



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108027367 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680037097.0

G·J·F·朗博 G·多拉

(22)申请日 2016.07.08

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30)优先权数据

代理人 孟凡宏 王月

15306148.6 2015.07.10 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2017.12.22

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/066320 2016.07.08

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/009245 EN 2017.01.19

(71)申请人 楚尼斯

地址 法国尼斯

申请人 国家科学研究中心

尼斯索菲娅昂蒂波利斯大学

(72)发明人 V·L·M·埃斯诺 B·波斯基

权利要求书2页 说明书21页

(54)发明名称

基于PLA2R1表位谱和扩散分析的膜性肾病的预后和监测

(57)摘要

本发明涉及一种基于分析PLA2R1表位谱来评估受试者的特发性膜性肾病预后的方法。本发明进一步涉及一种基于分析PLA2R1表位扩散来监测特发性膜性肾病进展的方法。本发明强调三个PLA2R1结构域(CysR、CTLD1和CTLD7)参与抗PLA2R1活性,其中两个(CTLD1和CTLD7)与活动性特发性膜性肾病更紧密相关,可能通过表位扩散机制相连。

1. 一种用于评估受试者的特发性膜性肾病预后的方法,所述方法包括步骤a)检测和/或测量从所述受试者获得的生物样品中抗PLA2R1的C型凝集素结构域1 (CTLD1)的自身抗体的水平,其中存在抗CTLD1的自身抗体指示预后差。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述步骤a)进一步包括检测和/或测量抗PLA2R1的C型凝集素结构域7 (CTLD7)的自身抗体的水平,其中存在抗CTLD1的自身抗体和/或抗CTLD7的自身抗体指示预后差。

3. 权利要求2所述的方法,其中所述步骤a)进一步包括检测和/或测量抗PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域 (CysR)的自身抗体的水平。

4. 权利要求3所述的方法,其中:

-不存在分别抗CysR、CTLD1、CTLD7的自身抗体指示预后良好;和/或

-存在仅抗CysR的自身抗体指示预后良好;

-存在抗CysR的自身抗体和抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体指示预后差。

5. 权利要求1-4任一项所述的方法,其中:

-预后良好是指缓解机会高,优选需要血液透析或发展为肾衰竭的风险低;和

-预后差是指随后的肾脏并发症,例如肾衰竭发作的机会高,或复发的机会高。

6. 权利要求1-5任一项所述的方法,其中预后差与以下相关:

-蛋白尿增加,通常蛋白尿 $>4\text{g/g}$;和/或

-血清肌酐升高超过30%;和/或

-eGFR $<45\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ 。

7. 权利要求1-6任一项所述的方法,其中所述生物样品选自全血样品、血浆和血清,优选血清。

8. 权利要求1-6任一项所述的方法,其中所述生物样品通过活检,例如肾脏活检获得。

9. 权利要求1-8任一项所述的方法,其中所述步骤a)通过ELISA进行,更优选通过旨在评估抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体滴度的特异性ELISA测定进行。

10. 权利要求1-9任一项所述的方法,其中所述自身抗体是IgG4。

11. 权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述PLA2R1选自人PLA2R1、兔PLA2R1或小鼠PLA2R1或其片段。

12. 权利要求1-11任一项所述的方法,其中所述PLA2R1是小鼠PLA2R1或其片段。

13. 权利要求1-12任一项所述的方法,其中所述步骤a)包括以下子步骤:

-将从所述患者获得的生物样品与小鼠PLA2R1接触;和

-检测形成的任何抗原-抗体复合物;

其中存在形成的任何抗原-抗体复合物指示预后差。

14. 一种用于监测受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病的治疗方法,所述方法包括:

-在第一时间点测定在所述第一时间点从所述受试者获得的生物样品中选自分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的至少一种、优选两种、更优选三种自身抗体的水平,

-在第二时间点测定在所述第二时间点从所述受试者获得的生物样品中选自分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的至少一种、优选两种、更优选三种自身抗体的水平,和

-比较两个时间点的自身抗体的水平,

其中：

-在第二时间点不存在分别抗CTLD1和CTLD7的自身抗体或者分别抗CTLD1和CTLD7的自身抗体水平降低表明治疗有效；和/或

-在第二时间点存在抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体或者抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体水平升高表明治疗无效。

15. 权利要求14所述的方法，其中在第二时间点不存在分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体或所述自身抗体的水平降低表明所述治疗有效。

16. 权利要求14或15所述的方法，其中所述治疗是选自以下的免疫抑制治疗：环孢菌素、他克莫司、硫唑嘌呤、英夫利昔单抗、奥马珠单抗、达珠单抗、阿达木单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、那他珠单抗、奥马珠单抗和雷帕霉素、环磷酰胺、苯丁酸氮芥和利妥昔单抗。

17. 权利要求14或15所述的方法，其中所述对症治疗是基于肾素-血管紧张素系统的阻断。

18. 一种用于诊断受试者的特发性膜性肾病的方法，所述方法包括步骤a') 检测从所述受试者获得的生物样品中至少一种选自以下的自身抗体：

-抗PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域 (CysR) 的自身抗体；和/或

-抗PLA2R1的C型凝集素结构域1 (CTLD1) 的自身抗体；和/或

-抗PLA2R1的C型凝集素结构域7 (CTLD7) 的自身抗体，

其中存在一种、优选两种、更优选三种抗PLA2R1的CysR、CTLD1和/或CTLD7的不同自身抗体指示特发性膜性肾病。

基于PLA2R1表位谱和扩散分析的膜性肾病的预后和监测

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于PLA2R1表位谱分析来评估受试者的膜性肾病预后的方法。本发明进一步涉及一种基于PLA2R1表位扩散分析来监测膜性肾病进展的方法。

背景技术

[0002] 特发性膜性肾病 (iMN) 是一种自身免疫疾病, 且是成人肾病综合征的常见病因。疾病演变随自发缓解、持续性蛋白尿或末期肾病而高度可变。2009年, Beck等人发现M型磷脂酶A2受体 (PLA2R1) 是iMN中主要的足细胞抗原。在随后的研究中, 已经在53%-80%的iMN患者中广泛证实抗PLA2R1自身抗体的存在。这些自身抗体的致病作用尚未被证实, 但在大多数研究人群中, 抗PLA2R1抗体滴度似乎与疾病活性相关。

[0003] 然而, 来自抗PLA2R1滴度的个体结果预测尚不清楚。实际上, 虽然自身抗体在大多数患者的对症治疗或免疫抑制治疗下的缓解期间消失, 但是在肾素-血管紧张素系统 (RAS) 阻断下, 其在明显的临床缓解期间可能持续存在。此外, 大多数情况下高抗PLA2R1抗体滴度似乎与随后的肾脏不良结果相关, 但一些发作时自身抗体滴度高的患者表现出抗PLA2R1活性的急剧下降和疾病缓解。

[0004] iMN的治疗是有争议的。KDIGO指南 (肾脏疾病改善全球结果) 建议在所有iMN患者中使用肾素血管紧张素系统的阻断剂和利尿剂进行支持性对症治疗, 仅在肾功能恶化或持续性肾病综合征的情况下使用免疫抑制治疗。

[0005] 因此, 免疫抑制治疗往往只在发生重大且可能不可逆的并发症之后才开始。另一方面, 在用对症治疗可能出现缓解的患者中, 不必要的早开始免疫抑制是徒劳的。因此, 需要更好地预测患有特发性膜性肾病的患者的结果。

[0006] 因此, 长期以来需要开发特发性膜性肾病预后的综合性、敏感性和特异性的方法。此外, 对于使其治疗作出反应的患者分层以便对无效的治疗方案提供必要的修改的方法还存在未满足的需求。

[0007] 发明简述

[0008] M型磷脂酶A2受体 (PLA2R1) 是具有大的胞外区的180kDa膜受体, 所述胞外区包含7-17kDa的10个不同球状结构域, 即一个富含半胱氨酸的结构域 (CysR)、一个纤连蛋白II型结构域 (FNII) 和八个不同的C型凝集素结构域 (CTL1-8)。各个结构域由约10个氨基酸的小接头序列分开。

[0009] 本发明人首次筛选了一组50名iMN患者对9个PLA2R1突变体的反应性, 所述突变体依次缺失该受体的10个胞外结构域中的每一个。本发明人鉴定了三个不同结构域中的表位:

[0010] -PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域 (CysR);

[0011] -PLA2R1的C型凝集素结构域1 (CTL1); 和

[0012] -PLA2R1的C型凝集素结构域7 (CTL7)。

[0013] 然后, 通过蛋白质印迹法和ELISA, 他们使用这些结构域的众多可溶形式证实了每

个结构域的独立反应性。然后,发明人建立了表位特异性ELISA,并将一组69名患者分为三个表位特异性亚组,并分析其表位谱和疾病活性之间的关系。因此,发明人已经表明,在血清采样中抗CysR的抗PLA2R1反应性与有利结果相关,而抗CTLD1和CTLD7的反应性与活动性疾病和肾脏预后差相关。

[0014] 此外,他们表明,随访期间表位谱可能会改变。抗CTLD1和抗CTLD7抗体随疾病缓解而消失,且随疾病复发再度出现,而抗CysR限制性活性与稳定且轻微的疾病活性相关。

[0015] 因此,在第一个方面,本发明涉及一种用于评估受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病预后的方法,所述方法包括步骤a) 检测和/或测量从所述受试者获得的生物样品中抗PLA2R1的C型凝集素结构域1 (CTLD1) 的自身抗体的水平,其中存在抗CTLD1的自身抗体指示预后差。

[0016] 在第二个方面,本发明涉及一种用于评估受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病预后的方法,所述方法包括以下步骤:

[0017] -将从所述受试者获得的生物样品与小鼠PLA2R1接触;和

[0018] -检测形成的任何抗原-抗体复合物;

[0019] 其中存在形成的任何抗原-抗体复合物指示预后差。

[0020] 在第三个方面,本发明涉及一种用于监测受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病的治疗效果的方法,所述方法包括:

[0021] -在第一时间点测定在所述第一时间点从所述受试者获得的生物样品中选自分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的至少一种、优选两种、更优选三种自身抗体的水平,

[0022] -在第二时间点测定在所述第二时间点从所述受试者获得的生物样品中选自分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的至少一种、优选两种、更优选三种自身抗体的水平,和

[0023] -比较两个时间点的自身抗体的水平,

[0024] 其中:

[0025] -在第二时间点不存在分别抗CTLD1和CTLD7的自身抗体或者分别抗CTLD1和CTLD7的自身抗体的水平降低表明治疗有效;和/或

[0026] -在第二时间点存在抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体或者抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体的水平升高表明治疗无效。

[0027] 在第四个方面,本发明涉及一种用于诊断受试者的膜性肾病,尤其是特发性膜性肾病的方法,所述方法包括步骤a') 检测从所述受试者获得的生物样品中至少一种选自以下的自身抗体:

[0028] -抗PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域 (CysR) 的自身抗体;和/或

[0029] -抗PLA2R1的C型凝集素结构域1 (CTLD1) 的自身抗体;和/或

[0030] -抗PLA2R1的C型凝集素结构域7 (CTLD7) 的自身抗体,

[0031] 其中存在一种、优选两种、更优选三种抗PLA2R1的CysR、CTLD1和/或CTLD7的自身抗体指示膜性肾病,优选特发性膜性肾病。

[0032] 发明详述

[0033] 用于预测特发性膜性肾病的方法

[0034] M型磷脂酶A2受体 (PLA2R1) 是特发性膜性肾病的主要自身抗原,其中最近鉴定了两个具有未知临床意义的表位。在本文中,通过蛋白质印迹筛选了50位PLA2R1阳性患者的

血清的一系列覆盖10个胞外结构域的PLA2R1缺失突变体。本发明人鉴定了CysR、CTLD1和CTLD7结构域中的表位,并用每个结构域的可溶形式证实了对这三个结构域的反应性。结构域特异性ELISA允许将69位PLA2R1阳性患者分为3个亚组:23位CysR、14位CysR+CTLD1和32位CysR+CTLD1+CTLD7。使用全长PLA2R1抗原测量的中值ELISA滴度在患者亚组之间没有统计学差异。具有抗CysR限制性活性的23位患者较年轻($p=0.008$)、肾病范围蛋白尿较少($p=0.018$)、自发缓解率较高($p=0.03$)、肾功能衰竭进展率较低($p=0.0025$)且随访期间末期肾病较少($p=0.01$)。实际上,根据KDIGO,31/69名患者的肾脏预后差(随访结束时,尿蛋白/肌酐比值超过 4g/g 或 $\text{eGFR}<45\text{ml/min/1.73m}^2$)。在多变量cox回归分析中,抗PLA2R1的高活性和CysR表位之外的表位扩散是肾脏预后差的独立风险因素。随访期间的表位扩散与疾病恶化相关($n=3$),而从CTLD7谱回到CysR的逆向扩散与有利结果相关($n=1$)。

[0035] 发明人已经承担了责任以显示在血清采样中抗CysR的抗PLA2R1反应性与有利结果相关,而抗CTLD1和CTLD7的反应性与活动性疾病和肾脏预后差相关。此外,发明人已经强调了抗CTLD1的反应性足以用于评估特发性膜性肾病的预后。

[0036] 因此,在第一个方面,本发明涉及一种用于评估受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病预后的方法,所述方法包括步骤a)检测和/或测量从所述受试者获得的生物样品中抗PLA2R1的C型凝集素结构域1(CTLD1)的自身抗体的水平,其中存在抗CTLD1的自身抗体指示预后差。

[0037] 发明人已经表明,除抗CTLD1的自身抗体外,抗C型凝集素结构域7(CTLD7)的自身抗体的检测与疾病的恶化有关。因此,在进一步的实施方案中,所述步骤a)进一步包括检测和/或测量抗PLA2R1的C型凝集素结构域7(CTLD7)的自身抗体的水平。在该实施方案中,存在抗CTLD1的自身抗体和/或抗CTLD7的自身抗体指示预后差。

[0038] 在一个优选的实施方案中,所述步骤a)进一步包括检测和/或测量抗PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域(CysR)的自身抗体的水平。

[0039] 还在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种用于评估受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病预后的方法,所述方法包括步骤a)检测和/或测量从所述受试者获得的生物样品中以下的水平:

[0040] -抗PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域(CysR)的自身抗体;和

[0041] -抗PLA2R1的C型凝集素结构域1(CTLD1)的自身抗体;和

[0042] -抗PLA2R1的C型凝集素结构域7(CTLD7)的自身抗体,

[0043] 其中:

[0044] -存在抗CTLD1的自身抗体和/或抗CTLD7的自身抗体指示预后差。

[0045] 优选地,本发明的方法进一步的特征在于:

[0046] -不存在分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体指示预后良好;和/或

[0047] -存在仅抗CysR的自身抗体指示预后良好。

[0048] 通常,存在抗CysR的自身抗体以及抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体指示预后差。

[0049] 术语“膜性肾病”具有本领域的通常含义,是指成人肾病综合征常见原因的肾病。它涵盖由诸如系统性红斑狼疮、乙肝或梅毒(...)的继发性因素引起的继发性膜性肾病和原发性自身免疫性膜性肾病(也称为“特发性膜性肾病”)。“特发性膜性肾病”被认为是靶向肾小球的自身免疫性疾病,其主要的已知靶标自身抗原是PLA2R1。

[0050] 术语“PLA2R1”或“分泌型磷脂酶A2受体”是指M型磷脂酶A2受体,在人中是由PLA2R1基因编码的受体,特别是已知为特发性膜性肾病中的主要自身抗原。示例性人天然PLA2R1氨基酸序列提供于NP_001007268 (GenPept数据库)。

[0051] 术语“自身抗体”具有本领域的通常含义,是指由受试者的免疫系统产生的且抗受试者自身蛋白(例如PLA2R1的特殊结构域)的抗体。自身抗体可能攻击机体自身的细胞、组织和/或器官,引起炎症和细胞损伤。

[0052] 如本文所用,表述“抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体”和“本发明的自身抗体”是指分别识别PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域(CysR)、PLA2R1的C型凝集素结构域1(CTLD1)和PLA2R1的C型凝集素结构域7(CTLD7)的自身抗体。

[0053] 如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指具有特发性膜性肾病的症状和/或疑似患有特发性膜性肾病的个体。在本发明的上下文中,受试者或患者优选是患有或疑似患有特发性膜性肾病的受试者。

[0054] 本发明的方法为从业者提供关键信息,以便确定适当的治疗策略以部署和/或决定患者是否可以从治疗中受益。通常,该方法允许识别可能需要血液透析或有肾衰竭风险的患者。

[0055] 如本文所用,表述“预后”是指预测受试者的特发性膜性肾病状况的过程或结果。这并不是指基于生物标志物的模式能够以100%的准确度预测病症的过程或结果,或甚至某一给定的过程或结果可预测地或多或少地发生。相反,本领域技术人员将会理解,表述“预后”是指增加的某一过程或结果将发生的可能性。

[0056] 优选地,在本发明的上下文中,“预后良好”是指缓解的机会高和/或优选需要血液透析的风险低和/或发展为肾衰竭的风险低。

[0057] 因此,根据本发明的方法被认为具有良好预后的受试者将不需要血液透析。此外,所述受试者不需要进行积极的免疫抑制治疗。实际上,本发明的方法允许鉴定自发缓解机会高的患者。通常,“自发缓解”是指在没有免疫抑制治疗的情况下由对症治疗(如RAS阻滞剂和利尿剂)诱导的缓解。

[0058] 优选地,在本发明的上下文中,“预后差”是指随后的肾脏并发症,例如肾衰竭发作的机会高,和/或复发的机会高。

[0059] 预后差通常与以下相关:

[0060] -蛋白尿增加,通常蛋白尿 $>4\text{g/g}$;和/或

[0061] -血清肌酐升高超过30%;和/或

[0062] -估计肾小球滤过率(eGFR) $<45\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ 。

[0063] eGFR用于筛选并检测早期肾脏损伤和监测肾脏状态。通过进行肌酐试验并计算估计肾小球滤过率来进行。

[0064] 通常,根据本发明的方法被认为预后差的受试者将需要血液透析。此外,所述受试者需要进行免疫抑制治疗。实际上,本发明的方法允许鉴定自发缓解机会低的患者。

[0065] 本发明的方法包括检测和/或测量生物样品中本发明的自身抗体水平的步骤。优选地,所述生物样品从所述受试者获得。这种样品包括但不限于可能包含或不包含细胞的体液,例如血液(例如全血、血清或血浆)。这种样品还包括活检(例如肾脏活检)。优选地,所述样品是所述受试者的体液。样品的非限制性实例包括但不限于全血样品、血浆或血清。优

选地,所述生物样品是血清。术语生物样品还涵盖通过加工生物样品得到的任何材料。衍生材料包括但不限于从样品分离的细胞(或其后代)或从样品中提取的蛋白质。生物样品的加工可涉及以下的一个或多个:过滤、蒸馏、提取、浓缩、干扰组分的失活、试剂的添加等。

[0066] 步骤a)可以是定量、半定量或定性测量本发明的自身抗体的步骤。优选地,所述步骤a)是测量从所述受试者获得的生物样品中抗PLA2R1的CysR的自身抗体、抗PLA2R1的CTLD1的自身抗体和抗PLA2R1的CTLD7的自身抗体的水平的步骤。

[0067] 在一个实施方案中,所述步骤a)包括以下子步骤:

[0068] -将从所述患者获得的生物样品与PLA2R1接触;和

[0069] -检测形成的任何抗原-抗体复合物,

[0070] 其中存在抗原-抗体复合物指示膜性肾病,优选特发性膜性肾病。

[0071] 优选地,PLA2R1选自人PLA2R1、兔PLA2R1、小鼠PLA2R1或其片段。

[0072] 如本文所用,PLA2R1的“片段”是指PLA2R1的连续元件。通常,所述片段是生物活性片段,即它包含一种或多种PLA2R1的功能性质。

[0073] 在本发明的上下文中,PLA2R1的“片段”包含PLA2R1完整氨基酸序列的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%,优选由PLA2R1完整氨基酸序列的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%、至少99%组成。

[0074] 优选地,所述片段包含PLA2R1完整氨基酸序列的至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1000、至少1100、至少1120、至少1250、至少1300、至少1310、至少1320个氨基酸。

[0075] 优选地,所述片段被抗PLA2R1的自身抗体识别。优选地,所述片段被抗PLA2R1的CysR、CTLD1或CTLD7的自身抗体识别。测定片段与所述自身抗体相互作用的能力可以通过上述方法之一或本领域已知的测定直接结合的方法来完成。

[0076] 用于测量生物样品中自身抗体水平的方法可以通过使用标准免疫诊断技术来测量,包括诸如竞争、直接反应或三明治式测定的免疫测定。这种测定包括但不限于凝集试验;酶标记和介导的免疫测定,例如ELISA;生物素/抗生物素蛋白类型测定;放射免疫分析;免疫电泳;免疫沉淀。反应通常包括显示标记如荧光、化学发光、放射性、酶标记或染料分子,或用于检测抗原和与其反应的一个或多个抗体之间形成复合物的其它方法。

[0077] 在一个优选的实施方案中,步骤a)通过ELISA进行。如本文所用,术语“ELISA”是指酶联免疫吸附测定,它是一种竞争性结合测定,包含用于定量样品中分析物的量的抗体和可检测标记。

[0078] 因此,本发明的所述步骤a)允许评估抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的滴度。通常,在ELISA的情况下,用一组靶抗原包被微量滴定板的孔。将生物样品加入到包被的孔中。孵育足够的时间以允许形成自身抗体-抗原复合物后,可以洗涤板以除去未结合的部分,并加入可检测标记的第二结合抗体。允许第二结合分子与任何捕获的人自身抗体反应,洗涤板并使用本领域公知的方法检测第二结合抗体的存在。

[0079] 值得注意的是,人抗PLA2R1自身抗体选自下列同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。优选地,人抗PLA2R1自身抗体是IgG4。基本上,在本发明的上下文中,用于进行ELISA的抗原

是：

[0080] -在HEK293细胞或大肠杆菌(E.coli)中产生的CysR结构域；

[0081] -在HEK293细胞或大肠杆菌中产生的CTLD1结构域；和

[0082] -在HEK293细胞或大肠杆菌中产生的CTLD6-7或CTLD6构建体。

[0083] 在HEK细胞中产生的两个抗原结构域可以在用抗HA抗体预包被的ELISA板上HA亲和捕获，而来自大肠杆菌的CTLD1结构域可以直接包被或用抗HA捕获。然后，将吸附的抗原与患者血清一起孵育，然后用第二抗人IgG特异性抗体进行检测，所述第二抗人IgG特异性抗体优选与过氧化物酶偶联的抗IgG4抗体，也可以是其他第二抗IgG，如抗总IgG、抗-IgG1、-IgG2和-IgG3第二抗体。

[0084] 或者，所有之前公开的抗原可用于测定。

[0085] 在一个优选的实施方案中，抗PLA2R1自身抗体是IgG4。事实上，发明人表明，患者中发现的大多数抗PLA2R1自身抗体是IgG4亚类。但是，也发现了抗PLA2R1的IgG1、IgG2和IgG3亚类。因此，在本发明的上下文中，抗CysR、CTLD1和CTLD7结构域的抗PLA2R1自身抗体的亚类优选但不限于IgG4自身抗体。

[0086] 可以通过将每个自身抗体组的检测水平或滴度与参考水平进行比较来确定自身抗体的存在或不存在。

[0087] 值得注意的是，自身抗体的存在可以看作是与参考水平相比较高的水平。类似地，自身抗体不存在可以看作是与参考水平相比较低的水平。

[0088] 在本发明的上下文中，当用于表征受试者时，术语“对照”是指健康受试者或已经被诊断为患有除肾病以外的特定疾病或患有特发性膜性肾病以外的肾病的患者。

[0089] 术语“对样品”是指从健康受试者或从被诊断为患有除肾病以外的疾病的患者获得的一种或多于一种的样品。

[0090] 术语“正常”和“健康”在本文中可互换使用。它们是指不显示任何与肾病有关的症状，并且没有被诊断为患有膜性肾病或其他肾病的受试者。优选地，正常受试者没有服用影响肾系统的药物，且没有被诊断为患有任何其它疾病。在某些实施方案中，正常受试者具有与获得待测生物样品的受试者相比相似的性别、年龄和/或体重指数。术语“正常”在本文中也用于限定从健康受试者获得的样品。

[0091] 如本文所用，术语“参考水平”是指从对照获得的生物样品中测量的水平，或优选地是指从几个对照获得的生物样品中测量的数个水平的平均值。通常，本领域技术人员可以测定已知是健康的至少100个个体的生物样品(优选血清)中的所述参考水平。然后根据众所周知的统计分析确定所得比值的平均值，以获得抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的平均水平。然后，所述值被认为是正常的并因此构成阈值。在一个具体的优选的实施方案中，用于预后的PLA2R1抗原是小鼠PLA2R1或其片段。

[0092] 在后一个非常具体的实施方案中，其中步骤a)包括以下子步骤：将从所述患者获得的生物样品与小鼠PLA2R1接触，并检测形成的任何抗原-抗体复合物，其中存在形成的任何抗原-抗体复合物指示预后差。

[0093] 事实上，本发明人的进一步实验提出小鼠PLA2R1可用于评估iMN的预后。

[0094] 因此，在第二个方面，本发明涉及一种用于评估受试者的膜性肾病，优选特发性膜性肾病预后的方法，所述方法包括以下步骤：将从所述受试者获得的生物样品与小鼠

PLA2R1接触,并检测形成的任何抗原-抗体复合物;其中存在形成的任何抗原-抗体复合物指示预后差。

[0095] 因此,在这个方面,本发明依赖于抗小鼠PLA2R1的自身抗体的鉴定。因此,本发明旨在鉴定显示差预后的患者。

[0096] 用于监测对iMN治疗的反应效果的方法

[0097] 本发明人已经强调了PLA2R1表位谱可以在特发性膜性肾病的随访和治疗性治疗期间改变。事实上,他们表明,抗CTLD1和抗CTLD7抗体随自发性或治疗性疾病缓解而消失,且随疾病复发再次出现,而抗CysR限制性活性与稳定且轻微的疾病活性相关。

[0098] 发明人因此得出结论:分析随访期间的PLA2R1表位谱和扩散是监测疾病严重性并将患者分为具有不同肾脏预后的亚组的强大工具。因此,本发明提供了通过允许临床医师定性和定量测量自身反应性程度(例如通过检测患者血清中靶向各自抗原CysR、CTLD1和CTLD7的各种抗PLA2R1特异性自身抗体的存在和滴度)来监测特发性膜性肾病进展的方法。这些自身抗体指示疾病进展。

[0099] 特别地,发明人已经指出,如果观察到抗CTLD1和CTLD7两者的自身抗体,则疾病恶化。

[0100] “表位扩散”是指在慢性自身免疫或炎症反应期间继发于自身抗原释放的内源性表位的免疫应答的发展。因此,表位扩散是其中具有相同或不同分子的新表位随时间被来自原始非交叉反应性抗原位点的T或B细胞识别的现象。如在许多自身免疫性疾病如人抗肾小球基底膜病、寻常型天疱疮、类风湿性关节炎、实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、多发性硬化症、1型糖尿病和Heymann肾炎中所述,分子内的表位扩散与疾病恶化相关。

[0101] 术语“表位”包括能够特异性结合抗体和/或T细胞受体的任何抗原性(例如蛋白质)决定簇。换言之,响应B和/或T细胞的抗原上的一个位点。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位通常包含至少3个、5个或8-10个氨基酸。氨基酸可以是连续的,也可以是通过三级折叠并列的非连续氨基酸。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂存在下,与前者但不是后者的结合消失。如本发明上下文中所定义的抗PLA2R1自身抗体全部识别构象表位。

[0102] 因此,在第三个方面,本发明涉及一种用于监测受试者的膜性肾病,优选特发性膜性肾病的治疗效果的方法,所述方法包括:

[0103] -在第一时间点测定在所述第一时间点从所述受试者获得的生物样品中选自分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的至少一种,优选两种,更优选三种自身抗体的水平,

[0104] -在第二时间点测定在所述第二时间点从所述受试者获得的生物样品中选自分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体的至少一种,优选两种,更优选三种自身抗体的水平,和

[0105] -比较两个时间点的自身抗体的水平,

[0106] 其中:

[0107] -在第二时间点不存在分别抗CTLD1和CTLD7的自身抗体或者分别抗CTLD1和CTLD7的自身抗体水平降低表明治疗有效;和/或

[0108] -在第二时间点存在抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体或者抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体水平升高表明治疗无效。

[0109] 优选地,在第二时间点不存在分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体或所述自身

抗体的水平降低表明治疗有效。更准确地,不存在分别抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体是治疗成功且有效的极好的体征。

[0110] 所述方法还允许监测特发性膜性肾病的进展。

[0111] 所有之前公开的技术数据和定义适用于此。

[0112] 与比较水平相比的“增加的水平”或“水平更高”或“降低的水平”或“较低水平”,或来自所述比较水平的“变化”或“偏差”在统计学上是显著的。

[0113] 如果水平与比较水平相差约5%或更多、约10%或更多、约20%或更多,或约50%或更多,则可以认为存在比较水平的增加的水平或降低的水平,或者比较水平的变化或偏差。在本发明的上下文中,“比较水平”优选是指在第一时间点获得的自身抗体的水平。

[0114] 或者,统计显著性可以计算为 $P \leq 0.05$ 。存在对照中缺少的标志物可以视为更高的水平,或变化或偏差。缺少对照中存在的标志物可以视为较低的水平,或变化或偏差。

[0115] 目前用于治疗特发性膜性肾病的的治疗可用于免疫抑制治疗以及对症治疗。

[0116] 通常,目前用于特发性膜性肾病尤其是重症特发性膜性肾病的的治疗是免疫抑制治疗。所述免疫抑制治疗通常基于施用至少一种选自以下的化合物:环孢菌素、他克莫司、硫唑嘌呤、英夫利昔单抗、奥马珠单抗、达珠单抗、阿达木单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、那他珠单抗、奥马珠单抗和雷帕霉素、环磷酰胺、苯丁酸氮芥和利妥昔单抗。

[0117] 优选地,特发性膜性肾病的的治疗基于使用环磷酰胺、苯丁酸氮芥、他克莫司和利妥昔单抗。

[0118] 对症治疗通常基于肾素-血管紧张素系统的阻断。

[0119] 因此,本发明为医师提供可以预测经受治疗的患者的反应的方法。

[0120] 通常,当观察到抗CysR、CTLD1和CTLD7的自身抗体水平降低至少10%、优选至少20%、更优选至少30%、甚至更优选至少40%、优选至少50%、更优选至少60%、甚至更优选至少70%,甚至更优选至少80%时,认为治疗有效。这通常表明预后良好。

[0121] 相反,当在第二时间点而不是在第一时间点检测到抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体时,认为治疗无效。此外,当第一和第二时间点之间的水平稳定或相对于抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体初始水平增加至少5%、优选至少10%、更优选至少20%、甚至更优选至少30%、还甚至更优选至少40%、优选至少50%、更优选至少60%、甚至更优选至少70%、甚至更优选至少80%或更多时,也认为治疗无效。

[0122] 通常,基于表位谱的组之间的差异通过对数秩检验来分析,一般使用Prism6和SAS9.3软件,并且认为 p 值 < 0.05 是统计学显著的。

[0123] 可能观察到几种情况。

[0124] 在一个实施方案中,在第二时间点没有检测到抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体。这表明,病人被认为处于缓解中。

[0125] 在另一个实施方案中,在第二时间点观察到抗CysR的自身抗体的水平稳定,或者在第一和第二时间点获得的水平在统计分析方差内比较相似,其中偏差在约1-5%偏差之间,优选为1-3%的偏差。这表明,病人被认为处于缓解中。

[0126] 在另一个实施方案中,观察到抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体的水平稳定:在第一和第二时间点获得的水平在统计分析方差内比较相似,其中偏差在约1-5%偏差之间,优选为1-3%的偏差。这表明疾病稳定,其中治疗的持续时间不足(所以如果临床指出,应该继续

或变为另一种类型的免疫抑制剂)或者是无效的。

[0127] 在另一个实施方案中,观察到与第一时间点相比,在第二时间点抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体的水平增加。这表明疾病恶化和/或缺乏有效治疗。认为增加至少30%、优选至少50%、更优选至少100%、甚至更优选至少200%表明情况恶化和预后差。

[0128] 根据本发明,第二时间点比第一时间点晚选择。可以策略性地选择第一和第二时间点,例如关于治疗策略和对以下患者的随访:有发展特发性膜性肾病的风险的患者,或已经患有膜性肾病,特别是特发性膜性肾病并有复发风险的患者。

[0129] 例如,第一时间点可以在对患者施用任何治疗之前,第二时间点可以是治疗应当显示效果的时刻或在治疗结束时,并且稍后可以重复测定。

[0130] 因此,可以重复测定几次;可以在两个以上的时间点评估自身抗体水平。基本上,当在时间内观察到抗自身抗体(特别是抗CTLD1和/或CTLD7的自身抗体)水平的整体降低时,表明患者健康的改善和治疗有效。

[0131] 相反,如果在时间内没有观察到抗CTLD1和/或CTLD7水平的自身抗体减少,或者观察到整体增加时,则表明患者健康的降低和治疗无效。

[0132] 对于在不同时间点从受试者收集的所有生物样品,使用的测定是相同的。

[0133] 在治疗无效的情况下,必须调整治疗策略。

[0134] 用于诊断特发性膜性肾病的方法

[0135] 在第四个方面,本发明涉及一种用于诊断受试者的膜性肾病,尤其是特发性膜性肾病的方法,所述方法包括步骤a')检测从所述受试者获得的生物样品中至少一种选自以下的自身抗体:

[0136] -抗PLA2R1的富含半胱氨酸的结构域(CysR)的自身抗体;和/或

[0137] -抗PLA2R1的C型凝集素结构域1(CTLD1)的自身抗体;和/或

[0138] -抗PLA2R1的C型凝集素结构域7(CTLD7)的自身抗体,

[0139] 其中存在一种、优选两种、更优选三种抗PLA2R1的CysR、CTLD1和/或CTLD7的自身抗体指示膜性肾病,优选特发性膜性肾病。

[0140] 在一个实施方案中,所述步骤a')包括以下子步骤:

[0141] -将从所述患者获得的生物样品与PLA2R1接触;和

[0142] -检测形成的任何抗原-抗体复合物。

[0143] 在该实施方案中,存在形成的抗原-抗体复合物指示膜性肾病,优选特发性膜性肾病。

[0144] 优选地,所述PLA2R1选自人PLA2R1、兔PLA2R1和小鼠PLA2R1。

[0145] 所有之前公开的技术数据均适用。

[0146] 如本文所用,所有其语法形式的术语“诊断”是指鉴定医疗病症或无症状病症的过程。在本发明的上下文中,术语诊断是指鉴别患有特发性膜性肾病的受试者。

[0147] 优选地,本文公开的方法是体外方法。

[0148] 本发明将通过以下实施例进一步阐述。然而,这些实施例不应当以任何方式理解为限制本发明的范围。

具体实施方式

[0149] 实施例1:PLA2R1中的表位扩散与膜性肾病的预后差相关

[0150] 方法

[0151] 患者

[0152] 从五家法国肾病中心收集经活检证实的iMN患者的血清。iMN定义为缺乏二级MN特征,如抗核抗体阳性、乙肝或丙肝病史、癌症或其他免疫病理(冷球蛋白血症、结节、移植抗宿主病等)。共收集69位患者的血清,并相继采集16位患者的血清。根据KDIGO推荐定义,蛋白尿>4g/g和/或血清肌酐增加超过30%和/或eGFR<45ml/min/1.73m²定义为肾脏预后差。肾病蛋白尿>3.5g/g定义为活动性疾病。两年随访后分析肾衰竭进展,其定义为血清肌酐从基线增加超过30%。

[0153] 制备并表达膜结合的PLA2R1缺失突变体

[0154] 本发明人通过PCR制备了一系列人PLA2R1缺失突变体,并如之前对野生型人PLA2R1(GenBank NM 007366)所述,将其克隆入pLPCX表达载体(Clontech)中。使用Phusion定点诱变试剂盒(Thermo scientific)制备缺失突变体。所有突变体包含PLA2R1信号肽(Met-1至Ala-20)和N端接头序列(Ala-21至Trp-35),接着是在接头区缺失以下结构域的PLA2R1序列:缺失N-末端结构域CysR(Δ C,缺失Gln-36至Asp-165)、CysR和FNII结构域(Δ F,Gln-36至Thr-223)、CysR至CTLD1结构域(Δ 1,Gln-36至Tyr-357)、CysR至CTLD2结构域(Δ 2,Gln-36至Ala-504)、CysR至CTLD3结构域(Δ 3,Gln-36至Pro-660)、CysR至CTLD4结构域(Δ 4,Gln-36至Lys-805)、CysR至CTLD5结构域(Δ 5,Gln-36至Lys-947)、CysR至CTLD6结构域(Δ 6,Gln-36至His-1105)以及CysR至CTLD7结构域(Δ 7,Gln-36至Pro-1235)。从克隆入pGEMTeasy载体(Promega)中的人全长PLA2R1cDNA的C端HA标记(YPYDVPDYA)版本制备所有突变体。全部测序后,将全部缺失构建体亚克隆入pLPCX逆转录病毒载体中,并用Ca/P04转染试剂盒(InvitroGen)或Exgen(Biomol GmbH)转染入HEK293细胞中。通过使用抗HA抗体的瞬时转染的HEK293细胞裂解物的蛋白质印迹证实表达(参见下文)。

[0155] 制备并表达PLA2R1的可溶结构域

[0156] 如上通过PCR制备可溶性PLA2R1突变体,并将其克隆入pcDNA3.1Z-表达载体(LifeTechnologies)中。它们都包含PLA2R1信号肽,接着是编码如下不同PLA2R1结构域的人PLA2R1序列:CysR结构域(CysR,从Ala-21至Lys-164)、CTLD1结构域(CTLD1或C1,Thr-223至Asn-359)、CTLD2至CTLD8(C2C8,357-Tyr至1397-Ser)、CTLD6至CTLD8(C6C8,947-Lys至1397-Ser)、CTLD6(C6,947-Lys至1114-Pro)、CTLD7(C7,Glu-1097至1246-Leu)、CTLD8(C8,Pro-1235至1397-Ser)、CTLD6至CTLD7(C6C7,947-Lys至1246-Leu)和CTLD7至CTLD8(C7C8,Glu-1097至1397-Ser)。所有可溶性突变体都是C末端HA标记的。产生CysR-FNII-CTLD1结构域,并如Kao等人所述用凝血酶(Sigma)切割,除了所述结构域是C-末端HA-标记的。如上所述,在HEK293细胞中表达所有突变体,并收集含有表达蛋白质的细胞培养基。当蛋白质以低水平表达时,使用标准程序用三氯乙酸沉淀培养基。

[0157] 基本上如所述,在大肠杆菌中产生DsbC-His-HA-PLA2R1融合蛋白。详细方案将在别处公开。将具有用于大肠杆菌表达的优化密码子的PLA2R1结构域与无前导序列的DsbC开放阅读框以及之后分别用于纯化和检测的His和HA标签一起添加至框内。插入的PLA2R1结构域的序列为:CysR:Ala-26至Lys-164,CTLD1:Thr-223至Asn-359,CTLD7:Thr-1102至Glu-1237,CTLD6-7:947-Lys至Glu-1237。还设计了CTLD1的4个单核苷酸多态性(SNP)变体。

SNP1:Val-292和Asp-300,SNP2:Met-292/Asp-300,SNP3:Met-292/His-300和SNP4:Val-292/His-300。

[0158] 蛋白质印迹分析

[0159] 除非另有说明,在非还原条件下通过SDS-PAGE分析PLA2R1的不同缺失突变体和可溶形式。在4-15%预制TGX SDS-PAGE凝胶(Bio-Rad)上运行总蛋白质(10-50 μ g/孔,以调节每个缺失突变体的不同表达水平)和细胞培养基(对于转染的可溶形式),并在半干燥条件下用Trans-blot Turbo(Bio-Rad)在恒定25V下转移至甲醇浸泡的PVDF膜(Bio-Rad)12分钟。在含有0.05%PBS-Tween(PBS-T)的5%牛奶中,将膜在4 $^{\circ}$ C封闭过夜,然后在室温下与第一抗体和第二抗体孵育2小时。第一抗体用含有0.5%奶粉的PBS-T稀释。以多次重复制备膜,并用1:5,000的小鼠单克隆抗HA抗体(Sigma)进行探测以验证表达,或用50种不同的iMN血清探测以1:25至1:500的工作稀释度(取决于抗PLA2R1滴度)来筛选表位谱。用于抗HA的第二抗体是在PBS-T中1:20,000稀释的山羊抗小鼠IgG(Southern Biotech#1030-05)。用于iMN血清的IgG第二抗体是在PBS-T中以1:30,000稀释的HRP偶联的小鼠抗人IgG4(Southern Biotech#9200-05)。对于抗PLA2R1 IgG亚类分析(参见补充数据),我们还使用了来自Southern Biotech的一组亚类特异性抗IgG和两种不同的抗总IgG(Southern Biotech和Santa Cruz)。用于验证IgG亚类特异性的纯化IgG来自Fitzgerald。与第一抗体和第二抗体孵育后,将膜在PBS-T中洗涤三次5分钟。用化学发光底物(Millipore)和Fuji LAS3000成像仪进行蛋白质条带的检测。

[0160] 抗PLA2R1ELISA

[0161] 基本上如标准的且商业上可获得的ELISA所述进行抗PLA2R1测定。将与整个胞外结构域对应的纯化重组人PLA2R1蛋白于4 $^{\circ}$ C在20mM Tris pH8.0(100 μ L/孔,1 μ g/mL)中包被到ELISA板上过夜。用SeramunBlock(Seramun Diagnostica)封闭板2小时。将患者血清以1:100(或更高,如需要)稀释于PBS/0.1%奶粉中,并一式两份(每孔100 μ L)加入ELISA板中,所述ELISA板还包含iMN标准血清的系列稀释液和质量控制校准(板之间)。在平板振荡器上室温孵育2小时后,用PBS/0.02%Tween20洗涤板4次。加入在SeramunStab ST plus中以1:7,500稀释的抗人IgG4-辣根过氧化物酶偶联物(Southern Biotech#9200-05)(每孔100 μ L)(Seramun Diagnostica),并在平板振荡器上室温孵育1小时。洗涤四次后,加入四甲基联苯胺,反应显影15分钟,然后用1.2N HCl终止。在450nm读板。用来自健康供体的67份血清确定正常范围(用平均值 \pm 3SD)。通过受试者工作特征(ROC)曲线分析来优化截止值。在每个板中使用高阳性指数患者血清来制备标准曲线和阴性对照。

[0162] 使用PLA2R1可溶形式的ELISA

[0163] 用在20mM Tris pH8.0(100 μ L/孔,1 μ g/mL)中以1:5,000稀释的抗HA抗体(Sigma)包被板于4 $^{\circ}$ C过夜。然后用SeramunBlock(Seramun Diagnostica)封闭板2小时。然后加入用PLA2R1可溶形式(10-100 μ L/孔,取决于蛋白表达)或纯化的大肠杆菌DsbC-HA-CTLD1融合蛋白(50ng/孔)转染的HEK293细胞的细胞培养基,并孵育1小时。洗涤板,并将以1:100(或更高,如需要)稀释于PBS/0.1%奶粉中的患者血清一式两份(每孔100 μ L)加入ELISA板中,所述ELISA板还包含iMN标准血清的系列稀释液和质量控制校准(板之间)。在平板振荡器上室温孵育2小时后,用PBS/0.02%Tween20洗涤板4次。加入在SeramunStab ST plus中以1:7,500稀释的抗人IgG4-辣根过氧化物酶偶联物(Southern Biotech#9200-05)(每孔100 μ L)

(Seramun Diagnostica),并在平板振荡器上室温孵育1小时。如上所述,用特异性抗IgG进行亚类分析。洗涤四次后,加入四甲基联苯胺,反应显影15分钟,然后用1.2N HCl终止。在450nm读板。用来自健康供体的20份血清确定正常范围(用平均值 \pm 3SD)。通过受试者工作特征(ROC)曲线分析来优化截止值。在每个板中使用高阳性指数患者血清来制备标准曲线和阴性对照。

[0164] 如下获得患者或正常受试者的每种抗原的ELISA指数值:(平均测试结果-平均结构域阴性对照)/(平均结构域阳性对照-平均结构域阴性对照) \times 结构域校正因子 \times 100。如Warren等人2003所述,每个结构域的结构域校正因子确定为:所有板上该结构域的所有阳性对照的平均值减去阴性对照的平均值,再除以该结构域测定的截止值。

[0165] 统计分析

[0166] 对于描述性统计,数据表示为平均值 \pm 标准差(对于具有高斯分布的变量)或中值(范围)(对于具有非高斯分布的变量)。发明人使用Shapiro-Wilk检验来确定变量是否具有高斯分布。根据使用条件,使用卡方检验或Fisher精确检验比较定性标准。使用Student t-检验或Wilcoxon-Mann-Whitney检验(对于非高斯分布的变量)比较定量变量,且对于多个比较,使用普通的单因素Anova(对于具有高斯分布的变量)、Kruskal-Wallis(对于具有非高斯分布的变量)和Turkey检验(两两比较)。如KDIGO定义,LOCF定义的预后差是蛋白尿 $>$ 4g/g,或血清肌酐增加超过30%和/或eGFR $<$ 45ml/min/1.73m²。使用Kaplan-Meier估计存活分布计算肾脏存活的生存曲线。肾脏存活分析的终点是我们测量到血清肌酐从基线增加超过30%的时间。使用对数秩检验分析基于表位谱的组之间的差异。进行多变量cox回归分析。在分析中,我们纳入并调整了可能影响预后的所有临床参数(年龄、性别、蛋白尿、肌酸血、免疫抑制治疗和抗PLA2R1滴度)。危害比表示为每自然对数单位的通过ELISA测定的PLA2R1抗体水平,并对性别、治疗和不同结构域的组进行对分。所有统计均使用Prism6和SAS 9.3软件进行。认为P值 $<$ 0.05是统计学显著的。

[0167] 结果

[0168] 鉴定三个表位谱

[0169] 本发明人首先通过定点诱变制备了一系列9个PLA2R1的缺失突变体,其中发明人相继从N末端序列删除各个结构域,从而使受体结合膜。本发明人在细胞质尾部引入了小HA标签,其允许我们验证重组蛋白在HEK293细胞中的表达。除了用抗HA抗体检测较差的 Δ 6之外,所有的PLA2R1构建体都容易表达,但是一些患者明显地检测到了 Δ 6。然后,他们从50位具有抗PLA2R1抗体的iMN患者筛选了血清针对野生型蛋白与缺失突变体的反应性。他们选择筛选患者的IgG4抗PLA2R1亚类,因为许多研究表明IgG4是iMN中的主要IgG亚类,与疾病活性最相关。CysR、CTLD1和CTLD7的连续缺失导致12位、然后11位和27位以上的患者的PLA2R1识别逐渐丧失,鉴定了三个表位谱,其可能对应于这三个结构域中每一个中的不同表位。

[0170] CysR和CTLD1结构域包含由两个不同抗PLA2R1自身抗体识别的不同表位

[0171] Fresquet等人最近描述了单独的CysR结构域含有抗PLA2R1表位,而Kao等人提出一个或几个表位交织在CysR和CTLD1结构域之间。我们上述数据反而表明在CysR和CTLD1结构域中存在两个独立的表位。为了证实这一假设,本发明人设计了4种构建体,在HEK293细胞或大肠杆菌中驱动表达单独的HA标记的可溶形式的CysR和CTLD1结构域。本发明人还制

备了由Kao等人描述的两重构建体,其中三个结构域CysR、FNII和CTLD1一起表达(三重结构域),其中在CysR和FNII之间或FNII和CTLD1之间的接头区插入凝血酶蛋白酶位点。CTL1单独在HEK293细胞中的表达非常低(未显示),这与之前的Kao等人的数据一致。另一方面,单独的CysR结构域在HEK293细胞中以低但显著的水平表达,这与Fresquet等人的数据一致。为了避免HEK293细胞中两个单独结构域的弱表达,我们在大肠杆菌中将它们作为HA标记的DsbC融合蛋白产生,并纯化可溶且折叠的CysR和CTLD1蛋白。发明人然后可以在非还原条件下用抗HA抗体容易地通过蛋白质印迹检测蛋白质。对于来自Kao等人的两重构建体,只有在CysR和FNII之间具有凝血酶位点的第一个构建体在HEK293细胞中表达良好,并且在用凝血酶切割前后可用抗HA检测。重要的是,切割后用抗HA标记的条带对应于切割的FNII-CTLD1-HA结构域,而不是没有HA标签的切割的CysR结构域。总之,可以获得4种构建体并通过用抗HA抗体的蛋白质印迹来验证:在HEK293细胞中表达的单独的CysR结构域和CysR-FNII-CTLD1三重结构域,以及在大肠杆菌中作为单个结构域表达的CysR和CTLD1结构域。然后,发明人测试了来自具有CysR谱的患者1和来自具有CTLD1谱的患者2和3中针对这些构建体的血清,其中三重结构域被或不被凝血酶切割。来自患者1的血清只能识别含有CysR结构域的构建体,并且仅在单独表达为DsbC融合蛋白或作为三重结构域表达时识别,而不能在用凝血酶切割后或单独载入CysR-HA结构域时识别。事实上,CysR-HA结构域可以在还原条件下而不是在还原条件下用抗HA抗体检测到,表明CysR结构域本身不具有足够的疏水性以在我们的条件下适当地转移到蛋白质印迹PVDF膜上(在硝酸纤维素膜上观察到类似结果),因此不能被患者的抗CysR抗体检测到。另一方面,来自患者2和3的血清可以识别含有CTLD1结构域和CysR结构域两者的构建体,所述CysR结构域单独表达为DsbC融合蛋白或作为三重结构域表达,现在用或不用FN-CTLD1结构域的凝血酶切割。有趣的是,针对两个结构域的相关信号是不同的,可能是因为两个患者血清中每种抗CysR和抗CTLD1自身抗体的滴度不同。为了证实这些结果,本发明人设计了ELISA,其中他们利用存在于所有抗原中的HA标签将其亲和捕获到预涂有抗HA抗体的孔中。在所有条件中,当省去抗HA或抗原时没有获得信号。ELISA数据完全符合蛋白质印迹,并且敏感和定量得多。如所预期的,患者1识别CysR和没有被凝血酶切割的CysR-FNII-CTLD1三重结构域,而不识别单独表达的CTLD1结构域和被凝血酶有效切割而实际上产生游离CysR结构域的CysR-FNII-CTLD1三重结构域,所述游离的CysR结构域不能结合抗HA包被的孔并被洗掉,而相应的FNII-CTLD1-HA结构域将结合孔。本发明人从蛋白质印迹推断,来自患者2和3的血清具有两个不同的自身抗体,其抗CysR和CTLD1结构域中的不同表位,可能患者2对CysR的滴度更高,患者3对CTLD1的滴度更高。ELISA数据清楚地证实了这一观点,CysR上的信号比CTLD1高,而对于患者2,凝血酶切割后的三重结构域没有信号,并导致患者3的镜像。为了更进一步证明靶向CysR或CTLD1的两种不同自身抗体的存在,本发明人进行了以下:i)耗尽实验,其中我们将患者2的血清(含有CysR和CTLD1自身抗体)预吸收到负载有CysR或CTLD1结构域的抗-HA小珠上,并在再次加载有CysR和CTLD1结构域的蛋白质印迹中分析流过级分的反应性;和ii)竞争实验,其中我们用过量的来自大肠杆菌的CysR或CTLD1结构域预先孵育患者2的血清,然后在加载有CysR和CTLD1结构域的蛋白质印迹中探测血清。

[0172] 最后,本发明人利用在大肠杆菌中表达的CysR、CTLD1和CTLD6-7结构域通过ELISA进行了针对全长PLA2R1的竞争实验,并观察到与上述结果完全一致的数据。CysR抗原可以

完全阻断具有CysR谱的两位患者的血清的ELISA信号,但仅部分阻断具有CTLD1谱的两位其他患者的血清。与此一致的是,与CTLD1抗原的竞争不抑制CysR血清的信号,但部分抑制CTLD1血清的信号,而两种抗原的组合完全抑制PLA2R1信号。最后,添加CTLD67本身没有作用,表明该抗原不能干扰靶向CysR和CTLD1结构域的抗PLA2R1抗体的相互作用。总之,这一系列实验清楚地表明存在两种自身抗体,其中一种识别CysR而另一种识别CTLD1。实验也清楚地表明,CysR和CTLD1结构域显示出不同的表位,其可以被两种不同的自身抗体独立识别,这些后者在不同患者血清中以不同滴度存在。他们还制备了之前描述的具有4种可能的SNP组合的DsbC-HA-CTLD1结构域,没有观察到来自具有CTLD1或CTLD7谱的两位患者的血清信号的差异。发明人还在还原和非还原条件下进行了蛋白质印迹,并证明抗PLA2R1抗体对CysR和CTLD1的反应性取决于存在于这些结构域中的二硫键。

[0173] CTLD7包含由抗PLA2R1抗体识别的第三表位

[0174] 为了证实提示在PLA2R1胞外区有第三个更远端表位的初步结果,并且证实该表位独立于PLA2R1的其他结构域,我们设计了一系列缺失CysR、FNII和CTLD1结构域的PLA2R1的可溶形式。本发明人制备了总共8个朝CTLD7汇合的构建体:CTLD2至CTLD8 (C2C8)、CTLD2至CTLD6 (C2C6)、CTLD6至CTLD8 (C6C8)、CTLD6至CTLD7 (C6C7)、CTLD6 (C6)、CTLD7 (C7)、CTLD7至CTLD8 (C7C8)和最后的CTLD8 (C8)。所有这些构建体均具有HA标签,发明人可以通过在还原条件下用抗HA抗体进行蛋白质印迹来确认它们在HEK293细胞中的表达。然而,在非还原条件下用抗HA的检测更困难,特别是对于缩小到CTLD7的短的可溶形式,可能是因为CTLD7及其邻近结构域是高度极性的(可能是由于高糖基化,如来自可溶形式的迁移所证实)并且在非还原条件下不能良好转移(未显示)。这种观点可能解释了以下事实:具有CTLD7谱的患者4可以识别C2C8和C6C8可溶形式,但不能识别较短的构建体。尽管如此,该患者识别没有CysR和CTLD1结构域的C2C8和C6C8这一事实清楚地表明,C6C8含有独立于CysR和CTLD1的第三种抗PLA2R1表位。为了克服这一转移问题,本发明人使用以上对于CysR和CTLD1进行的抗HA ELISA测定来探测不同的可溶性构建体。他们观察到,含有CTLD7结构域,甚至仅含有CTLD7的所有构建体都被具有CTLD7谱的患者4和5的血清所识别。本发明人使用来自患者1的血清作为阴性对照,如所预期的,其不识别任何构建体。总之,这些数据通过仅存在于具有CTLD7谱的患者的血清中的相应自身抗体表明,在CTLD7中存在第三个独立表位。如上对于CysR和CTLD1,本发明人在还原与非还原条件下进行了蛋白质印迹,并证明抗PLA2R1抗体对CTLD7的反应性取决于存在于该结构域中的二硫键。

[0175] 用CysR、CTLD1和CTLD7作为抗原建立三个特异性ELISA

[0176] 基于上述结果,发明人建立了三种ELISA以特异性测量靶向CysR、CTLD1和CTLD7结构域的自身抗体。他们用以下作为抗原:HEK293细胞中产生的CysR结构域、大肠杆菌中产生的CTLD1结构域和HEK293细胞中产生的CTLD6-7构建体,因为CTLD6-7构建体比单独的CTLD7更容易大规模生产。如上所述,HEK细胞产生的两个抗原性结构域在用抗HA抗体预包装的ELISA板上HA亲和捕获,而来自大肠杆菌的CTLD1结构域可以直接包被或用抗HA捕获。然后,将吸附的抗原与患者血清一起孵育,随后用与过氧化物酶偶联的第二抗IgG4抗体进行检测。发明人验证了三种ELISA,并使用69位PLA2R1阳性iMN患者的队列(下表1)与20个健康供体测量了表位特异性滴度。69名iMN患者的队列包括50个筛选的血清和19个额外的病例。

[0177] 表1:参与本研究的患者的临床特征

	诊断时的年龄 (岁)	55 ± 15
	性别 (男性/女性)	54/15
	诊断时的蛋白尿 (g/g)	5.0 (1.4-24.0)
	诊断时的血清肌酐(μmol/L)	99 (43-385)
	诊断和 PLA2R1 测定之间的月数	0 (0-100)
	抗-PLA2R1 滴度(ELISA 指数值)	3241 (210-50817)
	PLA2R1 测定时的蛋白尿 (g/g)	4.0 (0.3-24.0)
[0178]	PLA2R1 测定时的血清肌酐 (μmol/L)	94 (43-600)
	PLA2R1 测定之前治疗的患者 ¹	6 (9%)
	随访期间治疗的患者 ¹	41 (59%)
	LOCF² (月)	36 (12-216)
	LOCF 时的蛋白尿 (g/g)	2.0 (0.0-20.0)
	LOCF 时的血清肌酐(μ mol/L)	119 (48-926)
	自发缓解 ³	18 (26%)
	LOCF 时预后差 ⁴	31 (45%)
	血液透析 ⁸	12 (17%)

[0179] 正常值是平均值±标准差;非正常值是中值(范围);定性值是数字(%).

[0180] ¹用免疫抑制疗法治疗。所有患者接受对症治疗。

[0181] ²LOCF:末次观测值结转。

[0182] ³自发缓解定义为没有免疫抑制治疗的情况下由对症治疗(RAS阻断剂和利尿剂)诱导的缓解。

[0183] ⁴LOCF时的肾脏预后差定义为蛋白尿>4g/g和/或血清肌酐增加超过30%和/或eGFR<45ml/min/1.73m²。患有ESKD的患者进行血液透析。

[0184] 所有患者临床上均被很好地表征,且用全长PLA2R1作为抗原通过ELISA表现为抗PLA2R1阳性(表1)。在诊断时,大多数患者(74%)具有肾病范围的尿蛋白(尿蛋白/肌酐比值(UACR)超过3.5g/g),并且在通过ELISA和蛋白质印迹的PLA2R1测定时未经免疫抑制治疗(91%)。从PLA2R1测定开始,平均随访患者36个月。所有患者均接受对症治疗。18位患者在RAS阻断下进入缓解。36位患者接受免疫抑制治疗且21位缓解。发明人分析了他们的肾脏结果,并根据KDIGO将以下定义为肾脏预后差:末次观测值结转(LOCF)的UACR>4.0g/g和/或血清肌酐增加超过30%和/或估计肾小球滤过率(使用简化的MDRD公式的eGFR)<45ml/min/1.73m²。随访结束时,31位患者肾脏结果差,包括12位患有终末期肾病(ESKD)患者。他们还分析了抗PLA2R1测定后24个月的肾脏存活,并将血清肌酐从基线增加超过30%定义为一个事件(表1)。

[0185] 通过ELISA,除了一个血清外所有的(n=68)都识别CysR结构域。42个血清识别CTLD1结构域,32个血清识别CTLD7结构域。然后他们根据其ELISA模式将患者分成三组。

[0186] 23位患者分为一组,称为“CysR组”,因为它们仅具有靶向CysR结构域的抗体。

[0187] 14位患者分为一组,称为“CysRC1组”,其中13位具有针对CysR和CTLD1结构域两者的活性,1位具有仅针对CTLD1的抗体。

[0188] 32位患者最后分为一组,称为“CysRC1C7组”,其中28位具有靶向三个结构域CysR、CTLD1和CTLD7的抗体,4位患者靶向CysR、CTLD7但不是CTLD1。

[0189] 当考虑最初通过蛋白质印迹筛选的50位患者时,本发明人观察到ELISA数据和它们的蛋白质印迹表位谱之间的完美一致性。最后,发明人观察到CysRC1和CysRC1C7组中的CysR滴度显著高于CysR。另一方面,CysRC1和CysRC1C7组之间的CTLD1滴度没有观察到差异。

[0190] 具有三个表位谱的患者的临床特征

[0191] 本发明人比较了三个组的患者的临床特征:CysR、CysRC1和CysRC1C7(表2)。

[0192] 表2:根据其表位谱分组的患者的临床特征比较和随访

患者 ²	CysR 组 n=23	CysRC1 组 n=14	CysRC1C7 组 n=32	P 值 ³
诊断时的年龄 (岁)	48 +/-12	54 +/-16	61 +/-15	0.008
性别(男性/女性)	19/4	10/4	25/7	ns
诊断时的蛋白尿(g/g)	3.7 (2.0-10.8)	4.7 (1.4-15.0)	6.0 (2.5-24.0)	ns
诊断时的血清肌酐 ($\mu\text{mol/l}$)	93 (54-134)	96 (43-150)	103 (59-385)	ns
诊断和 PLA2R1 测定之间的 月数	0 (0-36)	1 (0-84)	0 (0-100)	ns
抗 PLA2R1 测定(ELISA 指数值) ¹	3175 (394-8043)	1625 (367-5947)	4288 (210-50817)	ns
PLA2R1 测定时的蛋白尿 (g/g)	3.0 ⁴ (0.3-5.1)	3.0 (0.8-10.6)	5.0 ⁴ (0.3-24.0)	0.018
PLA2R1 测定时的血清肌 酐($\mu\text{mol/l}$)	92 (45-149)	96 (43-280)	100 (59-926)	ns
PLA2R1 测定之前治疗的 患者 ⁴	3/23	2/14	1/32	ns
随访期间治疗的患者 ⁵	12/23	8/14	21/32	ns
LOCF ⁵ (月)	36 (12-201)	44 (12-133)	33 (12-216)	ns
LOCF 时的蛋白尿 (g/g)	0.6 ⁴ (0.0-5.0)	2.0 (0.0-10.6)	5.0 ⁴ (1.0-20.0)	0.01
LOCF 时的血清肌酐 ($\mu\text{mol/l}$)	89 (55-181)	130 (57-297)	157 (48-600)	ns
自发缓解 ⁶	10/23 43%	4/14 29%	4/32 12%	0.03
血液透析 ⁷	0/23 (0%)	2/14 (14%)	10/32 (31%)	0.01

[0193]

- [0194] ¹对相同的血清样品进行表位谱和抗PLA2R1的ELISA测定。
- [0195] ²正常值是平均值±标准差;非正常值是中值(范围);定性值是数字(%)。
- [0196] ³连续变量用ANOVA或Kruskal-Wallis检验(分别对于高斯分布或非高斯分布),分类变量用卡方检验或Fisher精确检验。
- [0197] ⁴用免疫抑制剂治疗。所有患者接受对症治疗。
- [0198] ⁵LOCF:末次观测值结转。
- [0199] ⁶自发缓解定义为没有免疫抑制治疗的情况下由对症治疗(RAS阻断剂和利尿剂)诱导的缓解。
- [0200] ⁷患有ESKD的患者进行血液透析。
- [0201] 在以下方面,三组之间没有统计学显著性差异:性别、免疫抑制治疗患者的数量和使用全长PLA2R1通过ELISA测量的抗PLA2R1抗体的滴度。相比之下,他们观察到年龄差异显著:CysR组患者显著比CysRC1和CysRC1C7组患者年轻($p=0.008$;使用普通的单因素Anova检测)。CysR组介入时的平均年龄为48岁,CysRC1组为54岁,CysRC1C7组为61岁。
- [0202] 在CysR组中,PLA2R1检测时的蛋白尿显著降低(表2, $p=0.018$;使用Kruskal-Wallis检验)。发明人然后根据他们在血清采样中的UACR将患者分成3个亚组:低于3g/g($n=22$),3-5g/g($n=22$)和超过5g/g($n=25$),并比较它们用全长PLA2R1、CysR、CTLD1和CTLD7抗原测量的ELISA滴度。UACR超过5g/g的组中,仅抗CTLD7滴度显著高于其他两组($p=0.006$,采用Kruskal-Wallis检验)。此外,他们观察到CTLD7滴度随蛋白尿增加而逐渐增加。
- [0203] 三个表位组中的患者演化
- [0204] 在我们的队列中,所有患者都接受了RAS阻断和/或利尿剂的对症治疗,且41名患者接受了免疫抑制治疗(59%)。在三个表位组之间使用的免疫抑制治疗和中位随访没有差异(使用卡方检验, $n=0.6$,使用Kruskal-Wallis检验, $p=0.24$)。
- [0205] 在CysR组($n=23$)中,在接受免疫抑制治疗的12位患者中,10位实现缓解(UACR低于4g/g,其中eGFR超过45ml/min/1.73m²),仅两位患者在随访结束时肾脏预后差(UACR>4g/g或eGFR<45ml/min/1.73m²)。在未接受任何免疫抑制治疗的11位患者中,10位进入缓解,1位介入时已经有显著肾衰竭的患者在LOCF预后差。
- [0206] 在CysRC1组($n=14$)中,在接受免疫抑制治疗的8位患者中,3位进入缓解,5位表现肾脏预后差(1位发生ESKD)。在未接受任何免疫抑制治疗的6位患者中,4位达到缓解,2位肾脏预后差(1位患者进入ESKD)。在这一组中,50%的患者肾脏预后差。
- [0207] 在CysRC1C7组($n=32$)中,在接受免疫抑制治疗的21位患者中,8位获得缓解(38%),13位在LOCF肾脏预后差,其中包括7位ESKD患者。在没有接受免疫抑制治疗的11位患者中,7位在介入时已经有肾衰竭,4位进入自发缓解。
- [0208] 在CysR组中,发明人观察到更多的自发缓解(使用卡方检验, $p=0.03$)。ESHG分别在CTLD1和CTLD7组的2位和10位患者中发生,但CysR组无一例患者(使用卡方检验, $p=0.01$)。
- [0209] 最后,随访2年后,血清肌酐没有从基线升高超过30%的生存曲线分析显示,与CysR组相比,CysRC1和CysRC1C7组患者的肾衰竭进展显著增加(使用对数秩检验, $p=0.0025$)。在接受免疫抑制治疗的33位患者的亚组中,具有CysR谱的患者的肾衰竭进展也明显较慢(使用对数秩检验, $p=0.014$)。

[0210] 鉴定预后因素

[0211] 如表3所总结,根据KDIGO指南 (UACR>4g/g或eGFR<45ml/min/1.73m²),随访结束时将患者分成缓解组 (n=38) 和肾脏预后差组 (n=31)。

[0212] 表3: 末次观测值结转时达到缓解和预后差的患者的临床基线特征、表位谱和PLA2R1抗体水平

[0213]

	缓解 n=38	预后差 n=31	p 值 单变量
性别	9F/29M	6F/25M	ns
年龄	50 +/- 2.2	62 +/- 2.6	0.0006
诊断时的蛋白尿 (g/g)	4.45 (1.4-15.0)	5.2 (2.5-24.0)	ns
诊断时的肌酐血 (μmol/L)	88 (43-187)	113 (60-385)	0.0002

[0214]

随访(月)	36 (12-216)	30 (12-158)	ns
接受免疫抑制治疗的 患者	21 (55%)	20 (64%)	ns
CysR 组	20 (52%)	3 (10%)	0.0002
CysRC1 组	7 (18%)	7 (23%)	ns
CysRC1C7 组	11 (30%)	21 (67%)	0.0013
PLA2R1 滴度	2594 (210-44194)	5947 (424-50817)	0.04

[0215] 正常值是平均值±标准差;非正常值是中值(范围);定性值是数字(%).

[0216] 研究结束时,38位患者达到缓解,31位预后差(蛋白尿>4g/g和/或血清肌酐增加超过30%和/或eGFR<45ml/min/1.73m²).

[0217] 随访结束时预后差的患者年龄明显较大,诊断时肌酐水平较高,在CysR组不明显但在CTLD7组多得多,PLA2R1抗体水平较高。在预后差和预后良好的患者之间,性别比例、诊断时的蛋白尿、随访时间、接受免疫抑制剂治疗的患者的百分比和CTLD1组没有差异。

[0218] 入选时两组患者的年龄、诊断时的蛋白尿、平均随访和接受免疫抑制剂治疗的患者的百分比没有显著差异。如其他研究所述,诊断时的年龄和血清肌酐水平在没有达到缓解的组中较高(分别地,使用不成对t检验p=0.0006;使用Mann-Whitney检验p=0.0002)。全

长PLA2R1、CysR、CTLD1和CTLD7特异性测定的ELISA滴度在肾脏预后差的组中显著更高,尤其是CTLD1和CTLD7特异性测定(分别 $p=0.04$, $p=0.03$, $p=0.003$ 和 $p<0.0001$;Mann-Whitney检验)。多重Cox回归分析将CysRC1和CysRC1C7组和具有全长PLA2R1的高滴度鉴定为肾脏预后差的独立风险因素。因此,表位谱是随后肾脏事件发作的预后因素。

[0219] 随访期间的表位扩散

[0220] 随访期间,发明人也有16位患者的血清可用。他们寻找在疾病过程中PLA2R1表位谱中的开关。9位患者在随访期间疾病活动性稳定且具有稳定的表位谱,其中5位患者在免疫抑制治疗或对症治疗抗CysR限制性活性稳定或降低,并进入缓解。患者9在肾移植后14年内且在环孢菌素治疗下保持缓解,尽管用全长PLA2R1测量他的ELISA滴度高。该患者仅具有针对CysR的活性,没有分子内扩散。1997年5月和2011年5月两次活检证实复发时和14年后有免疫沉积物存在。两位患者具有稳定的CTLD1谱且具有活动性疾病。两位患者具有稳定的CTLD7表位谱并且处于活动性疾病中。

[0221] 四位患者改变了他们的表位谱,并改变了疾病活性。来自CysRC1C7组的一位患者转入CysR组,并在免疫抑制治疗下进入缓解。相反,两位患者从CysR转为CysRC1和CysRC1C7组,并且肾病性蛋白尿复发,最后一名患者针对活动性疾病的CysR和CTLD7具有阳性反应,2年后蛋白尿增加,对CTLD1也呈阳性反应。

[0222] 最后,三位患者表现出对每个结构域的所有三种抗体逐渐减少并进入缓解。

[0223] IgG亚类

[0224] 所有上述表位研究均设计用于测量IgG4抗PLA2R1抗体,因为大量证据表明IgG4和抗PLA2R1 IgG4在iMN发病机理中起更重要的作用。为了证实这一观点,本发明人通过蛋白质印迹比较了来自选自三个表位组的患者的血清对PLA2R1缺失突变体的反应性,并通过ELISA比较了上述血清对CysR、CTLD1和CTLD7抗原的反应性,检测不同的IgG亚类(1、2、3和4)和总IgG。为了确定我们的结果,本发明人用纯化IgG验证了IgG亚类检测的特异性,然后进行蛋白质印迹分析和ELISA,同时检测所有的IgG。除了抗PLA2R1 IgG4抗体之外,本发明人在一些患者中观察到IgG1、IgG2和IgG3抗-CysR和抗CTLD1自身抗体的存在。但是,发明人从未观察到与IgG4不同的抗CTLD7自身抗体。最后,通过蛋白质印迹观察到的总IgG的模式与IgG4非常相似。总之,这些结果表明,如果我们选择用总IgG进行检测,选择检测抗PLA2R1 IgG4可能是最有效的,并且很可能不改变患者的表位分类。

[0225] 讨论

[0226] 本发明人筛选了69位患有iMN疾病的患者,并鉴定了PLA2R1的三个结构域中的表位:Cys-R、CTLD1和CTLD7。有趣的是,与iMN相关的几种常见遗传变体已经定位于这些结构域中。我们的结果进一步延伸了Kao等人 and Fresquet等人的结果,他们分别鉴定了CysR-CTLD1区的表位和单独的CysR。数据清楚地显示,CysR和CTLD1是由不同的抗PLA2R1抗体识别的两个独立的结构域。将CTLD7鉴定为另外的结构域并且更清楚地将CysR和CTLD1鉴定为两个单独的表位的能力可能是由于以下事实:发明人制备了不同的和全套的PLA2R1缺失突变体,并且还用了比总IgG更敏感的IgG4检测筛选了大量患者。事实上,以前的两个研究只使用了非常有限数量的患者,或者使用了5位患者的血清池,然后进行与更多患者的竞争测定。此外,尚不清楚是否从患有活动性疾病或缓解的患者收集血清。

[0227] 发明人然后观察到血清采样时针对CysR的抗PLA2R1反应性与有利结果相关,而针对

对CTLD1和CTLD7的反应性与活动性疾病和肾脏预后差相关。此外,发明人表明,表位谱可以在随访期间改变。抗CTLD1和抗CTLD7抗体随疾病缓解而消失,随疾病复发再度出现,而抗CysR限制性活性与稳定且轻微的疾病活性相关。重要的是,当用全长PLA2R1通过ELISA测量时,所有患者仍具有抗PLA2R1活性(表1)。这些发现可以解释疾病活动水平和抗PLA2R1滴度之间观察到的差异。

[0228] 这些发现使得发明人假设,抗-PLA2R1抗体最初可能针对具有轻症状iMN疾病的N-末端CysR结构域产生:CysR组中的患者比其他组年轻,表明这些患者可能在疾病开始阶段。第二次免疫挑战(过敏、感染等)然后可能诱导PLA2R1向C末端(CTLD1或CTLD7)分子内扩散,从而导致更为活跃的疾病。表位扩散是其中相同或不同分子内的新表位随时间被来自原始非交叉反应性抗原位点的T或B细胞识别的现象。如在许多自身免疫性疾病如人抗肾小球基底膜病、寻常型天疱疮、类风湿性关节炎、实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)、多发性硬化症、1型糖尿病和Heymann肾炎中所述,分子内的表位扩散与疾病恶化相关。此外,分子内的表位扩散也可能调节iMN的缓解和复发。如在EAE中所述,表位扩散在小鼠疾病进展中起主要作用,并且短期共刺激阻断可以特异性地抑制T细胞应答的启动,防止表位扩散和疾病恶化。

[0229] 总之,结果表明,三个PLA2R1结构域参与抗PLA2R1结合,其中两个与活性iMN更紧密相关并且可能通过表位扩散机制相连。

[0230] 实施例2:使用鼠PLA2R1评估患有iMN患者的结果

[0231] 本发明人已经表明,使用小鼠PLA2R1ELISA对抗PLA2R1自身抗体亚组的特异性检测可以预测长期临床结果。为此目的,本发明人首先在首次血清样品分析时测量了41位iMN患者中与hPLA2R1(人)、rbPLA2R1(兔)和mPLA2R1(小鼠)ELISA的对照相比较的IgG4抗PLA2R1滴度。他们在首次血清取样时首先通过WB,然后使用抗原特异性ELISA检测了所有41个iMN血清对三个PLA2R1同源物的交叉反应性。在WB分析中识别hPLA2R1的所有血清也识别rbPLA2R1,但41位患者中仅有26位与mPLA2R1反应。

[0232] 为了证实这些结果并定量测定抗PLA2R1自身抗体的水平,他们用同源物特异性ELISA测量了相同的血清。为实现这一目标,发明人使用包含全长胞外结构域的重组可溶形式的mPLA2R1建立了用于mPLA2R1的另一种ELISA,对rbPLA2R1和hPLA2R1也是如此。因此,他们通过WB和sPLA2结合测定验证了这种重组形式的mPLA2R1。

[0233] 至于hPLA2R1和rbPLA2R1,mPLA2R1ELISA对于iMN患者是特异性的,并且不识别任何其他疾病或健康对照。全部41个iMN血清在hPLA2R1和rbPLA2R1ELISA中反应,但其中仅有32个(78%)在mPLA2R1ELISA中具有活性。此外,与hPLA2R1和rbPLA2R1ELISA相反,在mPLA2R1ELISA中只有少数iMN血清产生高滴度。

[0234] 发明人随后分析了在首次血清采样时年龄、性别、蛋白尿、血清肌酐、免疫抑制治疗以及人、兔和小鼠PLA2R1抗体滴度与患者(即预后差的患者与缓解的患者)临床结果之间的关系。在单变量($p=0.007$)和多变量分析($p=0.009$)中,只有抗mPLA2R1活性与持续活动性疾病显著相关。mPLA2R1ELISA滴度的ROC曲线分析定义的阈值为605RU/mL,超过该阈值,100%的患者(12位患者)预后差(100%特异性,57%灵敏度,AUC0.76, $p=0.004$,95%IC 0.60-0.91)。

[0235] 因此,通过Kaplan-Meier方法分析肾脏结果表明,具有高滴度抗mPLA2R1抗体的患

者肾脏结果差。实际上,抗-mPLA2R1抗体滴度高于605RU/mL的患者(n=12)的血清肌酐倍增率高于(使用对数秩检验, $p<0.001$)抗-mPLA2R1抗体滴度低于605RU/mL的患者(n=29)。ROC曲线不能确定hPLA2R1和rbPLA2R1抗体滴度的这种阈值,与其余患者相比,具有最高抗hPLA2R1或抗rbPLA2R1滴度的12位患者的相应亚组没有统计学显著的差的肾脏结果(分别为 $p=0.88$ 和 $p=0.21$)。

[0236] 这些结果表明,rbPLA2R1是hPLA2R1的替代抗原,可用于测量活动性疾病中的抗PLA2R1,而mPLA2R1是一种独特的抗原,能够检测仅在有差的预后风险的iMN患者中以高水平(>605RU/mL)存在的抗PLA2R1自身抗体亚组,因此可用于预测iMN结果。

专利名称(译)	基于PLA2R1表位谱和扩散分析的膜性肾病的预后和监测		
公开(公告)号	CN108027367A	公开(公告)日	2018-05-11
申请号	CN201680037097.0	申请日	2016-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	国家科学研究中心 尼斯索菲娅昂蒂波利斯大学		
申请(专利权)人(译)	国家科学研究中心 尼斯索菲娅昂蒂波利斯大学		
当前申请(专利权)人(译)	国家科学研究中心 尼斯索菲娅昂蒂波利斯大学		
[标]发明人	V L M 埃斯诺 B 波斯基 G J F 朗博 G 多拉		
发明人	V·L·M·埃斯诺 B·波斯基 G·J·F·朗博 G·多拉		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6878 G01N33/6893 G01N2333/705 G01N2800/347 G01N33/6854 G01N2800/52		
代理人(译)	王月		
优先权	2015306148 2015-07-10 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译) 本发明涉及一种基于分析PLA2R1表位谱来评估受试者的特发性膜性肾病预后的方法。本发明进一步涉及一种基于分析PLA2R1表位扩散来监测特发性膜性肾病进展的方法。本发明强调三个PLA2R1结构域(CysR、CTLD1和CTLD7)参与抗PLA2R1活性，其中两个(CTLD1和CTLD7)与活动性特发性膜性肾病更紧密相关，可能通过表位扩散机制相连。	诊断时的年龄 (岁)	55 ± 15
	性别 (男性/女性)	54/15
	诊断时的蛋白尿 (g/g)	5.0 (1.4-24.0)
	诊断时的血清肌酐(μmol/L)	99 (43-385)
	诊断和 PLA2R1 测定之间的月数	0 (0-100)
	抗-PLA2R1 滴度(ELISA 指数值)	3241 (210-50817)
	PLA2R1 测定时的蛋白尿 (g/g)	4.0 (0.3-24.0)
	PLA2R1 测定时的血清肌酐 (μmol/L)	94 (43-600)
	PLA2R1 测定之前治疗的患者¹	6 (9%)
	随访期间治疗的患者¹	41 (59%)
	LOCF² (月)	36 (12-216)
	LOCF 时的蛋白尿 (g/g)	2.0 (0.0-20.0)
	LOCF 时的血清肌酐(μ mol/L)	119 (48-926)
	自发缓解³	18 (26%)
	LOCF 时预后差⁴	31 (45%)
血液透析⁵	12 (17%)	