

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-524585

(P2018-524585A)

(43) 公表日 平成30年8月30日(2018.8.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B O 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2017-566405 (P2017-566405)	(71) 出願人	517442373
(86) (22) 出願日	平成28年7月8日 (2016.7.8)		シュ デ ニース
(85) 翻訳文提出日	平成30年2月16日 (2018.2.16)		フランス国 06000 ニース アヴェ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/066320		ニュ デ ラ レイン ヴィクトリア 4
(87) 国際公開番号	W02017/009245	(71) 出願人	505351201
(87) 国際公開日	平成29年1月19日 (2017.1.19)		セントレ ナシオナル デ ラ ルシェル
(31) 優先権主張番号	15306148.6		シェ シエンティフィーク
(32) 優先日	平成27年7月10日 (2015.7.10)		フランス国 75016 パリ リュ ミ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		シェル-アンジュ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P L A 2 R 1 エピトーププロファイルおよび P L A 2 R 1 エピトープスプレッディングの分析に基づく膜性腎症の予後およびモニタリング

(57) 【要約】

本発明は、P L A 2 R 1 エピトーププロファイルの分析に基づいて対象における特発性膜性腎症の予後を評価するための方法に関する。本発明はさらに、P L A 2 R 1 エピトープスプレッディングの分析に基づいて特発性膜性腎症の進行をモニタリングするための方法に関する。本発明は、3つのP L A 2 R 1 ドメイン(C y s R、C T L D 1およびC T L D 7)が抗P L A 2 R 1 活性に関与すること、そして、そのうちの2つ(C T L D 1およびC T L D 7)は、活動性特発性膜性腎症と、より密接に関連し、おそらくエピトープスプレッディングの機序によって関連づけられることに着目する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における特発性膜性腎症の予後を評価するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料中の、P L A 2 R 1 の C 型レクチンドメイン 1 (C T L D 1) に対する自己抗体のレベルを検出および / または測定するステップ a) を含み、C T L D 1 に対する自己抗体の存在は予後不良を示す、方法。

【請求項 2】

前記ステップ a) が、P L A 2 R 1 の C 型レクチンドメイン 7 (C T L D 7) に対する自己抗体のレベルを検出および / または測定するステップをさらに含み、C T L D 1 に対する自己抗体および / または C T L D 7 に対する自己抗体の存在は予後不良を示す、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記ステップ a) が、P L A 2 R 1 のシステインリッチドメイン (C y s R) に対する自己抗体のレベルを検出および / または測定するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

それぞれ C y s R、C T L D 1、C T L D 7 に対する自己抗体の非存在は予後良好を示し、かつ / または

C y s R のみに対する自己抗体の存在は予後良好を示し、

C y s R に対する自己抗体ならびに C T L D 1 および / または C T L D 7 に対する自己抗体の存在は予後不良を示す、

請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

予後良好とは、寛解の可能性が高いこと、および好ましくは、血液透析を必要とするリスクまたは腎不全を発症するリスクが低いことをいい、かつ

予後不良とは、後に腎不全などの腎合併症を発症する可能性が高いこと、または再燃の可能性が高いことをいう、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

予後不良が、

タンパク尿の増加、典型的にはタンパク尿 $> 4 \text{ g / g}$ 、および / または

30% を超えて増加した血清中クレアチニン、および / または

$e G F R < 45 \text{ ml / 分 / } 1.73 \text{ m}^2$

と関連する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記生物学的試料が全血試料、血漿および血清からなる群より選択され、好ましくは血清である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記生物学的試料が腎生検などの生検によって得られる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

ステップ a) が E L I S A によって行われ、より好ましくは C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体に関する力価を評価することを目的とする特異的 E L I S A アッセイによって行われる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記自己抗体が I g G 4 である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記 P L A 2 R 1 が、ヒト P L A 2 R 1、ウサギ P L A 2 R 1 もしくはマウス P L A 2 R 1、またはそれらのフラグメントからなる群より選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

前記 P L A 2 R 1 がマウス P L A 2 R 1 またはそのフラグメントである、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

ステップ a) が、以下のサブステップ：

患者から得られた生物学的試料をマウス P L A 2 R 1 と接触させるサブステップ、および

形成された任意の抗原 - 抗体複合体を検出するサブステップ、

を含み、形成された任意の抗原 - 抗体複合体の存在は予後不良を示す、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の処置の有効性をモニタリングするための方法であって、

第 1 時点において前記対象から得られた生物学的試料中の、それぞれ C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つ、より好ましくは 3 つの自己抗体のレベルを、前記第 1 時点において決定するステップ、

第 2 時点において前記対象から得られた生物学的試料中の、それぞれ C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つ、より好ましくは 3 つの自己抗体のレベルを、前記第 2 時点において決定するステップ、および

20

前記 2 つの時点の前記自己抗体のレベルを比較するステップ

を含み、

前記第 2 時点における、それぞれ C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体の非存在またはそれぞれ C T L D 1 および C T L D 7 に対する前記自己抗体のレベルの減少は、前記処置が有効であることを示し、かつ/または

前記第 2 時点における、C T L D 1 および/もしくは C T L D 7 に対する自己抗体の存在、または C T L D 1 および/もしくは C T L D 7 に対する前記自己抗体のレベルの増加は、前記処置が有効でないことを示す、

方法。

30

【請求項 1 5】

前記第 2 時点における、それぞれ C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体の非存在、または前記自己抗体のレベルの減少は、前記処置が有効であることを示す、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記処置が、シクロスポリン、タクロリムス、アザチオプリン、インフリキシマブ、オマリズマブ、ダクリズマブ、アダリムマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブおよびラパマイシン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ならびにリツキシマブからなる群より選択される免疫抑制治療である、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の方法。

40

【請求項 1 7】

対症処置がレニン・アンジオテンシン系の遮断に基づく、請求項 1 4 または請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

対象における特発性膜性腎症を診断するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料において、

P L A 2 R 1 のシステインリッチドメイン (C y s R) に対する自己抗体、および/または

P L A 2 R 1 の C 型レクチンドメイン 1 (C T L D 1) に対する自己抗体、および/または

50

PLA2R1のC型レクチンドメイン7(CTLD7)に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも1つの自己抗体を検出するステップa')を含み、PLA2R1のCysR、CTLD1、および/またはCTLD7に対する1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つの相異なる自己抗体の存在は、特発性膜性腎症を示す、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PLA2R1エピトーププロファイルの分析に基づいて対象における膜性腎症の予後を評価するための方法に関する。本発明はさらに、PLA2R1エピトープスプレディングの分析に基づいて膜性腎症の進行をモニタリングするための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特発性膜性腎症(iMN: idiopathic Membranous Nephropathy)は自己免疫疾患であり、成人におけるネフローゼ症候群の一般的な原因である。疾患の進展は、自然寛解、持続性タンパク尿または末期腎臓病など、極めて多様である。2009年に、Beckらは、iMNにおける主要ボドサイト抗原として、M型ホスホリパーゼA2受容体(PLA2R(phospholipase A2 receptor)1)を同定した。抗PLA2R自己抗体の存在は、その後の研究において、iMN患者の53~80%に広く確認されている。これらの自己抗体の病因的役割はまだ判明していないが、抗PLA2R抗体価は、ほとんどの研究対象集団において、疾患活動度と相関するようである。

【0003】

しかし、抗PLA2R1価からの個々のアウトカムの予測は不確かである。実際、対症処置下または免疫抑制処置下のいずれかでの寛解中は大半の患者において自己抗体が消失するものの、レニン・アンジオテンシン系(RAS: renin-angiotensin system)遮断下での明らかな臨床的寛解中に自己抗体が持続する場合もある。さらにまた、高い抗PLA2R1抗体価は、ほとんどの場合、その後の不良な腎アウトカムと相関するようであるが、発症時に自己抗体価が高い患者の一部は、抗PLA2R1活性の急激な減少および疾患の寛解を呈する。

【0004】

iMNの処置には議論の余地がある。KDIGO(Kidney Disease Improving Global Outcomes)ガイドラインでは、iMNを持つすべての患者におけるレニン・アンジオテンシン系の遮断および利尿薬による支持的対症処置、ならびに腎機能低下または持続性ネフローゼ症候群の場合に限った免疫抑制治療が推奨された。

【0005】

それゆえに免疫抑制処置は、非可逆的である可能性を秘めた重大な合併症が起こるまで開始されないことが多い。その一方で、必要以上に早い免疫抑制の開始は、対症処置で寛解を生じるかもしれない患者では無駄になりうる。それゆえに、特発性膜性腎症を患っている患者のアウトカムについて、より良い予測因子が必要とされている。

【0006】

このように、特発性膜性腎症の予後のための包括的で高感度かつ特異的な方法は、長年にわたって必要とされてきた。加えて、無効な治療レジメンに必要な変更を加えるために、患者をそれぞれの処置に対する応答性に関して層別化するための方法も、必要とされながらまだ実現していない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【0007】

M型ホスホリパーゼA2受容体(PLA2R1)は、7~17kDaの10個の相異なる球状ドメイン、すなわちシステインリッチドメイン(CysR)、フィブロネクチンI型ドメイン(FNII: fibronectin type II)および8つの相異なるC型レクチンドメイン(CTLD(C-type lectin domain)1~8)を含む大きな細胞外領域を持つ、180kDaの膜受容体である。各ドメインは約10アミノ酸の小さなリンカー配列によって隔てられている。

【0008】

本発明者らはまず、iMN患者50人のコホートを、受容体の10個の細胞外ドメインのそれぞれを逐次的に欠失させた9個のPLA2R1突然変異体に対するそれぞれの反応性について、スクリーニングした。本発明者らは、3つの相異なるドメイン、

- PLA2R1のシステインリッチドメイン(CysR)；
- PLA2R1のC型レクチンドメイン1(CTLD1)；および
- PLA2R1のC型レクチンドメイン7(CTLD7)

に、エピトープを同定した。

【0009】

次に本発明者らは、これらのドメインの可溶型を多数使って、ウェスタンブロットとELISAとの両方により、各ドメインの独立した反応性を確認した。次に本発明者らはエピトープ特異的ELISAを設定し、患者69人のコホートを3つのエピトープ特異的サブグループに層別化して、それぞれのエピトーププロファイルと疾患活動度との間の関係を分析した。こうして本発明者らは、血清試料採取時のCysRに対する抗PLA2R1反応性が好ましいアウトカムと関連し、一方、CTLD1およびCTLD7に対する反応性は活動的疾患および不良な腎予後と関連することを明らかにした。

【0010】

さらにまた本発明者らは、エピトーププロファイルが経過観察中に変化しうることも明らかにした。抗CTLD1抗体および抗CTLD7抗体が疾患の寛解と共に消失し、疾患の再燃と共に再び出現したのに対し、抗CysR限定的活性は安定かつ軽度の疾患活動度と関連した。

【0011】

したがって、第1の側面において本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の予後を評価するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料中の、PLA2R1のC型レクチンドメイン1(CTLD1)に対する自己抗体のレベルを検出および/または測定するステップa)を含み、CTLD1に対する自己抗体の存在は予後不良を示す、方法に関する。

【0012】

第2の側面において、本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の予後を評価するための方法であって、

- 前記患者から得られた生物学的試料をマウスPLA2R1と接触させるステップ、および

- 形成された任意の抗原-抗体複合体を検出するステップ

を含み、形成された任意の抗原-抗体複合体の存在は予後不良を示す、方法に関する。

【0013】

第3の側面において、本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の処置の有効性をモニタリングするための方法であって、

- 第1時点において前記対象から得られた生物学的試料中の、それぞれCysR、CTLD1およびCTLD7に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つの自己抗体のレベルを、前記第1時点において決定するステップ、

- 第2時点において前記対象から得られた生物学的試料中の、それぞれCysR、CTLD1およびCTLD7に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも1つ、

好ましくは2つ、より好ましくは3つの自己抗体のレベルを、前記第2時点において決定するステップ、および

- 2つの時点の自己抗体のレベルを比較するステップ

を含み、

- 第2時点における、それぞれCTL D 1およびCTL D 7に対する自己抗体の非存在またはそれぞれCTL D 1およびCTL D 7に対する自己抗体のレベルの減少は、処置が有効であることを示し、かつ/または

- 第2時点における、CTL D 1および/もしくはCTL D 7に対する自己抗体の存在、またはCTL D 1および/もしくはCTL D 7に対する自己抗体のレベルの増加は、処置が有効でないことを示す、

方法に関する。

【0014】

第4の側面において、本発明は、対象における膜性腎症、特に特発性膜性腎症を診断するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料において、

- PLA 2 R 1のシステインリッチドメイン(Cys R)に対する自己抗体、および/または

- PLA 2 R 1のC型レクチンドメイン1(CTL D 1)に対する自己抗体、および/または

- PLA 2 R 1のC型レクチンドメイン7(CTL D 7)に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも1つの自己抗体を検出するステップa')

を含み、PLA 2 R 1のCys R、CTL D 1、および/またはCTL D 7に対する自己抗体のうち1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つの存在は、膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症を示す、

方法に関する。

【発明を実施するための形態】

【0015】

特発性膜性腎症を予後判定するための方法

M型ホスホリパーゼA2受容体(PLA 2 R 1)は、特発性膜性腎症における主要自己抗原であり、臨床的意義の不明な2つのエピトープが最近同定されている。ここでは、50人のPLA 2 R 1陽性患者の血清を、10個の細胞外ドメインをカバーする一連のPLA 2 R 1欠失突然変異体でのウェスタンブロットによって、スクリーニングした。本発明者らはCys Rドメイン、CTL D 1ドメインおよびCTL D 7ドメイン中のエピトープを同定し、各ドメインの可溶型で、それら3つのドメインに対する反応性を確認した。ドメイン特異的ELISAにより、69人のPLA 2 R 1陽性患者は、3つのサブグループ、すなわち23人のCys R、14人のCys R + CTL D 1、および32人のCys R + CTL D 1 + CTL D 7に層別化することができた。完全長PLA 2 R 1抗原を使って測定されるメジアンELISA力価は、患者サブグループ間で有意差がなかった。抗Cys R限定的活性を持つ23人の患者の方が、若く($p = 0.008$)、ネフローゼ域のタンパク尿が少なく($p = 0.018$)、経過観察中に、より多くの自然寛解($p = 0.03$)、低い腎不全進行速度($p = 0.0025$)および少ない末期腎臓病($p = 0.01$)を呈した。実際、69人中31人の患者はKDIGOによる不良な腎予後を有した(経過観察の最後に 4 g/g を上回る尿タンパク質/クレアチニン比または $eGFR < 45\text{ ml/分/1.73m}^2$)。高い抗PLA 2 R 1活性およびCys Rエピトープを越えるエピトープスプレディングは、多変量cox回帰分析において、不良な腎予後の独立したリスク因子であった。経過観察中のエピトープスプレディングが疾患の悪化と関連したのに対し($n = 3$)、CTL D 7プロファイルからCys Rに戻る逆スプレディングは好ましいアウトカムと関連した($n = 1$)。

【0016】

本発明者らは、血清試料採取時のCys Rに対する抗PLA 2 R 1反応性が好ましいアウトカムと関連すると同時に、CTL D 1およびCTL D 7に対する反応性は活動性疾患

10

20

30

40

50

および不良な腎予後と関連することを明らかにする責務を果たした。さらに本発明者らは、C T L D 1に対する反応性が、特発性膜性腎症の予後の評価にとって、十分な関連性を有することに着目した。

【0017】

それゆえに、第1の側面において本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の予後を評価するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料中の、P L A 2 R 1のC型レクチンドメイン1 (C T L D 1) に対する自己抗体のレベルを検出および/または測定するステップa)を含み、C T L D 1に対する自己抗体の存在は予後不良を示す、方法に関する。

【0018】

本発明者らは、C T L D 1に対する自己抗体に加えて、C型レクチンドメイン7 (C T L D 7) に対する自己抗体の検出は、疾患の悪化と関連することを明らかにした。したがって、さらなる実施形態において、前記ステップa)はさらに、P L A 2 R 1のC型レクチンドメイン7 (C T L D 7) に対する自己抗体のレベルを検出および/または測定する工程を含む。この実施形態において、C T L D 1に対する自己抗体および/またはC T L D 7に対する自己抗体の存在は、予後不良を示す。

【0019】

好ましい一実施形態において、前記ステップa)はさらに、P L A 2 R 1のシステインリッチドメイン (C y s R) に対する自己抗体のレベルを検出および/または測定する工程を含む。

【0020】

さらなる好ましい一実施形態において、本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の予後を評価するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料中の、

- P L A 2 R 1のシステインリッチドメイン (C y s R) に対する自己抗体、および
- P L A 2 R 1のC型レクチンドメイン1 (C T L D 1) に対する自己抗体、および
- P L A 2 R 1のC型レクチンドメイン7 (C T L D 7) に対する自己抗体

のレベルを検出および/または測定するステップa)を含み、

- C T L D 1に対する自己抗体および/またはC T L D 7に対する自己抗体の存在は予後不良を示す、

方法に関する。

【0021】

好ましくは、本発明の方法はさらに、

- それぞれC y s R、C T L D 1、C T L D 7に対する自己抗体の非存在は予後良好を示し、かつ/または

- C y s Rのみに対する自己抗体の存在は予後良好を示す、
ことを特徴とする。

【0022】

典型的に、C y s Rに対する自己抗体ならびにC T L D 1および/またはC T L D 7に対する自己抗体の存在は、予後不良を示す。

【0023】

「膜性腎症」という用語は、当技術分野におけるその一般的意味を有し、成人ネフローゼ症候群の原因になることが多い腎疾患を指す。この用語は、全身性エリテマトーデス、B型肝炎、または梅毒(. . .)などの二次的要因によって引き起こされる続発性膜性腎症、および「特発性膜性腎症」とも呼ばれる原発性自己免疫膜性腎症を包含する。「特発性膜性腎症」は、腎系球体を標的とする自己免疫疾患であるとみなされ、主要な既知標的の自己抗原はP L A 2 R 1である。

【0024】

「P L A 2 R 1」または「分泌型ホスホリパーゼA2受容体」という用語は、M型ホスホリパーゼA2受容体を指し、これは、ヒトではP L A 2 R 1遺伝子によってコードされ

10

20

30

40

50

ている受容体であって、特に、特発性膜性腎症主要自己抗原として知られている。例示的ヒト天然 P L A 2 R 1 アミノ酸配列は N P _ 0 0 1 0 0 7 2 6 8 (G e n P e p t データベース) に掲載されている。

【 0 0 2 5 】

「自己抗体」という用語は当技術分野におけるその一般的意味を有し、対象の免疫系によって生産される抗体であって、対象自身のタンパク質（例えば P L A 2 R 1 の特定ドメイン）に対する抗体を指す。自己抗体は、身体自身の細胞、組織、および/または器官を攻撃して、炎症および細胞傷害を引き起こしうる。

【 0 0 2 6 】

本明細書において使用する表現「 C y s R、 C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体」および「本発明の自己抗体」は、それぞれ P L A 2 R 1 のシステインリッチドメイン (C y s R)、 P L A 2 R 1 の C 型レクチンドメイン 1 (C T L D 1)、および P L A 2 R 1 の C 型レクチンドメイン 7 (C T L D 7) を認識する自己抗体を指す。

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用する用語「対象」または「患者」は、特発性膜性腎症を患っている症状を有しかつ/または特発性膜性腎症を患っていると疑われる個体を指す。本発明の文脈において、対象または患者は、好ましくは、特発性膜性腎症を患っている対象、または特発性膜性腎症を患っていると疑われる対象である。

【 0 0 2 8 】

本発明の方法は、採用すべき適当な治療戦略を実務家が決定しかつ/または患者が治療の恩恵を受けうるかどうかを実務家が判断するために、極めて重要な情報を実務家に提供する。典型的に、本方法は、血液透析を必要とするかもしれない患者または腎不全のリスクがある患者の同定を可能にする。

【 0 0 2 9 】

「予後」という表現は、本明細書において使用する場合、対象における特発性膜性腎症状態の経過またはアウトカムを予測することを指す。この表現は、状態の経過またはアウトカムを 1 0 0 % の正確度で予測できることを指しているわけではなく、所与の経過またはアウトカムが、バイオマーカーのパターンに基づいて、予測可能に起こりそうであることまたは起こりそうにないことを指しているわけでもない。そうではなく、「予後」という表現は、或る経過またはアウトカムが起こる確率の増加を指すことを、当業者は理解するであろう。

【 0 0 3 0 】

好ましくは、本発明の文脈において「予後良好」とは、寛解の可能性が高いことおよび/または好ましくは、血液透析を必要とするリスクが低いこと、および/または腎不全を発症するリスクが低いことを指す。

【 0 0 3 1 】

したがって、本発明の方法によって良好な予後を有するとみなされる対象は、血液透析を必要としないであろう。さらに前記対象は、積極的免疫抑制処置を受ける必要がないであろう。実際、本発明の方法は自然寛解の可能性が高い患者の同定を可能にする。典型的には、「自然寛解」は、免疫抑制処置を伴わない対症処置 (R A S 遮断薬および利尿薬など) によって誘発される寛解によって定義される。

【 0 0 3 2 】

好ましくは、本発明の文脈において、「予後不良」とは、後に腎不全などの腎合併症を発症する可能性が高いこと、および/または再燃の可能性が高いことを指す。

【 0 0 3 3 】

予後不良は、典型的には、

- タンパク尿の増加、典型的にはタンパク尿 > 4 g / g、および/または
- 3 0 % を超えて増加した血清中クレアチニン、および/または
- 推定糸球体濾過量 (e G F R : e s t i m a t e d g l o m e r u l a r f i l t r a t i o n) < 4 5 m l / 分 / 1 . 7 3 m ²

10

20

30

40

50

と関連する。e G F R は、初期腎損傷をスクリーニングして検出するために使用され、腎臓の状態をモニタリングするためにも使用される。これは、クレアチニン検査を行い、推定糸球体濾過量を算出することによって行われる。

【0034】

典型的には、本発明の方法によって予後不良を有するとみなされる対象は、血液透析を必要とするであろう。さらに前記対象は、免疫抑制処置を受ける必要があるだろう。実際、本発明の方法は、自然寛解の可能性が低い患者の同定を可能にする。

【0035】

本発明の方法は、生物学的試料中の本発明の自己抗体のレベルを検出および/または測定するステップを含む。好ましくは、前記生物学的試料は前記対象から得られる。そのような試料には、細胞を含んでも含まなくてもよい体液、例えば血液（例えば全血、血清または血漿）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。そのような試料には、生検（例えば腎生検）も含まれる。好ましくは前記試料は前記対象の体液である。試料の非限定的な例には、全血試料、血漿または血清が含まれるが、それらに限定されるわけではない。好ましくは、前記生物学的試料は血清である。生物学的試料という用語は、生物学的試料を処理することによって派生する任意の材料も包含する。派生材料には、試料から単離された細胞（もしくはそれらの子孫）または試料から抽出されたタンパク質が含まれるが、それらに限定されるわけではない。生物学的試料の処理は、濾過、蒸溜、抽出、濃縮、干渉成分の不活化、試薬の添加などのうちの1つ以上を伴いうる。

10

【0036】

ステップ a) は、本発明の自己抗体の定量的、半定量的または定性的測定のステップでありうる。好ましくは、前記ステップ a) は、前記対象から得られた生物学的試料中の、P L A 2 R 1 の C y s R に対する自己抗体、P L A 2 R 1 の C T L D 1 に対する自己抗体、および P L A 2 R 1 の C T L D 7 に対する自己抗体のレベルを測定するステップである。

20

【0037】

一実施形態において、前記ステップ a) は、以下のサブステップ：

- 前記患者から得られた生物学的試料を P L A 2 R 1 と接触させるサブステップ、および

- 形成された任意の抗原 - 抗体複合体を検出するサブステップ

30

を含み、抗原 - 抗体複合体の存在は膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症を示す。

【0038】

好ましくは、P L A 2 R 1 は、ヒト P L A 2 R 、ウサギ P L A 2 R 1 、マウス P L A 2 R 1 、またはそれらのフラグメントからなる群より選択される。

【0039】

本明細書にいう P L A 2 R 1 の「フラグメント」とは、P L A 2 R 1 の連続する一要素を指す。典型的には、前記フラグメントは生物学的に活性なフラグメントである。すなわち前記フラグメントは、P L A 2 R 1 の1つ以上の機能的性質を含む。

【0040】

本発明の文脈において、P L A 2 R 1 の「フラグメント」は、P L A 2 R 1 の全アミノ酸配列のうちの少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、少なくとも99%を含み、好ましくは、それからなる。

40

【0041】

好ましくは、前記フラグメントは、P L A 2 R 1 の全アミノ酸配列のうちの少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1000、少なくとも1100、少なくとも1120、少なくとも1250、少なくとも1300、少なくとも1310、少なくとも1320個のアミノ酸を含む。

50

【0042】

好ましくは、前記フラグメントは、P L A 2 R 1に対する自己抗体によって認識される。好ましくは、前記フラグメントは、P L A 2 R 1のC y s R、C T L D 1またはC T L D 7に対する自己抗体によって認識される。前記自己抗体と相互作用するフラグメントの能力の決定は、直接的結合を決定するための上述の方法または当技術分野において既知の方法の一つによって行うことができる。

【0043】

生物学的試料中の自己抗体のレベルを測定するための方法は、競合タイプ、直接反応タイプ、またはサンドイッチタイプのアッセイなどといったイムノアッセイを含む標準的な免疫診断技法を使用することによって測定されうる。そのようなアッセイには、凝集反応検査、E L I S Aなどの酵素標識および酵素媒介イムノアッセイ、ビオチン/アビジン型アッセイ、ラジオイムノアッセイ、免疫電気泳動、免疫沈降が含まれるが、それらに限定されるわけではない。反応には、一般に、蛍光ラベル、化学発光ラベル、放射性ラベル、酵素ラベル、もしくは色素分子などの顕示ラベル(revealing label)、または抗原と、それと反応した1つまたは複数の抗体との間の複合体の形成を検出するための他の方法が含まれる。

10

【0044】

好ましい一実施形態において、ステップa)はE L I S Aによって行われる。「E L I S A」という用語は、本明細書において使用する場合、試料中の分析物の量を定量するために使用される抗体と検出可能なラベルとを含む競合結合アッセイのタイプである、酵素結合免疫吸着アッセイを意味する。

20

【0045】

こうして、本発明の前記ステップa)は、C y s R、C T L D 1およびC T L D 7に対する自己抗体について、力価を評価することを可能にする。典型的に、E L I S Aの場合であれば、マイクロタイタープレートのウェルを一組の標的抗原でコーティングする。生物学的試料をそれら被覆ウェルに加える。自己抗体-抗原複合体を形成させるのに十分なインキュベーション期間後に、プレートを洗浄して未結合部分を除去し、検出可能に標識された二次結合抗体を加える。二次結合分子を、捕捉された任意のヒト自己抗体と反応させ、プレートを洗浄し、当技術分野において周知の方法を使って、二次結合抗体の存在を検出する。

30

【0046】

ヒト抗P L A 2 R 1自己抗体が以下のアイソタイプ、I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4から選択されることに留意することは、注目に値する。好ましくは、ヒト抗P L A 2 R 1自己抗体はI g G 4である。基本的に、本発明の文脈においてE L I S Aを実行するために使用される抗原は、

- H E K 2 9 3細胞または大腸菌(E . c o l i)において生産されたC y s Rドメイン、

- H E K 2 9 3細胞または大腸菌において生産されたC T L D 1ドメイン、および

- H E K 2 9 3細胞または大腸菌において生産されたC T L D 6 - 7またはC T L D 6コンストラクト

40

である。H E K細胞において生産された2つの抗原ドメインは、抗H A抗体で予めコーティングされたE L I S AプレートにH Aアフィニティー捕捉することができ、一方、大腸菌からのC T L D 1ドメインは、直接コーティングするか、抗H Aで捕捉することができる。次に、吸着させた抗原を患者の血清と共にインキュベートしてから、二次抗ヒトI g G特異的抗体で検出する。この二次抗ヒトI g G特異的抗体は、好ましくは、ペルオキシダーゼにカップリングされた抗I g G 4抗体であることができるが、抗トータルI g G(a n t i - t o t a l)、抗I g G 1、抗I g G 2および抗I g G 3二次抗体などといった他の二次抗I g Gであってもよい。

【0047】

あるいは、このアッセイでは、以前に開示された抗原のすべてが使用されうる。

50

【 0 0 4 8 】

好ましい実施形態において、抗 P L A 2 R 1 自己抗体は I g G 4 である。実際、本発明者らは、患者に見いだされる抗 P L A 2 R 1 自己抗体の大部分が I g G 4 サブクラスの抗体であることを明らかにした。しかし、抗 P L A 2 R 1 I g G 1、I g G 2、および I g G 3 のサブクラスも見いだされる。したがって、本発明の文脈において、C y s R ドメイン、C T L D 1 ドメインおよび C T L D 7 ドメインに対する抗 P L A 2 R 1 自己抗体のサブクラスは、好ましくは、I g G 4 自己抗体であるが、それに限るわけではない。

【 0 0 4 9 】

自己抗体の存在または非存在は、自己抗体の群のそれぞれについて検出されたレベルまたは力価を参照レベルと比較することによって決定することができる。

10

【 0 0 5 0 】

自己抗体の存在を、参照レベルとの比較で高いレベルとみてもよいことは、注目に値する。同様に、自己抗体の非存在を、参照レベルとの比較で低いレベルとみてもよい。

【 0 0 5 1 】

本発明の文脈において、「対照」という用語は、それが対象を特徴づけるために使用される場合には、健常な対象、または腎疾患以外の特定疾患または特発性膜性腎症以外の腎疾患と診断された患者を指す。

【 0 0 5 2 】

「対照試料」という用語は、健常対象から得られた、または腎障害以外の疾患と診断された患者から得られた、1つまたは複数の試料を指す。

20

【 0 0 5 3 】

「正常」および「健常」という用語は、本明細書においては相互可換的に使用される。これらの用語は、腎障害に関係する症状を何も示していない対象および膜性腎症とも他の腎症とも診断されていない対象を指す。好ましくは、正常対象は、腎系に影響を及ぼす投薬を受けておらず、他のどの疾患とも診断されていない。一定の実施形態において、正常対象は、試験される生物学的試料が得られた対象と比較して、同様の性別、年齢、および/またはボディマス指数を有する。「正常」という用語は、本明細書において、健常対象から得られた試料を形容するためにも使用される。

【 0 0 5 4 】

本明細書において使用する用語「参照レベル」は、対照から得られた生物学的試料中のレベルを指すか、好ましくは、いくつかの対照から得られた生物学的試料において測定されたいくつかのレベルの平均を指す。典型的には、当業者は、健常であることがわかっている少なくとも 100 個体の生物学的試料中、好ましくは血清中の前記参照レベルを、決定しうる。次に、C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体の平均レベルが得られるように、得られた比の平均値が周知の統計分析によって決定される。次に、前記の値が正常であるとみなされ、よって閾値を構成する。特定の好ましい一実施形態において、予後に使用される P L A 2 R 1 抗原は、マウス P L A 2 R 1 またはそのフラグメントである。

30

【 0 0 5 5 】

まさにこの特定実施形態では、ステップ a) が以下のサブステップ、すなわち前記患者から得られた生物学的試料をマウス P L A 2 R 1 と接触させるサブステップ、および形成された任意の抗原 - 抗体複合体を検出するサブステップを含み、形成された任意の抗原 - 抗体複合体の存在は予後不良を示す。

40

【 0 0 5 6 】

実際、本発明者らのさらなる実験は、i M N の予後を評価するためにマウス P L A 2 R 1 を使用できることを明らかにした。

【 0 0 5 7 】

したがって、第 2 の側面において、本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の予後を評価するための方法であって、前記患者から得られた生物学的試料をマウス P L A 2 R 1 と接触させるステップ、および形成された任意の抗原 - 抗体複合体を

50

検出するステップを含み、形成された任意の抗原 - 抗体複合体の存在は予後不良を示す方法に関する。

【0058】

したがって、この側面において本発明は、マウス P L A 2 R 1 に対する自己抗体の同定に依拠する。したがって本発明は、予後不良を示す患者を同定することを目的とする。

【0059】

i M N の処置に対する応答の有効性をモニタリングするための方法

本発明者らは、特発性膜性腎症の経過観察中および治療的処置中に P L A 2 R 1 エピトーププロファイルが変化しうることに着目した。実際、本発明者らは、抗 C T L D 1 抗体および抗 C T L D 7 抗体が自発的なまたは治療による疾患の寛解と共に消失し、疾患の再燃と共に再び出現し、一方、抗 C y s R 限定的活性は安定した軽度の疾患活動度に関連することを明らかにした。

10

【0060】

したがって本発明者らは、経過観察中の P L A 2 R 1 エピトーププロファイルおよび P L A 2 R 1 エピトープスプレディングの分析は、疾患重症度をモニタリングし、患者を、異なる腎予後を持つサブグループへと層別化するための強力なツールであると結論した。したがって本発明は、例えばそれぞれの抗原 C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 を標的とするさまざまな抗 P L A 2 R 1 特異的自己抗体の存在および力価を患者の血清中に検出することなどにより、臨床家が自己反応性の程度を定性的および定量的に測定できるようにすることによって、特発性膜性腎症の進行をモニタリングするための方法を提供する。これらの自己抗体は疾患の進行を示す。

20

【0061】

特に本発明者らは、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体がどちらも観察される場合に、疾患は悪化することを明らかにした。

【0062】

「エピトープスプレディング」とは、慢性自己免疫中または炎症性応答中の自己抗原の放出に続発する内在性エピトープに対する免疫応答の発生をいう。したがってエピトープスプレディングは、最初の非交差反応性抗原部位から、同じ分子または異なる分子内の新しいエピトープが、T細胞またはB細胞によって次第に認識されるようになる現象である。ヒト抗糸球体基底膜抗体病、尋常性天疱瘡、関節リウマチ、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (E A E : e x p e r i m e n t a l a u t o i m m u n e e n c e p h a l o m y e l i t i s)、多発性硬化症、1型糖尿病およびヘイマン腎炎などといった多くの自己免疫疾患において記載されているように、分子内エピトープスプレディングは疾患の悪化と関連する。

30

【0063】

「エピトープ」という用語には、抗体および/またはT細胞受容体に特異的に結合する能力を有する任意の抗原(例えばタンパク質)決定基が含まれる。すなわち、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位である。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖などといった分子の化学的に活性な表面配置からなり、通常は、特異な三次元構造特徴および特異な電荷特徴を有する。エピトープは、典型的には少なくとも3、5または8~10個のアミノ酸を含む。アミノ酸は連続的であってもよいし、三次フォールディングによって並置された不連続アミノ酸であってもよい。コンフォメーションエピトープと非コンフォメーションエピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合は失われるが、後者はそうでない点で、区別される。本発明の文脈において定義される抗 P L A 2 R 1 自己抗体はいずれも、コンフォメーションエピトープを認識する。

40

【0064】

それゆえに、第3の側面において本発明は、対象における膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症の処置の有効性をモニタリングするための方法であって、

- 第1時点において前記対象から得られた生物学的試料中の、それぞれ C y s R、C T L D 1 および C T L D 7 に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも1つ、

50

好ましくは2つ、より好ましくは3つの自己抗体のレベルを、前記第1時点において決定するステップ、

- 第2時点において前記対象から得られた生物学的試料中の、それぞれC y s R、C T L D 1およびC T L D 7に対する自己抗体からなる群より選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つの自己抗体のレベルを、前記第2時点において決定するステップ、および

- 2つの時点の自己抗体のレベルを比較するステップ
を含み、

- 第2時点における、それぞれC T L D 1およびC T L D 7に対する自己抗体の非存在またはそれぞれC T L D 1およびC T L D 7に対する自己抗体のレベルの減少は、処置が有効であることを示し、ならびに/または

- 第2時点における、C T L D 1および/もしくはC T L D 7に対する自己抗体の存在、またはC T L D 1および/もしくはC T L D 7に対する自己抗体のレベルの増加は、処置が有効でないことを示す、

方法に関する。

【0065】

好ましくは、第2時点における、それぞれC y s R、C T L D 1およびC T L D 7に対する自己抗体の非存在、または前記自己抗体のレベルの減少は、処置が有効であることを示す。より正確に述べると、それぞれC y s R、C T L D 1およびC T L D 7に対する自己抗体の非存在は、処置が成功しており有効であるという極めて良い徴候である。

【0066】

前記方法は、特発性膜性腎症の進行のモニタリングも可能にする。

【0067】

以前に開示された技術データおよび定義はすべて、ここでも適用可能である。

【0068】

比較レベルより「増加したレベル」もしくは「高いレベル」または「減少したレベル」もしくは「低いレベル」、あるいは前記比較レベルからの「変化」または「逸脱」は、統計的に有意である。

【0069】

比較レベルと比べて、レベルが、約5%以上、約10%以上、約20%以上、または約50%以上、比較レベルと異なる場合は、比較レベルから増加したレベルもしくは減少したレベル、または比較レベルからの変化もしくは逸脱が存在するとみなすことができる。本発明の文脈において、「比較レベル」とは、好ましくは、第1時点において得られる自己抗体のレベルを指す。

【0070】

あるいは、統計的有意性 (Statistically significant) を $P = 0.05$ として計算してもよい。対照に存在しないマーカーの存在は、より高いレベルまたは変化もしくは逸脱とみることができる。対照に存在するマーカーの非存在は、より低いレベルまたは変化もしくは逸脱とみることができる。

【0071】

免疫抑制治療ならびに対症処置では、特発性膜性腎症を処置するために使用されている現行の処置を使用することができる。

【0072】

典型的には、特発性膜性腎症、とりわけ特発性膜性腎症の重症例に使用されている現行の処置は、免疫抑制治療である。前記免疫抑制治療は典型的には、シクロスポリン、タクロリムス、アザチオプリン、インフリキシマブ、オマリズマブ、ダクリズマブ、アダリムマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブおよびラパマイシン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ならびにリツキシマブからなる群より選択される少なくとも1つの化合物の投与に基づく。

【0073】

10

20

30

40

50

好ましくは、特発性膜性腎症の処置は、シクロホスファミド、クロラムブシル、タクロリムス、およびリツキシマブの使用に基づく。

【0074】

対症処置は、典型的には、レニン・アンジオテンシン系の遮断に基づく。

【0075】

したがって本発明は、処置に付される患者の反応を実務家が予測する手段になりうる手段を提供する。

【0076】

典型的には、CysR、CTLD1およびCTLD7に対する自己抗体のレベルの少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より一層好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より一層好ましくは少なくとも70%、さらにより一層好ましくは少なくとも80%の減少が観察される場合、処置は有効とみなされる。これは、一般に、予後良好を示す。

10

【0077】

逆に、第1時点において存在しなかったCTLD1および/またはCTLD7に対する自己抗体が第2時点において検出される場合、処置は無効であるとみなされる。さらに、第1時点と第2時点との間で、レベルが安定しているか、CTLD1および/またはCTLD7に対する自己抗体の初期レベルの少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より一層好ましくは少なくとも30%、さらにより一層好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より一層好ましくは少なくとも70%、さらにより一層好ましくは少なくとも80%またはそれ以上増加している場合も、処置は無効であるとみなされる。

20

【0078】

典型的には、エピトーププロファイルに基づく群間の差はログ・ランク検定で、典型的にはPrism6およびSAS9.3ソフトウェアを使って分析され、 p 値 < 0.05 が統計的に有意とみなされる。

【0079】

いくつかの状況が観察されうる。

【0080】

一実施形態では、第2時点においてCTLD1および/またはCTLD7に対する自己抗体が検出されない。これは患者が寛解期にあると考えられることを示している。

30

【0081】

別の一実施形態では、安定したレベルの、CysRに対する自己抗体が、第2時点において観察されるか、第1時点および第2時点において得られるレベルが、統計分析分散内で比較的類似しており、両者間の偏差は、およそ1~5%の偏差、好ましくは1~3%の偏差である。これは、患者が寛解期にあると考えられることを示している。

【0082】

別の一実施形態では、安定したレベルの、CTLD1および/またはCTLD7に対する自己抗体が観察される。すなわち、第1時点および第2時点において得られるレベルは統計分析分散内で比較的類似しており、両者間の偏差はおよそ1~5%の偏差、好ましくは1~3%の偏差である。これは安定した疾患を示し、この場合、処置は、その継続期間が不十分であった(したがって、その処置は継続されるべきであるか、または臨床的適応があれば、別のタイプの免疫抑制剤に変えるべきである)か、または処置は無効である。

40

【0083】

別の一実施形態では、第2時点において、第1時点と比較して増加したレベルの、CTLD1および/またはCTLD7に対する自己抗体が観察される。これは、疾患の悪化および/または効率のよい処置の欠如を示す。少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも100%、より一層好ましくは少なくとも200%の増加は、状況の悪化および不良な予後を示すとみなされる。

50

【0084】

本発明によれば、第1時点より後の第2時点が選ばれる。第1時点および第2時点は、例えば治療戦略に関して、および特発性膜性腎症を発症するリスクがある患者、または膜性腎症、特に特発性膜性腎症を既に患ったことがあり、再燃のリスクがある患者の経過観察のために、戦略的に選ばれうる。

【0085】

例えば、第1時点は患者に何らかの処置を施行する前であることができ、第2時点は、処置が効果を示すべき時期または処置の終了時に置くことができるだろう。また、アッセイは、その後も繰り返されうる。

【0086】

したがって、アッセイは数回再現することができ、自己抗体レベルは3つ以上の時点において評価されうる。基本的に、患者の健康の改善および処置の有効性は、その間に、抗自己抗体のレベル、とりわけCTL D1および/またはCTL D7に対する自己抗体のレベルの、大幅な減少(global decrease)が観察される場合に示される。

【0087】

逆に、患者の健康の劣化および処置の無効性は、その間に、CTL D1および/またはCTL D7に対する自己抗体レベルの減少が観察されないか、大幅な増加(global increase)が観察される場合に示される。

【0088】

使用されるアッセイは、異なる時点において対象から収集されたすべての生物学的試料について、同一である。

【0089】

無効な処置であった場合は、治療戦略を適合させる必要がある。

【0090】

特発性膜性腎症を診断する方法

第4の側面において、本発明は、対象における膜性腎症、特に特発性膜性腎症を診断するための方法であって、前記対象から得られた生物学的試料において、

- PL A 2 R 1のシステインリッチドメイン(C y s R)に対する自己抗体、および/または
 - PL A 2 R 1のC型レクチンドメイン1(CTL D 1)に対する自己抗体、および/または
 - PL A 2 R 1のC型レクチンドメイン7(CTL D 7)に対する自己抗体
- からなる群より選択される少なくとも1つの自己抗体を検出するステップa')を含み、PL A 2 R 1のC y s R、CTL D 1、および/またはCTL D 7に対する自己抗体のうちの一つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つの存在は、膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症を示す方法に関する。

【0091】

一実施形態において、前記ステップa')は、以下のサブステップを含む：

- 前記患者から得られた生物学的試料をPL A 2 R 1と接触させるサブステップ、および
- 形成された任意の抗原-抗体複合体を検出するサブステップ。

【0092】

この実施形態において、形成された抗原-抗体複合体の存在は、膜性腎症、好ましくは特発性膜性腎症を示す。

【0093】

好ましくは、前記PL A 2 R 1は、ヒトPL A 2 R 1、ウサギPL A 2 R 1およびマウスPL A 2 R 1からなる群より選択される。

【0094】

以前に開示された技術データはいずれも適用可能である。

【0095】

10

20

30

40

50

本明細書において使用する用語「診断」は、その文法形のいずれにおいても、医学的状態または無症候性の状態を同定するためのプロセスを指す。本発明の文脈において、診断という用語は、特発性膜性腎症を患っている対象の同定を指す。

【0096】

好ましくは、本明細書において開示される方法は、インビトロ法である。

【0097】

以下の実施例によって本発明をさらに例証する。ただし、決して、これらの実施例が本発明の範囲を限定していると解釈してはならない。

【実施例】

【0098】

実施例1：PLA2R1におけるエピトープスプレディングは膜性腎症における予後不良と関連する

方法

患者

フランスの腎センター5箇所から、生検で確定診断されたiMNを持つ患者の血清を収集した。iMNは、抗核抗体に関する陽性、B型もしくはC型肝炎、がんまたは他の免疫病（クリオグロブリン血症、サルコイドーシス、移植片対宿主病など）の病歴などといった続発性MNの特徴が存在しないことによって定義した。合計69人の患者から血清を収集し、16人の患者については逐次血清試料採取を行った。不良な腎予後は、KDIGOの推奨によって定義されるとおり、タンパク尿 $> 4 \text{ g/g}$ および/または30%を超える血清中クレアチニン増加および/または $\text{eGFR} < 45 \text{ ml/分/1.73m}^2$ によって定義した。活動性疾患は腎炎性タンパク尿 $> 3.5 \text{ g/g}$ によって定義した。腎不全の進行は、2年間の経過観察後に分析して、ベースラインからの30%を超える血清中クレアチニンの増加によって定義した。

【0099】

膜結合型PLA2R1欠失突然変異体の作成および発現

本発明者らはPCRによって一連のヒトPLA2R1欠失突然変異体を作成し、それらを、野生型ヒトPLA2R1 (GenBank NM 007366) について以前に記載されたように、pLPCX発現ベクター（クロンテック (Clontech)）にクローニングした。欠失突然変異体はPhusion Site-Directed Mutagenesis Kit (サーモサイエンティフィック (Thermo scientific)) を使って作成した。突然変異体はいずれも、PLA2R1シグナルペプチド (Met-1~Ala-20) およびN末リンカー配列 (Ala-21~Trp-35) を含み、その後ろに以下のドメインがリンカー領域において欠失しているPLA2R1配列が続いていた：N末ドメインCysRの欠失 (C、Gln-36~Asp-165までの欠失)、CysRドメインおよびFNIIドメインの欠失 (F、Gln-36~Thr-223)、CysR~CTLD1ドメインの欠失 (1、Gln-36~Tyr-357)、CysR~CTLD2ドメインの欠失 (2、Gln-36~Ala-504)、CysR~CTLD3ドメインの欠失 (3、Gln-36~Pro-660)、CysR~CTLD4ドメインの欠失 (4、Gln-36~Lys-805)、CysR~CTLD5ドメインの欠失 (5、Gln-36~Lys-947)、CysR~CTLD6ドメインの欠失 (6、Gln-36~His-1105)、およびCysR~CTLD7ドメインの欠失 (7、Gln-36~Pro-1235)。すべての突然変異体を、pGEMTEasyベクター（プロメガ (Promega)）にクローニングされたC末HAタグ付き (YPYDVPDYA) バージョンのヒト完全長PLA2R1 cDNAから作成した。全配列決定後に、すべての欠失コンストラクトをpLPCXレトロウイルスベクターにサブクローニングし、Ca/P04トランスフェクションキット（インビトロジェン (Invitrogen)）またはExgen (Biomol GmbH) を使って、HEK293細胞中にトランスフェクトした。一過性にトランスフェクトされたHEK293細胞溶解物から、ウェスタンブロットにより、抗HA抗体を使って発現を

10

20

30

40

50

確認した（下記参照）。

【0100】

PLA2R1の可溶性ドメインの作成および発現

可溶性PLA2R1突然変異体を上述のようにPCRによって作成し、pcDNA3.1Z-発現ベクター（ライフテクノロジーズ（Life Technologies））にクローニングした。それらはすべてPLA2R1シグナルペプチドを含み、その後ろに、次のとおり、異なるPLA2R1ドメインをコードするヒトPLA2R1配列が続いていた：CysRドメイン（CysR、Ala-21~Lys-164まで）、CTLD1ドメイン（CTLD1またはC1、Thr-223~Asn-359）、CTLD2~CTLD8（C2C8、357-Tyr~1397-Ser）、CTLD6~CTLD8（C6C8、947-Lys~1397-Ser）、CTLD6（C6、947-Lys~1114-Pro）、CTLD7（C7、Glu-1097~1246-Leu）、CTLD8（C8、Pro-1235~1397-Ser）、CTLD6~CTLD7（C6C7、947-Lys~1246-Leu）、およびCTLD7~CTLD8（C7C8、Glu-1097~1397-Ser）。すべての可溶性突然変異体のC末にHAタグを付けた。CysR-FNII-CTLD1ドメインは、ドメインのC末にHAタグが付けられている点以外はKaoraが記載したとおりに生産し、トロンピン（シグマ（Sigma））で切断した。すべての突然変異体を上述のようにHEK293細胞中で発現させ、発現したタンパク質を含有する細胞培地を収集した。タンパク質の発現レベルが低い場合は、標準的手順を使って、培地をトリクロロ酢酸で沈殿させた。

10

20

【0101】

DsbC-His-HA-PLA2R1融合タンパク質は、本質的に記載されているように大腸菌中で生産した。詳細な手順は別途公表する。大腸菌発現用に最適化されたコドンを持つPLA2R1ドメインを、精製用および検出用にそれぞれHisタグおよびHAタグが後続しているリーダーレスDsbCオープンリーディングフレームと、インフレームに付加した。挿入されたPLA2R1ドメインの配列は、CysR：Ala-26~Lys-164、CTLD1：Thr-223~Asn-359、CTLD7：Thr-1102~Glu-1237、CTLD6-7：947-Lys~Glu-1237であった。CTLD1の一塩基多型（SNP：single nucleotide polymorphism）変異体も4種類、設計した。SNP1：Val-292およびAsp-300、SNP2：Met-292/Asp-300、SNP3：Met-292/His-300、ならびにSNP4：Val-292/His-300。

30

【0102】

ウェスタンブロット分析

さまざまな欠失突然変異体および可溶性のPLA2R1を、別段の表示がある場合を除き、非還元条件下で、SDS-PAGEによって分析した。全タンパク質（各欠失突然変異体の異なる発現レベルを調節するために10~50μg/ウェル）および細胞培地（トランスフェクトされた可溶性の場合）を4~15%プレキャストTGX SDS-PAGEゲル（バイオ・ラッド（Bio-Rad））で泳動し、メタノールに浸漬したPVDFメンブレンに、Trans-blot Turbo（バイオ・ラッド）を使って25V定電圧で12分間、セミドライ条件下で転写した。PBS-Tween（PBS-T）0.05%を使って5%ミルク中、4で一晩、メンブレンをブロッキングした後、一次抗体および二次抗体と共に室温で2時間インキュベートした。一次抗体はPBS-T中の0.5%粉乳で希釈した。メンブレンは複製を複数調製し、発現を検証するために1:5,000のマウスモノクローナル抗HA抗体（シグマ）によってプローブするか、エピトーププロファイルについてスクリーニングするために、抗PLA2R1価に応じて1:25~1:500の作業希釈度で、50の異なるiMN血清によってプローブした。抗HA用の二次抗体は、PBS-T中に1:20,000希釈したヤギ抗マウスIgG（サザンバイオテック（Southern Biotech）#1030-05）であった。iMN血清用のIgG二次抗体は、PBS-T中に1:30,000希釈したHRPコンジュゲ-

40

50

トマウス抗ヒトIgG4 (サザンバイオテック#9200-05)であった。抗PLA2R1 IgGサブクラス分析(補足データ参照)のために、本発明者らは、サザンバイオテックのサブクラス特異的抗IgGパネルおよび2つの異なる抗トータルIgG(サザンバイオテックおよびサンタクルズ(Santa Cruz))も使用した。IgGサブクラス特異性を検証するための精製IgGはFitzgeraldから入手した。一次抗体および二次抗体とのインキュベーション後に、メンブレンをPBS-T中で5分間ずつ3回洗浄した。タンパク質バンドの検出は、化学発光基質(ミリポア(Millipore))およびFuji LAS3000イメージャーを使って行った。

【0103】

抗PLA2R1 ELISA

抗PLA2R1アッセイは本質的に標準化された市販のELISAについて記載されているとおりに行った。全細胞外ドメインに相当する純粋な組換えヒトPLA2R1タンパク質を、20mM Tris pH8.0中(100 μ L/ウェル、1 μ g/mL)、4で、一晚、ELISAプレートにコーティングした。プレートをSeramunBlock(Seramun Diagnostica)で2時間ブロッキングした。患者の血清をPBS/0.1%粉乳に1:100(または必要に応じてそれ以上)希釈し、二つ組にして、iMN標準血清の段階希釈液および(プレート間の)品質管理用較正物質も入っているELISAプレートに加えた(1ウェルあたり100 μ L)。プレート振とう機上、室温で2時間のインキュベーション後に、プレートをPBS/0.02% Tween 20で4回洗浄し、SeramunStab ST plusに1:7,500希釈した抗ヒトIgG4-セイヨウワサビペルオキシダーゼコンジュゲート(サザンバイオテック#9200-05)を加え(1ウェルあたり100 μ L)(Seramun Diagnostica)、プレート振とう機上、室温で1時間インキュベートした。4回の洗浄後に、テトラメチルベンジジンを加え、反応を15分間進行させた後、HCl 1.2Nで反応を停止した。プレートを450nmで読み取った。健常ドナーから得た67の血清を使用し、平均+3SDを使って、正常範囲を画定した。カットオフは、受信者動作特性(ROC: receiver operating characteristics)曲線分析によって最適化した。標準曲線および陰性対照を作成するために、各プレートにおいて、高陽性インデックス患者血清を使用した。

【0104】

可溶性のPLA2R1を使ったELISA

プレートを、20mM Tris pH8.0に1:5,000希釈した抗HA抗体(シグマ)(100 μ L/ウェル)を使って、4で一晚、コーティングした。次に、プレートをSeramunBlock(Seramun Diagnostica)で2時間ブロッキングした。次に可溶性のPLA2R1をトランスフェクトしたHEK293細胞からの細胞培地(タンパク質発現量に応じて10~100 μ L/ウェル)または精製大腸菌Dsbc-HA-CTLD1融合タンパク質(50ng/ウェル)を加え、1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、iMN標準血清の段階希釈液および(プレート間の)品質管理用較正物質も入っているELISAプレートに、PBS/0.1%粉乳に1:100(または必要に応じてそれ以上)希釈した患者の血清を、二つ組にして加えた(1ウェルあたり100 μ L)。プレート振とう機上、室温で2時間インキュベートした後、プレートをPBS/0.02% Tween 20で4回洗浄した。SeramunStab ST plus(Seramun Diagnostica)に1:7,500希釈した抗ヒトIgG4-セイヨウワサビペルオキシダーゼ(サザンバイオテック#9200-05)を加え(1ウェルあたり100 μ L)、プレート振とう機上、室温で1時間インキュベートした。サブクラス分析は上に示したように特異的抗IgGで行った。4回の洗浄後に、テトラメチルベンジジンを加え、反応を15分間進行させてから、HCl 1.2Nで反応を停止した。プレートを450nmで読み取った。健常ドナーから得た20の血清を使用し、平均+3SDを使って、正常範囲を画定した。カットオフは、受信者動作特性(ROC)曲線分析によって最適化した。標準曲線および陰性対照を作成するた

10

20

30

40

50

めに、各プレートにおいて、高陽性インデックス患者血清を使用した。

【0105】

患者または正常対象について、次のようにして、各抗原に関するELISAインデックス値を得た（平均試験結果 - 平均ドメイン陰性対照） / （平均ドメイン陽性対照 - 平均ドメイン陰性対照） × ドメイン補正因子 × 100。ドメイン補正因子は、Warrenら2003に記載されているように、各ドメインについて、すべてのプレート上の当該ドメインに関するすべての陽性対照の平均から陰性対照の平均を引き、それを当該ドメインアッセイに関するカットオフで割ったものとして決定した。

【0106】

統計分析

記述統計のために、データを平均 ± 標準偏差（ガウス分布を持つ変量の場合）またはメジアン（範囲）（非ガウス分布を持つ変量の場合）として表す。或る変量がガウス分布を有するかどうかを決定するために、本発明者らはシャピロ・ウィルク検定を使用した。定性的変量は、カイ二乗検定またはフィッシャーの正確確率検定を、使用条件に従って使用することによって比較した。定量的変量はスチューデントt検定またはウィルコクソン・マン・ホイットニー検定（非ガウス分布を持つ変量の場合）を使って比較し、多重比較には通常の一元配置ANOVA（ガウス分布を持つ変量の場合）、クラスカル・ウォリス検定（非ガウス分布を持つ変量の場合）およびテューキーの検定（2つずつの比較の場合）を使用した。不良な予後は、LOC F時に、KDIGOによって定義されるとおり、タンパク尿 > 4g / g および / または 30% を超えて増加した血清中クレアチニンおよび / または eGFR < 45 ml / 分 / 1.73 m² によって定義した。腎生存に関する生存曲線は、生存分布のカプラン・マイヤー推定値を使って計算した。腎生存分析の終点は、本発明者らが血清中クレアチニンに30%を超えるベースラインからの増加を観察した時とした。エピトーププロファイルに基づく群間の差は、ログ・ランク検定で分析した。多変量cox回帰分析を行った。分析では、予後に影響を及ぼすかもしれないすべての臨床パラメータ（年齢、性別、タンパク尿、クレアチン血症、免疫抑制処置および抗PLA2R1価）を含め、調節した。ハザード比は、ELISAによって測定されたPLA2R1抗体レベルの自然対数単位によって表され、性別、処置、および異なるドメイン群で二分される。統計処理はすべてPrism6およびSAS9.3ソフトウェアを使って行った。P値 < 0.05を統計的に有意とみなした。

【0107】

結果

3つのエピトーププロファイルの同定

本発明者らはまず、部位特異的突然変異導入によって、一連の、PLA2R1の欠失突然変異体、9種類を作成し、ここでは、膜結合型の受容体が残るように、各ドメインをN末端配列から逐次的に欠失させた。本発明者らは細胞質テールに小さなHAタグを導入した。この小さなHAタグにより、本発明者らは、HEK293細胞における組換えタンパク質の発現を検証することが可能になった。抗HA抗体では不十分にしか検出されなかったが一部の患者では明らかに検出された6を除いて、すべてのPLA2R1コンストラクトが容易に発現した。次に、本発明者らは、抗PLA2R1抗体を持つ50人のiMN患者からの血清を、野生型タンパク質と欠失突然変異体に対するそれらの反応性について、スクリーニングした。本発明者らは、患者をIgG4抗PLA2R1サブクラスについてスクリーニングすることにした。なぜなら、IgG4はiMNにおける主要なIgGサブクラスであって、疾患活動度と最も相関することが、多くの研究によって示されているからである。CysR、CTLD1およびCTLD7の逐次的欠失は、まず12人の患者、次にさらに11人の患者、そしてさらに27人の患者での、PLA2R1認識の漸進的喪失につながったことから、これら3つのドメインのそれぞれの中の相異なるエピトープに対応すると思われる3つのエピトーププロファイルが同定された。

【0108】

CysRドメインとCTLD1ドメインは、2つの異なる抗PLA2R1自己抗体によ

10

20

30

40

50

って認識される相異なるエピトープを含んでいる

Fresquetらは、最近、CysRドメインだけが抗PLA2R1エピトープを含んでいると記載したのに対し、Kaorらは、CysRドメインとCTLD1ドメインとの間に1個または数個のエピトープが織り込まれていることを示唆した。本発明者らの上記のデータは、むしろ、CysRドメイン中およびCTLD1ドメイン中に2つの独立したエピトープが存在することを示唆している。この仮説を確認するために、本発明者らは、HEK293細胞または大腸菌のどちらかにおいて、HAタグ付きで可溶性のCysRドメインのみおよびCTLD1ドメインのみの発現を駆動する、4つのコンストラクトを設計した。本発明者らは、Kaorらによって記載された2つのコンストラクトも調製した。これら2つのコンストラクトでは、3つのドメインCysR、FNIIおよびCTLD1が一緒に発現され(トリプルドメイン)、CysRとFNIIとの間またはFNIIとCTLD1との間のリンカー領域のどちらかにトロンビンプロテアーゼ部位が挿入されている。HEK293細胞におけるCTLD1のみの発現は極めて低く(データ省略)、Kaorらによる過去のデータと合致した。他方、CysRドメインのみは、HEK293細胞において、低い有意なレベルで発現し、Fresquetらによるデータと合致した。HEK293細胞における2つの単一ドメインの弱い発現を回避するために、本発明者らはそれらが大腸菌中でHAタグ付きDsbC融合タンパク質として生産し、可溶性の折りたたまれたCysRタンパク質およびCTLD1タンパク質を精製した。その場合、本発明者らは、非還元条件下でのウェスタンブロットにより、抗HA抗体で、容易にタンパク質を検出することができた。Kaorらによる2つのコンストラクトについては、CysRとFNIIとの間にトロンビン部位を持つ第1コンストラクトだけが、HEK293細胞中で十分に発現し、トロンビンによる切断前および切断後に、抗HAで検出することができた。重要なことに、切断後に抗HAで標識されたバンドは、切断されたFNII-CTLD1-HAドメインに相当し、HAタグを有しない切断されたCysRドメインではなかった。要約すると、4つのコンストラクトを得て、それらを抗HA抗体によるウェスタンブロットで検証することができた。HEK293細胞では、CysRドメインのみおよびCysR-FNII-CTLD1トリプルドメインが発現し、大腸菌では、CysRドメインおよびCTLD1ドメインが、単一ドメインとして発現した。次に本発明者らは、CysRプロファイルを持つ患者1からの血清、ならびにCTLD1プロファイルを持つ患者2および患者3からの血清を、これらのコンストラクトに対して、ただしトリプルドメインはトロンビンで切断して、またはトロンビンで切断せずに、試験した。患者1からの血清は、CysRドメインを含むコンストラクトだけを、そしてそれが、DsbC融合タンパク質として単独で発現するか、トリプルドメインとして発現した場合(ただし、トロンビンによる切断後を除く)にのみ、またはCysR-HAドメインを単独でロードした場合にのみ、認識することができた。実際には、CysR-HAドメインは、還元条件下では抗HA抗体で検出できたが、還元条件下では抗HA抗体で検出できなかったことから、CysRドメインには、単独では、本発明者らの条件下でウェスタンブロットPVDフメンブレンに適正に移行できるほど十分な疎水性がなく(同様の結果がニトロセルロースメンブレンでも観察された)、したがって患者の抗CysR抗体では検出できないことが示唆される。他方、患者2および患者3からの血清は、DsbC融合タンパク質として単独で発現させた、またはトリプルドメインとして発現させた(この場合は、FN-CTLD1ドメインに関して、トロンビンで切断したもの、またはトロンビンで切断していないもの)、CTLD1ドメインとCysRドメインとの両方を含むコンストラクトを認識することができた。興味深いことに、これら2つのドメインに対する相対的シグナルは異なっていた。これはおそらく、これら2つの患者血清における抗CysR自己抗体と抗CTLD1自己抗体のそれぞれの力価が異なるからだろう。これらの結果を確認するために、本発明者らは、すべての抗原中に存在するHAタグを利用して、抗HA抗体で予めコーティングされたウェルにそれらをアフィニティー捕捉するELISAを設定した。どの条件でも、抗HAまたは抗原を省略した場合には、シグナルは得られなかった。このELISAデータは、ウェスタンブロットと完全に一致しており、はるかに高感度かつ定量的で

10

20

30

40

50

あった。予想どおり、患者1は、CysRドメインおよびトロンピンで切断されていないCysR-FNII-CTLD1トリプルドメインを認識したが、単独で発現されたCTLD1ドメインと、トロンピンで効率よく切断されたCysR-FNII-CTLD1トリプルドメイン（これは、実際には、抗HA被覆ウェルに結合することができず洗い流される遊離のCysRドメインを生成し、一方、対応するFNII-CTLD1-HAドメインはウェルに結合することになる）は、どちらも認識しなかった。本発明者らは、ウェスタンブロットから、患者2および患者3からの血清は、CysRドメイン中およびCTLD1ドメイン中の異なるエピトープに対する2つの異なる自己抗体を有し、おそらく、患者2ではCysRに対する力価の方が高く、患者3ではCTLD1に対する力価の方が高いと推論した。この見解は、患者2ではCTLD1よりCysRでのシグナルの方が高く、かつトロンピン切断後のトリプルドメインではシグナルがなく、患者3では逆の結果であるというELISAデータによって、明確に確認された。CysRまたはCTLD1を標的とする2つの異なる自己抗体の存在をさらに明示するために、本発明者らは、i) 枯渇実験（ここでは、本発明者らは、患者2の血清（CysR自己抗体およびCTLD1自己抗体を含有する）を、CysRドメインまたはCTLD1ドメインのどちらかがロードされた抗HAビーズ上に予め吸収させ、フロースルー画分を、ここでもCysRドメインおよびCTLD1ドメインがロードされたウェスタンブロットにおいて、反応性について分析した）、およびii) 競合実験（ここでは、本発明者らは、患者2の血清を、大腸菌からの過剰量のCysRドメインまたはCTLD1ドメインと共に、プレインキュベートしてから、CysRドメインおよびCTLD1ドメインがロードされたウェスタンブロットにおいて、血清をプローブした）を行った。

10

20

30

40

50

【0109】

最後に、本発明者らは、大腸菌中で発現させたCysRドメイン、CTLD1ドメインおよびCTLD6-7ドメインを使って、完全長PLA2R1に対する競合実験を、ELISAによって行い、上記の結果と完全に一致するデータを観察した。CysR抗原は、CysRプロファイルを持つ2人の患者の血清についてはELISAシグナルを完全に遮断することができたが、CTLD1プロファイルを持つ他の2人の患者からの血清についてはELISAシグナルを部分的にしか遮断できなかった。これと一致して、CTLD1抗原との競合は、CysR血清についてはシグナルを阻害しなかったが、CTLD1血清のシグナルは部分的に阻害し、一方、それら2つの抗原の組合せは、PLA2R1シグナルを完全に阻害した。最後に、CTLD67の添加は、それだけでは効果がなかったことから、この抗原はCysRドメインおよびCTLD1ドメインを標的とする抗PLA2R1抗体の相互作用を妨害できないことが明示された。総合すると、この一連の実験は、一方はCysRを認識し、他方はCTLD1を認識する、2つの自己抗体の存在を明確に示している。これらの実験は、CysRドメインとCTLD1ドメインが2つの異なる自己抗体によって独立して認識されうる相異なるエピトープを呈し、それら2つの自己抗体は異なる患者の血清には異なる力価で存在することも、極めて明確に示している。本発明者らは、以前に記載されたSNPの4つの可能な組合せを持つDsbC-HA-CTLD1ドメインも生産したが、CTLD1プロファイルまたはCTLD7プロファイルのどちらか一方を持つ2人の患者からの血清ではシグナルに相違は観察されなかった。本発明者らは、非還元条件下でのウェスタンブロットとの対比で還元条件下でのウェスタンブロットも行った。本発明者らは、CysRおよびCTLD1に対する抗PLA2R1抗体の反応性が、これらのドメイン中に存在するジスルフィド結合に依存することを明示する。

【0110】

CTLD7は抗PLA2R1抗体によって認識される第3のエピトープを含む
PLA2R1細胞外領域中の第3の、より遠位にあるエピトープを示唆する初期の結果を確認するために、そしてまた、このエピトープがPLA2R1の他のドメインとは独立していることを明示するために、本発明者らは、CysRドメイン、FNIIDドメインおよびCTLD1ドメインから切り離された一連の可溶性PLA2R1を設計した。本発明者らは、CTLD7に収れんする合計8つのコンストラクト、すなわちCTLD2~CT

LD8 (C2C8)、CTLD2~CTLD6 (C2C6)、CTLD6~CTLD8 (C6C8)、CTLD6~CTLD7 (C6C7)、CTLD6 (C6)、CTLD7 (C7)、CTLD7~CTLD8 (C7C8)、そして最後にCTLD8 (C8)を調製した。これらのコンストラクトはいずれもHAタグを有し、本発明者らは、HEK293細胞におけるそれらの発現を、還元条件下での抗HA抗体によるウェスタンブロットによって確認することができた。しかし非還元条件下での抗HAによる検出は、とりわけCTLD7に絞り込んだ短い可溶性の場合は、より困難であった。それはおそらく、CTLD7およびその隣接ドメインの極性が高く(おそらくは可溶性の移動度から証明されるように高度のグリコシル化による)、非還元条件下では十分に移行しないからであろう(示さず)。この見解は、おそらく、CTLD7プロファイルを有する患者4は、C2C8可溶性およびC6C8可溶性を認識することができたが、それより短いコンストラクトは認識することができなかったという事実の説明になる。それでもなお、この患者が、CysRドメインとCTLD1ドメインとを欠くC2C8およびC6C8を認識するという事実は、C6C8が、CysRおよびCTLD1に依存しない第3の抗PLA2R1エピトープを含んでいることを明確に示している。この移行の問題を克服するために、本発明者らは、CysRおよびCTLD1について上で行ったような抗HA ELISAアッセイを使って、さまざまな可溶性コンストラクトをプローブした。本発明者らは、CTLD7ドメインを含むコンストラクトは、CTLD7だけを含むコンストラクトでさえ、CTLD7プロファイルを持つ患者4および患者5からの血清によって十分に認識されることを観察した。陰性対照として、本発明者らは、予想どおりどのコンストラクトも認識しない患者1からの血清を使用した。総合すると、これらのデータは、CTLD7中に第3の独立したエピトープが存在し、対応する自己抗体はCTLD7プロファイルを持つ患者からの血清中にのみ存在することを明示している。CysRおよびCTLD1に関する上記と同様に、本発明者らは、非還元条件下でのウェスタンブロットとの対比で還元条件下でのウェスタンブロットを行った。本発明者らは、CTLD7に対する抗PLA2R1抗体の反応性がこのドメイン中に存在するジスルフィド結合に依存することを明示する。

10

20

30

40

【0111】

CysR、CTLD1およびCTLD7を抗原とする3つの特異的ELISAの設定
上記の結果に基づいて、本発明者らは、CysRドメイン、CTLD1ドメインおよびCTLD7ドメインを標的とする自己抗体を特異的に測定するために、3つのELISAを設定した。本発明者らは、抗原として、HEK293細胞中で生産されたCysRドメイン、大腸菌中で生産されたCTLD1ドメイン、そしてCTLD6-7はCTLD7単独よりも大量に生産することが容易であったのでHEK293細胞中で生産されたCTLD6-7を使用した。上記のように、HEK細胞中で生産された2つの抗原ドメインは、抗HA抗体で予めコーティングされているELISAプレートにHAアフィニティー捕捉し、一方、大腸菌からのCTLD1ドメインは、直接コーティングするか、抗HAで捕捉した。次に、吸着させた抗原を患者の血清と共にインキュベートしてから、ペルオキシダーゼとカップリングされた二次抗IgG4抗体による検出を行った。本発明者らは、69人のPLA2R1陽性iMN患者のコホート(下記表1)と20人の健常ドナーとを使って、3つのELISAを検証し、エピトープ特異的力価を測定した。69人のiMN患者のコホートは、50人の血清スクリーニング症例と19人の追加症例とを含んだ。

【0112】

【表 1】

表1:この試験に登録された患者の臨床的特徴

診断時の年齢(歳)	55±15	
性別(男/女)	54/15	
診断時のタンパク尿(g/g)	5.0(1.4-24.0)	
診断時の血清クレアチニン($\mu\text{mol/L}$)	99(43-385)	
診断とPLA2R1アッセイとの間の月数	0(0-100)	
抗PLA2R1価(ELISAインデックス値)	3241(210-50817)	10
PLA2R1アッセイ時のタンパク尿(g/g)	4.0(0.3-24.0)	
PLA2R1アッセイ時の血清クレアチニン($\mu\text{mol/L}$)	94(43-600)	
PLA2R1アッセイ前に処置を受けた患者 ¹	6(9%)	
経過観察中に処置を受けた患者 ¹	41(59%)	
LOCF ² (月数)	36(12-216)	
LOCF時のタンパク尿(g/g)	2.0(0.0-20.0)	
LOCF時の血清クレアチニン($\mu\text{mol/L}$)	119(48-926)	
自然寛解 ³	18(26%)	
LOCF時の不良な予後 ⁴	31(45%)	20
血液透析 ⁸	12(17%)	

正常値は平均±標準偏差である;非正常値はメジアン(範囲)である;定性的値は数(%)である。

¹免疫抑制処置による処置。すべての患者が対症処置を受けた。

²LOCF:最終観察繰越

³自然寛解は、免疫抑制処置なしの対症処置(RAS遮断薬および利尿薬)で誘発される寛解によって定義される。

⁴LOCF時の不良な腎予後は、タンパク尿 $>4\text{g/g}$ および/または30%を上回って増加した血清クレアチニンおよび/または $\text{eGFR} < 45\text{ml/分/1.73m}^2$ によって定義される。血液透析を受けているESKD患者。

【0113】

患者は全員、臨床的に詳しく特徴づけられ、完全長PLA2R1を抗原として使用するELISAで抗PLA2R1に関して陽性であった(表1)。大半の患者は、診断時に、ネフローゼ域のタンパク尿(3.5g/g を上回る尿タンパク質/クレアチニン比(UACR))を有し(74%)、ELISAおよびウェスタンブロットによるPLA2R1アッセイの時点で、免疫抑制処置を受けたことがなかった(91%)。患者はPLA2R1アッセイから36ヶ月の平均経過観察期間を有した。すべての患者が対症処置を受けた。18人の患者はRAS遮断下で寛解に入った。36人の患者は免疫抑制処置を受け、21人が寛解に入った。本発明者らは、患者の腎アウトカムを分析し、KDIGOに従って不良な腎予後を、最終観察繰越(LOCF: last observation carried forward)時の $\text{UACR} > 4.0\text{g/g}$ および/または30%を上回る血清中クレアチニンの増加および/または推定糸球体濾過量(簡易MDRD式を使った $\text{eGFR} < 45\text{ml/分/1.73m}^2$)の存在と定義した。12人の末期腎臓病(ESKD: end-stage kidney disease)患者を含めて、31人の患者は、経過観察の最後に不良な腎アウトカムを有した。本発明者らは、抗PLA2R1アッセ

イの24ヶ月後の腎生存も分析し、ベースラインからの30%を上回る血清中クレアチニンの増加によって、イベントを定義した(表1)。

【0114】

1つを除いてすべての血清(n=68)が、ELISAによってCysRドメインを認識した。42の血清がCTLD1ドメインを認識し、32の血清がCTLD7ドメインを認識した。次に本発明者らは、患者を、それぞれのELISAパターンに基づいて、3つの群に分類した。

【0115】

23人の患者は、CysRドメインを標的とする抗体だけを有するので、「CysR群」と呼ばれる群に分類された。

10

【0116】

14人の患者は「CysRC1群」と呼ばれる群に分類され、そのうちの13人は、CysRドメインとCTLD1ドメインとの両方に対して活性を有し、1人はCTLD1に対する抗体だけを有した。

【0117】

最後に32人の患者は「CysRC1C7群」と呼ばれる群に分類され、そのうちの28人は3つのドメインCysR、CTLD1およびCTLD7を標的とする抗体を有し、4人の患者はCysR、CTLD7を標的とするが、CTLD1は標的としなかった。

【0118】

ウェスタンブロットによって最初にスクリーニングされた50人の患者を検討する際に、本発明者らは、ELISAデータとそれらのウェスタンブロットエピトーププロファイルとの間に、完全な一致を観察した。最後に、本発明者らは、CysRC1群およびCysRC1C7群では、CysR群の場合と比較して、CysR力価が有意に高いことを観察した。一方、CysRC1群とCysRC1C7群との間にCTLD1力価の差は観察されなかった。

20

【0119】

3つのエピトーププロファイルを持つ患者の臨床的特徴

本発明者らは、3つの群、すなわちCysR、CysRC1およびCysRC1C7の患者の臨床的特徴を比較した(表2)。

【0120】

30

【表 2】

表2:それぞれのエピトーププロファイルに従って層別化された患者の臨床的特徴および経過観察の比較

患者 ²	CysR 群 n=23	CysRC1 群 n=14	CysRC1C7 群 n=32	p 値 ³
診断時の年齢(歳)	48 +/-12	54 +/-16	61 +/-15	0.008
性別(男/女)	19/4	10/4	25/7	有意差なし
診断時のタンパク尿(g/g)	3.7 (2.0-10.8)	4.7 (1.4-15.0)	6.0 (2.5-24.0)	有意差なし
診断時の血清クレアチニン ($\mu\text{mol/L}$)	93 (54-134)	96 (43-150)	103 (59-385)	有意差なし
診断とPLA2R1アッセイとの間の 月数	0 (0-36)	1 (0-84)	0 (0-100)	有意差なし
抗 PLA2R1 アッセイ (ELISA インデックス値) ¹	3175 (394-8043)	1625 (367-5947)	4288 (210-50817)	有意差なし
PLA2R1アッセイ時のタンパク尿 (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アッセイ時の血清 クレアチニン($\mu\text{mol/L}$)	92 (45-149)	96 (43-280)	100 (59-926)	有意差なし
PLA2R1アッセイ前に処置を 受けた患者 ⁴	3/23	2/14	1/32	有意差なし
経過観察中に処置を受けた患者 ⁵	12/23	8/14	21/32	有意差なし
LOCF ⁵ (月数)	36 (12-201)	44 (12-133)	33 (12-216)	有意差なし
LOCF時のタンパク尿(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時の血清クレアチニン ($\mu\text{mol/L}$)	89 (55-181)	130 (57-297)	157 (48-600)	有意差なし
自然寛解 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

¹エピトーププロファイルアッセイと抗PLA2R1 ELISAアッセイは同じ血清試料で行われた。

²正常値は平均±標準偏差である;非正常値はメジアン(範囲)である;定性的値は数(%)である。

³連続(それぞれガウス分布または非ガウス分布の場合)変量についてはANOVAまたはクルスカール・ワリス検定、カテゴリー変量についてはカイ二乗検定またはフィッシャーの正確確率検定。

⁴免疫抑制薬による処置。すべての患者が対症処置を受けた。

⁵LOCF:最終観察繰越

⁶自然寛解は、免疫抑制処置なしの対症処置(RAS遮断薬および利尿薬)で誘発される寛解によって定義される。

⁷血液透析を受けているESKD患者。

3群の間で、性別、免疫抑制処置を受けている患者の数、および完全長PLA2R1を用いるELISAによって測定される抗PLA2R1抗体の力価に、統計的有意差はなかった。対照的に、本発明者らは年齢については有意差を観察し、CysR群の患者はCysRC1群およびCysRC1C7群の患者より有意に若かった ($p = 0.008$; 通常の一元配置ANOVA検定を使用)。診察時の平均年齢は、CysR群では48歳、CysRC1群では54歳、CysRC1C7群では61歳であった。

【0122】

PLA2R1検査時のタンパク尿は、CysR群では有意に低かった (表2、 $p = 0.018$; クラスカル・ウォリス検定を使用)。次に本発明者らは、血清試料採取時の患者のUACRに基づいて、患者を3つのサブグループ、3g/g未満 ($n = 22$)、3~5g/g ($n = 22$) および5g/g超 ($n = 25$) に分類し、完全長PLA2R1抗原、CysR抗原、CTLD1抗原およびCTLD7抗原を使って測定されるそれらのELISA力価を比較した。5g/g超のUACRを持つ群では、他の2つの群と比較して、抗CTLD7力価だけが有意に高かった (クラスカル・ウォリス検定を使用して $p = 0.006$)。さらにまた本発明者らは、タンパク尿の増加に伴うCTLD7力価の漸進的増加も観察した。

10

【0123】

3つのエピソード群における患者の進展

本発明者らのコホートでは、すべての患者がRAS遮断および/または利尿薬による対症処置を受け、41人の患者は免疫抑制処置を受けた (59%)。免疫抑制処置の使用およびメジアン経過観察期間は3つのエピソード群の間で差がなかった (それぞれ、カイ二乗検定を使って $n = 0.6$ 、クラスカル・ウォリス検定を使って $p = 0.24$)。

20

【0124】

CysR群 ($n = 23$) では、免疫抑制処置を受けた12人の患者のうち、10人が、 $45\text{ ml / 分 / }1.73\text{ m}^2$ 超のeGFRを伴う4g/g未満のUACRによって定義される寛解を達成し、2人だけが経過観察の最後に不良な腎予後 (UACR > 4g/gまたは $eGFR < 45\text{ ml / 分 (mn) / }1.73\text{ m}^2$) を有した。免疫抑制処置を何も受けなかった11人の患者のうち、10人は寛解に入り、診察時に既に顕著な腎不全を有していた1人の患者はLOC F時に不良な予後を有した。

30

【0125】

CysRC1群 ($n = 14$) では、免疫抑制処置を受けた8人の患者のうち、3人が寛解に入り、5人は不良な腎予後を呈した (1人の患者はESKDを発症した)。免疫抑制処置を何も受けなかった6人の患者のうち、4人は寛解に達し、2人は不良な腎予後を有した (1人の患者はESKDに入った)。この群では患者の50%が不良な腎予後を有した。

【0126】

CysRC1C7群 ($n = 32$) では、免疫抑制処置を受けた21人の患者のうち、8人が寛解を達成し (38%)、7人のESKD患者を含む13人がLOC F時に不良な腎予後を有した。免疫抑制処置を受けなかった11人の患者のうち、7人は診察時に既に腎不全を有し、4人は自然寛解に入った。

40

【0127】

本発明者らは、CysR群において、より多くの自然寛解を観察した (カイ二乗検定を使って $p = 0.03$)。ESKDは、CTLD1群およびCTLD7群ではそれぞれ2人および10人の患者に発症したが、CysR群の患者には発症しなかった (カイ二乗検定を使って $p = 0.01$)。

【0128】

最後に、2年間の経過観察後にベースラインから30%を上回る血清中クレアチニンの増加がない生存曲線分析は、CysRC1群およびCysRC1C7群の患者ではCysR群と比較して、腎不全進行の際立った増加を示した (ログ・ランク検定を使って $p = 0.0025$)。また、腎不全進行は、CysRプロファイルを持つ患者では、免疫抑制処

50

置を受けた患者33人のサブグループにおいて有意に遅かった（ログ・ランク検定を使って $p = 0.014$ ）。

【0129】

予後因子の同定

表3に要約するように、患者を、寛解群（ $n = 38$ ）と、KDIGOガイドライン（ $UACR > 4 \text{ g/g}$ または $eGFR < 45 \text{ ml/分/1.73m}^2$ ）に従って、経過観察の最後に不良な腎予後群（ $n = 31$ ）とに分割した。

【0130】

【表 3】

表 3：寛解に達した患者および最終観察繰越時に予後不良であった患者の臨床的ベースライン特徴、エピソードプロファイルおよび PLA2R1 抗体レベル

	寛解 n = 38	予後不良 n = 31	p 値 一変量
性別	9 F / 29 M	6 F / 25 M	有意差なし
年齢	50+ / -2.2	62+ / -2.6	0.0006
診断時のタンパク尿 (g/g)	4.45 (1.4 - 15.0)	5.2 (2.5 - 24.0)	有意差なし
診断時のクレアチン 血 ($\mu\text{mol/L}$)	88 (43 - 187)	113 (60 - 385)	0.0002
経過観察 (月数)	36 (12 - 216)	30 (12 - 158)	有意差なし
免疫抑制処置を受け た患者	21 (55%)	20 (64%)	有意差なし
CysR 群	20 (52%)	3 (10%)	0.0002
CysRC1 群	7 (18%)	7 (23%)	有意差なし
CysRC1C7 群	11 (30%)	21 (67%)	0.0013
PLA2R1 力価	2594 (210 - 44194)	5947 (424 - 50817)	0.04

正常値は平均±標準偏差である;非正常値はメジアン(範囲)である;定性的値は数(%)である。

試験の終了時に38人の患者は寛解に達し、31人は予後不良(タンパク>4g/gおよび/または30%を上回って増加した血清クレアチニンおよび/またはeGFR<45ml/分/1.73m²)であった。

経過観察の終了時に予後不良である患者は有意に高齢であり、診断時のクレアチニンレベルが高く、CysR群ではなくCTLD7群においてはるかに多く、PLA2R1抗体レベルが高かった。性比、診断時のタンパク尿、経過観察の期間、免疫抑制治療を受けた患者のパーセンテージ、および予後不良の患者と予後良好の患者との間でのCTLD1群に、差はなかった。

【0131】

組み入れの時点において2つの群間で、年齢、診断時のタンパク尿、平均経過観察期間および免疫抑制治療を受けた患者のパーセンテージに、有意差はなかった。他の試験において記載されているとおり、年齢および診断時の血清中クレアチニンレベルは、寛解に達しなかった群の方が高かった(対応のないt検定およびマン・ホイットニー検定を使ってそれぞれp=0.0006およびp=0.0002)。完全長PLA2R1特異的アッセ

イ、C y s R 特異的アッセイ、C T L D 1 特異的アッセイおよびC T L D 7 特異的アッセイに関するE L I S A 力価はいずれも、不良な腎予後を持つ群の方が有意に高く、C T L D 1 特異的アッセイおよびC T L D 7 特異的アッセイについては特にそうであった(それぞれ $p = 0.04$ 、 $p = 0.03$ 、 $p = 0.003$ および $p < 0.0001$; マン・ホイットニー検定)。多重C o x 回帰分析では、C y s R C 1 群およびC y s R C 1 C 7 群ならびに完全長P L A 2 R 1 での高力価が、不良な腎予後の独立リスク因子として同定された。このように、エピトーププロファイリングは、以後の腎イベントの発生に関する予後因子である。

【0132】

経過観察中のエピトープスプレディング

また、本発明者らには、経過観察中に血清を入手することができる患者が16人いた。本発明者らは、疾患経過中のP L A 2 R 1 エピトーププロファイルの転換について調査した。9人の患者は、経過観察中は安定したエピトーププロファイルを有し、免疫抑制処置または対症処置後に抗C y s R 限定的活性が安定しているか減少して寛解に入った5人を含めて、疾患活動度も安定していた。患者9は腎臓移植後、シクロスポリン処置の下で、14年間にわたって寛解状態を保っていたが、完全長P L A 2 R 1 で測定されるE L I S A 力価は高かった。この患者はC y s R に対する活性だけを有し、分子内スプレディングを伴わなかった。1997年5月および2011年5月の2回の生検により、再発時および14年後における免疫沈着物の存在が確認された。2人の患者は安定なC T L D 1 プロファイルを有し、活動性疾患を伴った。2人の患者は安定なC T L D 7 エピトーププロ

10

20

【0133】

4人の患者は、疾患活動度の変化に伴って、それぞれのエピトーププロファイルを転換させた。C y s R C 1 C 7 群の患者の1人はC y s R 群へと転換し、免疫抑制処置下で寛解に入った。逆に、2人の患者はC y s R 群からC y s R C 1 群およびC y s R C 1 C 7 群へと転換して、腎炎性タンパク尿を伴って再燃し、最後の患者はC y s R およびC T L D 7 に対する陽性を有して活動性疾患を伴い、2年後にはC T L D 1 に対しても陽性になって、タンパク尿が増加した。

【0134】

最後に、3人の患者は、各ドメインに対する3つの抗体すべての漸進的減少を呈し、寛解に入った。

30

【0135】

I g G サブクラス

i M N の病理発生にはI g G 4 および抗P L A 2 R 1 I g G 4 がより目だった役割を果たすという多くの証拠があるので、上記のエピトープ研究はいずれもI g G 4 抗P L A 2 R 1 抗体を測定するように計画された。この見解を確認するために、本発明者らは、3つのエピトープ群から選択された患者からの血清の反応性を、P L A 2 R 1 の欠失突然変異体でのウェスタンブロットにより、ならびにC y s R 抗原、C T L D 1 抗原およびC T L D 7 抗原でのE L I S A により、異なるI g G サブクラス(1、2、3および4)およびトータルI g G を検出することで、比較した。本発明者らは、自らの結果を確かめるために、精製I g G を使ってI g G サブクラス検出の特異性を検証し、次に、すべてのI g G を同時に検出するウェスタンブロットアッセイおよびE L I S A を行った。本発明者らは、抗P L A 2 R 1 I g G 4 抗体に加えて、一部の患者に、I g G 1、I g G 2 およびI g G 3 抗C y s R および抗C T L D 1 自己抗体の存在を観察した。しかし本発明者らがI g G 4 とは異なる抗C T L D 7 自己抗体を観察することはなかった。最後に、ウェスタンブロットによりトータルI g G で観察されたパターンは、I g G 4 のそれと極めて類似していた。総合すると、これらの結果は、抗P L A 2 R 1 I g G 4 を検出するという選択肢がおそらく最も強力であったこと、そしてもし本発明者らがトータルI g G による検出を選んでいたとしても、患者のエピトープ分類にはたぶん変化がなかったことを示している。

40

50

【0136】

考察

本発明者らは、iMN疾患を持つ69人の患者をスクリーニングして、PLA2R1の3つのドメイン：Cys-R、CTLD1およびCTLD7に、エピトープを同定した。興味深いことに、iMNに関連するいくつかの一般的な遺伝子変異体は、これらのドメイン中に、その位置が特定されている。本発明者らの結果は、それぞれCysR-CTLD1領域およびCysRのみにエピトープを同定したKaoraおよびFresquetらによる結果を、さらに拡張するものである。データは、CysRおよびCTLD1が相異なる抗PLA2R1抗体によって認識される2つの独立したドメインであることを、明らかに示している。CTLD7をさらなるドメインとして同定できたこと、そして2つの別個のエピトープとしてCysRおよびCTLD1をより明確に同定できたことは、おそらく、本発明者らが、異なるフルセットのPLA2R1欠失突然変異体を作成すると共に、トータルIgGよりも高感度なIgG4検出で、多数の患者をスクリーニングしたという事実によるのだろう。実際、2つの過去の研究は、非常に限られた数の患者しか使用しなかったが、5人の患者の血清のプールを使用した後、より多くの患者で競合アッセイを行った。さらにまた、血清が活動性疾患を持つ患者から収集されたのか、寛解中の患者から収集されたのかも、不明であった。

10

【0137】

次に、本発明者らは、血清試料採取時のCysRに対する抗PLA2R1反応性は好ましいアウトカムと関連し、一方、CTLD1およびCTLD7に対する反応性は活動性疾患および不良な腎予後と関連することを観察した。さらにまた、本発明者らは、エピトーププロファイルが経過観察中に変化しうることを明らかにした。抗CTLD1抗体および抗CTLD7抗体は、疾患の寛解と共に消失し、疾患の再燃と共に再び出現した。一方、抗CysR限定的活性は安定した軽度の疾患活動度と関連した。重要なことに、完全長PLA2R1を使ったELISAによって測定した場合、すべての患者が依然として抗PLA2R1活性を有していた(表1)。これらの知見は、疾患活動度のレベルと抗PLA2R1価との間に観察された矛盾の説明になりうる。

20

【0138】

これらの知見から、本発明者らは、抗PLA2R1抗体は軽症候性iMN疾患を伴ってまずN末のCysRドメインに対して産生されるのだろうという仮説を立てた。CysR群の患者は他の群より若いことから、これらの患者はおそらく疾患の初期にあることが示唆される。次に、2回目の免疫負荷(アレルギー、感染...)が、PLA2R1においてC末端(CTLD1またはCTLD7)に向かう分子内スプレディングを誘発して、より活動性の高い疾患をもたらすのかもしれない。エピトープスプレディングは、最初の非交差反応性抗原部位から、同じ分子または異なる分子内の新しいエピトープが、T細胞またはB細胞によって次第に認識されるようになる現象である。ヒト抗糸球体基底膜抗体病、尋常性天疱瘡、関節リウマチ、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis)、多発性硬化症、1型糖尿病およびヘイマン腎炎などといった多くの自己免疫疾患において記載されているように、分子内エピトープスプレディングは疾患の悪化と関連する。そのうえ、分子内エピトープスプレディングはiMNの寛解および再燃も調整しうる。EAEにおいて記載されているように、エピトープスプレディングは、マウスにおける疾患進行に大きな役割を果たし、短期間の共刺激遮断はT細胞応答の開始を特異的に阻害して、エピトープスプレディングおよび疾患の悪化を防止することができる。

30

40

【0139】

結論として、上記の結果は、3つのPLA2R1ドメインが抗PLA2R1結合に関与しており、そのうちの2つは活動性iMNとより密接に関連していて、おそらくはエピトープスプレディングの機構によって関連づけられることを示している。

【0140】

実施例2：iMNを患っている患者のアウトカムを評価するためのマウスPLA2R1

50

の使用

本発明者らは、マウス P L A 2 R 1 E L I S A を使った抗 P L A 2 R 1 自己抗体のサブセットの特異的検出が、長期臨床アウトカムを予測できることを明らかにした。この目的のために、本発明者らは、まず、最初の血清試料分析時に、h P L A 2 R 1 (ヒト) E L I S A、r b P L A 2 R 1 (ウサギ) E L I S A および m P L A 2 R 1 (マウス) E L I S A によって、41人の i M N 患者における I g G 4 抗 P L A 2 R 1 価を対照と対比して測定した。本発明者らは、41の i M N 血清すべての交差反応性を、最初の血清試料採取時に、3つの P L A 2 R 1 オルソログに対して、まずは W B によって、次に抗原特異的 E L I S A を使って、調べた。W B 分析において h P L A 2 R 1 を認識した血清はすべてが、r b P L A 2 R 1 も認識したが、m P L A 2 R 1 には、41人中26人の患者しか反応しなかった。

10

【0141】

これらの結果を確認すると共に、抗 P L A 2 R 1 自己抗体のレベルを定量的に決定するために、本発明者らは、同じ血清をオルソログ特異的 E L I S A で測定した。この目標に向けて、本発明者らは、r b P L A 2 R 1 および h P L A 2 R 1 の場合と同様に、完全長細胞外ドメインを含む組換え可溶性 m P L A 2 R 1 を使って、m P L A 2 R 1 用に別の E L I S A を設定した。こうして本発明者らは、この組換え型 m P L A 2 R 1 を W B および s P L A 2 結合アッセイによって検証した。

【0142】

h P L A 2 R 1 および r b P L A 2 R 1 の場合と同様に、m P L A 2 R 1 E L I S A は i M N 患者に特異的であり、他の疾患または健常対照を認識しなかった。41の i M N 血清はすべて h P L A 2 R 1 E L I S A および r b P L A 2 R 1 E L I S A において反応したが、m P L A 2 R 1 E L I S A において活性を有するのは、そのうちの32 (78%) だけだった。さらにまた、h P L A 2 R 1 E L I S A および r b P L A 2 R 1 E L I S A とは対照的に、m P L A 2 R 1 E L I S A では、ほんのわずかな i M N 血清しか高い力価を与えなかった。

20

【0143】

次に、本発明者らは、最初の血清試料採取時の年齢、性別、タンパク尿、血清中クレアチニン、免疫抑制処置ならびにヒト、ウサギおよびマウス P L A 2 R 1 抗体価と、患者の臨床アウトカム、すなわち予後不良の患者対寛解状態にある患者との間の関連を分析した。抗 m P L A 2 R 1 活性だけが、一変量分析 ($p = 0.007$) でも多変量分析 ($p = 0.009$) でも、持続的活動性疾患と有意に関連した。m P L A 2 R 1 E L I S A 力価の R O C 曲線分析により 605 RU/mL の閾が規定され、これより上では100%の患者 (12患者) が不良な予後を有した (特異度100%、感度57%、 $AUC 0.76$ 、 $p = 0.004$ 、95% $IC 0.60 \sim 0.91$) 。

30

【0144】

したがって、カプラン・マイヤー法による腎アウトカムの分析は、抗 m P L A 2 R 1 抗体の力価が高い患者は不良な腎アウトカムを有することを示した。実際、 605 RU/mL を上回る抗 m P L A 2 R 1 抗体価を持つ患者 ($n = 12$) は、 605 RU/mL 未満の抗 m P L A 2 R 1 抗体価を持つ患者 ($n = 29$) より早い血清中クレアチニンの倍加速度を有した (ログ・ランク検定を使って $p < 0.001$)。R O C 曲線は、h P L A 2 R 1 抗体価および r b P L A 2 R 1 抗体価についてそのような閾を同定することができず、高い抗 h P L A 2 R 1 価または抗 r b P L A 2 R 1 価を持つ患者12人の対応するサブグループは、残りの患者と比較して統計的に有意な不良な腎アウトカムを有しなかった (それぞれ $p = 0.88$ および $p = 0.21$) 。

40

【0145】

これらの結果は、r b P L A 2 R 1 が活動性疾患における抗 P L A 2 R 1 を測定するための h P L A 2 R 1 の代替抗原であるのに対し、m P L A 2 R 1 は、不良な予後のリスクがある i M N 患者にのみ高レベル ($> 605 \text{ RU/mL}$) で存在する抗 P L A 2 R 1 自己抗体のサブセットを検出することができるユニークな抗原であり、それゆえに i M N アウ

50

トカムを予測するのに有用であることを示している。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/066320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/53 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/009457 A1 (BOSTON MEDICAL CT CORP [US]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; SALANT DAVID) 21 January 2010 (2010-01-21) claims 1-19; examples 1-3 -----	1-12, 14-18
X	DURGA KANIGICHERLA ET AL: "Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy", KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 83, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 940-948, XP055208680, ISSN: 0085-2538, DOI: 10.1038/ki.2012.486 the whole document ----- -/--	1-12, 14-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 September 2016		Date of mailing of the international search report 04/10/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bradbrook, Derek

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/066320

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. HOXHA ET AL: "Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Clinical Outcome in Patients with Primary Membranous Nephropathy", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY., vol. 25, no. 6, 1 June 2014 (2014-06-01), pages 1357-1366, XP055227595, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2013040430 the whole document	1-12, 14-18
X	BECK L H ET AL: "M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, US, vol. 361, no. 1, 2 July 2009 (2009-07-02), pages 11-21, XP002553808, ISSN: 0028-4793, DOI: 10.1056/NEJMOA0810457 abstract	18
X	PIERRE RONCO ET AL: "Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care", THE LANCET, vol. 385, no. 9981, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 1983-1992, XP055227536, GB ISSN: 0140-6736, DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60731-0 page 1988, column 1 - page 1989, column 2; figure 2; table 2	1-12, 14-18
X,P	BARBARA SEITZ-POLSKI ET AL: "Cross-reactivity of anti-PLA2R1 autoantibodies to rabbit and mouse PLA2R1 antigens and development of two novel ELISAs with different diagnostic performances in idiopathic membranous nephropathy", BIOCHIMIE, vol. 118, 19 August 2015 (2015-08-19), pages 104-115, XP055226492, FR ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.08.007 the whole document	1-18

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066320

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. FRESQUET ET AL: "Identification of a Major Epitope Recognized by PLA2R Autoantibodies in Primary Membranous Nephropathy", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY., vol. 26, no. 2, 6 October 2014 (2014-10-06), pages 302-313, XP055224195, US ISSN: 1046-6673, DOI: 10.1681/ASN.2014050502 the whole document -----	1-18
A	KAO LIYO ET AL: "Identification of the immunodominant epitope region in phospholipase A2 receptor-mediating autoantibody binding in idiopathic membranous nephropathy", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 26, no. 2, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 291-301, XP009187063, ISSN: 1533-3450, DOI: 10.1681/ASN.2013121315 [retrieved on 2014-09-09] the whole document -----	1-18
A	ASTRID BEHNERT ET AL: "An Anti-Phospholipase A2 Receptor Quantitative Immunoassay and Epitope Analysis in Membranous Nephropathy Reveals Different Antigenic Domains of the Receptor", PLOS ONE, vol. 8, no. 4, 29 April 2013 (2013-04-29), page e61669, XP055227637, DOI: 10.1371/journal.pone.0061669 the whole document -----	1-18
X,P	FRANCIS JEAN M ET AL: "Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside", AMERICAN JOURNAL OF KIDNEY DISEASES, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 68, no. 1, 13 April 2016 (2016-04-13) , pages 138-147, XP029621185, ISSN: 0272-6386, DOI: 10.1053/J.AJKD.2016.01.030 the whole document -----	1,13,18

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/066320

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2010009457	A1	21-01-2010	CA 2731065 A1	21-01-2010
			CN 102159951 A	17-08-2011
			DK 2313778 T3	27-04-2015
			EP 2313778 A1	27-04-2011
			ES 2535640 T3	13-05-2015
			JP 5453420 B2	26-03-2014
			JP 2011528789 A	24-11-2011
			KR 20110033275 A	30-03-2011
			SI 2313778 T1	30-06-2015
			US 2011177534 A1	21-07-2011
			US 2013280738 A1	24-10-2013
			WO 2010009457 A1	21-01-2010

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(71)出願人 517442384

ユニヴェルシテ デ ニース ソフィア アンティポリス

フランス国 0 6 1 0 3 ニース アヴェニュー ヴァルローズ - ビーピー 2 1 3 5 ポール ヴ
アロリサシオン グランド シャトー パーク ヴァルローズ 2 8

(74)代理人 100106002

弁理士 正林 真之

(74)代理人 100120891

弁理士 林 一好

(74)代理人 100165157

弁理士 芝 哲央

(74)代理人 100126000

弁理士 岩池 満

(72)発明者 エスノルト ヴィンセント ルイ マリー

フランス国 0 6 0 0 0 ニース ヴィラ フローレンティーヌ ブルヴァード デ シミーズ
6 6

(72)発明者 ボルスキー バーバラ

フランス国 0 6 3 4 0 ラ トリニティー ブルヴァード ブランキ 1 8

(72)発明者 ランボー ジェラルド ジャン フランツ

フランス国 0 6 5 3 0 カプリス シェマン デ シュトラムッセ 2 0 3 7

(72)発明者 ドーラ ギローム

フランス国 0 6 5 6 0 ヴァルボン ソフィア アンティポリス ルート デ ルシオル 6 6
0

Fターム(参考) 4B063 QQ03 QS33

专利名称(译)	基于PLA2R1表位谱和PLA2R1表位扩散分析的膜肾病预后和监测		
公开(公告)号	JP2018524585A	公开(公告)日	2018-08-30
申请号	JP2017566405	申请日	2016-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	全国中心德拉Rusheru切斯乳木果实费点击		
申请(专利权)人(译)	全国中心德拉Rusherushe乳木果实费点击		
[标]发明人	エスノルトヴィンセントルイマリー ポルスキーバーバラ ランボージェラルドジャンフランツ ドーラギローム		
发明人	エスノルト ヴィンセント ルイ マリー ポルスキー バーバラ ランボー ジェラルド ジャン フランツ ドーラ ギローム		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/6878 G01N2333/705 G01N2800/347 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.545.A C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QQ03 4B063/QS33		
代理人(译)	Seihayashi正幸 和义林		
优先权	2015306148 2015-07-10 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及基于PLA2R1表位谱分析评估受试者中特发性膜性肾病预后的方法。本发明进一步涉及基于PLA2R1表位扩散分析监测特发性膜性肾病进展的方法。本发明中，3个PLA2R1域 (CysR , CTLD1和CTLD7) 参与抗PLA2R1活性，并且，其中的两个 (CTLD1和CTLD7) 包括有源特发性膜性肾病，更紧密地相关的，可能是与抗原表位的传播机制有关重点关注。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2018-524585 (P2018-524585A) (43) 公表日 平成30年8月30日 (2018. 8. 30)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考) 4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 545A	
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-566405 (P2017-566405)	(71) 出願人 517442373	
(22) 出願日 平成28年7月8日 (2016. 7. 8)	シュア ニース	
(23) 優先権主張日 平成30年2月16日 (2018. 2. 16)	フランス国 06000 ニース アヴェ	
(24) 国際出願番号 PCT/EP2016/066320	ニュア ラ レイン ヴィクトリア 4	
(25) 国際公開番号 W02017/009245	(71) 出願人 505351201	
(26) 国際公開日 平成28年1月19日 (2017. 1. 19)	セントレ ナシオナル ガ ラ ルシェル	
(31) 優先権主張番号 15306148.6	シェ シエンティフィーク	
(32) 優先日 平成27年7月10日 (2015. 7. 10)	フランス国 75016 パリ リュ ミ	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	シェルーアージュ 3	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 PLA2R1 エピトーププロファイルおよびPLA2R1 エピトープスプレッティングの分析に基づく膜性腎症の予後およびモニタリング		