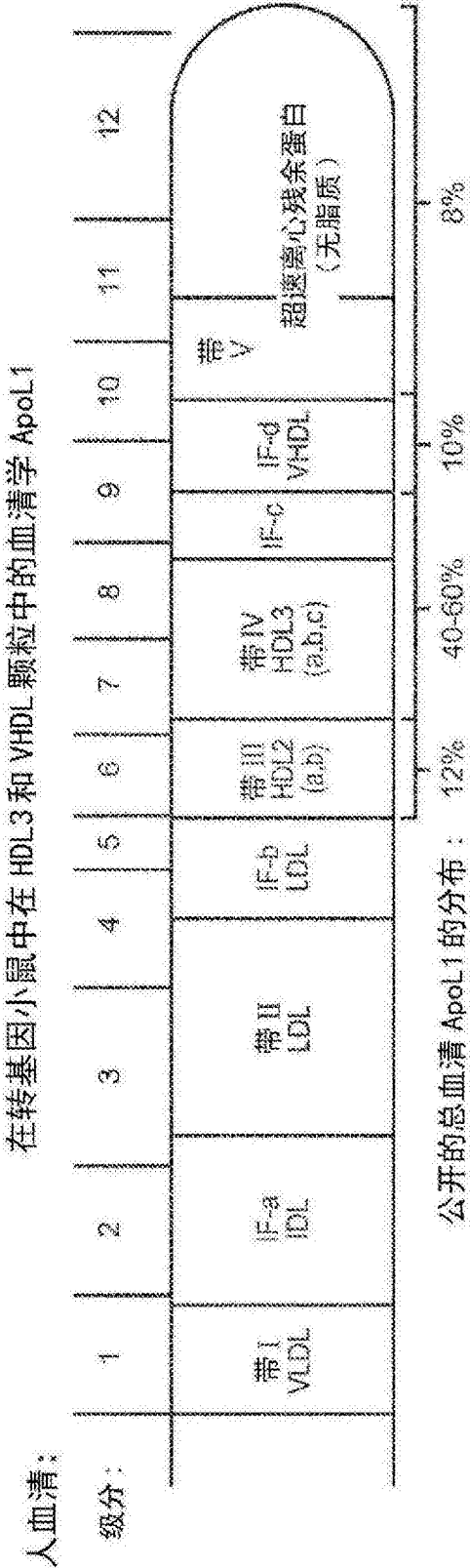


图2A



图2B

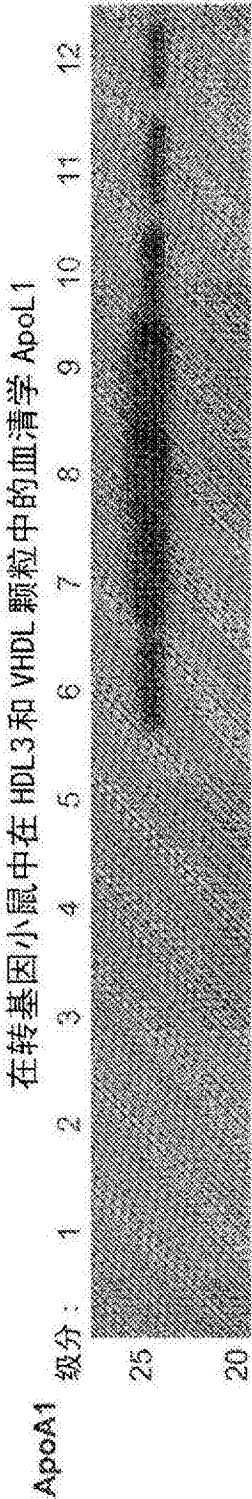


图2C



图2D

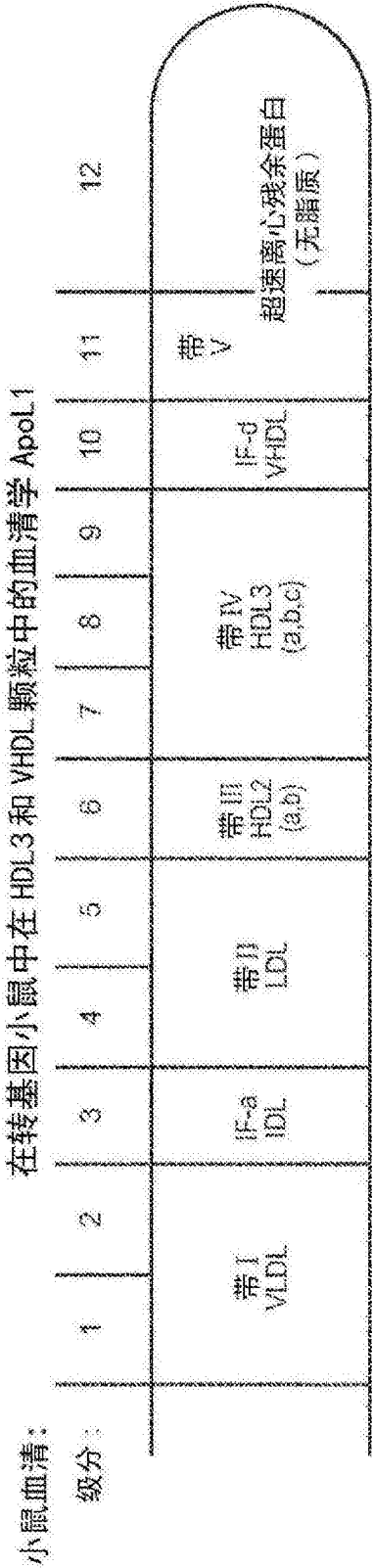


图2E

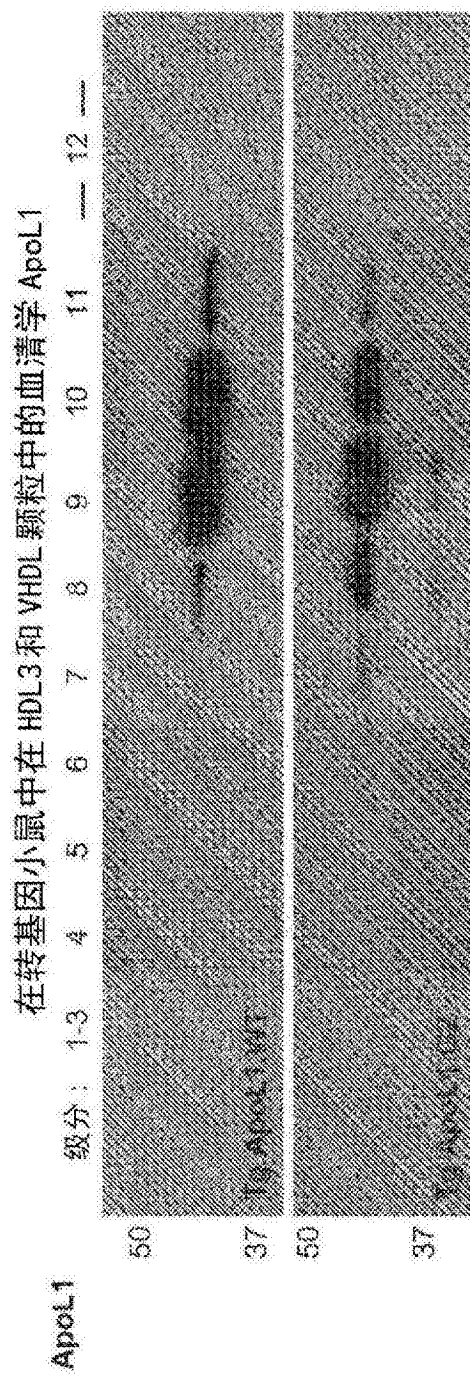


图2F

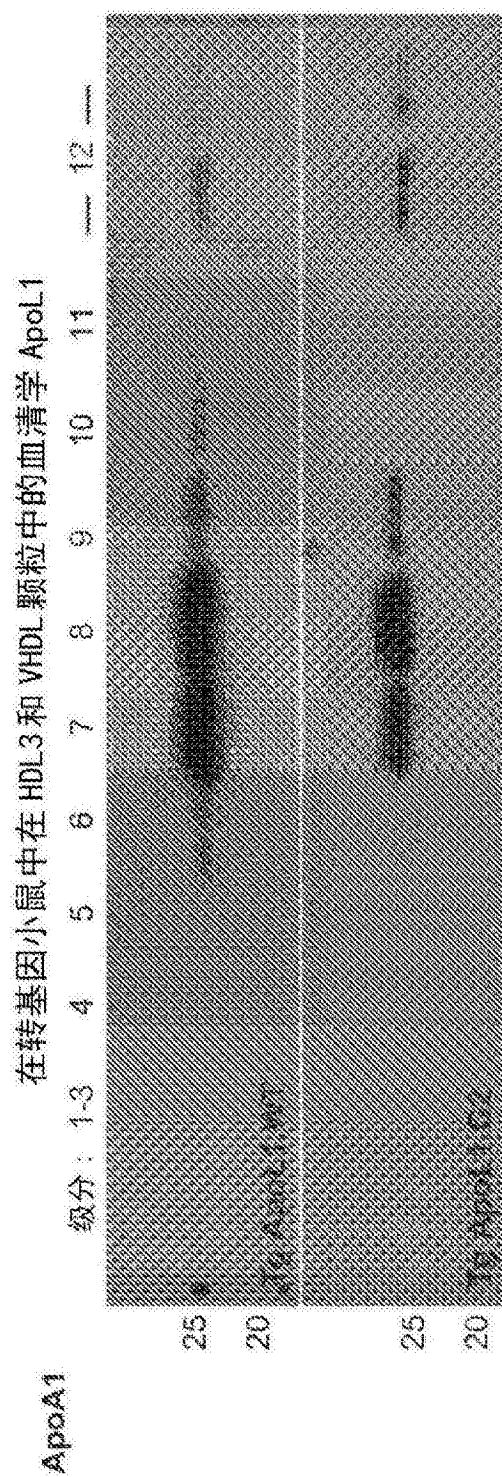


图2G

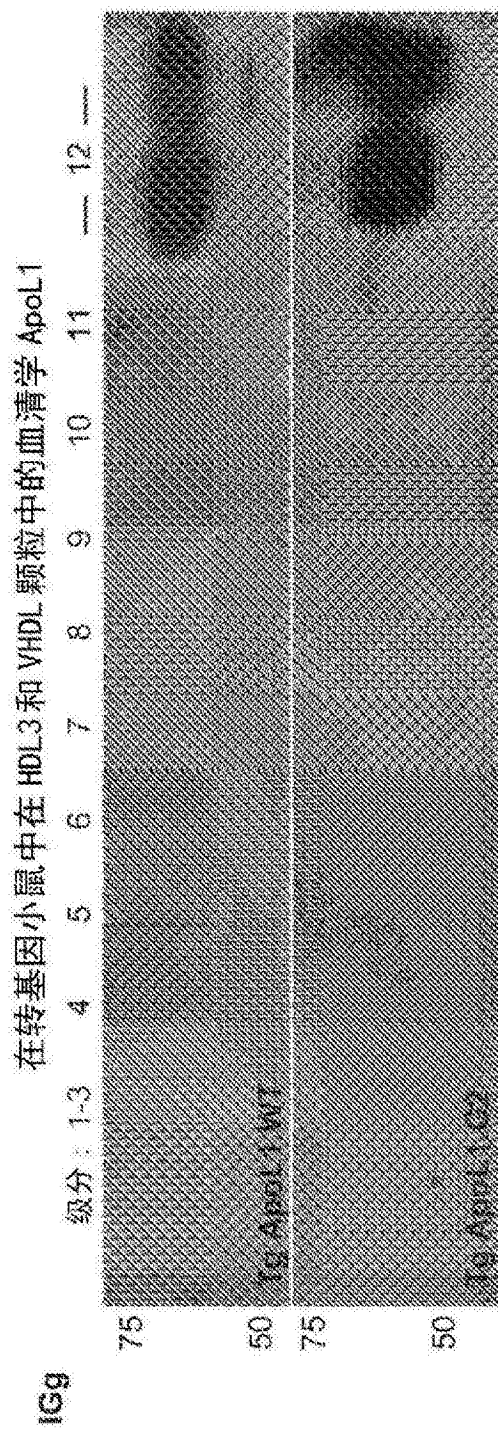


图2H

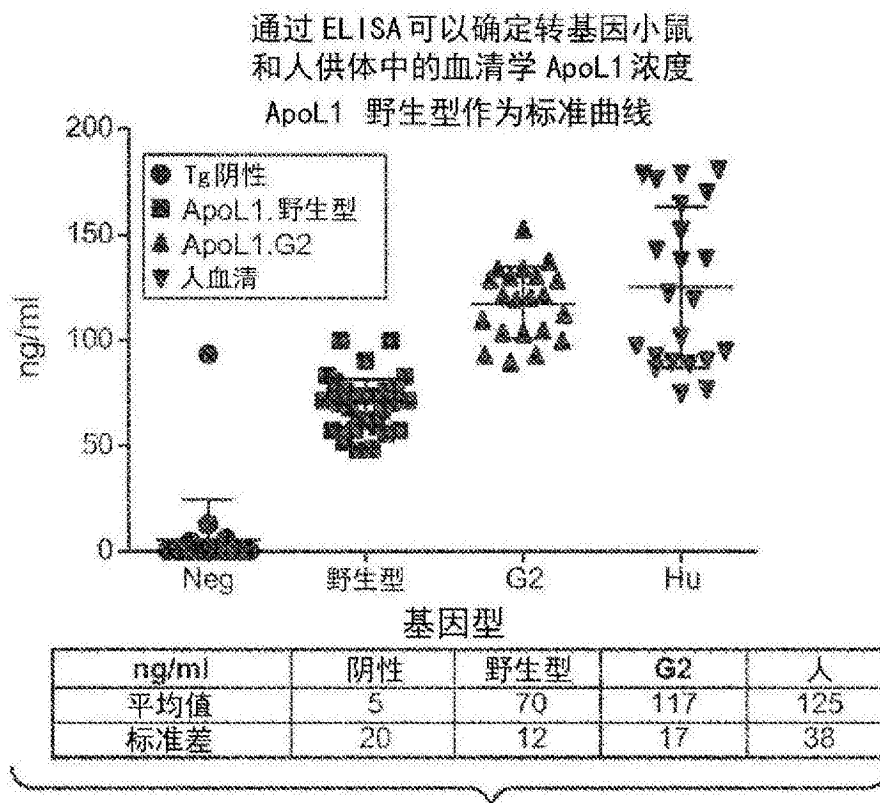


图3A

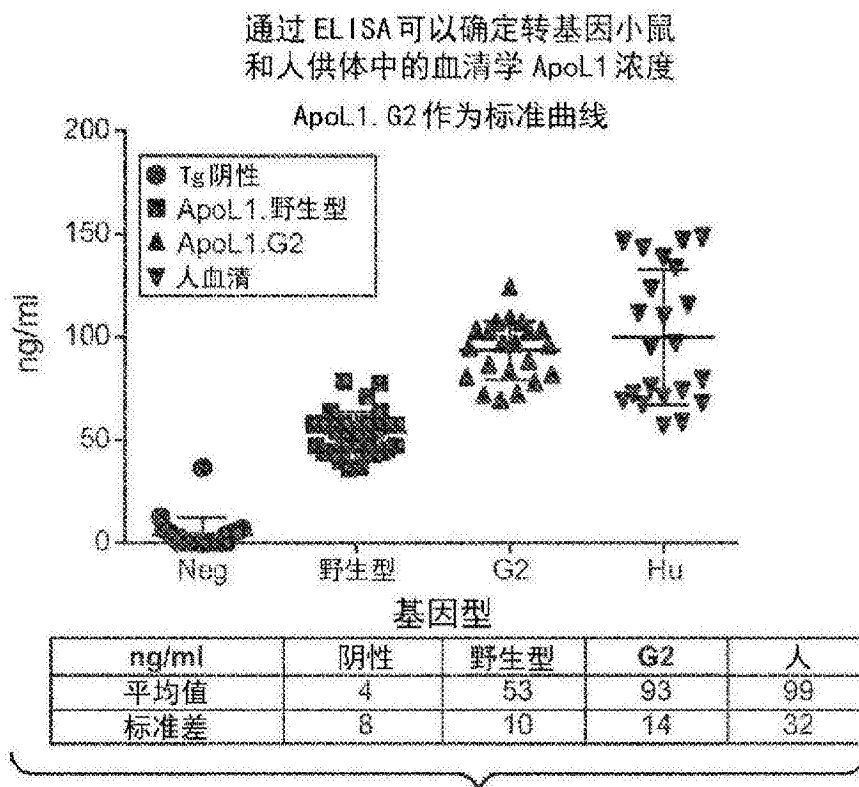


图3B

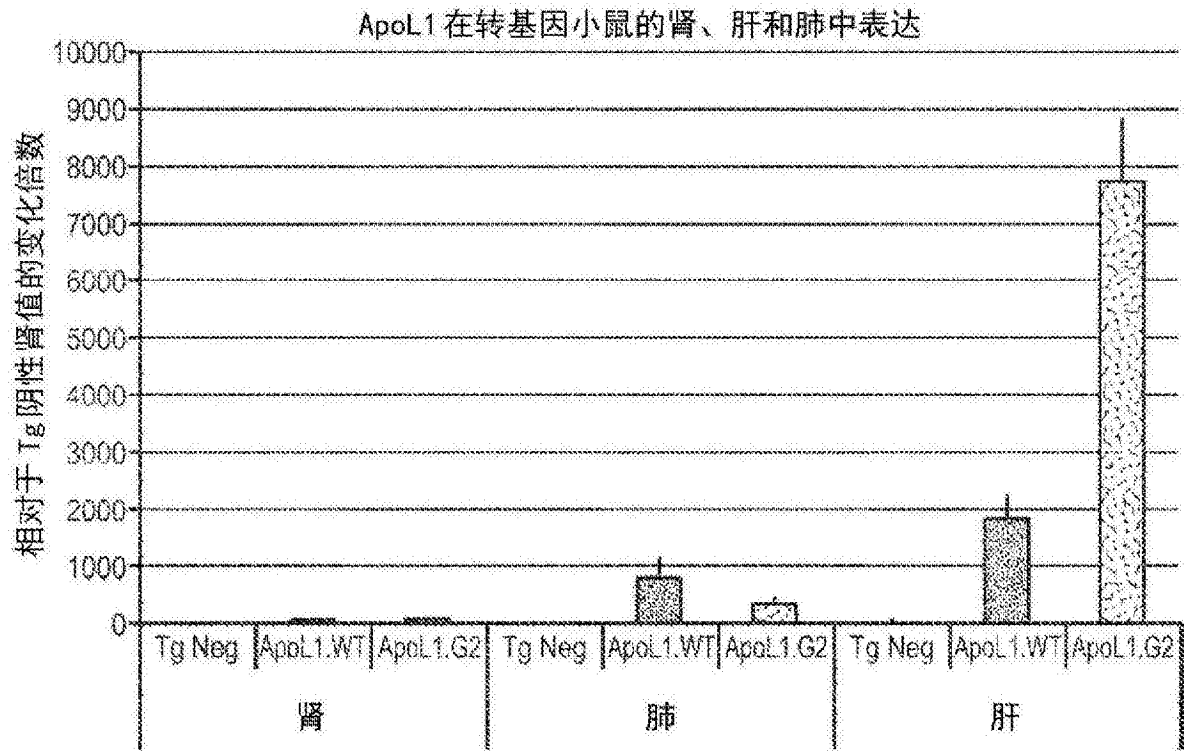


图4A

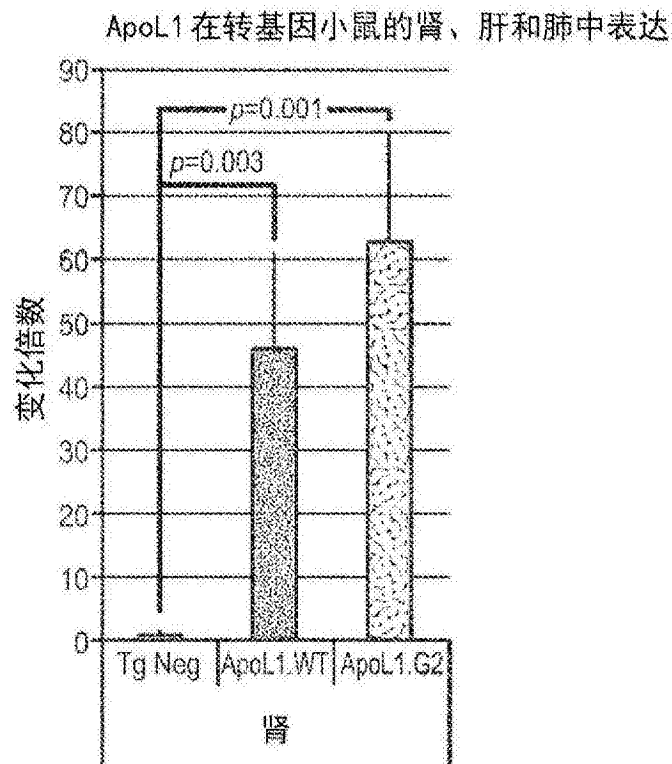


图4A'

ApoL1 在转基因小鼠的肾、肝和肺中表达

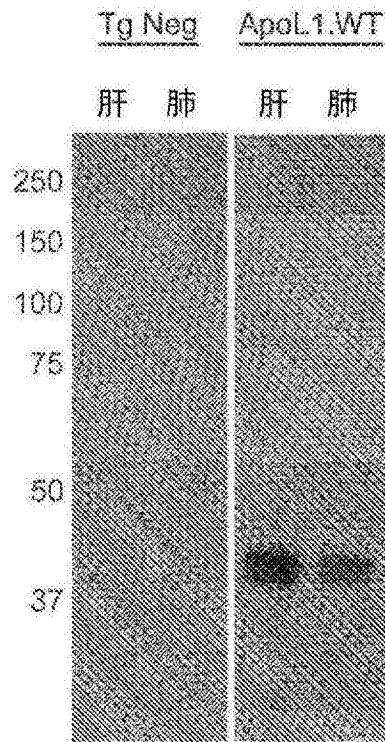


图4B

ApoL1 在转基因小鼠的肾、肝和肺中表达

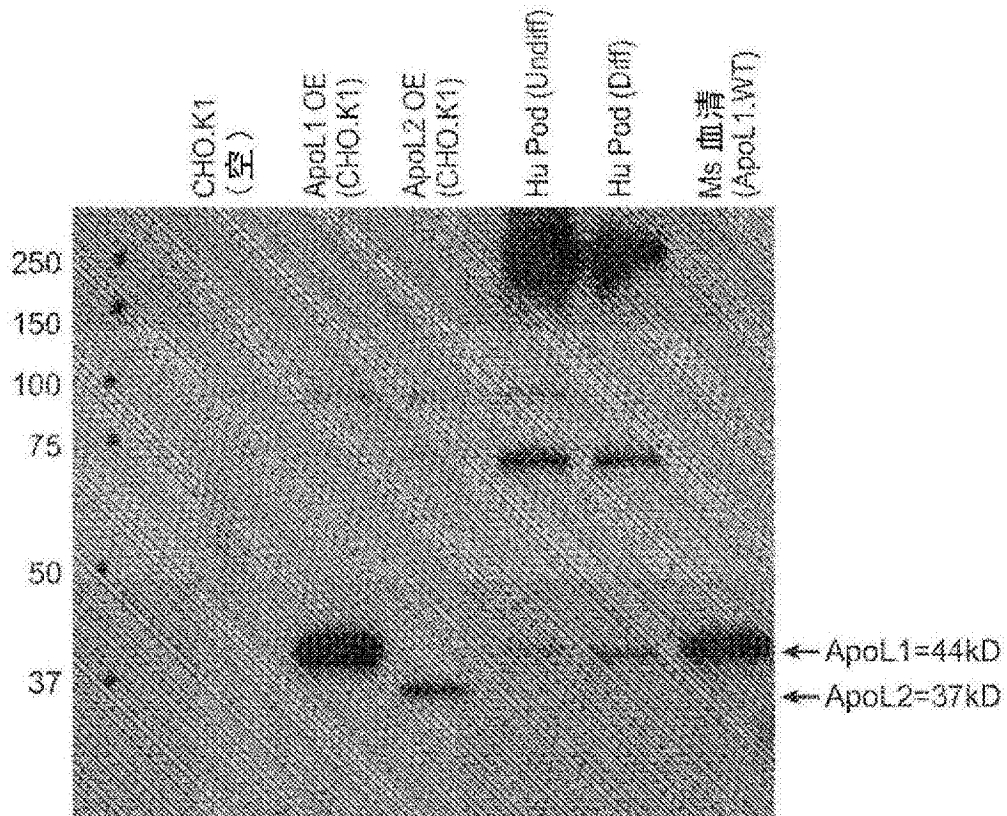


图4C

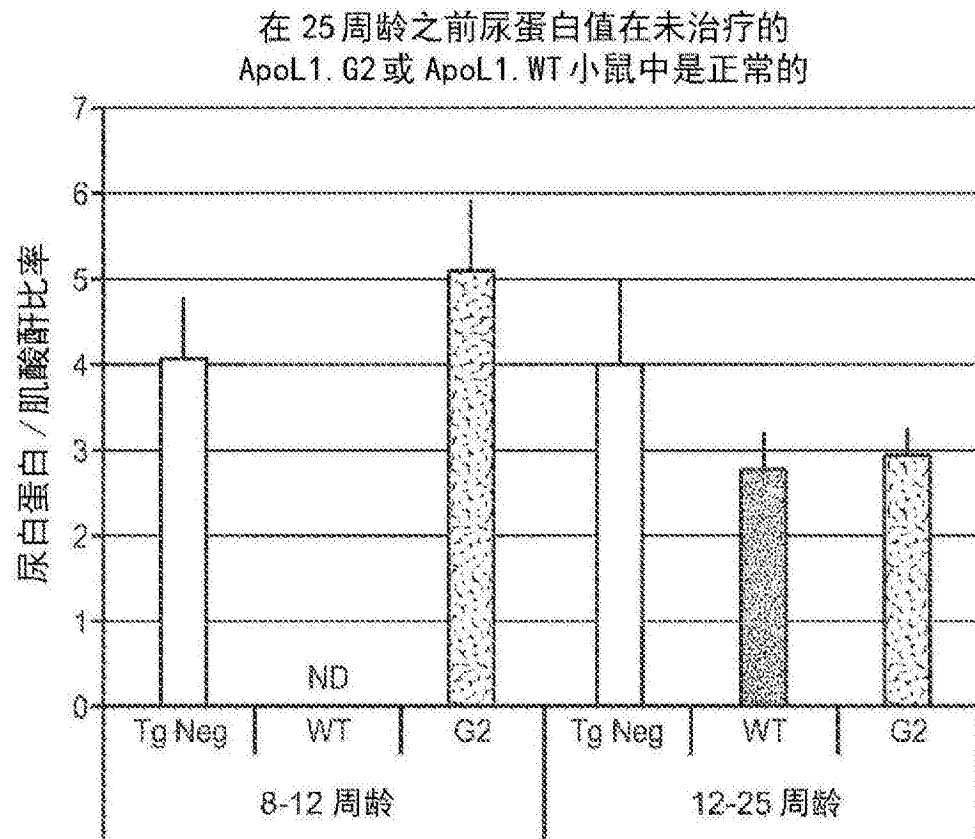


图5

在第9-11天12、15或20 mg/kg的Adriamycin剂量对蛋白尿具有不同影响

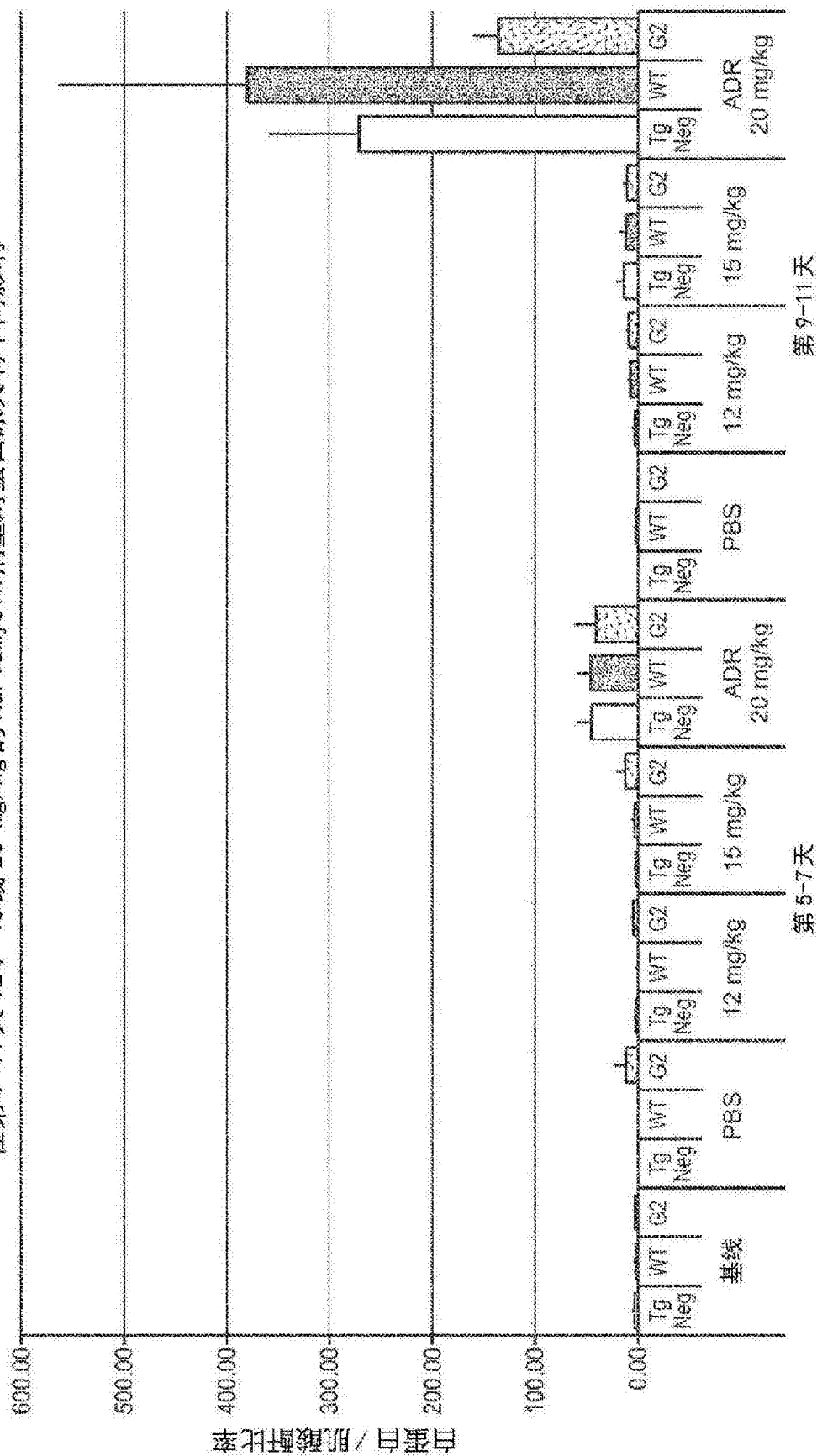


图6

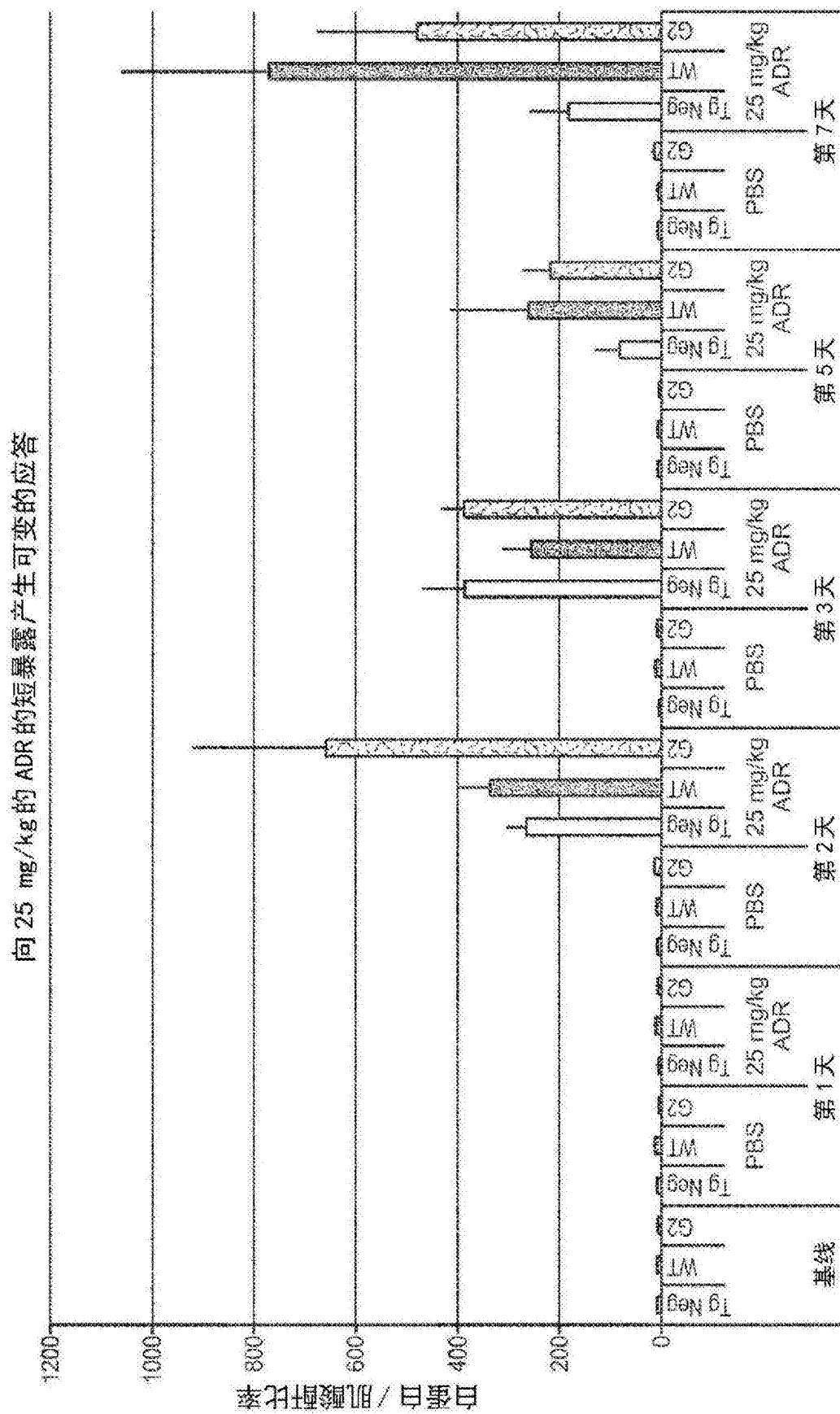


图7A

向 25 mg/kg 的 ADR 的
短暴露产生可变的应答

Tg Neg, ADR
在第 6 天取下

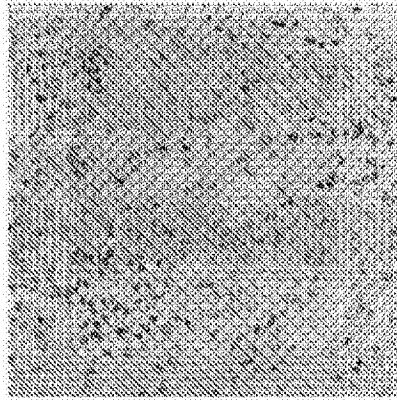
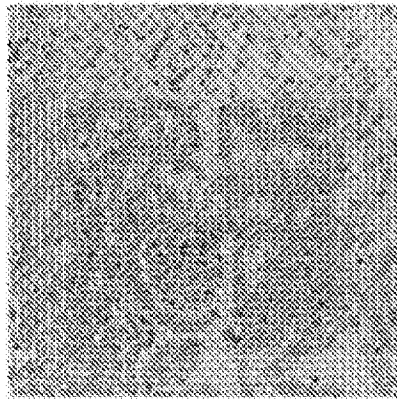


图7B



Tg Neg, PBS
在第 9 天取下

向 25 mg/kg 的 ADR 的
短暴露产生可变的应答

图7C

向 25 mg/kg 的 ADR 的
短暴露产生可变的应答

ApoL1.WT, ADR
在第 7 天取下

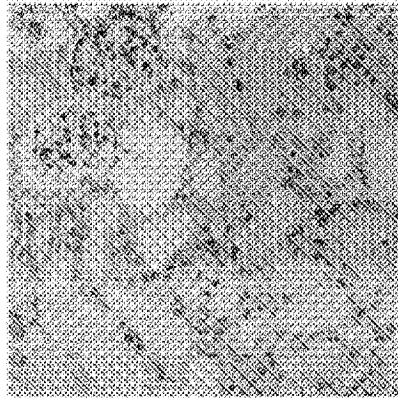
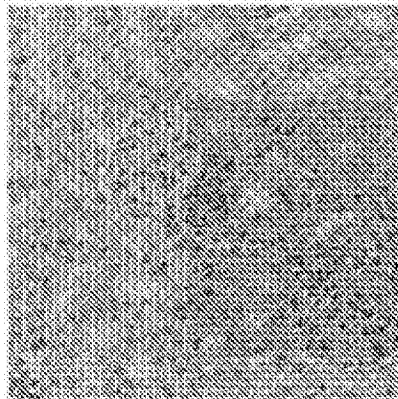


图7D



ApoL1.WT, ADR
在第 9 天取下

向 25 mg/kg 的 ADR 的
短暴露产生可变的应答

图7E

向 25 mg/kg 的 ADR 的
短暴露产生可变的应答

ApoL1.G2, ADR
在第 3 天死亡

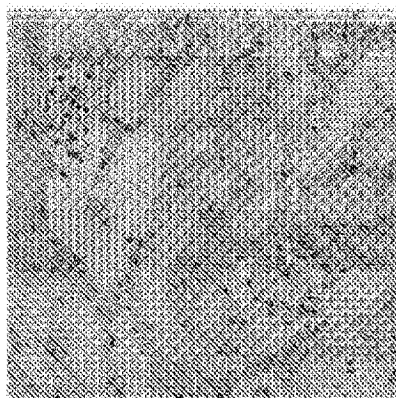
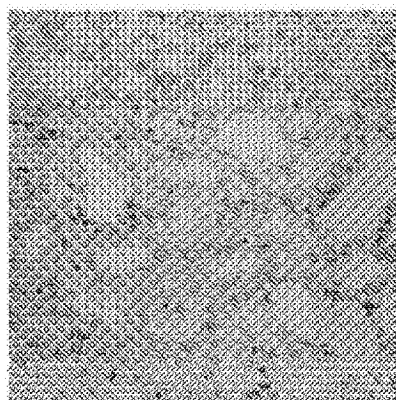


图7F



ApoL1.G2, ADR
在第 9 天取下

向 25 mg/kg 的 ADR 的
短暴露产生可变的应答

图7G

重量减轻在用 Adriamycin 治疗 21 天的、
表达 ApoL1.G2 变体的转基因小鼠中是更突出的

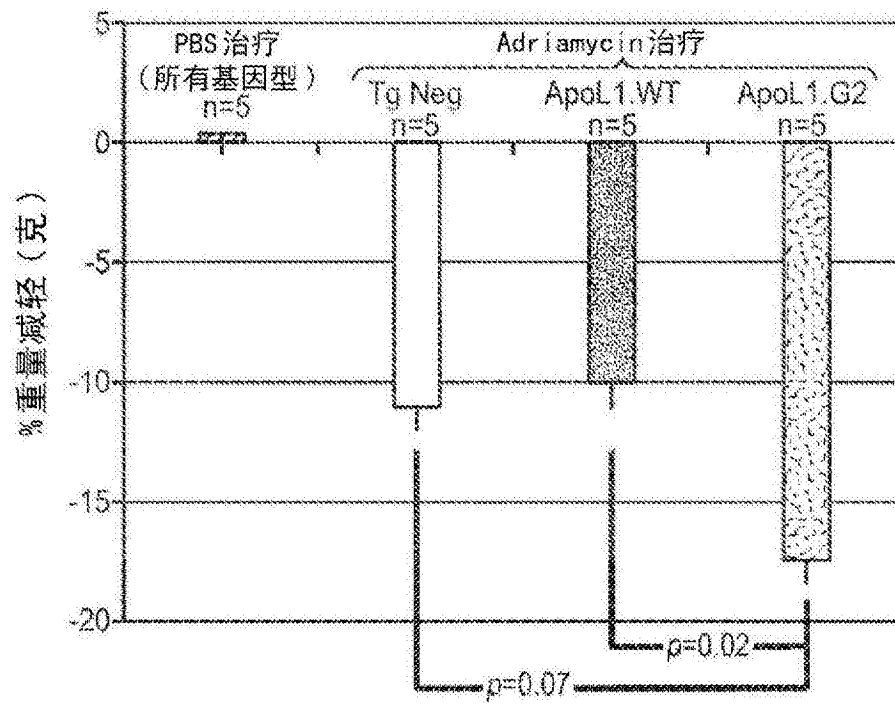


图8

蛋白尿在用 Adriamycin 治疗的 ApoL1.G2 小鼠中明显更高

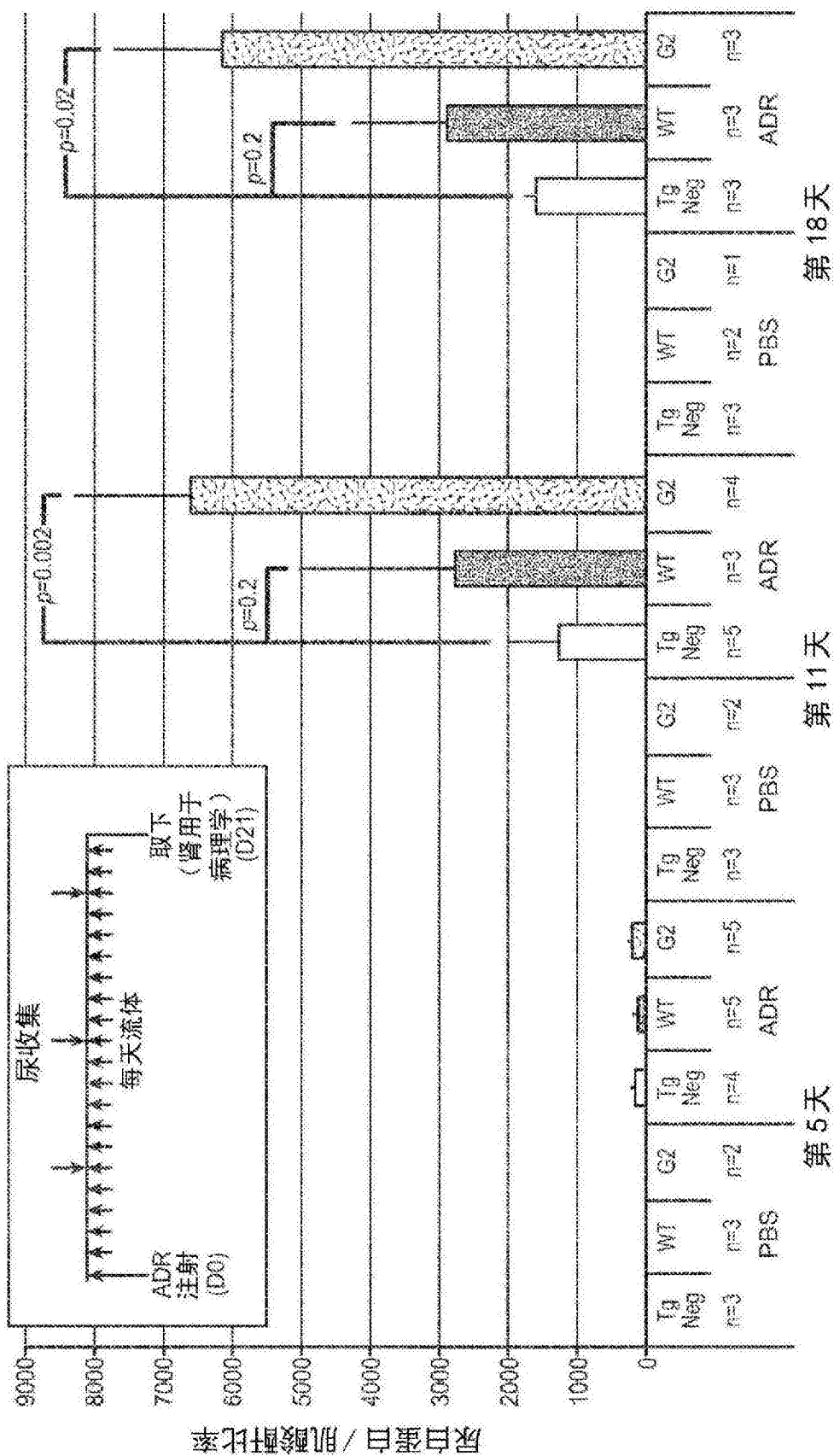


图9

足细胞消失在 Adriamycin 治疗
的动物中是明显的

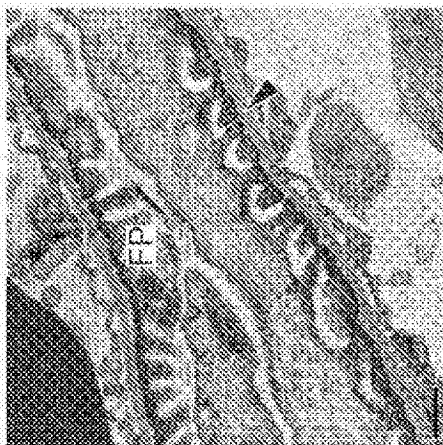


图10A

足细胞消失在 Adriamycin 治疗
的动物中是明显的

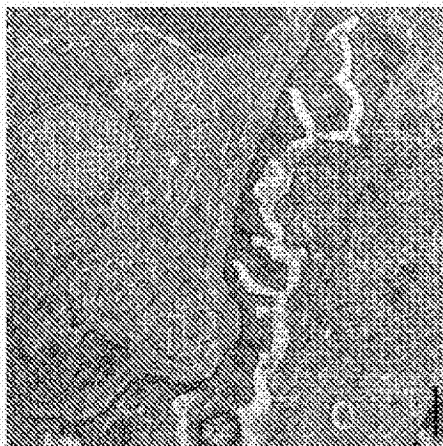


图10B

足细胞消失在 Adriamycin 治疗
的动物中是明显的



图10C

足细胞消失在 Adriamycin 治疗的动物中是明显的

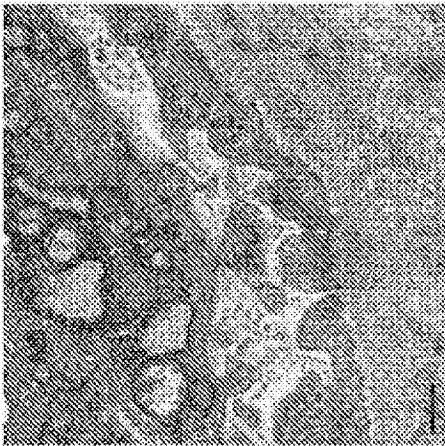
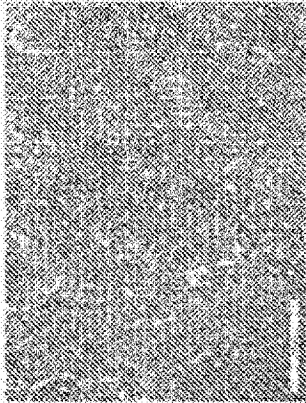


图10D

ADR 诱导的肾病模型中肾病的进展在表达 ApoL1. WT 或 ApoL1. G2 的转基因动物的病理学中与转基因阴性小鼠相比是明显的

PBS 治疗的动物



H&E 低放大率

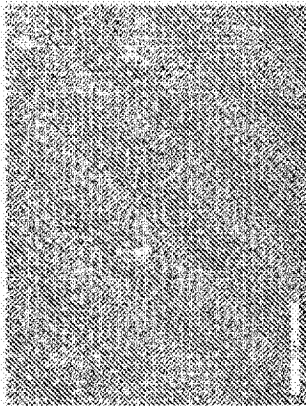
(5x)

图11A

ADR 诱导的肾病模型中肾病的进展在表达 ApoL1. WT 或 ApoL1. G2 的转基因动物的病理学中与转基因阴性小鼠相比是明显的

Adriamycin 治疗的动物

转基因阴性



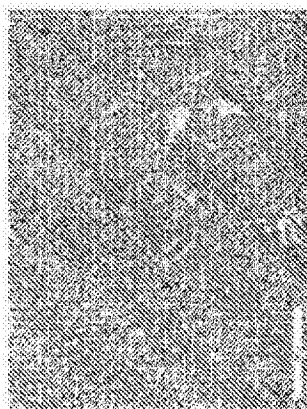
H&E 低放大率

(5x)

图11B

ADR 诱导的肾病模型中肾病的进展在表达 ApoL1.WT 或 ApoL1.G2 的转基因动物的病理学中与转基因阴性小鼠相比是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.WT

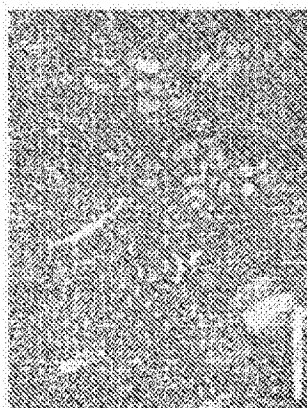


H&E 低放大率
(5x)

图11C

ADR 诱导的肾病模型中肾病的进展在表达 ApoL1.WT 或 ApoL1.G2 的转基因动物的病理学中与转基因阴性小鼠相比是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.G2



H&E 低放大率
(5x)

图11D

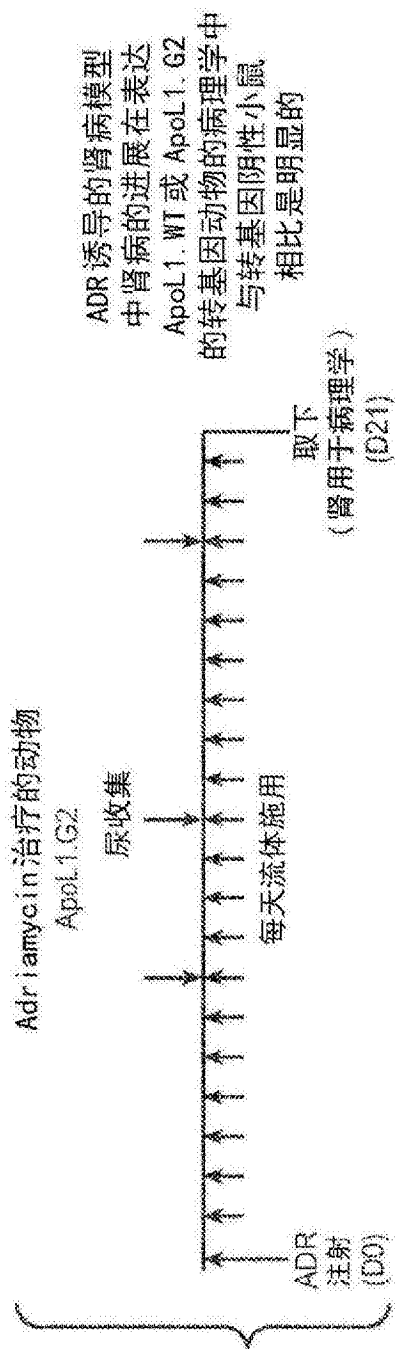


图11E

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

PBS 治疗的动物

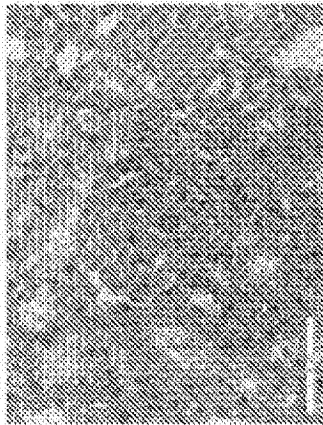


H&E
(20x)

图11F

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
转基因阴性

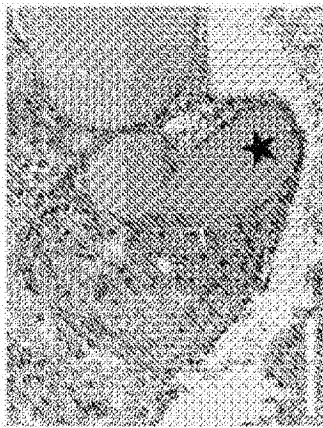


H&E
(20x)

图11G

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.WT



H&E
(20x)

图11H

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.G2

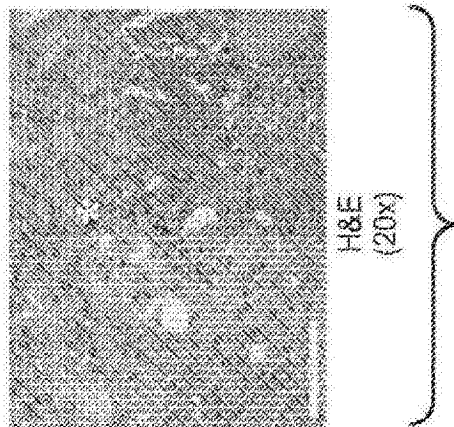


图11I

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.G2

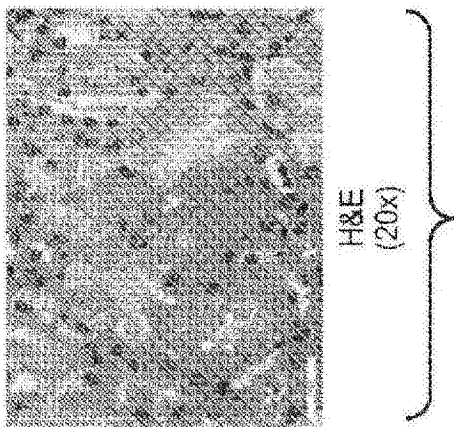


图11J

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

PBS 治疗的动物

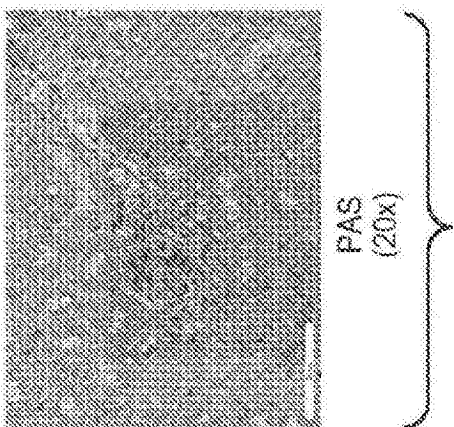
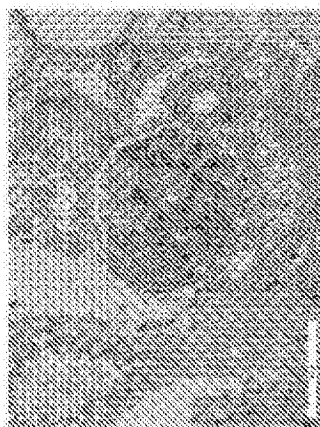


图11K

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1.WT 或 ApoL1.G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
转基因阴性



PAS
(20x)

图11L

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1.WT 或 ApoL1.G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.WT

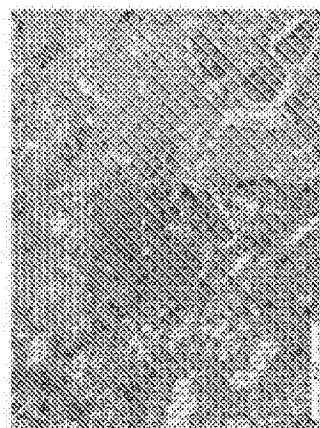


PAS
(20x)

图11M

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1.WT 或 ApoL1.G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.G2



PAS
(20x)

图11N

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1.WT 或 ApoL1.G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.G2

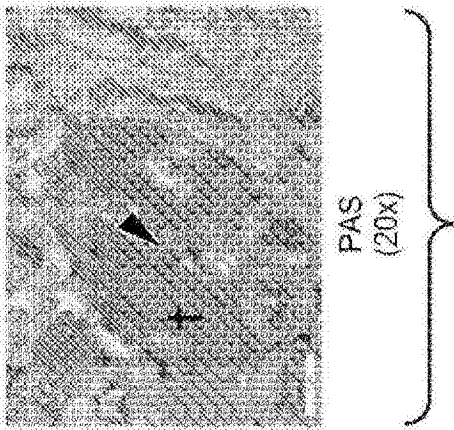


图11o

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1.WT 或 ApoL1.G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

PBS 治疗的动物

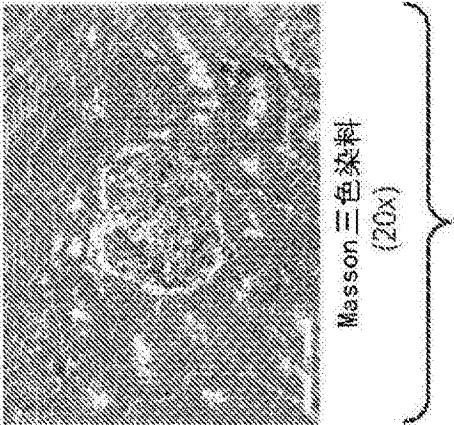


图11p

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
ApoL1.WT 或 ApoL1.G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
转基因阴性

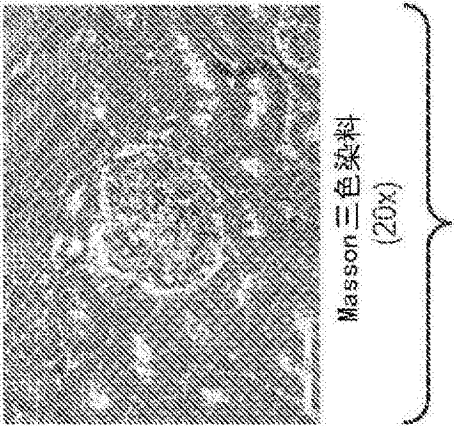
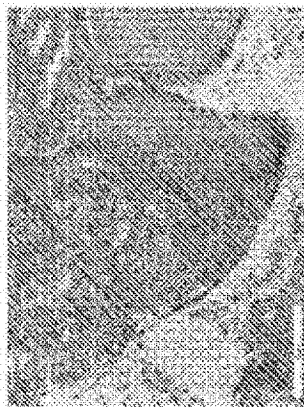


图11q

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
Apol1. WT 或 Apol1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
Apol1. WT



Masson 三色染料
(20x)

图11R

ADR 诱导的肾病模型
中肾病的进展在表达
Apol1. WT 或 Apol1. G2
的转基因动物的病理学中
与转基因阴性小鼠相比
是明显的

Adriamycin 治疗的动物
Apol1. G2



Masson 三色染料
(20x)

图11S

ADR 诱导的肾病模型中肾病的进展在表达
ApoL1. WT 或 ApoL1. G2 的转基因动物的
病理学中与转基因阴性小鼠相比是明显的

Adriamycin 治疗的动物
ApoL1.G2

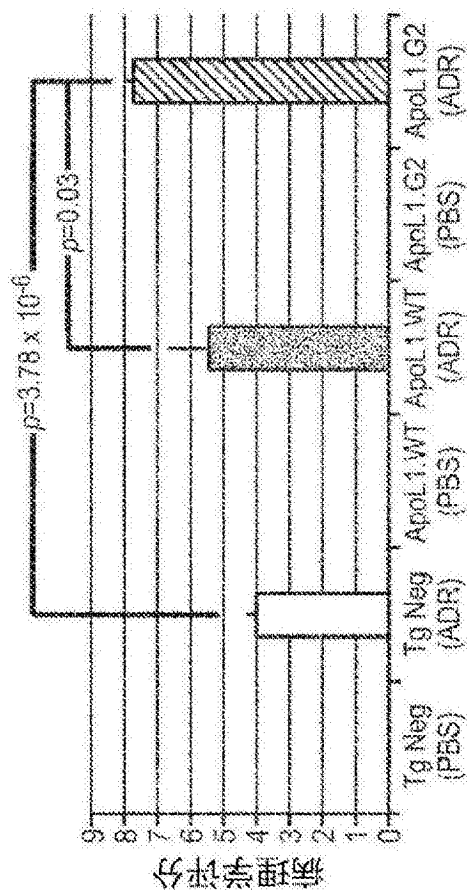


图11T

在转基因动物中表达的 ApoL1. WT 和 ApoL1. G2
会促进 ADR 诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展

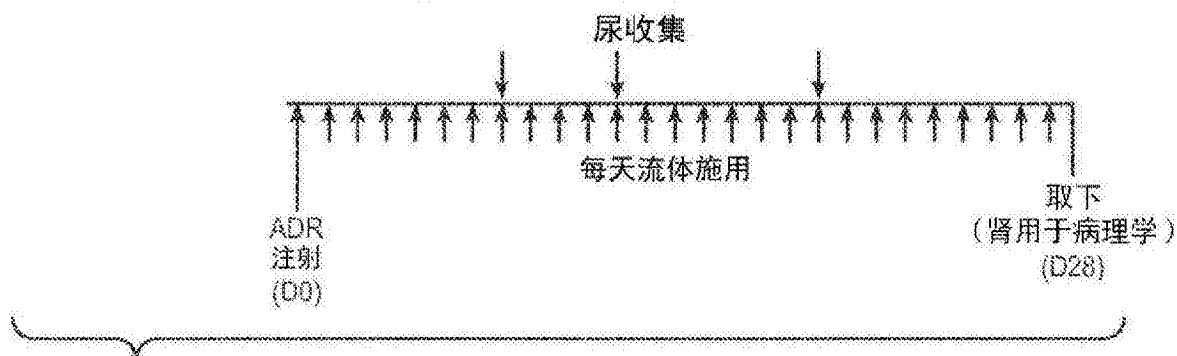


图12A

在转基因动物中表达的 ApoL1. WT 和 ApoL1. G2
会促进 ADR 诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展

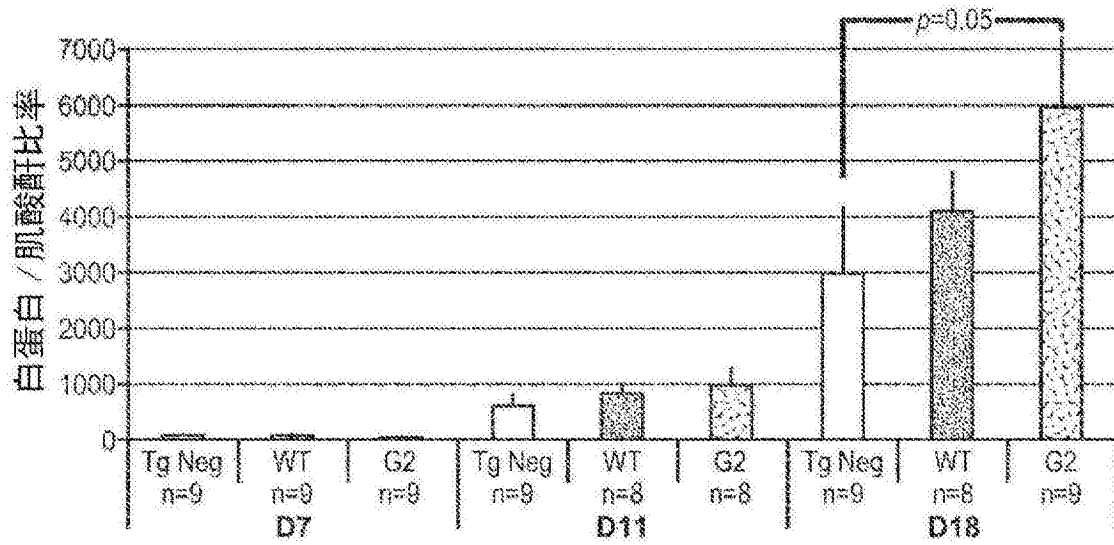
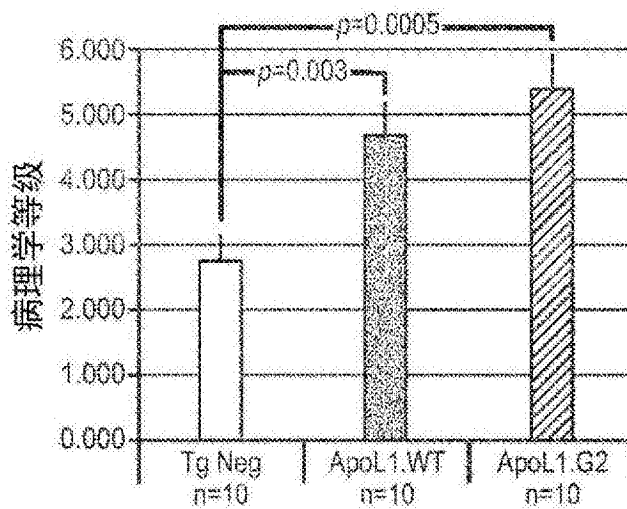


图12B



在转基因动物中
表达的 ApoL1. WT
和 ApoL1. G2
会促进 ADR 诱导的
肾病模型中的
肾脏疾病进展

图12C

通过腺病毒递送在非转基因动物中表达的 ApoL1.WT、ApoL1.G1
和 ApoL1.G2 会促进 ADR 诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展

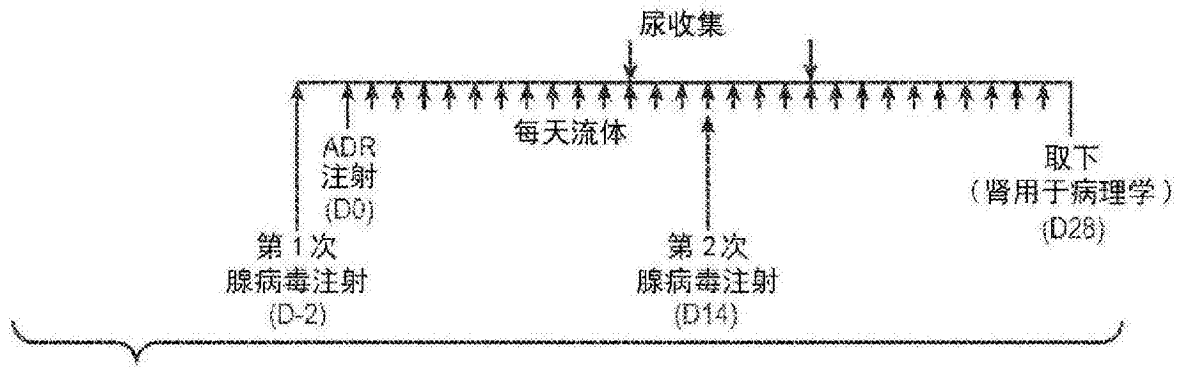


图13A

通过腺病毒递送在非转基因动物中表达的 ApoL1.WT、ApoL1.G1
和 ApoL1.G2 会促进 ADR 诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展

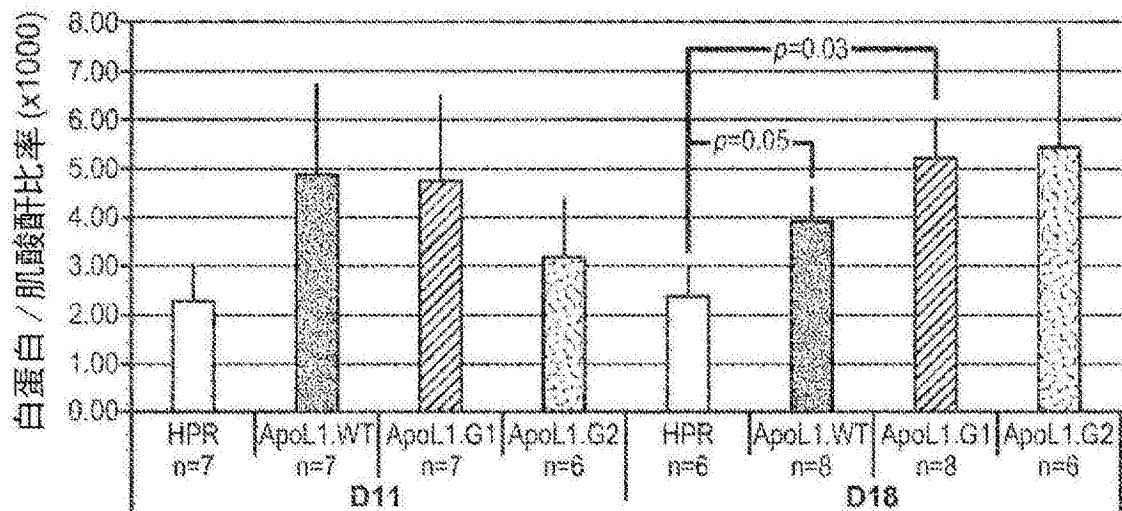


图13B

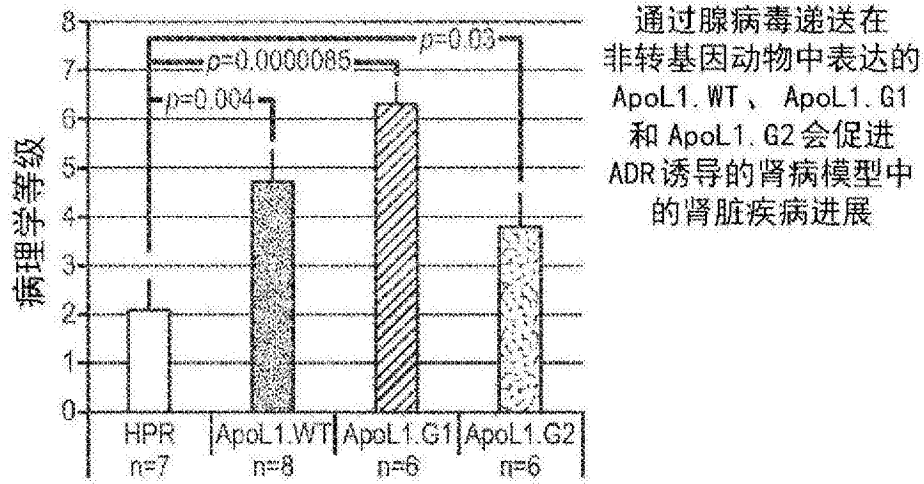


图13C

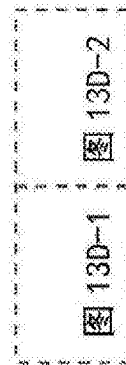


图13D

通过腺病毒递送在非转基因动物中表达的 ApoL1.WT、ApoL1.G1
和 ApoL1.G2 会促进 ADR 诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展

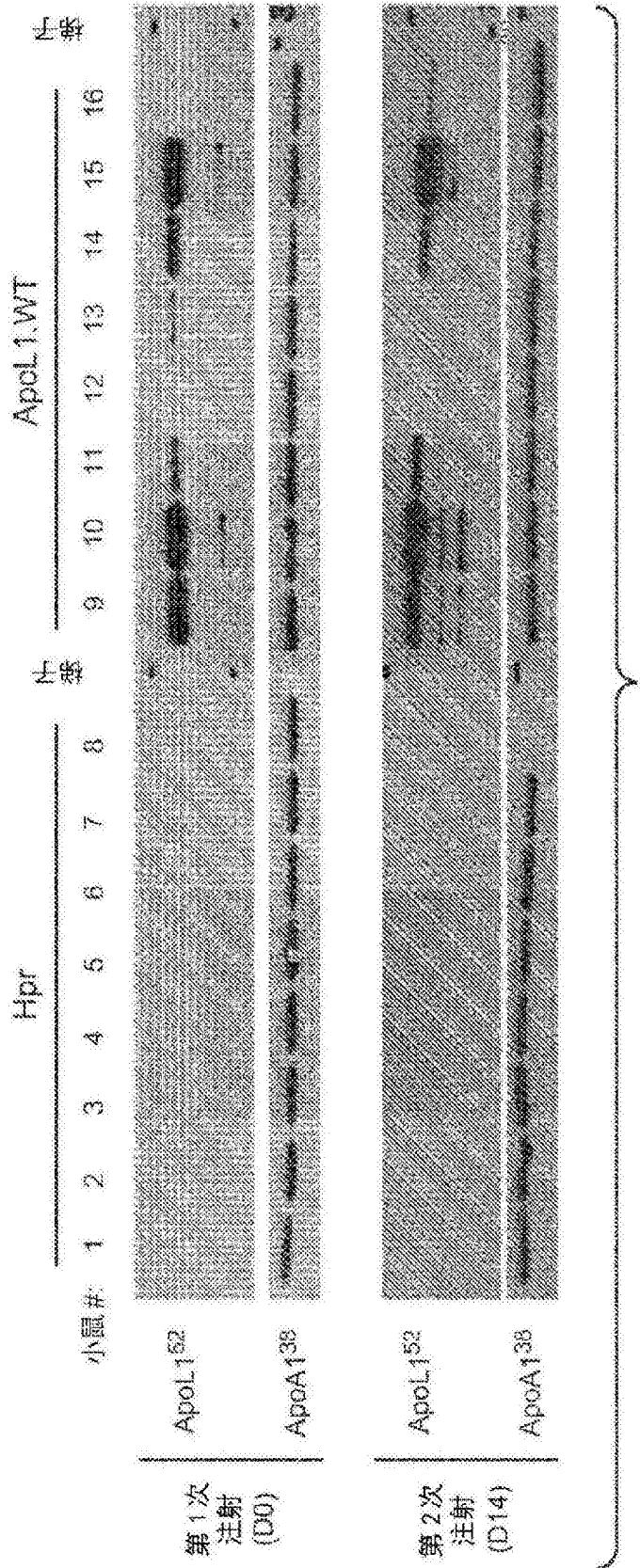


图13D-1

通过腺病毒递送在非转基因动物中表达的 ApoL1.WT、ApoL1.G1
和 ApoL1.G2 会促进 ADR 诱导的肾病模型中的肾脏疾病进展

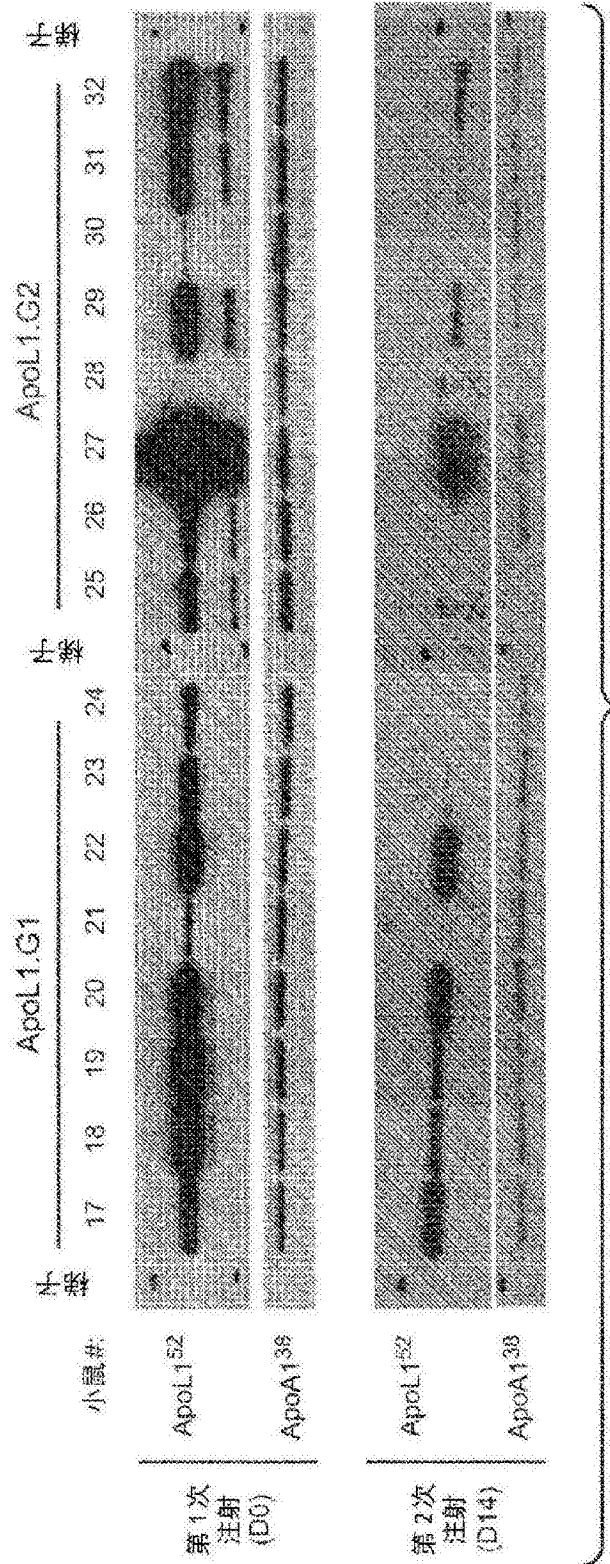


图13D-2

通过 FACS 用于交叉结构域绘图的 APOL1 构建体

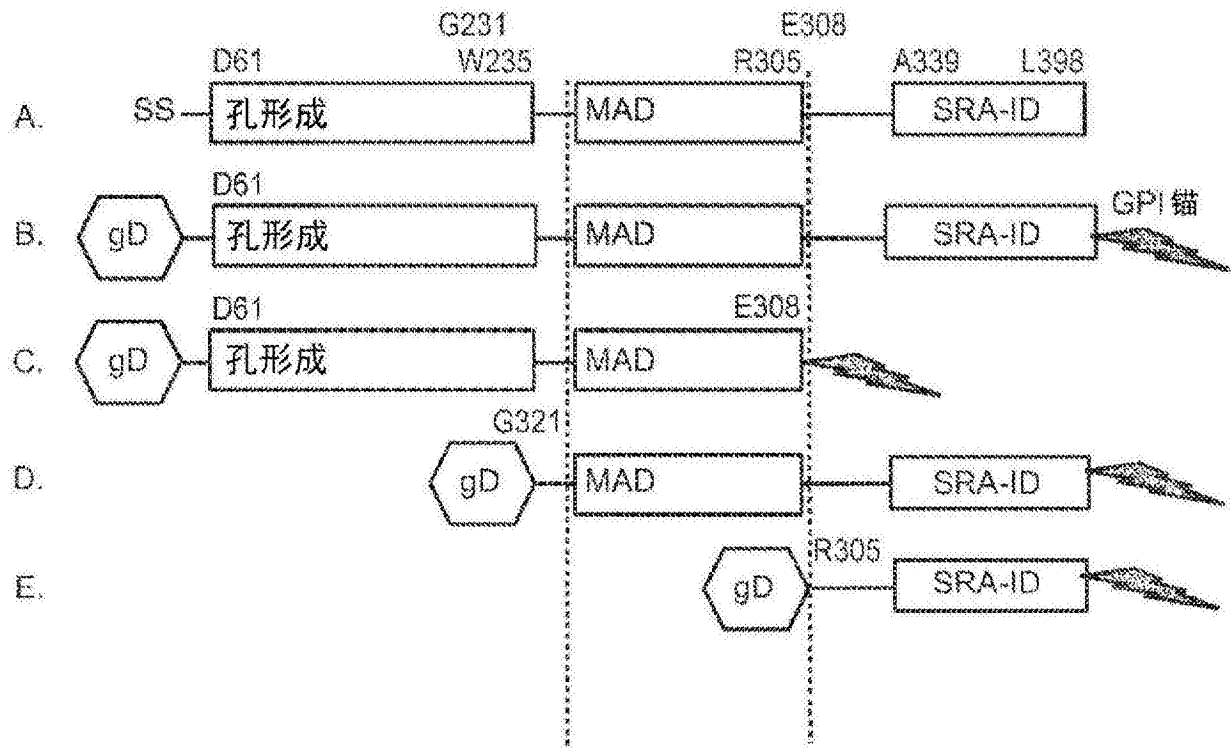


图14

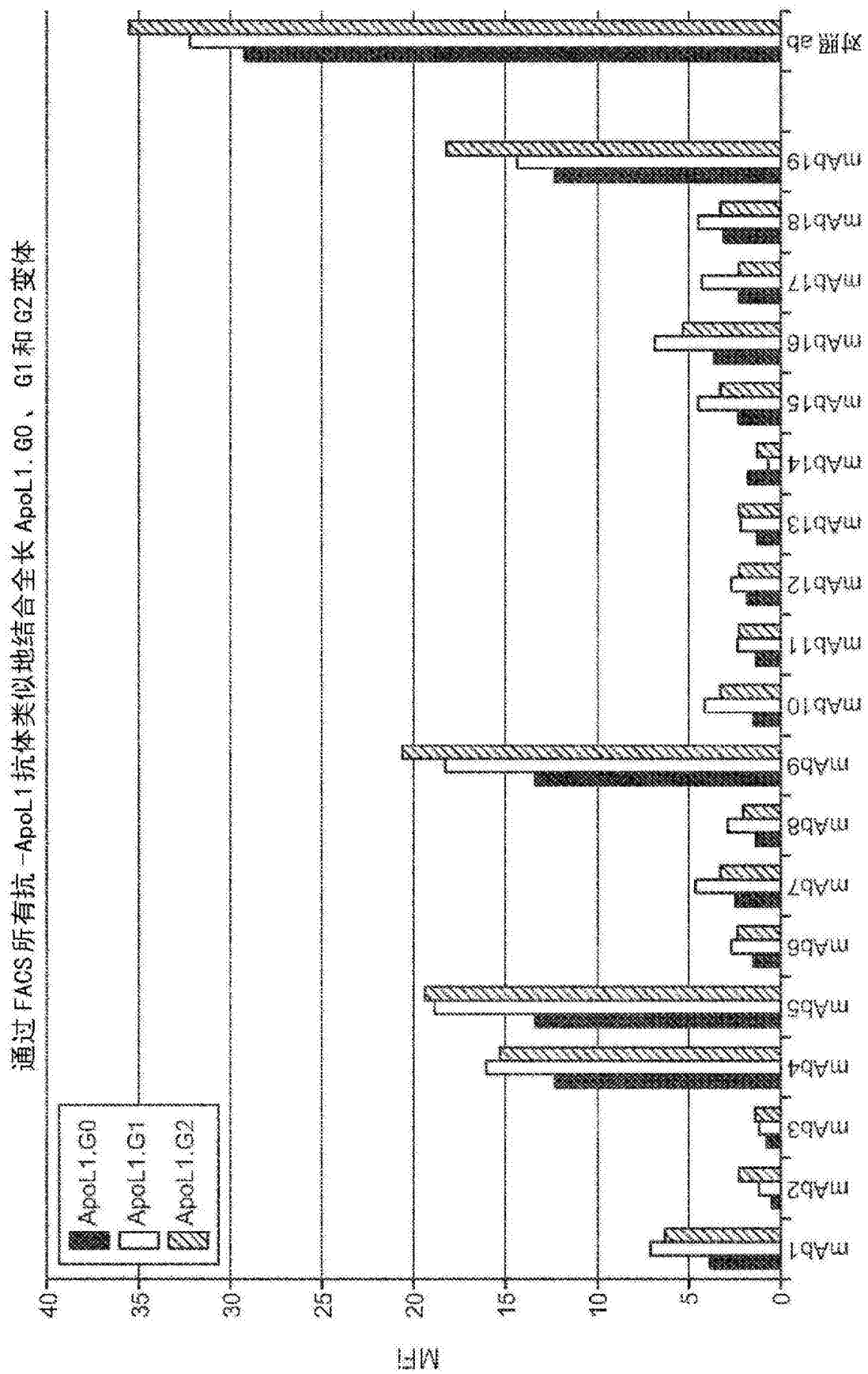


图15

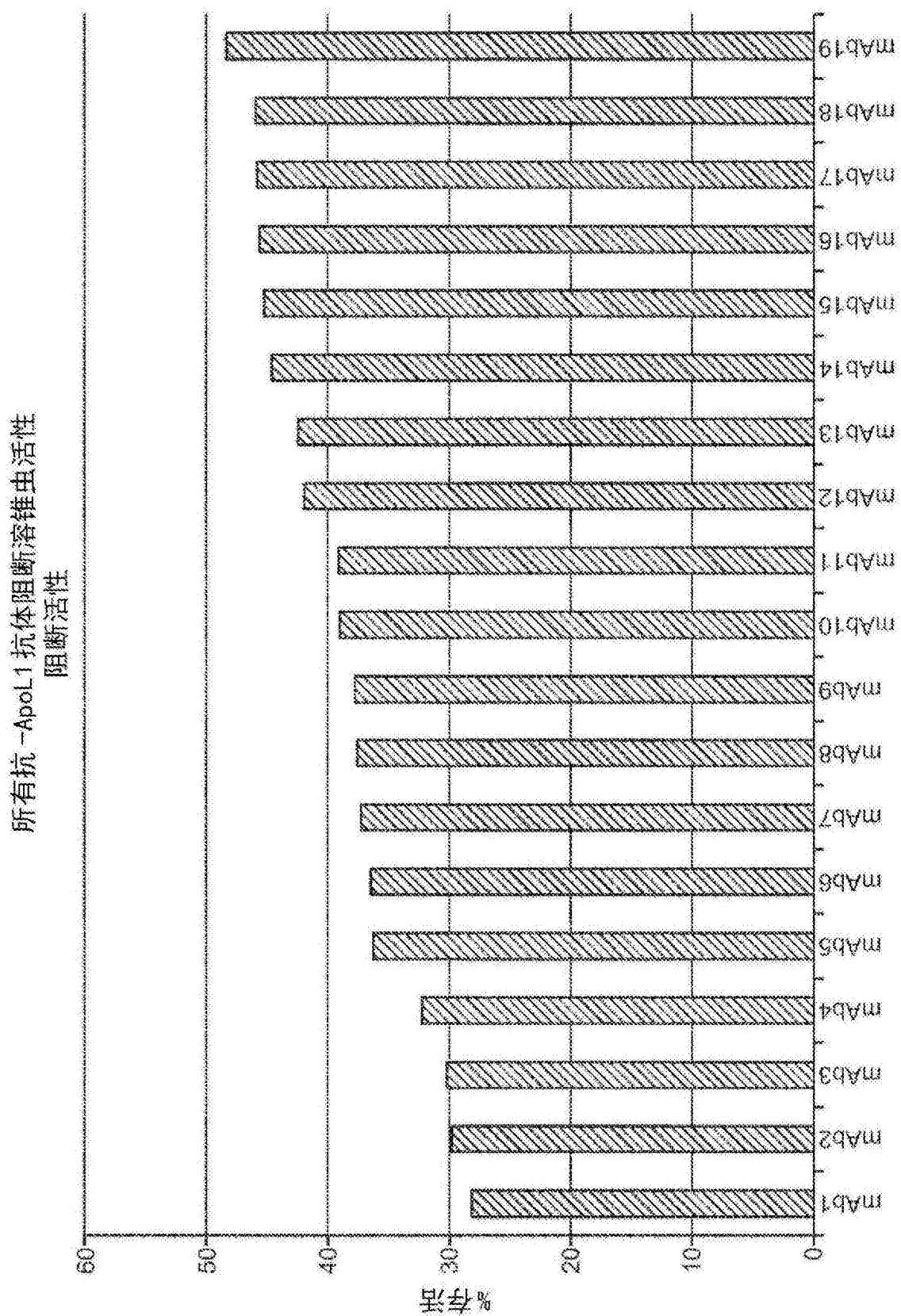


图16