



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106999547 B

(45) 授权公告日 2021.06.18

(21) 申请号 201580040159.9

(73) 专利权人 欧蒙医学实验诊断股份公司

(22) 申请日 2015.07.23

地址 德国吕贝克

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 G·朗博 N·M·托马斯

申请公布号 CN 106999547 A

B·塞茨-波尔斯基

(43) 申请公布日 2017.08.01

R·A·K·斯塔尔

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

14306195.0 2014.07.24 EP

代理人 张小勇

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.CI.

2017.01.24

A61K 38/17 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01N 33/564 (2006.01)

PCT/EP2015/066881 2015.07.23

G01N 33/68 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 陶然

W02016/012542 EN 2016.01.28

权利要求书1页 说明书26页 附图3页

(54) 发明名称

用于监测膜性肾病的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及作为膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的生物标志物自身抗原的蛋白质THSD7A (含有I型血小板应答蛋白结构域的7A)。本发明基于检测识别THSD7A蛋白的自身抗体(抗THSD7A自身抗体)提供用于患者膜性肾病的诊断、预后和监测方法和相关试剂盒。本发明还基于THSD7A水平的检测提供了诊断方法和试剂盒。本发明还提供了膜性肾病的治疗方法。

1. THSD7A(含有I型血小板应答蛋白结构域的7A)多肽或其抗体结合片段在制备诊断剂中的用途,所述诊断剂用于诊断患者中的膜性肾病的体外方法,所述方法包括在从所述患者获得的生物样品中检测识别THSD7A的一种或多种自身抗体的步骤,其中所述方法包括以下步骤:

(i) 使从所述患者获得的生物样品与THSD7A多肽或其抗体结合片段接触,和

(ii) 检测形成的任何抗原抗体复合物,

其中抗原抗体复合物的存在指示膜性肾病,并且其中所述片段包含THSD7A的整个氨基酸序列的至少80%,并且

其中所述生物样品是全血、血清、血浆或肾活检。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述膜性肾病是特发性膜性肾病。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中所述患者是PLA2R1阴性患者。

4. 一种用于诊断患者中的膜性肾病的试剂盒,所述试剂盒包含:

• THSD7A多肽或其抗体结合片段,其中所述片段包含THSD7A的整个氨基酸序列的至少80%,和

• 用于检测在THSD7A多肽或其抗体结合片段与针对存在于生物样品中的THSD7A的自身抗体之间形成的抗原抗体复合物的试剂,其中所述试剂是标记的抗人IgG抗体。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,所述试剂盒还包含PLA2R1多肽或其抗体结合片段。

6. 用于测量THSD7A自身抗体的试剂在制备试剂盒中的用途,该试剂盒用于评估对患者中的膜性肾病的治疗的有效性的体外方法,所述方法包括:

(i) 在第一时间点测定在所述第一时间点从所述患者获得的样品中的抗THSD7A自身抗体的水平,

(ii) 在第二时间点测定在所述第二时间点从所述患者获得的样品中的抗THSD7A自身抗体的水平,以及

(iii) 比较两个时间点的自身抗体的水平,

其中:

• 与第一时间点相比,第二时间点中抗THSD7A自身抗体水平的降低表明治疗有效,和/或

• 与第一时间点相比,第二时间点中抗THSD7A自身抗体水平的增加表明治疗无效,并且

其中所述样品是全血、血清、血浆或肾活检。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述方法包括使用涂覆有THSD7A多肽或其片段的装置,并且其中所述片段包含THSD7A的整个氨基酸序列的至少80%。

## 用于监测膜性肾病的方法和试剂盒

### 发明领域

[0001] 本发明涉及由膜性肾病、特别是特发性膜性肾病患者的生物样品中存在的自身抗体特异性识别的生物标志物自身抗原。

[0002] 本发明提供了用于诊断、预后、监测和治疗患者的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法和试剂盒。

### [0003] 发明背景

[0004] 膜性肾病是肾病综合征的常见原因。约15%的膜性肾病病例是由药物、感染、肿瘤、免疫性疾病等引起的继发性膜性肾病。其余85%的膜性肾病病例是特发性的，也称为自身免疫性原发性膜性肾病。它的起源仍然未知。没有接受治疗的特发性膜性肾病患者中的大约一半将发展需要透析或肾移植的终末期肾病。在肾移植者中，他们中的约40%将复发。

[0005] PLA2R1已被描述为特发性膜性肾病中的主要自身抗原，并且可用于诊断和监测肾移植术之前和之后特发性膜性肾病的治疗。基于这种自身抗原的可能的治疗策略也已经被报道。

[0006] 然而，仅有约70%的患有特发性膜性肾病的患者具有抗PLA2R1自身抗体，表明其他自身抗原和相应的自身抗体可能参与剩余的30%病例。因此，对于基于PLA2R1自身抗原不能被跟踪的30%的患者，存在相应的诊断、预后和诊疗的需要。

### [0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及鉴定含有I型血小板应答蛋白结构域的7A (THSD7A) 作为膜性肾病中的新的自身抗原和相应的诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的体外方法，所述方法包括在从所述患者获得的生物样品中检测识别THSD7A蛋白的一种或多种自身抗体的步骤。

[0009] 在一个实施方案中，所述体外方法包括以下步骤：

[0010] (i) 使从所述患者获得的生物样品与THSD7A多肽或其抗体结合片段接触，和

[0011] (ii) 检测形成的任何抗原抗体复合物，

[0012] 其中抗原抗体复合物的存在指示膜性肾病。

[0013] 优选地，生物样品是血液样品。

[0014] 本发明涉及用于评估对患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的治疗的有效性的体外方法，包括：

[0015] (i) 在第一时间点确定在所述第一时间点从所述患者获得的所述样品中的抗THSD7A自身抗体的水平，

[0016] (ii) 在第二时间点测定在所述第二时间点从所述患者获得的所述样品中的抗THSD7A自身抗体的水平，以及

[0017] (iii) 比较两个时间点的自身抗体的水平，

[0018] 其中：

[0019] • 与第一时间点相比，第二时间点中抗THSD7A自身抗体水平的降低表明治疗有效，和/或

[0020] • 与第一时间点相比,第二时间点中抗THSD7A自身抗体水平的增加表明治疗无效。

[0021] 本发明还提供了用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0022] • THSD7A多肽或其抗体结合片段,和

[0023] • 用于检测在自身抗原和存在于生物样品中的自身抗体之间形成的抗原抗体复合物的试剂。

[0024] 本发明还涉及用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的体外方法,包括测定从所述患者获得的生物样品中的THSD7A水平的步骤。

[0025] 在一个实施例方案中,所述方法包括以下步骤:

[0026] (i) 测量从所述患者获得的生物样品中THSD7A蛋白的水平,

[0027] (ii) 将所述水平与参考水平进行比较,

[0028] 其中与所述参考水平相比增加的THSD7A蛋白水平指示膜性肾病。

[0029] 优选地,生物样品是肾活检或血液样品。

[0030] 最后,本发明涉及治疗方法、药物组合物和用于治疗膜性肾病的用途。

[0031] 实际上,本发明涉及用于治疗患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法,所述方法包括从所述患者体内的样品中离体去除抗THSD7A自身抗体。

[0032] 本发明还涉及治疗患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法,所述方法包括给予治疗有效量的THSD7A多肽或其片段,表达所述THSD7A多肽或其片段的载体或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞。

[0033] 此外,本发明涉及用于治疗膜性肾病的THSD7A多肽或其片段(表达所述THSD7A多肽或其片段的载体或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞)和药物组合物,药物组合物包含所述THSD7A多肽或其片段(表达所述THSD7A多肽或其片段的载体或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞),特别是用于治疗膜性肾病,更特别是特发性膜性肾病。

[0034] 优选地,对于本发明的治疗方法、药物组合物和用途,患者是THSD7A阳性患者。

[0035] 附图简述

[0036] 图1:在膜性肾病患者中检测针对未知抗原的自身抗体。用来自膜性肾病(MN)患者和对照患者的血清探测的人肾小球提取物(HGE)的蛋白质印迹结果。这些测试的患者中的大多数(88%)血清取自来自汉堡的预先存在的血清库,而剩余的血清来自尼斯的患者队列。该图显示不同反应性模式的代表性图像:所描绘的三种MN血清(MN 2至MN 4)与大小约250kDa的肾小球蛋白反应,但不与重组磷脂酶A2受体(rPLA2R1)反应。一个MN血清识别约180kDa的肾小球蛋白以及重组PLA2R1(MN 36)。对于一个MN血清(MN 6)、来自蛋白尿对照的两个血清、一个患有最小变化疾病(MCD)和一个患有局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)和一个健康供体的血清没有观察到反应性。B.在针对抗PLA2R1抗体阴性的膜性肾病(MN)的69个患者中,6个与250kDa抗原反应。这6个中的5个患有特发性MN,而1个患有具有阳性抗核抗体(ANA)的继发性MN。在抗PLA2R1阳性患者(n=60)、其他肾小球疾病患者(n=76)或健康对照(n=44)中没有观察到反应性。

[0037] 图2:靶抗原的鉴定。A.人肾小球提取物(HGE)和过表达的含有1型血小板应答蛋白结构域的7A(rTHSD7A)的转染的HEK293细胞与反应性和非反应性血清的蛋白质印迹的结

果。该图显示了三个膜性肾病(MN)患者(其血清与HGE和rTHSD7A(MN 1至MN 3)二者均反应)、一个非反应性MN患者(MN 36),一个患有最小变化疾病(MCD)的非反应性患者和一名非反应性健康对照患者的代表性图像。rTHSD7A迁移至比包含在肾小球裂解物中的天然蛋白质略低的位置,最有可能是由于翻译后修饰的差异。B.来自人肾小球提取物(HGE)的裂解物的THSD7A的免疫沉淀结果。HGE与来自MN患者和对照的反应性和非反应性血清样品孵育,随后加入人IgG4亲和基质。离心样品,将免疫沉淀物在还原条件下电泳,印迹在PVDF膜上,并用多克隆兔抗THSD7A抗体检测。来自MN患者的所有5个反应性血清免疫沉淀来自HGE的靶抗原(MN 1至MN 5),而一个非反应性MN血清(MN 9)以及来自健康对照患者的一个血清则没有。在实验中当用水替换血清时不发生免疫沉淀。

[0038] 图3:抗THSD7A抗体与MN患者的临床病程之间的关系。来自一个膜性肾病患者的连续血清样品的等体积人肾小球提取物(HGE)的蛋白质印迹结果。在蛋白尿初始减少后,患者在2012年9月出现严重的水肿和重的蛋白尿。开始用环孢素A和类固醇的免疫抑制治疗,并且蛋白尿减少,直到患者在2014年1月达到部分缓解。疾病活动的这种发展反映在免疫抑制治疗开始后的蛋白质印迹信号的减少。

[0039] 图4:大THSD7A蛋白(1657个氨基酸)的分子结构。THSD7A蛋白由含有信号肽的大胞外部分、至少10个1型血小板应答蛋白重复(其中几个含有富含色氨酸的序列)和一个RGD基序、起始于氨基酸残基1608的跨膜结构域和短的细胞内尾巴组成。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明人强调了在患有特发性膜性肾病的患者中存在自身抗体,所述自身抗体对新的自身抗原,即含有1型血小板应答蛋白结构域的7A(THSD7A)蛋白具有反应性。

[0042] 这些自身抗体存在于约15%的患有特发性膜性肾病的患者的血清中,其不存在抗PLA2R1自身抗体。这代表了患有膜性肾病的患者总人口的约5-10%。

[0043] 本发明人显示,在患者中发现的大多数抗THSD7A自身抗体是IgG4亚类;也发现了亚类IgG3、IgG2和IgG1。

[0044] 定义

[0045] 术语“膜性肾病”具有其在本领域中的一般含义,并且是指肾病,其是成人肾病综合征的常见病因。它包括由继发性因素诸如系统性红斑狼疮、乙型肝炎或梅毒等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,主要已知的靶抗原是自身抗原PLA2R1。

[0046] 本文公开的所有疾病、病症和症状在提交本申请时具有本领域接受的如教科书所证实的一般含义。

[0047] 如本文所使用的,术语“指示膜性肾病”在应用于过程或事件时是指对膜性肾病进行诊断的过程或事件,使得该过程或事件在患有膜性肾病比健康受试者和/或患有除膜性肾病以外的疾病的患者中明显更频繁地被发现。

[0048] 术语“生物标志物”和“标志物”在本文中可互换使用。它们是指作为生物过程、生物事件和/或病理状况的独特指示物的物质。根据本发明,THSD7A蛋白(或THSD7A多肽)及其任何抗体结合片段和抗THSD7A自身抗体是膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的生物标志物。

[0049] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用,是指多种长度的氨基酸序列,

以其中性(不带电)形式或盐形式，并且未修饰或通过糖基化、侧链氧化、磷酸化、瓜氨酸化或转谷氨酰胺修饰。在某些实施方案中，氨基酸序列是全长天然蛋白。在其他实施方案中，氨基酸序列是全长蛋白质的较小片段。在其它实施方案中，氨基酸序列通过附接于氨基酸侧链的附加取代基修饰，诸如添加N-或C-末端的蛋白质标签、糖基单位、脂质或无机离子诸如磷酸盐，以及涉及链的化学转化修饰，诸如巯基的氧化。因此，术语“蛋白质”(或其等同术语)旨在包括经历不显著改变其特定性质的那些修饰的全长天然蛋白质或其片段的氨基酸序列。特别地，术语“蛋白质”包括蛋白质同种型，即由相同基因编码但在pI或MW或两者上不同的变体。此类同种型在其氨基酸序列(例如，作为选择性剪接或有限的蛋白水解的结果)方面可以不同，或者可以由差异翻译后修饰(例如糖基化、酰化、磷酸化)引起。

[0050] 术语THSD7A(Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7A，含有I型血小板应答蛋白结构域的7A)具有其在本领域中的一般含义，并且指在足细胞上高表达的1657个氨基酸的蛋白质，并且在血管发生期间通过FAK依赖性机制参与内皮细胞迁移和丝状伪足形成。该术语可以包括天然存在的THSD7A及其变体和修饰形式。THSD7A可以来自任何来源，但通常是哺乳动物(例如，人和非人灵长类动物或其他哺乳动物物种)THSD7A，特别是人THSD7A。在Q9UPZ6(UniProt数据库)和NP\_056019(GenPept数据库，前体序列)中提供示例性人天然THSD7A氨基酸序列，并且在NM\_015204(GenBank数据库，前体序列)中提供示例性人天然THSD7A mRNA序列。THSD7A蛋白的结构如图4所示。

[0051] 如本文所用，表述“THSD7A的片段”是指THSD7A的连续元件。通常，所述片段是生物活性片段，即它包含THSD7A的一种或多种功能性质。

[0052] 在本发明的上下文中，THSD7A的“片段”包含、优选由THSD7A的整个氨基酸序列的至少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。

[0053] 优选地，所述片段包含THSD7A的整个氨基酸序列中至少100个，至少200个，至少300个，至少400个，至少500个，至少600个，至少700个，至少800个，至少900个，至少1000个，至少1100个，至少1120个，至少1250个，至少1300个，至少1400个，至少1500个，至少1600个，至少1620个，至少1640个氨基酸。

[0054] 优选地，所述片段被针对THSD7A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或本领域已知的用于测定直接结合的方法之一完成。

[0055] 术语PLA2R1(分泌性磷脂酶A2受体，也称为PLA2R1)具有其在本领域中的一般含义，并且本文中指M型磷脂酶A2受体，其是通过PLA2R1基因在人类中编码的受体，特别地已知为特发性膜性肾病的主要抗原肾病。在NP\_001007268(GenPept数据库)中提供示例性人天然PLA2R1氨基酸序列，并且在NM\_001007267(GenBank数据库)中提供示例性人天然THSD7A mRNA序列。值得注意的是，本文公开的所有对数据库的引用诸如代码或登录号均指可在2014年7月24日在线获得的版本。

[0056] 术语“PLA2R1阴性患者”或“THSD7A阴性患者”是指其血清不含分别针对PLA2R1或THSD7A的自身抗体(或至少不含可检测的自身抗体)的患者。相反，“PLA2R1阳性患者”或“THSD7A阳性患者”是指其血清含有分别针对PLA2R1或THSD7A的自身抗体的患者。

[0057] 术语“自身抗体”具有其在本领域中的一般含义，并且是指由受试者(或患者)的免疫系统产生的并针对受试者(或患者)自身蛋白质(例如THSD7A)的抗体。自身抗体可攻击身

体自身的细胞、组织和/或器官,引起炎症和细胞损伤。术语“识别THSD7A的自身抗体”可以与“抗THSD7A自身抗体”互换使用。

[0058] 当在本文中与抗原(例如THSD7A)结合使用时,术语“抗体结合片段”是指保留抗原结合抗体以形成抗体抗原复合物的能力的抗原片段。特别地,本发明的抗原的抗体结合片段保留了结合对膜性肾病特异性的自身抗体的能力。抗原的合适的抗体结合片段可以由本领域技术人员通过简单试验来鉴定,以确定其结合膜性肾病的特异性自身抗体的能力。

[0059] 如本文所用,术语“患者”是指人类受试者或另一哺乳动物受试者(例如灵长类动物、狗、猫、山羊、马、猪、小鼠、大鼠、兔等),它们可患有膜性肾病、特别是特发性膜性肾病。优选地,患者是人类患者。更优选地,所述患者被怀疑患有膜性肾病、特别是特发性膜性肾病。

[0060] 术语“生物样品”在本文中以其最广泛的含义使用。生物样品通常被获得用于受试者。所述受试者是哺乳动物,优选人。通常,生物样品通常从患者获得。通常,所述样品包含一组代表性的自身抗体。

[0061] 样品可以是可以测定本发明的生物标志物的任何生物组织或流体。这样的样品包括但不限于可以含有或不含有细胞,例如血液(例如全血、血清或血浆)的体液。这样的样品还包括活检(例如肾活检)。术语生物样品还包括通过处理生物样品衍生的任何材料。衍生材料包括但不限于从样品中分离的细胞(或其后代)或从样品提取的蛋白质。生物样品的处理可以涉及以下一种或多种:过滤、蒸馏、提取、浓缩、干扰组分的灭活、试剂的添加等。

[0062] 在本发明的上下文中,术语“对照”,当用于表征受试者时,是指健康的受试者或已被诊断患有除肾病以外的特定疾病的患者。术语“对照样品”是指从健康受试者或诊断患有除肾病症之外的疾病的患者获得的一个或多于一个样品。

[0063] 术语“正常”和“健康”在本文中可互换使用。他们是指没有显示与肾脏疾病相关的任何症状,并且没有诊断出患有膜性肾病或其他肾病的受试者。优选地,正常受试者没有使用影响肾系统的药物上,并且没有被诊断为患有任何其他疾病。在某些实施方案中,与获得待测试的生物样品的受试者相比,正常受试者具有相似的性别、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。

[0064] 如本文所用,术语“参考水平”是指在从对照获得的生物样品中测量的水平,或优选至从几个对照获得的生物样品中测量的几个水平的平均值。

[0065] 如本文所用,术语“诊断”(“diagnosis”、“diagnosing”或“diagnostic”)以其最广泛的含义使用,并且包括膜性肾病的诊断、预后、诊疗和监测。

[0066] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”或“treatment”)是指减轻或缓解与膜性肾病(特别是特发性膜性肾病)相关的医学病况相关的至少一种不良作用或症状。这些包括减少抗THSD7A自身抗体的量,减少、抑制或终止抗THSD7A自身抗体的产生,抑制免疫系统,并且当它们结合肾小球时减少与自身抗体的活性相关的炎症和降解/损伤。

[0067] 如本文所用,术语“诊疗”是指例如通过诊断方法鉴定可能受益于特定治疗的患者的鉴定。

[0068] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指可以减少可溶性抗THSD7A自身抗体的量的活性剂的量。与在治疗开始之前存在于血清中的自身抗体的量相比,减少的量为自身抗体减少至少10%,特别是至少20%,更特别地至少40%,优选地至少60%,更优选地至少80%,甚

至更优选地至少95%。

[0069] 如本文所用,术语“药物组合物”是指本发明的活性剂(例如THSD7A多肽或其片段,表达所述THSD7A多肽或其片段的载体或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞,如下所述)与药学工业中通常使用的化学品和化合物的药学上可接受的载体组合。

[0070] 基于抗THSD7A自身抗体的检测的诊断和预后方法和试剂盒

[0071] 诊断方法

[0072] 因此,本发明的第一个目的涉及用于诊断和/或预后患者中膜性肾病、更特别是特发性膜性肾病的体外方法,所述方法包括在从所述患者获得的生物样品中检测一种或更多种识别THSD7A蛋白的自身抗体。

[0073] 在优选的实施方案中,生物样品是血液样品(包括全血、血清或血浆)。优选地,生物样品是血清或血浆。

[0074] 在一个实施方案中,用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的体外方法包括以下步骤:

[0075] (i)使从所述患者获得的生物样品与THSD7A多肽或其抗体结合片段接触,和

[0076] (ii)检测形成的任何抗原抗体复合物,

[0077] 其中抗原抗体复合物的存在指示膜性肾病。

[0078] 在本发明的一个实施方案中,THSD7A多肽或其抗体结合片段可以来自不同的哺乳动物物种,特别是人、非人灵长类动物、猪、兔或小鼠。

[0079] 在一个实施方案中,THSD7A多肽可以是完全THSD7A蛋白。

[0080] 在本发明的一个实施方案中,抗体结合片段可以包含THSD7A的完整细胞外结构域或由其组成或由THSD7A的一个或几个独特的I型血小板应答蛋白结构域和/或接头茎构成的其片段。

[0081] 本发明的THSD7A多肽和更一般地所有生物标志物可以通过任何合适的方法制备,包括重组方法。例如在“The Proteins”(第II卷,第3版,H.Neurath等人(编辑),1976,Academic Press:New York,NY,第105-237页)如所描述的此类方法也可以用于合成本发明的生物标志物。

[0082] 在某些实施方案中,本发明的多肽/蛋白质生物标志(例如THSD7A多肽)固定在固体载体或支持物(例如珠或阵列)上。因此,在该实施方案中,本发明的方法包括使用涂覆有THSD7A多肽或其片段的装置。通常,所述装置是医疗装置或诊断装置,优选诊断装置。

[0083] 通常,在本发明的上下文中,THSD7A多肽或其片段固定到所述装置上。

[0084] 本发明的诊断方法包括检测在本发明的生物标志物(例如THSD7A多肽)和存在于测试的生物样品中的自身抗体之间形成的抗原抗体复合物。该检测指示所述样品中存在自身抗体(即抗THSD7A自身抗体)。

[0085] 在本发明的实践中,可以通过任何合适的方法进行此类复合物的检测(参见例如E.Harlow和A.Lane,“Antibodies:A Laboratories Manual”,1988,Cold Spring Harbor Laboratory:Cold Spring Harbor,NY)。

[0086] 例如,可以使用免疫测定法进行抗原抗体复合物的检测。大量免疫测定技术是可用的,包括放射免疫测定、酶免疫测定(EIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光、免疫沉淀和线印迹。免疫测定是本领域众所周知的,并且落入本领域技术人员的一般知识内。用于

进行此类测定的方法以及实际应用和程序概述在教科书中。此类教科书的实例包括 P.Tijssen于Practice and theory of enzyme immunoassays, 编辑R.H.Burdon 和 v.P.H.Knuppenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), pp.221-278中以及Methods in Enzymology, 编辑S.P.Colowick等人, Academic Press涉及免疫学检测方法的各卷,特别是第70、73、74、84、92和121卷。免疫测定可以是竞争性或非竞争性的。例如,夹心测定的许多变化中的任何一种技术可用于进行免疫测定。简言之,在应用于根据本发明的抗THSD7A自身抗体的检测的典型夹心测定中,将未标记的THSD7A多肽(生物标志物)固定在固体表面上(如上所述),并将待测试的生物样品在允许形成抗原抗体复合物的条件下与结合的生物标志物接触一段时间。优选地,抗原抗体复合物的形成在非还原条件下完成。

[0087] 孵育后,加入用可检测部分标记并特异性识别来自所测试物种的抗体的抗体(例如,用于人受试者的抗人IgG),并在允许任何生物标志物-结合的自身抗体和标记的抗体之间的三元复合物形成的条件下孵育。洗去任何未结合的物质,通过观察/检测由可检测部分直接或间接产生的信号来确定样品中任何抗THSD7A自身抗体的存在。该测定中的变化包括其中将生物样品和标记的抗体同时加入到固定化的THSD7A蛋白/多肽生物标志物中的测定。

[0088] 二抗(即,如上所述在夹心测定中加入的抗体)可以用任何可检测部分标记,即任何实体,其通过其化学性质提供分析上可识别的信号,从而允许检测三元复合物,因此检测生物标志物-抗体复合物。

[0089] 检测可以是定性的或定量的。用于标记生物分子诸如抗体的方法是本领域众所周知的(参见例如"Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B", Methods in Enzymol, 1974, Vol. 34, W.B.Jakoby 和 M.Wilneck (Eds.), Academic Press: New York, NY; 以及 M.Wilchek 和 E.A.Bayer, Anal.Biochem., 1988, 171:1-32)。免疫测定中最常用的可检测部分是酶和荧光团。在酶免疫测定(EIA或ELISA)的情况下,通常通过戊二醛或高碘酸盐将诸如辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶等的酶与二抗缀合。与特定酶一起使用的底物通常被选择用于在相应的酶水解时产生可检测的颜色变化。在免疫荧光的情况下,二抗与荧光部分化学偶联,而不改变其结合能力。在荧光标记的抗体与生物标志物-抗体复合物结合并去除任何未结合的材料后,检测荧光部分产生的荧光信号,并任选地定量。或者,二抗可以用放射性同位素、化学发光部分或生物发光部分标记。

[0090] 通常,在本发明的上下文中,THSD7A多肽是分离的多肽或重组多肽。

[0091] 如上所述,本发明的生物标志物被患有膜性肾病、更特别是特发性膜性肾病的患者群体的血清特异性识别,并且特别是被没有抗性-PLA2R1自身抗体的膜性肾病患者的血清特异性识别。

[0092] 因此,在本发明的具体实施方案中,所述患者是PLA2R阴性患者。

[0093] 该患者对于膜性肾病的所有常见原因(例如系统性红斑狼疮、乙型肝炎和梅毒)也被检测为阴性。

[0094] 目前,对于PLA2R1阴性患者,没有可用于诊断膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的非侵入性方法。因此,所述患者必须经历肾活检。

[0095] 相反,本发明的方法是非常有希望的,因为它可以免除在THSD7A阴性患者中以及在THSD7A阳性患者中执行侵入性技术的需要。

[0096] 在具体实施方案中,所述患者没有和/或不会经历肾活检。

[0097] 所述方法还可以基于检测抗PLA2R1自身抗体(在专利申请W02010/009457中描述)并行地应用于膜性肾病的诊断方法,和评估膜性肾病的另外的生物标志物(例如继发性膜性肾病的生物标志物)。此类生物标志物的实例包括但不限于抗核抗体(ANA)、抗乙型肝炎抗原和快速血浆反应素(RPR)。

[0098] 使用所述诊断方法获得的结果可以与临床数据、来自其他测试的结果、对膜性肾病的诊断进行的测定或程序进行比较和/或组合。这样的比较和/或组合可以帮助提供更精细的诊断。

[0099] 膜性肾病的预后方法和治疗监测

[0100] 本发明人还显示抗THSD7A自身抗体的存在和水平与膜性肾病患者、更特别是特发性膜性肾病患者的治疗有效性、缓解或复发之间的相关性。

[0101] 目前用于膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的治疗是免疫抑制治疗,例如环孢素,他克莫司,硫唑嘌呤,英夫利昔单抗,奥马珠单抗,达利珠单抗,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。它还包括环磷酰胺、苯丁酸氮芥和利妥昔单抗。

[0102] 因此,本发明的另一个目的涉及用于评估对患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的治疗有效性的体外方法,包括:

[0103] (i) 在第一时间点确定在所述第一时间点从所述患者获得的所述样品中的抗THSD7A自身抗体的水平,

[0104] (ii) 在第二时间点测定在所述第二时间点从所述患者获得的所述样品中的抗THSD7A自身抗体的水平,以及

[0105] (iii) 比较两个时间点的自身抗体的水平,

[0106] 其中:

[0107] • 与第一时间点相比,第二时间点中抗THSD7A自身抗体水平的降低表明治疗有效,和/或

[0108] • 与第一时间点相比,第二时间点中抗THSD7A自身抗体水平的增加表明治疗无效。

[0109] 本发明的方法优选对已诊断为膜性肾病、特别是特发性膜性肾病并且是THSD7A阳性患者的患者进行。

[0110] 在本发明的实践中,抗THSD7A自身抗体的水平的测定可以通过任何合适的定量方法进行,例如如上所述(参见例如E.Harlow和A.Lane,"Antibodies:A Laboratories Manual",1988,Cold Spring Harbor Laboratory:Cold Spring Harbor,NY)。特别地,抗THSD7A自身抗体的水平可以通过其中形成抗原抗体复合物的免疫测定法来检测。

[0111] 如上所述,患者通常最初被诊断患有膜性肾病,并且具有可检测量的抗THSD7A自身抗体。在例如用免疫抑制治疗治疗时,随着时间的推移,在有效治疗的情况下观察到可检测的抗THSD7A自身抗体的量的减少。

[0112] 当减少至少10%,特别是至少20%,更特别地至少30%,甚至更特别地至少40%,优选地至少50%,更优选地至少60%,甚至更优选至少70%,甚至更优选至少80%的抗THSD7A自身抗体水平时,治疗被认为是有效的。这通常表明良好的预后。

[0113] 在理想情况下,自身抗体的量应当低于本文所述的检测方法的可检测水平,并且患者被认为处于病症的缓解中。

[0114] 相反,当第一和第二时间点之间的水平稳定或增加至少5%,特别是至少10%,更特别地至少20%,甚至更特别地至少30%时,甚至更特别地至少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%或更多的初始水平的抗THSD7A自身抗体,治疗被认为是无效的。

[0115] 可以观察到几种情况。

[0116] 在一个实施方案中,在第二时间点没有检测到抗THSD7A自身抗体。这表明患者被认为处于缓解。

[0117] 在另一个实施方案中,观察到抗THSD7A自身抗体的稳定水平:在第一和第二时间点获得的水平在统计学分析方差内相当地相似,偏差在约1-5%偏差之间,优选3%偏差。这表示稳定的疾病,其中治疗持续时间不足(因此如果临床指示,则应继续治疗)或无效。

[0118] 在另一个实施方案中,与第一时间点相比,在第二时间点观察到增加水平的抗THSD7A自身抗体,并且第一时间点具有可检测的抗THSD7A自身抗体。这表明疾病的恶化和/或缺乏有效的治疗。增加至少30%,优选至少50%,更优选至少100%,甚至更优选至少200%被认为表示情况恶化和不良预后。

[0119] 在另一个实施方案中,与第一时间点相比,在第二时间点观察到增加水平的抗THSD7A自身抗体,并且第一时间点没有可检测的抗THSD7A自身抗体。这表明患者已复发并且膜性肾病已复发。

[0120] 根据本发明,第二时间点被选择为晚于第一时间点。可以策略性地例如就治疗策略和用于对有发展膜性肾病、特别是特发性膜性肾病风险的患者或已经患有膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的患者和具有复发的风险的患者选择第一和第二时间点。

[0121] 例如,第一时间点可以在对患者施用任何治疗之前,第二时间点可以置于治疗应当显示效果的时刻或在治疗结束时,并且可以稍后重复该测定。

[0122] 因此,该测定可以重复几次;可以在多于两个时间点评估抗THSD7A自身抗体水平。步骤(iii)的比较必须与第一时间点或与先前的时间点进行比较。当在该时间期间观察到抗THSD7A自身抗体水平的全面降低时,指示患者健康的改善和治疗的有效性。相反,当在该时间期间没有观察到抗THSD7A自身抗体水平的降低时,特别是当观察到总体增加时,指示患者健康的降低和治疗的无效性。在一段时间的没有可检测的抗THSD7A自身抗体之后可检测的抗THSD7A自身抗体的再现指示复发。

[0123] 对于在不同时间点从患者收集的所有样品,所使用的测定是相同的。

[0124] 在无效治疗的情况下,必须调整治疗策略。

[0125] 考虑到上述内容,用于评估对患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的治疗的有效性的体外方法也构成了在患者中预后膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法。

#### [0126] 试剂盒

[0127] 在另一方面,本发明提供了包含可用于实施根据本发明的方法的材料的试剂盒。本文提供的诊断程序可以由诊断实验室、实验实验室或从业者来进行。本发明提供了可用于这些不同设置的试剂盒。

[0128] 用于检测生物样品中的THSD7A自身抗体和/或用于诊断根据本发明的患者中的膜

性肾病的材料和试剂可以在试剂盒中组装在一起。本发明的每种试剂盒包含至少一种本发明的蛋白质/多肽生物标志物，优选其量适合于检测生物样品中的自身抗体。

[0129] 因此，本发明的另一个目的涉及用于检测从患者获得的生物样品中识别THSD7A的自身抗体的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0130] • THSD7A多肽或其抗体结合片段，和

[0131] • 用于检测在自身抗原、优选THSD7A多肽或其抗体结合片段与自身抗体、优选针对存在于生物样品中的THSD7A的自身抗体之间形成的抗原抗体复合物的试剂。

[0132] 根据本发明，所述试剂允许检测存在于所述生物样品中的自身抗体，其中所述自身抗体是指示膜性肾病的抗THSD7A自身抗体。

[0133] 在本发明的上下文中，所述THSD7A多肽是哺乳动物THSD7A多肽/蛋白或其抗体结合片段，优选人THSD7A多肽/蛋白或其抗体结合片段，特别是包含THSD7A的细胞外结构域或由其组成或由其一个或几个独特的I型血小板应答蛋白结构域和/或接头茎构成的其片段。

[0134] 在本发明的一个实施方案中，THSD7A多肽或其抗体结合片段可来自不同的哺乳动物物种，特别是来自人、非人灵长类动物、猪、兔或小鼠。

[0135] 在一个实施方案中，本发明涉及如上所述的本发明的试剂盒，其用于诊断患者中的膜性肾病。

[0136] 在一个实施方案中，所述试剂盒还包含PLA2R1多肽或其抗体结合片段。

[0137] 在本发明的上下文中，所述PLA2R1多肽是哺乳动物PLA2R1多肽/蛋白及其抗体结合片段，优选人PLA2R1多肽/蛋白及其抗体结合片段。

[0138] 在本发明的一个实施方案中，PLA2R1多肽或其抗体结合片段可以来自不同的哺乳动物物种，特别是来自人、非人灵长类动物、猪、兔或小鼠。

[0139] 用于检测在自身抗原标志物和存在于生物样品中的自身抗体之间形成的抗原抗体复合物的试剂还允许检测指示膜性肾病(还指抗THSD7A自身抗体)的抗PLA2R1自身抗体。

[0140] 在另一个实施方案中，所述试剂盒可以进一步包含至少一种额外的膜性肾病的生物标志物，例如继发性膜性肾病的生物标志物(诸如ANA、抗乙型肝炎抗原、快速血浆反应素等)。

[0141] 包括在本发明的试剂盒中的多肽生物标志物可以或可以不固定在基材表面上(例如珠、阵列等)。

[0142] 因此，一方面，本发明还涉涂覆有THSD7A多肽或其片段的装置。通常，所述装置是医疗装置或诊断装置，优选诊断装置。

[0143] 优选地，所述装置用于诊断和/或预后膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法中。通常，在本发明的上下文中，THSD7A多肽或其片段固定在所述装置上。

[0144] 将多肽分子固定在固体表面上的方法是本领域已知的。多肽/蛋白质可以通过共价或被动结合到固体载体或支持物的表面而被固定化。合适的载体或支持物材料的实例包括但不限于琼脂糖、纤维素、硝化纤维素、葡聚糖、Sephadex、Sepharose、羧甲基纤维素、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、滤纸、磁铁矿、离子交换树脂、玻璃、聚胺-甲基-乙烯基-醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、丝绸等。多肽/蛋白质生物标志物在固体载体或支持物的表面上的固定可以包括使用本领域公知的方法交联，共价结合或物理吸附。固体载体或支持物可以是珠、颗粒、微孔板、阵列、比色皿、管、膜或适于进

行根据本发明的诊断方法的任何其它形状(例如,使用免疫测定)。

[0145] 因此,在优选的实施方案中,如本文所提供的,本发明的试剂盒包括用于诊断膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的阵列。或者,基材表面可以包括在本发明的试剂盒中,用于固定本发明的生物标志物。

[0146] 本发明的试剂盒还包含至少一种用于检测试剂盒中包含的肽生物标志物(例如THSD7A和/或PLA2R)与存在于生物样品中的自身抗体之间形成的生物标志物-抗体复合物的试剂。这样的试剂可以是例如如上所述特异性识别来自所测试物种的抗体(例如,针对人受试者的抗人IgG,特别是IgG4、IgG3、IgG2和IgG1,优选IgG4)的标记抗体。

[0147] 在一个实施方案中,所述标记的抗体识别所有形式的人IgG。

[0148] 在另一个实施方案中,所述标记的抗体特异性识别人IgG4亚类。

[0149] 取决于程序,试剂盒可以进一步包括以下的一种或多种:提取缓冲液和/或试剂,封闭缓冲液和/或试剂,免疫检测缓冲液和/或试剂,标记缓冲液和/或试剂和检测工具。使用这些缓冲液和试剂进行该方法的不同步骤的方案可以包括在试剂盒中。包括在本发明的试剂盒中的不同试剂可以固体(例如冻干)或液体形式提供。本发明的试剂盒可任选地包含用于每种个体缓冲液和/或试剂的不同容器(例如,小瓶、安瓿、试管、烧瓶或瓶)。每种成分通常适合在其各自的容器中等分或以浓缩形式提供。还可以提供适于执行所公开的方法的某些步骤的其他容器。试剂盒的个体容器优选保持在密闭限制中用于商业销售。

[0150] 在某些实施方案中,试剂盒包括根据本发明的方法在患者中使用其组分用于诊断膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的说明书。使用根据本发明方法的试剂盒的说明书可包括用于处理从患者获得的生物样品和/或用于进行测试的说明书,和/或用于解释结果的说明书。试剂盒还可以含有由管理药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知。

[0151] 在一个具体实施方案中,本发明提供了用于诊断膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的阵列或蛋白质阵列,其包含至少固定于其表面的本发明的THSD7A多肽生物标志物。优选地,阵列包含多于一种本发明的多肽/蛋白质生物标志物,因此还包含适合于检测PLA2R阳性患者的PLA2R1多肽生物标志物。阵列还可以包含膜性肾病的至少一种另外的生物标志物,例如继发性膜性肾病的生物标志物(诸如ANA、抗乙型肝炎抗原、快速血浆反应素等)。

[0152] 在另一个具体实施方案中,本发明还提供了用于诊断膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的蛋白质珠悬浮液阵列。这种珠悬浮阵列包括一种或多种可识别的独特颗粒或珠的悬浮液,其中每个珠含有与其大小、颜色或荧光特征相关的编码特征,并且其中每个珠涂覆有本发明的多肽/蛋白质生物标志物。

[0153] 本发明的另一个目的涉及本发明的试剂盒、阵列或珠在患者中诊断膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的用途。

[0154] 在一个实施方案中,本发明的所述试剂盒、阵列或珠包含

[0155] • THSD7A多肽或其抗体结合片段,和

[0156] • 用于检测在自身抗原标志物和存在于生物样品中的自身抗体之间形成的抗原抗体复合物的试剂,

[0157] 并且可以根据本发明的方法使用。

[0158] 本发明的所述试剂盒、阵列或珠还可以用于评估患者中膜性肾病、特别是特发性

膜性肾病的治疗的有效性,以及用于预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病。

[0159] 在具体实施方案中,所述患者先前已经评估了识别PLA2R1的自身抗体的存在并且对于所述自身抗体是阴性的。该患者对于膜性肾病的所有常见原因(例如,系统性红斑狼疮、乙型肝炎和梅毒)也被检测为阴性。

[0160] 在这种情况下,用于诊断所述患者的膜性肾病的本发明的试剂盒或阵列既不包含PLA2R1多肽或其抗体结合片段,也不包含膜性肾病的任何其它生物标志物。

[0161] 基于THSD7A自身抗原检测的诊断方法和试剂盒

[0162] 本发明人显示自身抗原THSD7A在患有膜性肾病、特别是特发性膜性肾病(特别是具有THSD7A自身抗体的患者)的患者的肾中过表达。

[0163] 因此,本发明的另一个目的涉及THSD7A作为膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的生物标志物的用途。

[0164] 因此,本发明涉及用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的体外方法,包括测定从所述患者获得的生物样品中的THSD7A水平的步骤。

[0165] 根据本发明,用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的所述体外方法还包括监测患者的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病。

[0166] 根据本发明,THSD7A水平包括THSD7A蛋白水平和mRNA蛋白水平。

[0167] 在具体实施方案中,所述患者是PLA2R阴性患者。

[0168] 在一个实施方案中,所述方法还可以基于检测抗PLA2R1自身抗体和膜性肾病的其它生物标志物,与膜性肾病的诊断方法并行应用。

[0169] 在另一个实施方案中,所述生物样品优选是血液样品或肾活检。

[0170] 基于检测THSD7A蛋白水平的诊断方法

[0171] 在一个实施方案中,本发明涉及用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的体外方法,包括测定从所述患者获得的生物样品中THSD7A蛋白水平的步骤。

[0172] 在特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0173] (i) 测量从所述患者获得的生物样品中的THSD7A蛋白水平,

[0174] (ii) 将所述水平与参考水平相比较,

[0175] 其中与所述参考水平相比增加的THSD7A蛋白水平指示膜性肾病、特别是特发性膜性肾病。

[0176] 优选地,所述生物样品是血液样品或肾活检。

[0177] 通常,THSD7A蛋白水平的增加对应于在对照样品中测量的蛋白质水平的至少20%、优选至少50%的增加。

[0178] THSD7A水平可以通过本领域众所周知的不同方法测量。

[0179] 在具体实施方案中,本发明的方法包括使生物样品与能够与存在于生物样品中的生物标志物(例如THSD7A)选择性相互作用的结合伴侣接触。

[0180] 结合伴侣可以是可以是多克隆或单克隆抗体,优选单克隆抗体。在另一个实施方案中,结合伴侣可以是适体。

[0181] 本发明的多克隆抗体或其片段可以根据已知方法通过向选自例如猪、牛、马、兔、山羊、绵羊和小鼠等的宿主动物施用适当的抗原或表位来产生。本领域已知的各种佐剂可

用于增强抗体产生。尽管可用于实施本发明的抗体可以是多克隆抗体,但优选单克隆抗体。  
[0182] 本发明的单克隆抗体或其片段可以通过使用通过培养中的连续细胞系提供抗体分子产生的任何技术来制备和分离。用于生产和分离的技术包括但不限于最初由Kohler和Milstein(1975)描述的杂交瘤技术;人类B细胞杂交瘤技术(Cote等人,1983);和EBV杂交瘤技术(Cole等人,1985)。

[0183] 或者,描述的用于生产单链抗体的技术(参见例如美国专利号4,946,778)可以适用于产生针对本发明的生物标志物的单链抗体。可用于实施本发明的抗体还包括抗生物标志物片段,包括但不限于可通过胃蛋白酶消化完整抗体分子产生的F(ab')2片段,和可通过将F(ab')2片段的二硫键还原产生的Fab片段。或者,可构建Fab和/或scFv表达文库以允许快速鉴定对本发明的生物标志物具有所需特异性的片段。例如,可以使用抗体的噬菌体展示。在这样的方法中,单链Fv(scFv)或Fab片段在合适的噬菌体的表面上表达,例如,M13。简言之,取出合适宿主(例如已经用蛋白质免疫的小鼠)的脾细胞。VL和VH链的编码区从产生针对蛋白质的所需抗体的那些细胞获得。然后将这些编码区融合到噬菌体序列的末端。一旦噬菌体插入合适的载体中,例如细菌,噬菌体展示抗体片段。抗体的噬菌体展示也可以通过本领域技术人员已知的组合方法提供。然后可以将噬菌体展示的抗体片段用作免疫测定的一部分。也可以使用VHH。

[0184] 识别THSD7A的市售单克隆抗体的实例包括获自Abcam(ab121122)、Novus Biologicals(NBP1-93612)、Abnova Corporation(PAB20021)、Atlas Antibodies(HPA000923)和Santa Cruz(sc-163453、sc-163455)的那些。

[0185] 在另一个实施方案中,结合伴侣可以是适体。适体是在分子识别方面代表抗体的替代物的一类分子。适体是具有以高亲和力和特异性识别几乎任何类别的靶分子的能力的寡核苷酸或寡肽序列。这样的配体可以通过随机序列文库的Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment(SELEX)来分离,如Tuerk C.1997所述。随机序列文库可通过DNA的组合化学合成获得。在该文库中,每个成员是独特序列的线性寡聚体(最终被化学修饰的)。在Jayasena SD,1999中已经综述了这类分子的可能的修饰、用途和优点。肽适体由通过平台蛋白(例如大肠杆菌硫氧还蛋白A)展示的构象约束的抗体可变区组成,其选自两种杂交方法产生的组合文库(Colas等人,1996)。

[0186] 本发明的结合伴侣(诸如抗体或适体)可以用可检测的分子或物质(诸如荧光分子、放射性分子或本领域已知的任何其它标记)标记。本领域中已知标记通常(直接或间接地)提供信号。

[0187] 如本文所用,关于抗体的术语“标记的”旨在包括通过偶联(即物理连接)可检测物质诸如放射性试剂或荧光团(例如荧光素异硫氰酸酯(FITC)或藻红蛋白(PE)或吲哚菁(Cy5))至抗体或适体直接标记抗体或适体,以及通过与可检测物质的反应性间接标记探针或抗体。本发明的抗体或适体可以通过本领域已知的任何方法用放射性分子标记。例如,放射性分子包括但不限于用于闪烁照相研究的放射性原子,诸如I123、I124、InI11、Re186、Re188。

[0188] 上述测定可以涉及结合伴侣(即抗体或适配体)与固体支持物的结合。可用于本发明实践中的固体支持物包括基材,诸如硝酸纤维素(例如,以膜或微量滴定孔形式);聚氯乙烯(例如,片或微量滴定孔);聚苯乙烯胶乳(例如珠或微量滴定板);聚偏氟乙烯;重氮纸;尼

龙膜;活化珠,磁响应珠等。

[0189] 本发明的生物标志物可以通过使用标准免疫诊断技术检测,包括免疫测定诸如竞争、直接反应或夹心型测定。这样的测定包括但不限于凝集试验;酶标记和介导的免疫测定,诸如如ELISA;生物素/亲和素型测定;放射免疫测定;免疫电泳;免疫沉淀。

[0190] 更具体地,可以使用ELISA方法,其中微量滴定板的孔用针对本发明的生物标志物的一组抗体包被。然后将含有或怀疑含有所述生物标志物的生物样品加入包被的孔中。在足以允许形成抗体抗原复合物的孵育时间段后,可洗涤板以除去未结合的部分和添加可检测标记的二级结合分子。允许二级结合分子与任何捕获的样品标志物蛋白反应,洗涤板并使用本领域众所周知的方法检测二级结合分子的存在。

[0191] 或者,可以使用免疫组织化学(IHC)方法。IHC具体提供了原位检测样品或组织样品中靶标的方法。在IHC中保持样品的总体细胞完整性,从而允许检测感兴趣靶标的存 在和位置。通常,样品用福尔马林固定,包埋在石蜡中并切成切片用于染色和随后通过光学显微镜检查。IHC的当前方法使用直接标记或基于二抗或基于半抗原的标记。已知的IHC系统的实例包括例如EnVision<sup>TM</sup>(DakoCytomation)、Powervision<sup>®</sup>(Immunovision, Springdale, AZ)、NBA<sup>TM</sup>试剂盒(Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA)、HistoFine<sup>®</sup>(Nichirei Corp, Tokyo, Japan)。

[0192] 在具体实施方案中,在与识别本发明的生物标志物的抗体(例如抗THSD7A抗体)孵育后,组织切片(即肾活检样品)可以安装在载玻片或其它支持物上。然后,可以进行安装在合适的固体支持物上的样品的显微镜检查。为了产生显微照片,包含样品的切片可以安装在载玻片或其它平面支持物上,以通过选择性染色突出本发明的生物标志物(例如THSD7A蛋白)的存在。

[0193] 因此,IHC样品可以包括例如:(a)包含从所述组织分离的新鲜组织或细胞的制备物,(b)固定和包埋所述组织或细胞样品,和(c)在所述组织或细胞样品中检测本发明的生物标志物(例如THSD7A蛋白)组织或细胞样品。在一些实施方案中,IHC染色程序可包括如下步骤:切割和修整组织,固定,脱水,石蜡浸润,薄切片切割,安装到载玻片上,烘烤,脱石蜡,再水合,抗原修复,封闭步骤,施加识别本发明的生物标志物的一抗,洗涤,施加二抗(任选偶联至合适的可检测标记),洗涤,复染和显微镜检查。

[0194] 检测生物标志物(使用或不使用基于免疫测定的方法)还可以包括化合物的分离:基于化合物的分子量的离心;基于质量和电荷的电泳;基于疏水性的HPLC;基于尺寸的尺寸排阻层析;和基于化合物对所用的特定固相的亲和力的固相亲和力。一旦分离,可以基于已知的“分离谱”(例如,该化合物的保留时间)来鉴定本发明的生物标志物,并使用标准技术测量。

[0195] 或者,可以通过例如质谱仪检测和测量分离的化合物,特别是当测量生物标志物的片段或肽时。

[0196] 在另一方面,如上所述,本发明提供了包含可用于实施根据本发明的方法的材料的试剂盒。本文提供的诊断程序可以由诊断实验室、实验实验室或从业者来进行。本发明提供了可用于这些不同设置的试剂盒。

[0197] 用于检测生物样品中THSD7A水平(mRNA或蛋白质水平)和/或用于诊断根据本发明的患者的膜性肾病的材料和试剂可以在试剂盒中组装在一起。

[0198] 在一个实施方案中,本发明的试剂盒至少包含识别THSD7A或THSD7A的其他结合伴侣的抗体。

[0199] 在具体实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含至少一种识别PLA2R1或PLA2R1的其它结合伴侣的抗体。

[0200] 在另一个特定的实施方案中,所述试剂盒还可以包含识别膜性肾病的另一种生物标志物的至少一种另一种抗体(或另一种结合伴侣),例如继发性膜性肾病的生物标志物(例如ANA、抗乙型肝炎抗原、快速血浆反应素等)。

[0201] 可以将结合伴侣加标签以便于检测。其可以或可以不固定在基材表面上(例如,珠、阵列等)。例如,本发明的试剂盒可以包括用于诊断本文提供的膜性肾病的阵列。或者,可以在用于固定结合伴侣(例如,通过电泳和转移至膜)的本发明试剂盒中包括基材表面(例如膜)。

[0202] 此外,本发明的试剂盒通常还包含至少一种用于检测试剂盒中包括的结合伴侣和本发明的生物标志物之间的复合物的试剂。

[0203] 根据程序,试剂盒可以进一步包含以下一种或多种:提取缓冲液和/或试剂,免疫印迹缓冲液和/或试剂,以及检测工具。使用这些缓冲液和进行该方法的不同步骤的试剂的操作方案可以包括在试剂盒中。

[0204] 包括在本发明试剂盒中的不同试剂可以固体(例如冻干)或液体形式提供。本发明的试剂盒可任选地包含用于每种个体缓冲液和/或试剂的不同容器(例如,小瓶、安瓿、试管、烧瓶或瓶)。每种组分通常适合在其各自的容器中等分或以浓缩形式提供。还可以提供适于执行所公开的方法的某些步骤的其他容器。试剂盒的个体容器优选保持在密闭限制中用于商业销售。在某些实施方案中,试剂盒包括根据本发明的方法使用其组分用于诊断、预后或监测患者中的膜性肾病的说明书。使用根据本发明方法的试剂盒的说明书可包括用于处理从受试者获得的生物样品和/或用于进行测试的说明书,或用于解释结果的说明书。试剂盒还可以包含由管理药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知。

[0205] 基于检测THSD7A mRNA水平的诊断方法

[0206] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于诊断和/或预后患者中的膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的体外方法,包括测定从所述患者获得的生物样品中THSD7A表达水平的步骤。

[0207] 在特定实施例中,所述方法包括以下步骤:

[0208] (i) 测量从所述患者获得的生物样品中的THSD7A mRNA水平,

[0209] (ii) 将所述水平与参考水平相比较,

[0210] 其中与所述参考水平相比增加的THSD7A mRNA水平指示膜性肾病、特别是特发性膜性肾病。

[0211] 优选地,所述生物样品是血液样品或肾活检。

[0212] 通常,THSD7A mRNA水平的增加对应于在对照样品中测量的mRNA水平的至少20%、优选至少50%的增加。

[0213] 测定mRNA量的方法是本领域众所周知的。例如,根据标准方法,例如根据制造商的说明书使用裂解酶或化学溶液或通过核酸结合树脂提取,首先提取样品(例如,由患者制备

的细胞或组织)中包含的核酸。然后通过杂交(例如Northern印迹分析)和/或扩增(例如, RT-PCR)检测提取的mRNA。在优选的实施方案中,通过RT-PCR,优选定量或半定量RT-PCR,甚至更优选实时定量或半定量RT-PCR测定THSD7A的mRNA水平。

[0214] 其他扩增方法包括连接酶链式反应(LCR)、转录介导的扩增(TMA)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。

[0215] 具有至少10个核苷酸并且显示与感兴趣的mRNA的序列互补性或同源性的核酸可用作杂交探针或扩增引物。应当理解,这样的核酸不需要是相同的,但通常与相当大小的同源区域具有至少约80%同一性,更优选85%同一性,甚至更优选90-95%同一性。在某些实施方案中,有利的是使用核酸与用于检测杂交的合适工具诸如可检测标记组合。本领域已知各种适当的指示剂,包括荧光、放射性、酶或其它配体(例如亲和素/生物素)。

[0216] 探针通常包含长度为10至1000个核苷酸之间,例如10至800个之间,更优选15至700个之间,通常20至500个之间的单链核酸。引物通常是较短的单链核酸,长度为10至25个核苷酸,被设计为完全或几乎完全匹配待扩增的感兴趣的核酸。探针和引物对它们杂交的核酸是“特异性”的,即它们优选在高严格杂交条件(对应于最高解链温度T<sub>m</sub>,例如50%甲酰胺,5x或6x SCC。SCC是0.15M NaCl,0.015M柠檬酸钠)下杂交。

[0217] 在上述扩增和检测方法中使用的核酸引物或探针可以作为试剂盒组装。此类试剂盒包括共有引物和分子探针。优选的试剂盒还包括确定是否发生扩增所必需的组分。试剂盒还可以包括例如PCR缓冲液和酶;阳性对照序列,反应用引物;和用于扩增和检测特定序列的说明书。

#### [0218] 本发明的治疗方法

[0219] 发明人强调,在足细胞上表达的THSD7A蛋白在膜性肾病的某些情况下是自身抗原,这允许设想基于靶向该自身抗原的新的治疗方法。

[0220] 实际上,如现有技术中所描述的,特别是对于PLA2R1,由自身抗体结合足细胞足上的靶抗原的免疫沉积可以激活导致足细胞损伤的补体系统。

[0221] 因此,本发明的另一个目的涉及在患者中治疗膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法,所述方法包括从所述患者的样品中离体去除抗THSD7A自身抗体。

[0222] 在一个实施方案中,膜性肾病是特发性膜性肾病。

[0223] 在另一个实施方案中,患者是THSD7A阳性患者。

[0224] 优选地,患者是人类患者。

[0225] 可以通过用THSD7A多肽或其片段作为抗原的免疫吸附从血液中去除抗体。在去除抗体后,将样品返回到患者体内。

[0226] 自身抗体对THSD7A的免疫吸收有助于减少循环自身抗体的量,特别是循环THSD7A自身抗体,从而减少对肾的潜在损害。可以在免疫学确认抗THSD7A自身抗体的存在之后并且在任何免疫抑制治疗开始之前初始应用这种治疗。这在免疫抑制治疗可以对患者的免疫系统和自身抗体的产生具有影响之前的这个早期是特别有用的。也可以在治疗期间和在将所述患者诊断为阳性THSD7A患者之后的任何时间应用该治疗。

[0227] 在一个实施方案中,抗THSD7A自身抗体的免疫吸收可以通过将血液、血清或血浆通过固定化的THSD7A多肽而发生。重组THSD7A、优选重组人THSD7A或片段可以固定在本领域已知的惰性和无菌基质上,诸如Sepharose珠。抗THSD7A自身抗体将结合固定化的THSD7A

多肽或片段，并提醒 (remind) 与基质间接结合。然后收集血液、血清或血浆。所得的血液、血清或血浆应该具有减少的或没有可检测的抗THSD7A自身抗体。免疫吸附程序应在无菌条件下进行。然后可以将收集的耗尽了抗THSD7A自身抗体的血液、血清或血浆输送回患者体内。

[0228] 如在本发明的治疗方法中所使用的，THSD7A多肽的片段通常是抗体结合片段。

[0229] 本发明的另一个目的涉及用于在患者中治疗膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的方法，所述方法包括给予治疗有效量的THSD7A多肽或其片段、表达所述THSD7A多肽的载体或其片段或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞。

[0230] 在一个实施方案中，膜性肾病是特发性膜性肾病。

[0231] 在另一个实施方案中，患者是THSD7A阳性患者。

[0232] 优选地，患者是人类患者。

[0233] 根据本发明，THSD7A多肽或其片段以可溶形式施用。

[0234] 通过提供可溶性THSD7A多肽或其片段，可溶性多肽可以作为诱饵抗原，并隔离远离肾小球中的THSD7A的自身抗体，从而减少对肾的潜在损害。THSD7A多肽优选是人来源的THSD7A多肽。

[0235] 在一个实施方案中，适于治疗或从血清吸附THSD7A的自身抗体的片段是包含THSD7A的细胞外结构域或由其组成的片段或其由一个或几个其不同的I型血小板应答蛋白结构域和/或接头茎构成的其片段。

[0236] 如上所述，THSD7A多肽和片段可以通过本领域众所周知的任何方法合成，诸如例如在细菌、哺乳动物、昆虫、酵母或植物细胞中的重组蛋白质合成。

[0237] 常规的聚合酶链反应 (PCR) 克隆技术可用于克隆编码THSD7A的核酸，使用THSD7A的mRNA作为PCR克隆的模板。如上所述，在NM\_015204 (GeneBank) 中提供了示例性人天然THSD7A mRNA序列。

[0238] 理想地，应当在PCR引物的有义链和反义链的末端设计限制性酶消化识别位点，以促进扩增的核酸连接到克隆载体或其他载体中。或者，为了本领域众所周知的TA-克隆的目的，可以包括3'-A单链突出端。此类具有3'-A单链突出端的编码核酸可容易地连接到Invitrogen拓扑异构酶辅助的TA载体中，诸如 **pCR®-TOPO**、**pCR®-Blunt II-TOPO**、**pENTR/D-TOPO®** 和 **pENTR/SD/TOPO®**。编码核酸可以克隆到通用克隆载体诸如pUC19、pBR322、pBLUESCRIPT载体 (STRATAGENE Inc.) 或来自 INVITROGEN INC 的 pCR **TOP®** 中。然后将所得的携带编码THSD7A的核酸的重组载体亚克隆入蛋白质表达载体或病毒载体用于在多种蛋白质表达系统中使用选自哺乳动物细胞系、昆虫细胞系、酵母、细菌和植物细胞的宿主细胞合成THSD7A融合蛋白。还可以设计并且包括在核酸内的蛋白酶切割位点以促进THSD7A从更大的融合蛋白中释放，例如His-THSD7A或硫氧还蛋白-THSD7A。蛋白酶切割位点的实例包括但不限于肠激酶、胰凝乳蛋白酶和凝血酶的那些。

[0239] 可以使用在INVITROGEN拓扑异构酶辅助的TA载体中的 **TOPO®** 克隆方法将PCR扩增的编码核酸克隆到载体中，所述TA载体诸如 **pCR®-TOPO**、**pCR®-Blunt II-TOPO**、**pENTR/D-TOPO®** 和 **pENTR/SD/ D-TOPO®**。**pENTR/D-TOPO®** 和 **pENTR/SD/D-TOPO®** 二者都是定向TOPO进入载体，其允许将5'→3' 方向的DNA序列

克隆到**GATEWAY®**表达载体中。在5'→3'方向的定向克隆促进DNA序列单向插入蛋白质表达载体中,使得启动子位于核酸的5'ATG起始密码子的上游,从而启动由启动子驱动的蛋白质表达。携带THSD7A编码核酸的重组载体可以转染并在通用克隆大肠杆菌细胞诸如XLIBlue、SURE (STRATAGENE) 和TOP-10细胞 (INVITROGEN) 中繁殖。

[0240] 不同的表达载体可用于表达和纯化从异源蛋白质表达系统产生的重组蛋白质。使用选自以下的宿主细胞的异源蛋白质表达系统:例如哺乳动物、昆虫、酵母、细菌或植物细胞是本领域技术人员众所周知的。表达载体应具有必需的5'上游和3'下游调控元件,诸如启动子序列、核糖体识别和结合TATA盒和3'UTR AAUAAA转录终止序列,用于在其各自的宿主细胞中有效的基因转录和翻译。表达载体可以具有另外的序列,诸如6X-组氨酸,V5,硫氧还蛋白,谷胱甘肽-S-转移酶,c-Myc,VSV-G,HSV,FLAG,麦芽糖结合肽,金属结合肽,HA和“分泌”信号(蜜蜂蜂毒肽,α因子,PHO,Bip),其被掺入表达的重组蛋白中。此外,可以在这些序列之后掺入酶消化位点,以在不需要时促进额外的序列的酶促去除。这些额外的序列可用于检测重组蛋白表达,用于通过亲和层析进行蛋白纯化,增强重组蛋白在宿主细胞质中的溶解性,用于更好的蛋白表达,特别是用于小蛋白片段和/或用于分泌表达的重组蛋白进入培养基,进入原核细菌的周质或酵母细胞的原生质球。重组蛋白的表达可以在宿主细胞中是组成型的,或者其可以例如用硫酸铜,糖例诸如半乳糖,甲醇,甲胺,硫胺素,四环素,杆状病毒感染和(异丙基-β-硫代毗喃半乳糖苷) IPTG (一种乳糖的稳定合成类似物) 进行诱导。

[0241] 在一些实施方案中,重组THSD7A可在各种表达宿主细胞中表达,细菌例如大肠杆菌、酵母、哺乳动物、昆虫和植物细胞诸如衣藻 (Chlamydomonas),或甚至来自无细胞表达系统。从克隆载体,可以将核酸亚克隆到适于蛋白质在哺乳动物、昆虫、酵母、细菌或植物细胞中表达的重组表达载体或无细胞表达系统中,诸如兔网织红细胞表达系统。亚克隆可以通过PCR克隆,限制性消化然后连接或重组反应,诸如使用**Gateway®LR** 和BP CLONASE™ 酶混合物的基于λ噬菌体的位点特异性重组的那些来实现。亚克隆应当是单向的,使得核酸的5'ATG起始密码子在表达载体中的启动子的下游。或者,当将编码核酸克隆到**pENTR/D-TOPO®**、**pENTR/SD/D-TOPO®** (定向进入载体) 或任何

Invitrogen的**Gateway®Technology** pENTR (进入) 载体时,编码核酸可以在一个单重重组反应中分别转移到哺乳动物细胞、大肠杆菌、昆虫和酵母中的蛋白质表达的各种**GATEWAY®**表达载体(目的)中。一些**GATEWAY®**目的载体设计用于杆状病毒、腺病毒、腺相关病毒 (AAV)、逆转录病毒和慢病毒的构建,其在感染其各自的宿主细胞时允许重组蛋白在宿主细胞中异源表达。根据制造商的说明书,将基因转移到目的载体中仅在两个步骤中完成。存在用于在大肠杆菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞和酵母中蛋白表达的**GATEWAY®**表达载体。在大肠杆菌中转化和选择后,表达载体准备用于在合适的宿主中表达。

[0242] 其它表达载体和宿主细胞的实例是用于大肠杆菌宿主细胞中的蛋白质表达的pET载体 (NOVAGEN),pGEX载体 (Amersham Pharmacia) 和pMAL载体 (New England labs. Inc.) ,诸如BL21, BL21 (DE3) 和AD494 (DE3) pLysS, Rosetta (DE3) 和Origami (DE3) (NOVAGEN);用于在哺乳动物细胞系诸如CHO,COS,HEK-293,Jurkat和MCF-7中表达的基于强CMV启动子的

pcDNA3.1 (INVITROGEN) 和pCIneo载体 (Promega) 用于在哺乳动物细胞中腺病毒介导的基因转移和表达的复制无能力腺病毒载体载体pADENO-X, pAd5F35, pLP-ADENO-X-CMV (CLONTECH), pAd/CMV/V5-DEST, pAd-DEST载体 (INVITROGEN); pLNCX2, pLXSN和pLAPSN逆转录病毒载体与来自Clontech的RETRO-X<sup>TM</sup>系统一起用于哺乳动物细胞中逆转录病毒介导的基因转移和表达; pLenti4/V5-DEST<sup>TM</sup>, pLenti6/V5-DEST<sup>TM</sup>和pLenti6.2/V5-GW/lacZ (INVITROGEN) 用于在哺乳动物细胞中慢病毒介导的基因转移和表达; 腺病毒相关病毒表达载体, 例如用于腺相关病毒介导的基因转移和在哺乳动物细胞中表达的pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP和pAAV-RC载体 (STRATAGENE); BACpak6杆状病毒 (CLONTECH) 和pFASTBAC<sup>TM</sup> HT (INVITROGEN) 在Spodopera frugiperda 9 (Sf9) 和Sf11昆虫细胞系中的表达; pMT/BiP/V5-His (INVITROGEN) 用于在果蝇Schneider S2细胞中表达; 用于在巴斯德毕赤酵母中表达的毕赤酵母表达载体pPICZα, pPICZ, pFLDα和pFLD (INVITROGEN) 和用于在甲醇毕赤酵母中表达的载体pMETα和pMET; 用于在酵母酿酒酵母中表达的pYES2/GS和pYD1 (INVITROGEN) 载体。在Chlamydomonas reinhardtii中大规模表达异源蛋白质的最新进展由Griesbeck C. 等人, 2006 MoI. Biotechnol. 34:213-33和Fuhrmann M. 2004, Methods MoI Med. 94:191-5描述。外源异源编码序列通过同源重组插入核、叶绿体和线粒体的基因组中。携带多样性叶绿体选择标记氨基糖苷腺苷酸转移酶 (aadA) 的叶绿体表达载体p64 (其赋予对大观霉素或链霉素的抗性) 可用于在叶绿体中表达外源蛋白。生物弹枪基因枪方法可用于将载体引入藻类中。在其进入叶绿体时, 外源DNA从基因枪颗粒释放并通过同源重组整合到叶绿体基因组中。

[0243] 在不同宿主细胞中的重组蛋白表达可以是组成型或采用诱导物诸如硫酸铜, 糖诸如半乳糖, 甲醇, 甲胺, 硫胺素, 四环素或IPTG的诱导型。在宿主细胞中表达蛋白质后, 裂解宿主细胞以释放表达的蛋白质用于纯化。裂解各种宿主细胞的方法在"Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience和在the Current Protocols in Protein Sciences (CPPS) 中有所介绍。优选的纯化方法是亲和层析, 诸如使用镍、钴或锌亲和树脂用于组氨酸标记的重组蛋白的离子金属亲和层析。纯化加组氨酸标签的重组蛋白的方法由CLONTECH使用他们的**TALON®** 钴树脂和NOVAGEN在他们的pET系统手册第10版中描述。另一种优选的纯化策略是通过免疫亲和层析, 例如, 抗myc抗体缀合的树脂可以用于亲和纯化加myc标签的重组肽。用丝氨酸蛋白酶诸如凝血酶和肠激酶的酶消化从组氨酸或myc标签切割和释放重组蛋白, 从亲和树脂释放重组蛋白, 而组氨酸标签和myc标签保留附接于亲和树脂。

[0244] 也设想了无细胞表达系统。无细胞表达系统提供了优于传统的基于细胞的表达方法的若干优点, 包括容易修饰反应条件以有利于蛋白质折叠, 降低对产物毒性的敏感性和适用于高通量策略诸如快速表达筛选或因为减少反应体积和处理时间的大量蛋白质生产。无细胞表达系统可以使用质粒或线性DNA。此外, 翻译效率的提高导致每毫升反应混合物超过一毫克蛋白质的产量。能够以高产量产生蛋白质的无细胞翻译系统的实例由Spirin AS等人, Science 242:1162 (1988) 描述。该方法使用在整个反应混合物中含有氨基酸、三磷酸腺苷 (ATP) 和三磷酸鸟苷 (GTP) 的进料缓冲液的连续流设计和连续去除翻译的多肽产物。该系统使用大肠杆菌裂解物提供无细胞连续进料缓冲液。这种连续流动系统与原核和真核表达载体都是相容的。作为实例, Chang G. 等人, Science 310:1950-3 (2005) 描述了大规模无

细胞生产的内在膜蛋白EmrE多药转运蛋白。

[0245] 其它市售的无细胞表达系统包括EXPRESSWAY<sup>TM</sup>无细胞表达系统(Invitrogen),其利用基于大肠杆菌的体外系统进行有效的偶联转录和翻译反应,以管反应形式产生高达毫克量的活性重组蛋白;快速翻译系统(RTS)(Roche Applied Science),其也使用基于大肠杆菌的体外系统;和TNT偶联网状细胞裂解物系统(Promega),其使用基于兔网织红细胞的体外系统。

[0246] 在一个实施方案中,使用几种THSD7A多肽的混合物用于治疗。预想的肽可以与其他蛋白融合以获得更长的血清半衰期,串联连接的肽或环状肽。

[0247] 本文所述的方法包括哺乳动物THSD7A,其从哺乳动物(例如猪或兔)中纯化。在一个实施方案中,从肾脏中离体纯化天然(非重组)哺乳动物THSD7A。天然蛋白质纯化的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0248] 本发明的另一个方面涉及用于治疗膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的THSD7A多肽或其片段。

[0249] 在一个实施方案中,膜性肾病是特发性膜性肾病。

[0250] 在另一个实施方案中,患者是THSD7A阳性患者。

[0251] 优选地,患者是人类患者。

[0252] 在优选的实施方案中,所述THSD7A多肽片段是抗体结合片段(根据本发明意味着患有特发性膜性肾病的患者的自身抗体识别所述片段)。

[0253] 优选地,所述THSD7A的片段包含THSD7A的细胞外结构域或由其组成,或其由其一个或几个不同的I型血小板应答蛋白结构域和/或接头茎构成的其片段。

[0254] 根据本发明,所述THSD7A多肽或其片段以治疗有效量使用。

[0255] 在具体实施方案中,本发明还提供了表达所述THSD7A多肽或其片段的载体或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞。

[0256] 本发明的另一目的涉及包含THSD7A多肽或其片段和药学上可接受的载体的药物组合物。另一方面,本发明涉及用于治疗膜性肾病的所述药物组合物。

[0257] 在一个实施方案中,膜性肾病是特发性膜性肾病。

[0258] 在另一个实施方案中,患者是THSD7A阳性患者。

[0259] 优选地,患者是人类患者。

[0260] 在具体实施方案中,所述药物组合物可包含表达所述THSD7A多肽或其片段的载体或表达所述THSD7A多肽或其片段的宿主细胞。

[0261] 药物组合物可以是全长THSD7A和各种大小的片段、特别是抗体结合片段和药学上可接受的媒介物的组合。此类片段的实例包括但不限于包含THSD7A的细胞外结构域或由其组成的片段或由其一个或几个不同的I型血小板应答蛋白结构域和/或接头茎构成的其片段。

[0262] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物可以包含几种THSD7A多肽或其片段的混合物。预想的肽可以与其他蛋白融合以获得更长的血清半衰期,串联连接的肽或环状肽。

[0263] 在一个实施方案中,术语“药学上可接受的”是指由美国联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其他公认的药典中列出的用于动物、更特别是用于人的。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这样的药物载体可以是无菌

液体，诸如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的那些，诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可以用作液体载体，特别是用于可注射溶液。合适的药物赋形剂包括淀粉，葡萄糖，乳糖，蔗糖，明胶，麦芽，大米，面粉，白垩，硅胶，硬脂酸钠，单硬脂酸甘油酯，滑石，氯化钠，干燥脱脂乳品，甘油，丙二醇，水，乙醇等。如果需要，组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采取溶液，悬浮液，乳液，片剂，丸剂，胶囊，粉末，缓释制剂等形式。该组合物可以使用传统的粘合剂和载体诸如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体，诸如药物级的甘露醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，纤维素，碳酸镁等。合适的药物载体的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Gennaro, 编辑 (Mack Publishing Co., 1990) 中。在一个实施方案中，可以将其它成分加入到药物制剂中，包括抗氧化剂，例如抗坏血酸；低分子量(小于约10个残基)多肽，例如聚精氨酸或三肽；蛋白质，诸如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸，谷氨酸，天冬氨酸或精氨酸；单糖，二糖和其它碳水化合物，包括纤维素或其衍生物，葡萄糖，甘露糖或糊精；螯合剂诸如EDTA；和糖醇诸如甘露醇或山梨醇。

[0264] 在一个实施方案中，根据常规方法将组合物配制为适于静脉内施用于人的药物组合物。通常，用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。如果需要，组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂诸如利诺卡因(lignocamne)以减轻注射部位的疼痛。通常，成分以单位剂量型分开或混合在一起供应，例如作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物在气密密封的(hermetically sealed)容器诸如指示活性剂的量的安瓿或小袋中供应。当组合物通过输注施用时，其可以用含有无菌药物级水或盐水的输注瓶分配。当组合物通过注射施用时，可以提供安瓿的注射用无菌水或盐水，使得可以在施用之前混合成分。

[0265] 本发明的组合物可以配制成中性或盐形式。

[0266] 药学上可接受的盐包括与阴离子诸如衍生自盐酸，磷酸，乙酸，草酸，酒石酸等的阴离子形成的盐，以及与阳离子诸如衍生自举例来说的钠，钾，铵，钙，氢氧化铁，异丙胺，三乙胺，2-乙基氨基乙醇，组氨酸，普鲁卡因等的阳离子形成的盐。

[0267] 各种递送系统是本领域已知的，并且可以用于施用THSD7A多肽或其片段，例如包封在脂质体、微粒和微胶囊中(参见例如Wu和Wu, J.Biol.Chem., 262:4429-4432 (1987))。组合物可以在囊泡、特别是脂质体中递送(参见Langer, Science, 249:1527-1533 (1990); Treat等人，在Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler, eds. (Liss, New York 1989), pp.353-365; Lopez-Berestein, 同上, pp.317-327;一般参见同上)。引入方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。组合物可以通过任何方便的途径施用，例如通过输注或团注，通过上皮或被覆粘膜皮肤(mucocutaneous linings)(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收，并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身或局部的。此外，可能需要通过任何合适的途径将本发明的药物组合物引入中枢神经系统，包括心室内和鞘内注射；可以通过例如附接到储器(诸如0mcana储器)的心室内导管来促进心室内注射。也可以使用肺给药，例如通过使用吸入器或雾化器，以及具有雾化剂的制剂。

[0268] 在一个实施方案中，用于治疗性施用的药物制剂必须是无菌的。通过经无菌过滤膜(例如,0.2微米膜)过滤容易实现无菌。药物制剂的pH通常应为约6至8。

[0269] 在一个实施方案中,组合物可以在控释系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.,14:201(1987);Buchwald等人,Surgery,88:507(1980);Saudek等人,N Engl.J.Med.,321:574(1989))。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise,编辑(CRC Press,Boca Raton,FLA.1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball,编辑(Wiley,New York 1984);Ranger和Peppas,Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.,23:61(1983);也参见Levy等人,Science,228:190(1985);During等人,Ann.Neurol.,25:35 1(1989);Howard等人,J.Neurosurg.,71:105(1989))。其他控释系统在Langer的综述(Science,249:1527-1533(1990))中讨论。关于缓释组合物的实例,参见美国专利号3,773,919,EP 58,481A,美国专利号3,887,699,EP 158,277A,加拿大专利号1176565,U.Sidman等人,Biopolymers 22:547(1983)和R.Langer等人,Chem.Tech.12:98(1982)。

[0270] 在制剂中使用的精确剂量还将取决于施用途径以及膜性肾病的严重性和血清中抗THSD7A自身抗体的滴度,并且应当根据从业者的判断和每位患者的情况来决定。有效剂量可以从源自体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线外推。

[0271] 给予患者的剂量通常为0.1mg/kg至100mg/kg患者体重。优选地,给予患者的剂量为0.1mg/kg至20mg/kg患者体重,更优选1mg/kg至10mg/kg患者体重。对于基因治疗,病毒载体应该在每个患者每次施用 $1\times10^6$ 至 $10^{14}$ 个病毒载体颗粒的范围内。

[0272] 此外,可以任选地使用体外或体内测定来帮助鉴定最佳剂量范围。所使用的精确剂量还取决于给药途径和所治疗病症的严重性,并且应根据从业者的判断和每个受试者的情况,例如根据公开的临床研究来决定。然而,合适的有效剂量范围为约每4小时约10微克至约5克,尽管它们通常每4小时约500mg或更少。在一个实施方案中,有效剂量为每4小时约10μg,约20μg,约50μg,约100μg,约200μg,约300μg,约400μg,约500μg,约600μg,约700μg,约800μg,约900μg,约1mg,约1.2mg,约1.4mg,约1.6mg,约1.8mg,约2.0mg,约2.2mg,约2.4mg,约2.6mg,约2.8mg,约3.0mg,约3.2mg,约3.4mg,约3.6mg,约3.8mg,约4.0mg,约4.2mg,约4.4mg,约4.6mg,约4.8mg,或约5.0mg,10.0mg,15.0mg,20.0mg,25.0mg,50.0mg。等效剂量可以在各种时间段内施用,包括但不限于约每2小时,约每6小时,约每8小时,约每12小时,约每24小时,约每36小时,约每48小时,约每72小时,约每周,约每两周,约每三周,约每月和约每两个月。本文所述的有效剂量是指给药的总量。包含THSD7A多肽、其片段的组合物或表达载体和/或包含其的宿主细胞一次或通过一系列治疗合适地施用于患者。

[0273] 在实施方案中,包含THSD7A多肽或其片段的组合物与免疫抑制治疗组合施用,所述免疫抑制治疗包括但不限于硫唑嘌呤,英夫利昔单抗,奥马珠单抗,达利珠单抗,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,环磷酰胺,苯丁酸氮芥和/利妥昔单抗。

[0274] 特别地,包含THSD7A多肽或其片段的组合物与用于治疗膜性肾病、特别是特发性膜性肾病的任何治疗组合施用,并且可以对患者有效。

[0275] 本发明将通过以下实施例进行进一步说明。但是,这些实施例不应当以任何方式被解释为限制本发明的保护范围。

## 实施例

### [0276] 材料和方法

[0277] 患者。膜性肾病(MN)的诊断是通过肾活检进行的。血清取自膜性肾病患者、其他肾脏疾病患者和健康对照组。所有患者在取第一次血清时没有事先进行免疫抑制治疗。通过ELISA研究血清的抗PLA2R1抗体。

[0278] 人肾组织。来自接受肾切除术的患者的肾的健康部分用于制备人肾小球的制备物。通过分级筛分和杜恩斯(dounce)匀浆获得肾小球。通过超速离心和增溶作用分开可溶性级分和膜级分。为了除去存在的免疫球蛋白G,将样品与蛋白G微珠(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)一起孵育,并通过磁性分离柱(同上)提取结合的免疫球蛋白。对于酶促去糖基化,本发明人根据制造商的说明书使用N-糖肽酶F和神经氨酸酶(均来自Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。

[0279] 蛋白质印迹分析。蛋白质样品在非还原或还原条件下在聚丙烯酰胺凝胶中电泳,并在半干条件(BioRad, Hercules, USA)下转移到PVDF膜。将膜(Millipore, Billerica, USA)用在PBS-Tween 0.05%中的5%奶粉过夜封闭,随后在室温下与一抗和二抗孵育2小时。为了用作第一抗体,将血清在0.5%奶粉中以1:100工作稀释度稀释。对于THSD7A(含有I型血小板应答蛋白结构域的7A)的特异性检测,本发明人使用市售的兔多克隆抗体(Sigma, St. Louis, USA),工作稀释度为1:1,000。二抗是辣根过氧化物酶缀合的小鼠抗人或山羊抗兔IgG(均来自SouthernBiotech, Birmingham, USA)。当需要IgG亚类检测时,应用小鼠抗人IgG1-IgG4(同上)。

[0280] 免疫沉淀。将人肾小球裂解物与来自膜性肾病或其他肾小球疾病患者的血清以及健康对照一起孵育。加入IgG4亲和基质(Life Technologies, Leiden, Netherlands),将样品在4°C孵育过夜。通过低速离心收集免疫沉淀物,将样品进行电泳、印迹,并如上所述用抗THSD7A抗体检测。

[0281] 质谱。切下对应于在蛋白质印迹分析中可见条带的凝胶区,并进行胰蛋白酶胶内(in-gel)消化。消化的肽使用甲酸和乙腈分离,通过纳米高效液相层析(nanoHPLC)分开,并使用ABI 4700质谱仪(AB Sciex, Framingham, USA)通过基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)串联质谱法鉴定。通过ProteinPilot软件(AB Sciex, Framingham, USA)分析原始数据,并使用Paragon算法进一步处理。

[0282] 候选蛋白质的重组表达。使用标准方法通过PCR克隆或从公司(Gene Coppoeia和OriGene)购买编码THSD7A和PLA2R1的三个旁系同源物(即巨噬细胞甘露糖受体(MRC1)、内吞受体180(MRC2)和树突状细胞受体205(LY75)的人cDNA。在亚克隆到哺乳动物表达载体中并添加特异性HA或DDK标签(pLPCX或pCMV6进入)后,通过测序验证所有cDNA序列。通过磷酸钙转染将质粒瞬时转染到HEK293细胞中。72小时后,收集培养基,刮下细胞并裂解细胞。通过超速离心获得表达的目标蛋白的可溶性级分。将膜级分重悬于裂解缓冲液中,通过剧烈的手动杜恩思搅拌进行匀浆,并且在高速离心后获得溶解的级分。通过使用特异性抗体的蛋白质印迹分析并与模拟转染相比较来验证候选蛋白的表达。

[0283] 组织学分析。对于免疫荧光分析,将人肿瘤肾切除术标本的健康极的2μM石蜡切片脱石蜡并在水中再水合。通过在pH 6.1的柠檬酸盐缓冲液中煮沸(在恒定98°C下30分钟)来获得抗原修复。用在PBS中的0.05% Triton X-100(SIGMA, St. Louis, USA)的5%马血清

(Vector, Burlingame, USA) 在室温下将非特异性结合封闭30分钟, 然后一抗在封闭缓冲液中4℃过夜。用荧光色素缀合的二抗 (Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Germany; 1:400, 在5% 马血清中室温下30分钟) 显现染色。使用DRAQ5 (Molecular Probes, LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, USA) 显现细胞核。省略一抗进行阴性对照。使用激光扫描显微镜510和适当的软件 (ALL ZEISS, OBERKOCHE, Germany) 通过共聚焦显微镜评估染色切片。

[0284] 对于免疫组织化学, 将来自MN患者的肾活检的1μM石蜡切片脱石蜡并再水合。通过在DAKO抗原修复缓冲液 (pH9) 中煮沸 (98℃下15分钟) 并随后在室温下冷却15分钟来获得抗原修复。在室温下用含有0.05% Triton X-100 (SIGMA) 的PBS中的5% 马血清 (Vector) 封闭非特异性结合30分钟, 然后用在封闭缓冲液中兔抗THSD7A (1:400, Atlas) 在4℃下孵育过夜。根据制造商的说明书, 使用ZytochemPlus AP聚合物试剂盒 (ZYTOMED SYSTEMS) 显现染色。将核用hemalaun复染色, 切片用阿拉伯树胶 (SIGMA) 固定。省略一抗进行阴性对照。用Axioskop使用Axiovision软件 (ALL ZEISS) 评估染色。

[0285] 用于组织学分析的一抗是: 兔抗THSD7A和抗PLA2R1 (ATLAS, 1:200), 豚鼠抗Nephrin (ACRIS, 1:100), 山羊抗IV型胶原蛋白 (SOUTHERNBIOTECH, 1:400) 和绵羊抗纤连蛋白 (DAKO, 1:500)。所有二抗都是荧光色素缀合的亲和纯化的驴抗体 (JACKSON IMMUNORESEARCH, Dianova, Hamburg, Germany, 1:400)。

#### [0286] 结果

[0287] 用PLA2R1的旁系同源物和人肾小球的蛋白裂解物筛查特发性膜性肾病血清。我们通过两种平行方法筛查特发性膜性肾病 (iMN) 血清和相关对照血清。第一个方法聚焦于PLA2R1的旁系同源物作为候选抗原。第二个方法是更一般的, 就来自人肾小球提取物 (HGE) 中的总蛋白筛查血清。

[0288] PLA2R1的三种旁系同源蛋白, 即巨噬细胞甘露糖受体 (MRC1)、内吞受体180 (MRC2) 和树突状细胞受体205 (LY75) 在HEK293细胞中作为重组蛋白瞬时表达。通过在非还原条件下的蛋白质印迹分析, 用来自65个膜性肾病 (其中30个为抗-PLA2R1抗体阴性) 患者、57个其他蛋白尿性肾病患者和44个膜性肾病患者以及健康对照的血清, 研究了针对这些旁系同源物以及HGE的血清反应性。如前面通过ELISA所测试的, 已知对抗-PLA2R1抗体是阳性的所有血清在蛋白质印迹分析上与重组PLA2R1反应, 但是这些血清和来自其他类别的血清都没有与PLA2R1的旁系同源蛋白反应。来自4个患有iMN的患者的血清 (其对抗-PLA2R1抗体都是阴性的) 识别出大小约250kDa的相同的肾小球蛋白 (图1A)。来自其他肾脏疾病患者或健康对照的血清在该区域中没有显示任何反应性。然后将筛查扩展至129个膜性肾病患者 (95个 iMN, 34个继发性MN)。发现在ELISA和蛋白质印迹分析中对于抗-PLA2R1抗体都是阴性的总共6个血清与250kDa的相同蛋白质反应 (图1B)。在这些患者中, 5个患有iMN, 1个患有抗核抗体 (ANA) 阳性滴度的MN, 将该患者分类为继发性MN的情况 (图1B)。

[0289] 因此, 上述筛查鉴定了新的存在于HGE中的250kDa的自身抗原, 可能不同于在相同HGE制剂中具有约180kDa大小的PLA2R1。为了更好地区分两种抗原, 我们在具有低丙烯酰胺百分比的SDS-PAGE凝胶上运行HGE蛋白以分开这两种目标蛋白质, 然后准备蛋白质印迹, 并用与PLA2R1或新的抗原反应的血清连续孵育膜。如所预期的, 显示具有约60kDa的大小差异的两个不同的条带, 表明存在两种不同的抗原。为了进一步与PLA2R1相比表征新的抗原, 我

们对含有两种抗原的HGE酶促去糖基化。N-糖肽酶F使新的抗原的大小减小至接近225kDa，并且添加神经氨酸酶(去除唾液酸的酶)引起进一步迁移至200kDa。另一方面，如前所述，PLA2R1在加入N-糖肽酶F后迁移至约145kDa，但在加入神经氨酸酶后没有观察到更多的迁移。与完全糖基化的250kDa蛋白质反应的所有血清也以相同的分子量识别去糖基化形式，这表明所有血清识别相同的蛋白质。此外，新的抗原和PLA2R1都存在于HGE的膜级分中，但是仅PLA2R1存在于可溶性级分中。

[0290] 鉴定作为THSD7A的新型HGE抗原。我们进行了天然肾小球蛋白和用N-糖肽酶F处理以及N-糖肽酶F和神经氨酸酶处理的肾小球蛋白的凝胶电泳。来自每个处理的绝大部分蛋白用考马斯蓝染料染色，另一部分转移到PVDF并用患者针对新的抗原的抗体阳性的血清进行探测。然后，我们在如上所述的250kDa、225kDa和200kDa处切除对应于蛋白质印迹信号的考马斯染色的凝胶区域，假设靶蛋白将特异性存在于所有三种条件下。在所有凝胶切片中进行质谱分析，获得最初候选列表。根据新的抗原的预期生化特性，即通过参考它们的分子量、N-糖基化、膜定位和在人肾或肾小球中的表达，对候选蛋白质进行分级(rank)。有趣的是，所有以前测试的PLA2R1旁系同源物在质谱分析中出现在显著位置，回顾性地证明了初始方法的合理性。我们使用商业上可获得的抗体和瞬时转染的HEK293细胞来特异地测试候选抗原，并最终鉴定含有1型血小板应答蛋白结构域的7A (THSD7A) 作为目的蛋白。

[0291] 事实上，先前与HGE中的250kDa蛋白质反应的所有6种血清也识别在HEK293细胞中表达的重组THSD7A，而抗-PLA2R1阳性血清或对照中没有一个识别(图2A)。值得注意的是，HGE中存在的天然THSD7A蛋白和在HEK293细胞中表达的重组蛋白显示出相同的糖基化模式，然而重组蛋白迁移至稍低的位置，表明翻译后修饰的微小差异(图2A)。作为反应性血清识别的肾小球自身抗原确实是THSD7A的最终证据，我们进行免疫沉淀实验。所有反应性血清，但不是对照，从HGE免疫沉淀THSD7A，如通过沉淀物与针对THSD7A的特异性多克隆抗体的反应性所证明的(图2B)。

[0292] 抗THSD7A自身抗体的表征。为了测定抗THSD7A自身抗体的IgG亚型，我们使用针对不同IgG(1至4)的二抗。发现抗THSD7A的IgG4是所有6种反应性血清的主要抗体。然而，其他IgG亚型也存在于大多数血清中。这一发现与所有可用活检中IgG4的增强染色一致。此外，当凝胶在还原条件下运行时，所有阳性血清都失去了它们对HGE中的250kDa蛋白和重组THSD7A的反应性。因此，对于抗PLA2R1自身抗体，抗THSD7A自身抗体大部分是IgG4，并且识别THSD7A中存在于天然和重组THSD7A蛋白中的一个或多个构象依赖性表位。

[0293] 抗THSD7A自身抗体和疾病活动。来自两个iMN患者和抗THSD7A抗体阳性的系列血清样品可通过半定量蛋白质印迹分析用于抗THSD7A抗体水平的分析。在一个患者中，免疫抑制治疗诱导抗THSD7A抗体水平的实质性降低，随后是蛋白尿的减少(图3)。另一方面，在由于临床症状轻微(minor clinical complaint)未接受免疫抑制治疗的一个患者中，抗体水平保持稳定地高，具有持续的肾病范围的蛋白尿。总之，这些结果表明抗体水平和临床疾病活性之间的关联。

[0294] THSD7A在健康对照和MN患者中的肾小球表达。为了研究THSD7A的肾小球表达，我们在来自健康受试者和来自iMN患者的活检样品中进行免疫荧光和免疫组织化学分析。当用两种不同的抗THSD7A特异性抗体探测时，我们在来自健康肾的活检标本中发现了THSD7A的显著的线性肾小球表达。省略一抗的阴性对照显示根本没有染色。当对Nephrin染色时，

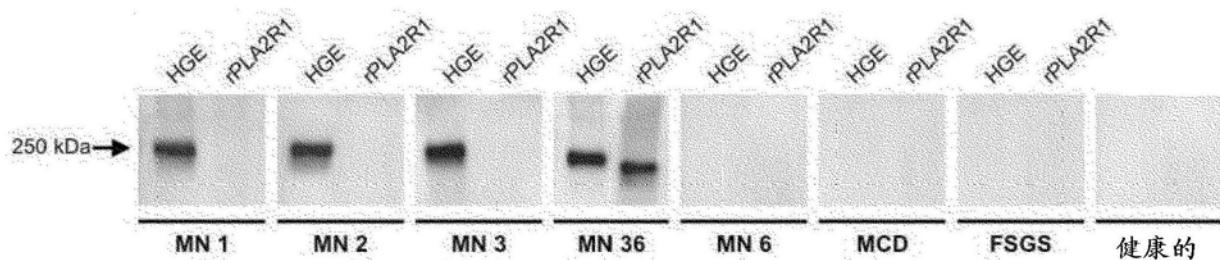
观察到在足细胞足突的细胞间裂孔隔膜区域中表达的跨膜蛋白,与THSD7A非常相似的染色模式。此外,两个分子显示强共定位,表明THSD7A位于足细胞足突中或非常接近足细胞足突。另一方面,THSD7A不与肾小球基底膜的标志物(诸如IV型胶原蛋白和纤连蛋白)共定位。确切地说,THSD7A相对于IV型胶原蛋白和纤连蛋白位于上皮下,表明其在足细胞足突上而不是肾小球基底膜上表达。

[0295] 从先前的研究已知PLA2R1与在来自患有MN和具有可检测的抗PLA2R1抗体的患者的活检的上皮下沉积物中的IgG4共定位。为了研究抗THSD7A阳性MN患者中的这种现象,我们使用特异性抗THSD7A以及抗IgG4抗体进行免疫荧光显微镜检查。我们发现在来自抗THSD7A阳性MN患者(n=5)的所有可用活检中IgG4和THSD7A的强染色。因此,THSD7A以典型的MN的颗粒模式与IgG4共定位。

[0296] THSD7A的免疫组织化学染色显示在来自健康对照的活组织检查样品中沿着足细胞质膜的线性阳性。相比之下,PLA2R1表达略少。在来自患有抗THSD7A阳性MN的所有五各可用活检中,与正常对照相比,免疫组织化学显示THSD7A的染色显著增强。另一方面,PLA2R1染色在这些患者中是正常的。相比之下,所有研究的具有抗PLA2R1抗体的患者具有正常的THSD7A染色,但增强的PLA2R1的颗粒染色,如前所述。来自患有继发性MN的所有研究的活检都对THSD7A和PLA2R1具有正常染色。

[0297] 来自活检组织的抗THSD7A的IgG的洗脱。IgG从来自一个其血清与THSD7A反应的患者、来自两个PLA2R1相关iMN的病例和来自一个V型狼疮肾炎的病例的冷冻残余活检核心酸性洗脱出来。来自抗THSD7A血清阳性病例的IgG在蛋白质印迹上特异性识别重组THSD7A,而从PLA2R1相关的MN病例中洗脱的IgG不识别THSD7A且特异性识别PLA2R1。从V类狼疮肾炎活检中洗脱的IgG不识别任一抗原。

### A. 与大小为250kDa的肾小球蛋白的反应性



### B. 患者

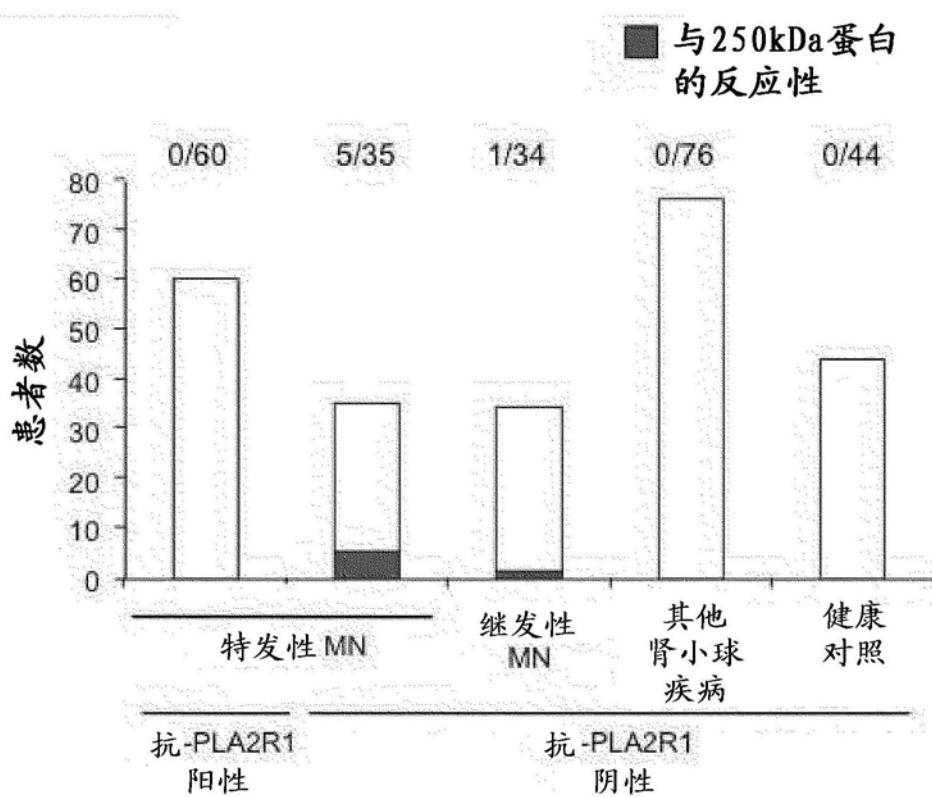


图1

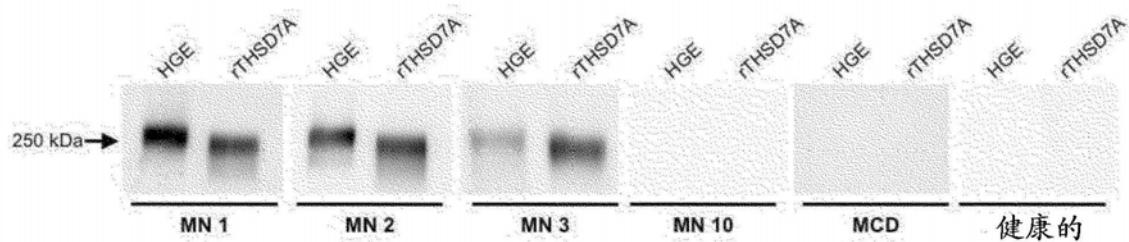
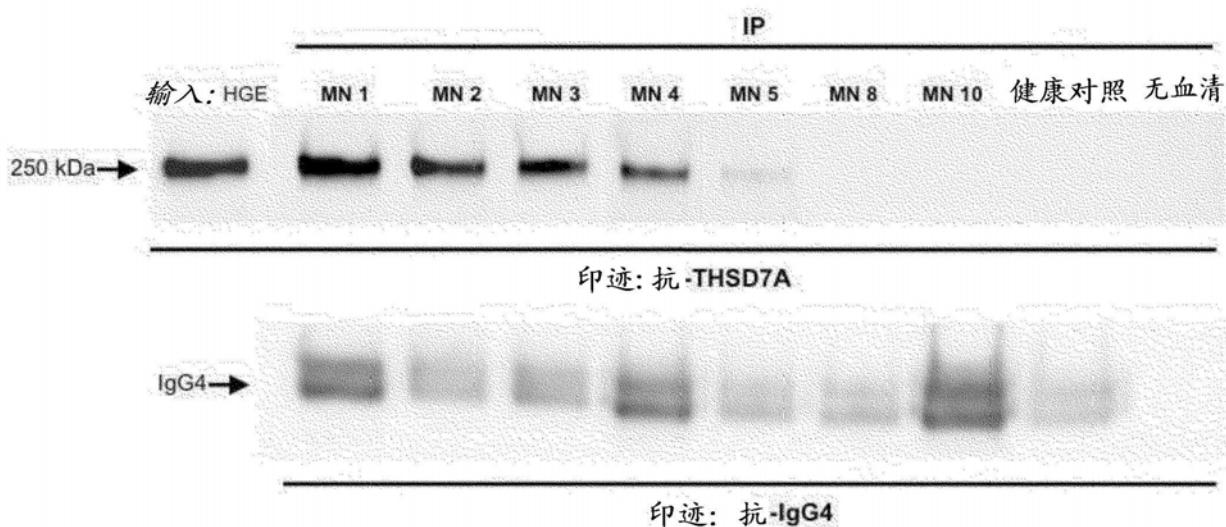
**A. 重组THSD7A的蛋白质印迹****B. 免疫沉淀 (IP)**

图2

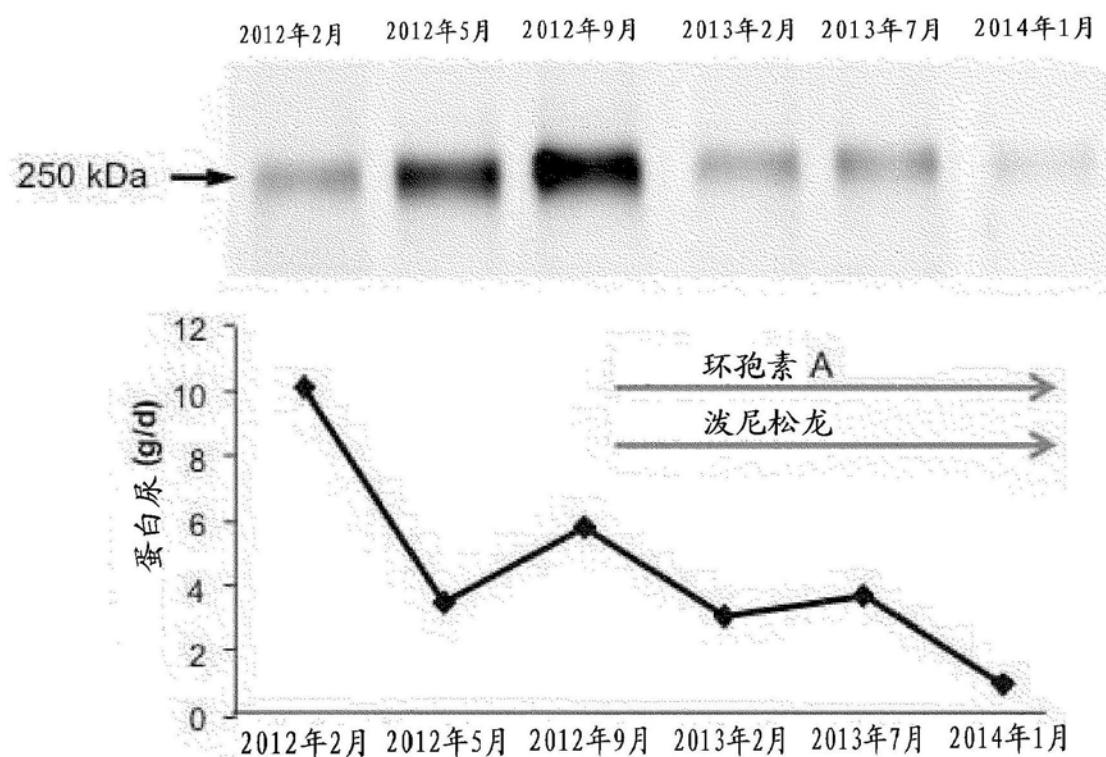


图3

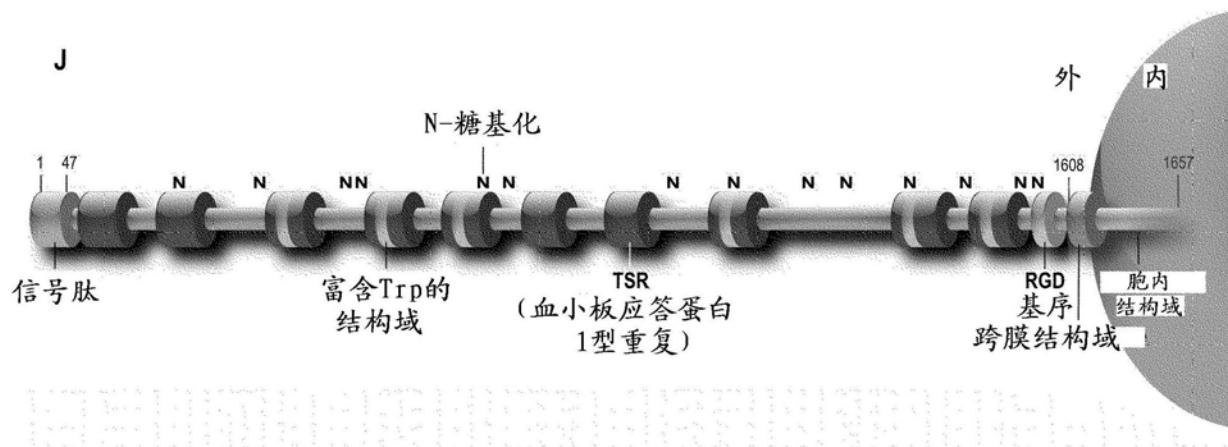


图4