

(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2018-519525
(P2018-519525A)

(43) 公表日 平成30年7月19日(2018.7.19)

(51) Int.Cl.

GO1N 33/53 (2006.01)

F1

GO1N 33/53 N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2017-568262 (P2017-568262)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月28日 (2016. 6. 28)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年2月28日 (2018. 2. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2016/051939
 (87) 国際公開番号 WO2017/001841
 (87) 国際公開日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)
 (31) 優先権主張番号 1511364.0
 (32) 優先日 平成27年6月29日 (2015. 6. 29)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 514212652
 ザ バインディング サイト グループ
 リミテッド
 イギリス国, ウェスト ミッドランズ ビ
 ー15 1 キューティー, バーミンガム,
 エッジバストーン, カルソープ ロード 8
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IgG4κ/λハイブリッド抗体の検出によってIgG4関連疾患を検出またはモニタリングする方法

(57) 【要約】

抗体または結合剤(例えば、IgGクラスと重鎖サブクラスを含んでいて、1つの 軽鎖クラス、または1つの 軽鎖クラス、または複数の軽鎖クラスに結合していることをさらに特徴とする免疫グロブリンに特異的な抗体)を使用してIgG4関連疾患を検出またはモニタリングするための方法およびアッセイキットが提供される。そのような免疫グロブリンの全量が検出され得、あるいは、IgGクラスと重鎖サブクラスは同じだが、1つの 軽鎖クラスに結合した免疫グロブリン、または1つの 軽鎖クラスに結合した免疫グロブリン、または1つの 軽鎖クラスと1つの 軽鎖クラスの両方に結合した免疫グロブリン間の比が検出され得る。

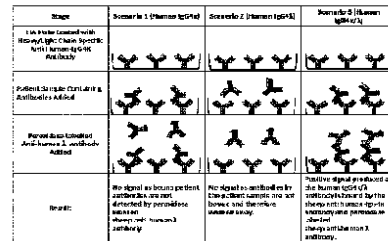


Figure 2a

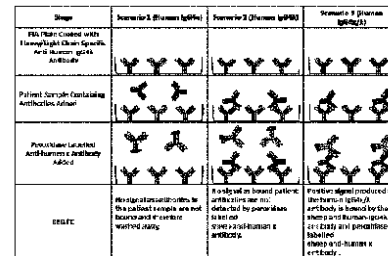


Figure 2b

【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象のIgG4関連疾患を診断またはモニタリングする方法であって、
サンプル中で、

(i) IgG重鎖クラス；および

(ii) 軽鎖および 軽鎖の両方に結合したIgG4重鎖クラス；

および場合によっては、

(iii) 同じ重鎖クラスを有するが、 軽鎖のみ、または 軽鎖のみに結合した免疫グロブリン

を有する、2つ以上の免疫グロブリンの相対量の間比を検出すること

を含み、

前記方法は、

(i) 前記免疫グロブリンを前記免疫グロブリンに特異的な結合剤に結合させ、ここで前記結合剤は、基材に固定化されているか、レポーター分子と複合化されており、

(ii) 前記結合剤に結合した、又はレポーター分子と複合化された免疫グロブリンを検出する、標識化された検出剤を使用すること

を含む結合アッセイによる、前記免疫グロブリンの定量的検出を含む、方法。

【請求項2】

IgG4 / ハイブリッド分子の量を検出する方法であって、

サンプル中で、

(i) IgG重鎖クラス；および / または

(ii) 軽鎖と 軽鎖の両方に結合したIgG4重鎖クラス；および / または

(iii) 同じ重鎖クラスを有するが、 軽鎖のみ、または 軽鎖のみに結合した免疫グロブリン

を有する免疫グロブリンの量を検出すること

を含み、

前記方法は、

(i) 前記免疫グロブリンを前記免疫グロブリンに特異的な結合剤に結合させ、ここで前記結合剤は、基材に固定化されているか、レポーター分子と複合化されており、

(ii) 前記結合剤に結合した、又はレポーター分子と複合化された免疫グロブリンを検出する、標識化された検出剤を使用すること

を含む結合アッセイによる、前記免疫グロブリンの定量的検出を含む、方法。

【請求項3】

(i) IgG重鎖クラスに特異的な少なくとも1つの結合剤；および

a) 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および / または

b) 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および / または

c) 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤の組み合わせ；

を使用するか、あるいは、

(ii) 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤の組み合わせ

を使用して、前記比が決定される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記IgG重鎖クラスがIgG4である、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項5】

抗体を含む酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して前記比が決定される、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

10

20

30

40

50

フローサイトメトリーまたは蛍光標識ビーズを使用して前記結合が決定される、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項7】

前記サンプルが、全血、血漿、血清、尿、脳脊髄液、リンパ液、組織、または腫瘍組織であり、最も典型的には、全血、血漿、または血清である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

結果は、IgG4関連疾患の治療に対する対象の応答を決定するために使用される、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項9】

結果は、対象の環境からの抗原の除去を決定するために使用される、請求項1、2または3に記載の方法。

10

【請求項10】

結果は、IgG4関連疾患またはアレルギー応答をさらに特徴づけるために使用される、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項11】

IgG4アイソアロタイプK409の存在を決定する工程をさらに含む、請求項1、2または3に記載の方法。

【請求項12】

サンプル中の遊離した軽鎖および/または軽鎖の、存在および/または量を検出する工程をさらに含む、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項13】

遊離した軽鎖と遊離した軽鎖の量の比が決定される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記遊離した軽鎖および/または前記遊離した軽鎖は、遊離した軽鎖および/または遊離した軽鎖に特異的な抗体または結合剤によって検出される、請求項12および13に記載の方法。

【請求項15】

合成抗体調製物の中の軽鎖抗体および軽鎖抗体の両方に結合したIgG4重鎖クラスの量または割合を決定する方法であって、

30

前記合成抗体調製物のサンプル中で、

(i) IgG重鎖クラス；および

(ii) 軽鎖および軽鎖の両方に結合したIgG4重鎖クラス；

および場合によっては、

(iii) 同じ重鎖クラスを有するが、軽鎖のみ、または軽鎖のみに結合した免疫グロブリン

を有する、2つ以上の免疫グロブリンの相対量の間の比を検出すること

を含み、

前記方法は、

(i) 前記免疫グロブリンを前記免疫グロブリンに特異的な結合剤に結合させ、ここで前記結合剤は、基材に固定化されているか、レポーター分子と複合化されており、

40

(ii) 前記結合剤に結合した、又はレポーター分子と複合化された免疫グロブリンを検出する、標識化された検出剤を使用すること

を含む結合アッセイによる、前記免疫グロブリンの定量的検出を含む、方法。

【請求項16】

(i) 特定の軽鎖クラスに結合したIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤と；

(ii) 反対側の軽鎖クラスに特異的な結合剤と；

場合によっては

(iii) IgG4に特異的な結合剤、およびIgG重鎖クラスに特異的な結合剤とを含む、アッセイキット。

【請求項17】

50

所定量のIgG4 / ハイブリッド較正剤を含む、請求項16に記載のアッセイキット。

【請求項18】

請求項16または17のアッセイキットによって実施される方法であって、

(i) IgG重鎖クラスに特異的な少なくとも1つの結合剤；および、

a) 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および/または

b) 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および/または

c) 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤の組み合わせ；

を有する、2つ以上の免疫グロブリンの相対量の間の方が検出される、方法。

10

【請求項19】

(i) 軽鎖に特異的な結合剤と；

(ii) 軽鎖に特異的な結合剤と；

(iii) 所定量のIgG4 / 混合ハイブリッド較正剤と

を含む、アッセイキット。

【請求項20】

前記結合剤または検出剤が、抗原特異的アプタマー、抗体、またはその抗原特異的フラグメントである、請求項1~20のいずれか1項に記載の方法またはキット。

【請求項21】

実質的に添付の表と図面を参照して本明細書に記載した、請求項1に記載の方法または請求項16に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体または結合剤（例えば、IgGクラスと重鎖サブクラスを含んでいて、1つの軽鎖クラス、または1つの軽鎖クラス、または複数の軽鎖クラスに結合することをさらに特徴とする免疫グロブリンに対して特異的な抗体）を使用してIgG4関連疾患を検出またはモニタリングするためのアッセイキットおよび方法に関する。当該アッセイを、例えばIgG4関連疾患の検出に使用する組成物および方法も提供される。

30

【背景技術】

【0002】

抗体分子（免疫グロブリンとしても知られる）は二重の対称性を有しており、2本の重鎖と2本の軽鎖からなり、それぞれが可変領域と定常領域を含んでいる。重鎖と軽鎖の可変領域は合わさって抗原結合部位を形成するため、両方の鎖が抗体分子の抗原結合特異性に寄与する。抗体の基本的な四量体構造は、ジスルフィド結合によって共有結合した2本の重鎖を含んでいる。それぞれの重鎖は、やはりジスルフィド結合によって軽鎖に結合している。これによって、実質的に「Y」形状の分子が生じる。

【0003】

重鎖は、抗体に見られる2種類の鎖のうち、より小さな軽鎖（25,000 D）と比較して大きい方であり、典型的な分子量は50,000~77,000 Dである。

40

【0004】

重鎖には、 γ 、 μ 、 δ 、 ϵ 、 α という5つの主要なクラスが存在していて、これらがそれぞれIgG、IgA、IgM、IgD、IgEの重鎖を構成する。IgGは、正常なヒト血清の主要な免疫グロブリンであり、全免疫グロブリンプールの70~75%を占める。これは、二次免疫応答の主要な抗体である。IgGは、2本の重鎖+2本の軽鎖からなる単一の四量体を形成する。

【0005】

IgMは全免疫グロブリンプールの約10%を占める。この分子は、J鎖と合わさって、5つの基本的な4鎖構造からなる五量体を形成する。個々の重鎖は約65,000の分子量を持ち、分子全体は約970,000の分子量を持つ。IgMは血管内プールにほぼ限定されていて、一次免

50

疫応答において産生される主要な抗体である。

【0006】

IgAはヒト血清免疫グロブリンプールの15~20%を占める。IgAの80%超が単量体として生じる。しかしIgAのいくらか(分泌型IgA)は二量体の形で存在する。

【0007】

IgDは、成熟したBリンパ球の形質膜に存在し、血漿中の全免疫グロブリンの1%超を占める。

【0008】

IgEは、血清免疫グロブリンの最も少ないアイソタイプであり、マスト細胞と好塩基球の表面にあるFc受容体に結合した状態で見いだされることが最も一般的である。

10

【0009】

5つの主要なクラスに加え、IgGには4つのサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)が存在している。それに加え、IgAには2つのサブクラス(IgA1とIgA2)が存在している。健康な成人の血清では、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4は、全IgGプールの60~70%、14~20%、4~8%、2~6%をそれぞれ占める。これらの割合は、ある種の疾患では変化する可能性がある。

【0010】

したがってIgG4は、ヒト血漿中の最も少ないIgGサブクラスだが、通常の濃度範囲の100倍は0.01~2.1 g/lであり、平均範囲は0.35~0.51 mg/mlである。IgG4の定常領域は、他のIgGサブクラスとアミノ酸配列が95%一致する。IgG4は半減期が約21日であり、新生フラグメント結晶化可能受容体(FcRn)を媒介としたプロセスによってリサイクルされる。

20

【0011】

抗体の軽鎖には2種類ある。すなわちラムダ()とカッパ()である。ヒトでは分子が 分子の約2倍多く作られるが、この割合はいくつかの哺乳動物では非常に異なっている。それぞれの鎖は1本のポリペプチド鎖に約220個のアミノ酸を含んでいて、そのポリペプチド鎖が折り畳まれて1つの定常領域と1つの可変領域になる。形質細胞は、5種類の重鎖のうちの一つと、 分子または 分子を産生する。通常は、合成される重鎖よりも約40%過剰な遊離した軽鎖が産生される。軽鎖分子は、重鎖分子に結合していない場合、「遊離した軽鎖分子」として知られる。 軽鎖は通常は単量体として見いだされる。 軽鎖は二量体を形成する傾向がある。

30

【0012】

抗体の古典的なパラダイムは、1つの成熟した形質細胞が1種類の免疫グロブリン重鎖(ヒトでは 、 、 μ、 、)と1種類の免疫グロブリン軽鎖(または)を産生するというものである。これらがその細胞内で合わさって、2本の同じ重鎖と2本の同じ軽鎖からなる四量体分子を形成する。IgG4分子はダイナミックであり、半数の分子が交換されてハイブリッド二重特異性(1価)抗体となることができる。このプロセスは「Fabアーム交換」としても知られ、可能性のある免疫療法においてIgG4の抗炎症特性に焦点を当てた研究で最初に特徴づけられた(van der Neut Kolfshoten他、2007年)。

【0013】

IgG4は古典的な代替りの補体経路を活性化することがなく、マクロファージと食細胞のFc受容体に対して弱い親和性しか持たない。Fabアーム交換は抗体をうまく1価にするため、Fabアーム交換を受けたIgG4について、IgG4が抗原に架橋する能力を制限する。Fabアーム交換を受けたIgG4分子(ハイブリッドIgG4分子)は、2本の異なる 軽鎖(1本がそれぞれの重鎖に結合する)、または2本の異なる 軽鎖(1本がそれぞれの重鎖に結合する)、または1本の 軽鎖と1本の 軽鎖(それぞれの重鎖に結合する)を持つことができる。最後のものはIgG4 / 混合ハイブリッド分子と呼ばれる。したがってIgG4の上方調節は、免疫応答を抑制できる可能性があると考えられる。IgG4の産生には通常は抗原への長期の曝露とTヘルパー2(Th2)サイトカインの増加が関係していて、それが、アレルギー反応とIgE産生を媒介する。IgG4は、IgEとは異なり、マスト細胞と好塩基球への強い結合親和性を示さない。IgG4は、リウマチ因子相互作用と同様、IgGクラスとIgEクラスの抗体とそ

40

50

のFcドメインを通じて相互作用することが報告されている。

【 0 0 1 4 】

Fabアーム交換は、異なるIgG4分子間での重鎖-軽鎖対（半抗体）の交換を含んでいて、ヒンジ領域に新たなジスルフィドを再形成している可能性があるが、重鎖-軽鎖ジスルフィド結合は破壊しない。したがって上に説明したように、非対称な免疫グロブリンまたはハイブリッド免疫グロブリンの生成が可能になる（図1も参照のこと）。IgG4のコアヒンジ内の位置228にあつて、鎖間ジスルフィドより鎖内ジスルフィドの形成を可能にするセリン残基と、CH3ドメイン内の位置409にあるアルギニンが、このメカニズムの制御に関与している。他のIgGサブクラスで見られるこれら両方の位置の代替アミノ酸は、この交換プロセスをなくすか低減させるが、その代替アミノ酸は、IgG4アイソアロタイプ分子では見られることが少ない。

10

【 0 0 1 5 】

IgG4を例外としてすべての抗体サブクラスは唯一のGmアロタイプを有する。IgG4は、位置309のアイソアロタイプ（そのことによってロイシンがバリンに変化する（L309/K409））と、位置409のアイソアロタイプ（そのことによってアルギニンがリシンに変化する（R409/K409））を持つ。R409 IgG4アイソアロタイプではアルギニン残基R409によってIgG4 Fabアーム交換が可能になるのに対し、K409 IgG4アイソアロタイプではリシン残基K409になることで、Fabアーム交換を受けないIgG1、IgG2、IgG3に似たものになる。

【 0 0 1 6 】

半分子交換は、生理学的な役割を果たしている可能性がある。なぜなら自然に産生されるこれら二重特異性分子は、抗原に架橋したり、リンパ様応答を誘導したりすることができず、炎症反応を阻止する可能性があるからである。Fabアーム交換はIgG4抗体を効果的に1価にするため、インビトロで抗原に架橋する能力を制限する。IgG4における軽鎖の使用の偏りは、IgGクラスそのものにおけるよりもはるかに大きく、それぞれ約5：1であると報告されている（Young他、2014年）。

20

【 0 0 1 7 】

したがってIgG重鎖特異的クラスであるIgG4は、重鎖に結合した軽鎖によって決まる3つの異なる形態で存在することができる。第1の形態は、2本の軽鎖（1本が2本の重鎖のそれぞれに結合する）に結合したIgG4分子として存在する（IgG4）。第2の形態は、2本の軽鎖（1本が2本の重鎖のそれぞれに結合する）に結合したIgG4分子として存在する（IgG4）。最後に、他のアイソフォームが、2本の軽鎖（一方が軽鎖であり、他方が軽鎖である）に結合したIgG4分子として存在する（IgG / ）。それは、いわゆるIgG / 混合ハイブリッド分子である。

30

【 0 0 1 8 】

Fabアーム交換を受けていないIgG4分子とIgG分子に対するIgG / 混合ハイブリッド分子の正確な割合は、健康な対象の間で大きく変動するが、全IgG4の大きな割合を占めることが予想される。IgG / 混合ハイブリッド分子は、全IgG4免疫グロブリンの20～30%であると報告されている。同様の値が、Young他、2014年（21～33%）と、Silva他、2015年（28%）で報告されている。

【 0 0 1 9 】

IgG4抗体の産生増加は、標的臓器へのIgG4発現細胞の浸潤を特徴とする多数の増殖性疾患、自己免疫疾患、慢性炎症疾患と関係している。これらの疾患は、まとめてIgG4関連疾患として知られる。抗原への慢性的な曝露により血清IgG4も増加する。Karagiannis他、2013年には、IgG4レベルの上昇が、液性免疫応答をIgEに支配される応答から転じさせることが提案されている。しかしIgG4関連疾患においてIgG4が病因であるかどうかや、宿主の反応を媒介するかどうかは、わかっていない。IgG4関連疾患の疫学はあまりよく知られていないが、日本人集団における発生率は10万人当たり0.28～1.08であると報告されている。

40

【 0 0 2 0 】

IgG4関連疾患には、特定の病理的特徴、血清学的特徴、臨床的特徴を共有する一群の異

50

常が含まれる。共通する特徴には、臓器の腫瘍様膨張、IgG4陽性形質細胞とCD4⁺Tリンパ球が豊富なリンパ形質細胞性浸潤、閉塞性静脈炎、線維芽細胞と炎症細胞が荷車の車輪のように配置されて見えることを典型とする特徴的な「花むしろ状」パターンを有する程度の繊維症を含めることができる。軽度の組織好酸球増加症も一般的である。対象は、臓器の質量増加や、臓器のびまん性腫大を示すことがしばしばある。60～90%の対象で多数の臓器が冒される。

【0021】

IgGとIgG4の血清濃度上昇が、IgG4関連疾患を有する対象の60～70%に見られる。成人におけるIgG4の正常値の上限は約2.1 g/lである。IgG4関連疾患の重篤度の上昇は、血清IgG4の量の増加と相関している。IgG4関連疾患におけるIgG4測定の感度は約50～100%の範囲だが、これらの疾患の多くにおけるIgG4測定の感度は明確になっていない。典型的には、対象はグルココルチコイドに応答するため、グルココルチコイド応答性がこれら疾患の1つの診断基準と見なされている。IgG4のレベルは、グルココルチコイド治療に応答して低下する。

10

【0022】

IgG4関連疾患で影響を受ける一般的な臓器は、頻度の順に、膵臓、唾液腺、腎臓、涙腺、大動脈、胆管、肺、傍脊椎、眼窩、後腹膜、動脈である（Inoue他、2015年）。

【0023】

通常は、IgG4関連疾患は、中年と老年の男性により一般的に発生する。しかし頭と首の臓器のIgG4関連疾患は、男性と女性の両方で同じように見られる。IgG4関連疾患に含まれる主な異常は、1型のIgG4関連自己免疫膵臓炎、唾液腺疾患（ミクリッツ病）、眼窩疾患、後腹膜繊維症である。IgG4関連疾患は、悪性疾患、特にリンパ腫と胃がんのリスクを増大させるようにも見える。

20

【0024】

IgG4関連疾患の病因はほとんどわかっていないままである。血清と組織におけるIgG4の上昇は、IgG4関連疾患に特有ではない。これは、多中心キャスルマン病、アレルギー性疾患、チャージ-ストラウス症候群などの他の異常でも起こる。アレルギー応答には、冒された組織におけるIgEの血清レベルの上昇と、Th2サイトカイン（IL-10、TGF- β ）のレベル上昇が含まれることがしばしばある。それに加え、IgG4関連疾患を有する対象では、アレルギー性鼻炎と気管支性喘息の割合が増加している。IgG4関連疾患を有する対象の40%までが末梢好酸球増加症を有する。

30

【0025】

IgG4関連疾患は、現在は、レントゲン写真判読や、組織サンプルの組織学的検査の際に診断される。組織サンプルは侵襲的コア針生検を使用して抽出される。組織サンプルでは、IgG4陽性形質細胞とリンパ球によるリンパ形質細胞性組織浸潤の兆候に、花むしろ状の特徴を有する繊維症と閉塞性静脈炎が伴っていることが観察される。組織IgG4陽性細胞のカウント数と、IgG4陽性細胞に対するIgG4陰性細胞の比も考慮する。しかし細胞のカウント数は、組織間、対象間で大きく変動する。線維性組織の領域を同定するのにPET検査、CT検査、MRI検査も推奨される。血清中の全IgG4のレベルは測定可能だが、診断のみを目的とするとは見なされない。なぜならそのレベルは、IgG4関連疾患に関して十分に高感度であるとも特異的であるとも考えられていないからである。

40

【0026】

IgG4関連疾患は自己免疫膵炎の患者で最初に観察されたが、自己免疫膵炎は膵臓がんと同視される可能性がある。IgG4の上昇は膵臓がんで見られる可能性があるが、自己免疫膵炎におけるよりも少ない。1型自己免疫膵炎をステロイドで治療するとIgG4が低下するため、この疾患は膵臓がんとは区別される。したがってIgG4を測定することが、膵臓がんが自己免疫膵炎ではないこととその逆を確認する上で役に立つ。IgG4の上昇は、IgG4関連硬化性胆管炎でも観察することができるが、原発性の硬化性胆管炎および/または胆管癌では観察されないため、診断に役立つ可能性がある。なぜなら生検が、IgG4関連硬化性胆管炎の組織学的特徴を明らかにするのに十分なほど深くまで達することは稀だからである。

50

【0027】

IgG4は、いくつかの炎症性疾患でIL-10によって駆動されるTh2免疫応答に存在することも示されている。Th2を媒介とする炎症も、通常は腫瘍の増殖を示唆している。黒色腫では、IgG4が腫瘍細胞に浸潤して腫瘍の周囲に蓄積することが示されている（Karagiannis他、2014年）。IgG4はIgG1の抗腫瘍機能を抑制することも示されている。それはおそらく、Fc受容体の結合がない状態でIgG4が腫瘍抗原に結合し、その腫瘍抗原への非IgG4抗体の結合をさらに阻止することで、IgG1の抗腫瘍免疫機能を効果的に阻止することによるのであろう。IgG4はFc受容体の拮抗を通じて抗腫瘍機能を抑制できる可能性があることも示唆されている（Karagiannis他、JCI、2013年）。この研究は、黒色腫におけるIgG4クラスの産生への切り換えの指標としてのIgG4：全IgGの比に焦点を当てている。この研究は、将来の治療薬を設計する際にIgG4免疫調節を刺激することを回避することの必要性も強調している。したがってIgG4は、免疫抑制効果と低い細胞毒性能力を持つと見なされている。

10

【0028】

出願人は、遊離した軽鎖の検出と、それとは別に遊離した軽鎖の検出が可能な高感度アッセイを以前に開発した。この方法では、遊離した軽鎖または遊離した軽鎖に向かうポリクローナル抗体を用いる。WO97/17372では、そのような抗体を可能な多数のさまざまな抗原の1つとして生じさせうることも議論された。この文献には、動物を寛容化して、その動物に、先行技術で産生させることができるよりも特異的な望む抗体を産生させることのできる方法が開示されている。遊離軽鎖アッセイ（Freelite（商標））では、遊離した軽鎖または遊離した軽鎖に結合する抗体を用いる。遊離した軽鎖の濃度は、比濁測定または濁度測定によって決定される。この形態のアッセイは高感度である。軽鎖のクローン産生の兆候は、軽鎖多発性骨髄腫におけるように、血清中の遊離した軽鎖に対する遊離した軽鎖が異常な比であることを明らかにすることによって与えられる。

20

【0029】

抗体の比の測定は、疾患の診断とモニタリングに役立つ。さらに、その疾患を治療する場合、その技術によってその疾患の進行をモニタリングすることが可能になる。その疾患の治療がうまくいっているのであれば、遊離した軽鎖は血液中での寿命が比較的短いため濃度が変化し、正常な血清で観察される正常な濃度により近づくであろう。

【0030】

出願人は、EP1842071とEP2306202に開示されているように、例えばIgG とIgG の識別を可能にすると考えられる抗体とアッセイ（Hevylite（商標））も実現した。出願人は、完全な免疫グロブリンに対して特異的で、重鎖クラスと軽鎖タイプの両方に対する特異性を有する抗体を作製した。出願人は、WO2011/021041に開示されているように、結合した鎖または鎖に加え、特定の重鎖クラス、それどころか重鎖サブクラスの産生に付随する疾患の迅速な同定を可能にする、および/または進行を追跡するため、例えばIgG とIgG の比の迅速な定量的測定を可能にするアッセイも実現した。

30

【0031】

本発明者らは、ある重鎖クラスと同時にある軽鎖タイプに特異的な抗体を用いて免疫グロブリンの組成を明らかにすることにより、またはある重鎖クラスに対する第1の抗体と、その重鎖に結合する軽鎖タイプを明らかにする第2の抗体を用いることにより、特定の免疫グロブリン関連疾患のための高感度アッセイを実現した。開発されたアッセイにより、疾患の進行に対する感度を例えばSPEよりも高くすることが可能になる。現在のところ、血清中の混合ハイブリッドと単独型の軽鎖IgG4分子を識別する血清学的アッセイは存在していない。重鎖-軽鎖特異的アッセイが出願人によってHevylite（商標）として実現されている。Hevylite（商標）では、重鎖-軽鎖特異的であって、軽鎖または軽鎖に結合した特定の重鎖クラスを有する免疫グロブリン同士を識別することのできる捕獲抗体を使用する。しかしHevylite（商標）自体は、IgG4混合ハイブリッド分子を軽鎖または軽鎖のみを有するIgG4から識別することができない。なぜなら、Hevylite（商標）には非常に特異的な抗IgG4捕獲抗体が必要とされるからである。Hevylite（商標）を用いてサンプル中で軽鎖に結合したIgG4分子の量を測定する場合には、鎖に結合したすべてのIg

40

50

G4分子でプラスの結果が得られるであろう。ここには単独型 軽鎖IgG4と混合ハイブリッドIgG4が含まれると考えられるが、混合ハイブリッドIgG4は 軽鎖も含むため、まったく異なるクラスの分子である。

【0032】

したがってHevylite (商標) 自体はハイブリッドIgG4と単独型軽鎖IgG4を識別することができないため、単独型軽鎖IgG4の増加の測定が不正確になる。Hevylite (商標) は、悪性形質細胞疾患におけるモノクローナル重鎖-軽鎖特異的抗体の増殖の検出にも関係している。IgG4は全IgGの非常にわずかな割合(約4%)しか占めていないため、悪性形質細胞疾患でIgG4分子が増殖することは非常に稀である。したがってHevylite (商標) は、単独で使用するとき、IgG4関連疾患の診断またはモニタリングに用いるのには適していないと考えられる。

10

【0033】

IgG4 / ハイブリッドの検出にはHevylite (商標) の使用を控えることが出願人によって報告されている(Young他、2014年)。IgG4半分子交換に関する以前の研究の大半は、精製したモノクローナル分子または抗原特異的IgG4分子をヒト血漿または動物血漿に添加して用いることによって可能になっていた。本出願人は、異なる分析-抽出手続きを使用してIgG4ハイブリッド(IgG4 /)とIgG4単独型軽鎖(IgG4 とIgG4)を捕獲、精製、同定することが可能であることを認識した。抽出プロセスにより、ポリクローナルIgG4の非常に純粋なサンプルが得られ、他の血漿タンパク質は存在していなかった。さらなる分画によってIgG4、IgG4、IgG4 / の純粋なサンプルが得られた。

20

【0034】

そこで出願人は、ELISAと免疫沈降とHevylite (商標) の組み合わせを使用して、これら精製サンプル中のIgG4 / の割合を推定した。表1に、全IgGアッセイを使用するか、抗 捕獲抗体または抗 捕獲抗体を用いたHevylite (商標) を使用して各分画を測定した結果を示す。サンプル中のIgGの全量と比較すると、Hevylite (商標) アッセイのそれぞれで捕獲されたIgG4の量の間には違いが存在している。Hevylite (商標) はIgG4 / 混合ハイブリッド分子を識別できないため、ハイブリッドを検出するときに両方のHevylite (商標) アッセイでプラスの結果が生じることで、これらの分子が二重にカウントされたことが明らかである。抗 捕獲抗体を用いたHevylite (商標) アッセイと抗 捕獲抗体を用いたHevylite (商標) アッセイの両方が、IgG4 / 混合ハイブリッドが検出されたことを示して、しかもどちらの結果も全量とは等しくないため、アッセイの校正に影響することが証明される。さらに、出願人は、アッセイの校正に対するIgG4 / 混合ハイブリッド分子の影響はわかっていないことをコメントする。

30

【0035】

出願人は、対象からのサンプル中の免疫グロブリンを検出できて初期精製工程を必要としないアッセイが存在することには利点があると認識した。そのようなアッセイにより、結果を得るまでの時間が短くなり、労働集約的な作業がより少なくなる。アフィニティカラムやHPLCといった特殊な装置や技術を持つ必要もなくなるため、クリニックで用いるのに理想的である。

【0036】

出願人は、Hevylite (商標) IgG 抗体とHevylite (商標) IgG 抗体がそれぞれIgG、IgG と反応するだけでなく、IgG Hevylite (商標) 抗体とIgG Hevylite (商標) 抗体の両方がIgG4 IgG4 / 混合ハイブリッド分子とも反応することを以前に示している。これは、IgG Hevylite抗体がIgG4 IgG4 / 混合ハイブリッド分子を検出するのに適していないことを示していた。IgG4 / ハイブリッドの割合は、Hevylite (商標) を使用してこうした違いが見いだされた後にSDS-PAGE分析をしてようやく明確になった。これらの結果は、生体内Fabアーム交換の結果としてIgG4 / ハイブリッドのかなりの割合(約30%)が正常で健康なヒトの血清に存在していることを示していた。

40

【0037】

IgG4 / 混合ハイブリッドの存在と測定結果は本分野で知られているとはいえ、その

50

測定結果が有用である証拠は存在していなかった。IgG4関連疾患を有する人は、Fabアーム交換を弱めるIgG4のK409変異の頻度が実質的に増加していないことが報告されている (Ahmad他、2014年)。このことが示唆しているのは、混合ハイブリッド分子のダイナミクスはIgG4関連疾患では影響を受けないため、IgG4関連疾患の診断またはモニタリングにおいて選択されることはないと考えられるということである。

【0038】

別の研究では、治療用抗体が、生体内で内在性ヒトIgG4とのFabアーム交換に関与することが報告されているが、臨床におけるその重要性についてはコメントがなく (Labrijn他、2009年)、IgG4 / ハイブリッドへの具体的な言及もない。さらに、IgG4 / 混合ハイブリッドのレベルを求めることのできるアッセイの開発では、IgG4 / ハイブリッドまたはIgG4 / ハイブリッドのレベルを明らかにできることが望ましいが、それはできない可能性が大きい。したがって、IgG4 / 混合ハイブリッドの正確なレベルを求めるためのより簡単で効果的なアッセイを実現する動機はこれまでなかった。

10

【0039】

Fabアーム交換を抑制するS228P変異を持っていてIL-6に対して生じるIgG4分子のみを検出する非常に特異的な抗IL-6 IgG4 S228P変異抗体を用いたMSD (メゾスケール発見) イムノアッセイが開発されている (Silva他、2015年)。これは、抗原特異性に依存しているため、サンプル中のIgG4 / ハイブリッドの全数を測定するのに用いることはできない。さらに、Silvaら (2015年) には、IgG4 / ハイブリッドの数の測定、さらにはFabアーム交換の推定が臨床的に重要であることの示唆はない。

20

【0040】

IgG4抗体の単離またはアミノ酸修飾をカバーする多数の特許出願が存在している。アメリカ合衆国特許出願公開第2004/092719号には、抗体調製の際に重鎖間ジスルフィド結合が欠けたIgG4抗体を単離する方法が開示されており、EP1810979には、免疫療法のための安定化されたヒトIgG4抗体が開示されている。アメリカ合衆国特許出願公開第2013/323236号には、免疫療法における好ましい特性を付与するため、特定の重鎖アミノ酸置換を含むIgG4抗体が開示されている。WO2013/124451、WO2013/124450、EP2626372には、免疫療法のための二重特異性重鎖修飾が開示されている。アメリカ合衆国特許出願公開第2011/293607号にも、アミノ酸修飾を有するIgG4抗体が開示されているが、その修飾は定常領域におけるものである。どの先行技術も、IgG4 / ハイブリッドの単離または定量的測定に関するものではない。

30

【0041】

出願人は、Karagiannisら (2014年) に報告されている黒色腫の中の腫瘍の生存におけるIgG4のレベルと全IgGの関係や、IgG4関連疾患の存在または重篤度におけるIgG4のレベルと全IgGの関係が、全IgG4抗体プールの中のIgG4 / ハイブリッド抗体の割合の影響を受けている可能性があるかと仮定した。出願人は、全IgG4のレベルに対するIgG4 / ハイブリッドの比がある種のIgG4関連疾患 (皮膚に水疱を生じさせる天疱瘡や自己免疫膵炎など) では乱されることを明らかにした。IgG4抗体は、IgG1抗体の補体固定作用に拮抗することで炎症を抑制することが知られているため、出願人は、IgG4 / ハイブリッドの割合がこの効果を変える可能性があるかと推測している。IgG4抗体は、Fc受容体の結合を通じ、抗体を媒介とした細胞の殺傷に干渉するようにも見える (Karagiannis他、2014年)。

40

【0042】

IgG4混合ハイブリッド抗体を精製して分析する1つの方法が最近報告された (Yang他、2015年)。精製したヒトIgGをIgG4モノクローナル抗体と混合し、生じた半分子交換の量を、混合モードクロマトグラフィでIgG4混合ハイブリッド抗体を分離することによって検出した。次に、IgG4モノクローナル抗体との半分子交換を受けたIgG4混合ハイブリッド抗体を、UV吸収またはタンパク質蛍光を使用して定量的に測定した。この方法には、ヒト対象からのIgGサンプルと産生されたモノクローナルIgG4抗体の両方を精製するいくつかの工程が含まれる。これは、IgG4混合ハイブリッドを測定する長くて労働集約的な方法である

50

ため、特殊な装置（質量分析器など）なしには実施できないと考えられる。さらに、Yangは、イムノアッセイを使用したIgG4混合ハイブリッドの測定は、現在のところ、一方のハイブリッドFabアームのための抗原を固相に固定化し、第2のFabアームに対する抗イデオタイプ抗体、またはその他方のアームのための抗抗体または抗抗体を用いる場合に限定されていることを教示している。Yangは、そうすることで投与された抗体と内在性IgG4の間で多重交差反応が起こる可能性があることを強調し、IgG4混合ハイブリッド抗体の測定にイムノアッセイを使用すると正確にならないと結論している。

【発明の概要】

【0043】

出願人は、対象に直接由来する精製されていないサンプルからIgG4 / ハイブリッドの存在を検出するための非常に特異的な定量血清学的アッセイの開発が可能であると認識した。先行技術においてIgG4 / の割合を分析する以前のあらゆる試みは、IgG4の分画を精製した後、SDS-PAGEまたは免疫沈降で分析することを含む長大なプロトコルを使用している。出願人は、自己免疫膵炎や天疱瘡などのIgG4関連疾患を診断またはモニタリングすることを目的として、重鎖鎖特異的抗体に関する彼らの知見を使用し、全IgG4に対するIgG4 / ハイブリッドの比を明らかにするイムノアッセイを開発した。

【0044】

本発明の第1の側面により、IgG4関連疾患を診断またはモニタリングする方法であって、サンプル中で、

(i) IgG重鎖クラス；

(ii) 軽鎖および 軽鎖の両方に結合するIgG4重鎖クラス；

および場合によっては、

(iii) 同じ重鎖クラスを有するが、 軽鎖のみ、または 軽鎖のみに結合した免疫グロブリン

を有する、抗体の相対量の間比を検出すること

を含み、

前記方法は、

(i) 前記免疫グロブリンを前記免疫グロブリンに特異的な結合剤に結合させ、ここで前記結合剤は、基材に固定化されているか、レポーター分子と複合化されており、

(ii) 前記結合剤に結合した、又はレポーター分子と複合化された免疫グロブリンを検出する、標識化された検出剤を使用すること

を含む、前記免疫グロブリンの定量的検出を含む、方法が提供される。

【0045】

この方法は、好ましくは、サンプル中の免疫グロブリンの量を定量的に測定する。

【0046】

未結合の免疫グロブリンを除去するために、結合剤（例えば固定化された結合剤）に結合した免疫グロブリンは、洗浄されてもよい。

【0047】

上記の工程(iii)は、 軽鎖または 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスの全量を決定するために使用されてもよい。IgG4の全量は、工程(i)を使用して決定される。 軽鎖と

軽鎖の両方に結合したIgG4重鎖クラスの全量も工程(ii)を使用して決定され、工程(i)からのIgG4の全量から差し引かれる。残った分画は、 軽鎖または 軽鎖に結合したIgG4重鎖クラスの全量を示している。

【0048】

本発明者らは、単独の抗体を組み合わせて使用して、異なる重鎖クラス/単独軽鎖タイプ抗体と重鎖クラス/ハイブリッド軽鎖タイプ抗体を識別できることを見いだした。したがって本発明の方法は、

(i) IgG重鎖クラスに特異的な少なくとも1つの結合剤；および、

a) 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および/または

10

20

30

40

50

b) 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および/または

c) 軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、軽鎖に結合したIgG重鎖クラスに特異的な結合剤の組み合わせ；
を使用して決定され得る。

【0049】

IgG4 特異的結合剤は、IgG4に結合することができる。IgG4は、IgG4 特異的結合剤にも結合する。結合の量は、所定の濃度のIgG4 / 混合ハイブリッドについて得られた較正曲線から求めることができる。

【0050】

図2は、抗IgG4 捕獲抗体と抗 検出抗体、または抗IgG4 捕獲抗体と抗 検出抗体を組み合わせるIgG / 混合ハイブリッドを検出する2つの実例を示している。

【0051】

検出する免疫グロブリンに特異的な結合剤は、好ましくは、抗体またはそのフラグメントであるか、またはアプタマーである。本発明のあらゆる側面で用いる抗体のフラグメントは、FabフラグメントまたはF(ab')₂フラグメントであってもよい。アプタマーは、大きな親和性と特異性を有する短い一本鎖のDNA分子またはRNA分子であり、「核酸抗体」と呼ぶことができる。

【0052】

検出する重鎖クラスは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から選択することができ、最も好ましくはIgG4である。すべてのクラスの組み合わせも全IgGとして検出することができる。

【0053】

サンプルは、アフィニティ精製または吸着による検出法における使用前に、場合によっては、IgG重鎖サブクラスに関して富化されてもよい。

【0054】

本発明の方法は、以下の方法の1つ以上を使用して使用されてもよい。ここで、サンプル中の抗体に対する結合剤の結合は、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、フローサイトメトリー、または蛍光標識したビーズ（Luminex（商標）ビーズなど）を使用することによって決定される。これらのアッセイ法は、シングルプレックス（目的の1つの分析物を測定する）であってもよいし、またはマルチプレックス（目的の多数の分析物を測定する）であってもよい。あるいは、特異的結合剤を用いてマイクロアレイアッセイが生成されてもよい。

【0055】

上に記載したようにして検出される特定のIgG重鎖クラスの全量、またはIgGの全量は、多重ELISAアッセイの一部として、または上記のa)、および/またはb)、および/またはc)の検出工程とともに実施されるシングルプレックスアッセイとして測定されることが好ましい。

【0056】

全IgG4に対するIgG4 / 混合ハイブリッドの比、または全IgGに対するIgG4 / 混合ハイブリッドの比は、免疫学的に決定されることが好ましく、ELISAによって決定されることが最も好ましい。ELISA型のアッセイそれ自体は本分野で周知である。このアッセイでは、特異的結合剤（例えば血液型を検出するための抗体など）、細胞表面マーカー、薬、および毒素を用いる。本発明の場合、このタイプのアッセイは、本発明の方法のために使用されている。

【0057】

ELISAでは、特異的抗原を検出するのに抗体または他の結合剤（例えばアプタマー）、または抗体のフラグメントを使用する。アッセイで使用される1つ以上の抗体、アプタマー、抗体フラグメントは、基質を検出可能な分析物に変換することのできる酵素で標識することができる。そのような酵素に含まれるのは、西洋ワサビのペルオキシダーゼ、アルカ

10

20

30

40

50

リホスファターゼ、本分野で知られている他の酵素である。あるいは他の検出可能なタグまたは標識を用いることができる。その中に含まれるのは、放射性同位体、本分野で知られている多彩な着色標識や蛍光標識（フルオレセイン、Alexa fluor、Oregon Green、BODIPY、ローダミンレッド、Cascade Blue、Marina Blue、Pacific Blue、Cascade Yellow、ゴールドなど）、ビオチン（例えばInvitrogen Ltd社（イギリス）から入手できる）などの共役体である。染料ゾル、金属ゾル、着色ラテックスも使用することができる。これら標識の1つ以上を、本明細書に記載したさまざまな本発明によるELISAアッセイ、または本明細書に記載した他のアッセイ、標識した抗体、キットで用いることができる。

【0058】

ELISA型のアッセイの構成それ自体は本分野で周知である。例えば抗原に特異的な「結合抗体」は、基材の表面に固定化される。この場合、抗原は、軽鎖に結合するか、軽鎖に結合するか、軽鎖と軽鎖の両方に結合したIgG重鎖または特定のサブクラスのIgG重鎖を含む抗体である。「結合抗体」は、本分野で周知の方法によって基材の表面に固定化することができる。サンプル中の抗原は「結合抗体」によって結合し、その「結合抗体」を通じて抗原を基材に結合させる。

10

【0059】

未結合の抗体は洗い流すことができる。

【0060】

ELISAアッセイにおいて、結合抗体ではなく目的の抗原の異なる部分に対して特異的な、標識化された「検出抗体」を使用することにより、結合した抗体の存在が決定され得る。

20

【0061】

フローサイトメトリーを使用して目的の抗体の結合を検出し、比を測定することができる。この技術は本分野で例えばセルソーティングとして周知である。しかしこの技術は、標識した粒子（例えばビーズ）の検出とそのサイズの測定にも使用することができる。多数の教科書にフローサイトメトリーが記載されていて、例えば『Practical Flow Cytometry』、第3版（1994年）、H. Shapiro著、Alan R. Liss社、ニューヨークと、『Flow Cytometry, First Principles』（第2版）2001年、A.L. Given著、Wiley Liss社がある。

【0062】

結合抗体の1つ（重鎖クラスに特異的な抗体など）は、ビーズ（ポリスチレンビーズやラテックスビーズなど）に結合する。ビーズは、サンプルおよび第2の検出抗体（軽鎖に対して特異的な抗体など）と混合する。検出抗体は、サンプル中で検出される抗体に結合する検出可能な標識で標識することが好ましい。そうすることで、調べる抗体が存在するとき、標識されたビーズが得られる。

30

【0063】

その後、標識されたビーズはフローサイトメトリーによって検出され得る。異なる標識（例えば異なる蛍光標識）を、例えば抗抗体および抗抗体のために使用することができる。そうすることで、所与の重鎖クラスの全量を同定する作業と組み合わせて実施するとき、結合した各タイプの抗体の量を同時に求めることと、所与の重鎖クラスに関して / ハイブリッド：単独型の または の比を迅速に同定することが可能になる。

40

【0064】

あるいは、またはそれに加えて、異なるサイズのビーズを、例えば異なるクラスの特異的な抗体で使用することができる。フローサイトメトリーは、異なるサイズのビーズを識別できるため、サンプル中の各重鎖クラスの量を迅速に求めることが可能である。

【0065】

代替の方法では、例えば蛍光標識したビーズ（市販されているLuminex（商標）ビーズなど）に結合した抗体を用いる。異なるビーズが異なる抗体とともに使用される。異なるビーズを異なる蛍光体混合物で標識することで、特定の重鎖クラスまたは重鎖サブクラスに関する単独型またはハイブリッド型の比を蛍光波長によって決定することが可能になる。Luminex（商標）ビーズは、Luminex（商標）社（オースチン、テキサス州、アメリカ

50

合衆国)から入手できる。

【0066】

目的の免疫グロブリンは、時間分解蛍光(HTRF)アッセイのプラットフォームを使用して検出することもできる。均質アッセイは、簡単な混合と読み取りの手続きを必要とするが、分離や洗浄といった多数の処理工程は必要としない。HTRF技術は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に蛍光の時間分解測定(TR)を組み合わせたものである。FRETは、1つのタンパク質が別のタンパク質(その両方にドナー蛍光体またはアクセプター蛍光体が付着している)と相互作用するとき密に接触する2つの蛍光体の間のエネルギー移動に依存している。例えば(蛍光の持続時間が長い)ドナー蛍光体を抗IgG4抗体に付着させることができよう。次に、サンプルからの目的のタンパク質(IgG4 / 混合ハイブリッド抗体)をドナーで標識した抗IgG4抗体に結合させることが考えられる。次に抗抗体を添加することができよう。この抗体には(蛍光の持続時間が短い)アクセプター蛍光体を付着させることができ、IgG4 / 混合ハイブリッド抗体にも結合すると考えられる。標識されたこれら2つのタンパク質(抗IgG4抗体と抗抗体)が近接するとき(例えばIgG4 / 混合ハイブリッド抗体に結合するとき)、ドナー蛍光体とアクセプター蛍光体の間のエネルギー移動のレベルを蛍光の放出として検出することができる。この情報を使用して、サンプル中の特定の目的のタンパク質の量を知ることができる。

10

【0067】

目的の免疫グロブリンは、ラテラルフローアッセイのプラットフォーム、好ましくはラテラルフローサンドイッチアッセイのプラットフォームを使用して検出することもできる。ラテラルフローサンドイッチアッセイでは、結合剤(典型的には抗体)の標識に用いられる着色粒子または蛍光粒子を使用する。標識した抗体を用い、サンプル由来で一連のキャピラリー床を通過する目的の抗原を検出する。標識した抗体は、通常は、キャピラリー床の1つの表面に固定化されていて、サンプル中の目的の抗原に遭遇したときに抗原-抗体複合体を形成する。サンプルの流れが一連のキャピラリー床を通過するにつれて、キャピラリー床に抗体を固定化しているマトリックスが溶解することで抗原-抗体複合体が遊離してさらに移動し、第2の特異的結合剤(典型的には抗体)に結合する。着色/蛍光バンドを、サンプル中の抗原の存在または量の指標となる抗原-抗体粒子の蓄積として観察することができる。

20

【0068】

サンプルは、動物の血液に由来する組織または体液(全血、血漿、血清)から得られることが好ましい。動物は例えば哺乳動物であり、ヒトであることが好ましいが、動物としてそれに加え、アカゲザル(*Macaca mulatta*)、カニクイザル(*Macaca fascicularis*)、ウサギ(*Oryctolagus cuniculus*)、モルモット(*Cavia porcellus*)、ラット(*Rattus norvegicus*)、ウマ(*Equus caballus*)、ヒツジ(*Ovis aries*)、ウシ(*Bos taurus*)、ロバ(*Equus asinus*)、マウス(*Mus musculus*)、ヤギ(*Capra hircus*)、ブタ(*Sus scrofa*)が挙げられる(Labrijn他、2011年)。それに加え、他の哺乳動物(マウスなど)が別のクラス(IgG3)の軽鎖混合ハイブリッド抗体を示すことができる。それに加え、組織(腫瘍組織、尿、唾液、脳脊髄液、リンパ液が好ましい)中のそのようなタンパク質を同定することができる。組織または体液は、身体内の特定の領域(例えば腫瘍を取り囲んでいる局所的な組織または流体)から採取することができる。サンプルはインビトロでアッセイされることが好ましい。

30

40

【0069】

ヒト抗体の存在は、例えばヒツジ、ウマ、ヤギ、ロバ、ウサギ、ニワトリ、マウス、ラットからの抗ヒト抗体を用いて決定され得る。

【0070】

重鎖-軽鎖特異的なペアまたはハイブリッドペアの測定は、自動化することができる。さらに、この技術はより感度が高いため、さまざまな免疫グロブリンの量を定量的に求めることが可能である。この技術は、疾患を診断する助けにすることと、治療(例えばグルココルチコイド処置)に対する疾患の反応をモニタリングすることの両方に用いることが

50

できる。この技術は、IgG4関連疾患で腫瘍の存在を検出するのにも用いることができる。この技術は、将来の疾患進行と対象生存のリスクを予測するのにも使用することができる。これらの値はリスクの割合として計算することができる。この方法は、治療に対するアレルギーの応答をモニタリングするのにも使用することができる。この方法は、特定の抗原が対象の環境から除去されているかどうかを知るのにも使用することができる。

【0071】

IgG4関連疾患は、IgG4関連全身疾患、IgG4症候群、IgG4随伴疾患、IgG4関連硬化性疾患、IgG4関連全身硬化性疾患、IgG4関連自己免疫疾患、IgG4陽性多臓器リンパ増殖症候群、超IgG4疾患、全身性IgG4関連形質細胞症候群、IgG4関連多焦点全身性線維症、多焦点線維性硬化症、多焦点特発性線維性硬化症として知られているであろう。

10

【0072】

IgG4関連疾患の選択は、1型(IgG4関連)自己免疫膵炎、IgG4関連硬化性胆管炎、ミクリッツ病(またはIgG4関連の涙腺炎と唾液腺炎)、硬化性唾液腺炎(またはキュットナー腫瘍、IgG4関連顎下腺疾患)、IgG4関連眼窩炎症またはIgG4関連眼窩炎症性偽腫瘍、慢性硬化性涙腺炎(または涙腺肥大、IgG4関連涙腺炎)、後腹膜線維症(またはオーモンド病)とそれに関連する異常(IgG4関連後腹膜線維症、IgG4関連腸間膜炎)、慢性硬化性の大動脈炎と大動脈周囲炎(またはIgG4関連の大動脈炎または大動脈周囲炎)、多焦点線維硬化症、橋本甲状腺炎の線維性パリアント、リーデル甲状腺炎(またはIgG4関連甲状腺疾患)、IgG4関連の間質性肺炎と肺炎性偽腫瘍(またはIgG4関連肺疾患)、IgG4関連腎疾患(IgG4関連の二次的な尿細管間質性腎炎と膜性腎症が含まれる)、IgG4関連下垂体炎、IgG4関連硬膜炎、IgG4関連中線破壊性疾患、IgG4関連リンパ節腫脹、IgG4関連眼窩筋炎、IgG4関連皮膚疾患(天疱瘡、皮膚偽リンパ腫)、IgG4関連肝障害、肝炎、偽腫瘍、自己免疫膵炎に付随するリンパ形質細胞性胃炎、硬化性乳腺炎、乳房の炎症性偽腫瘍、前立腺炎、収縮性心膜炎、炎症性大動脈瘤、シェーグレン症候群、リンパ形質細胞性硬化性膵炎、家族性多焦点線維硬化症、キュットナー腫瘍、好酸球性血管中心性線維症、ロザイ-ドルフマン病、縦隔線線維症、動脈周囲炎、豊富な尿細管間質性沈着物を伴う特発性低補体性尿細管間質性腎炎、IgG4関連鼻咽頭疾患からなされることが好ましい。IgG4関連疾患に冒される一般的な臓器は、頻度の順に、膵臓、唾液腺、腎臓、涙腺、大動脈、胆管、肺、傍脊椎、眼窩、後腹膜、動脈である。それに加え、黒色腫などのがんやアレルギーがIgG4の上昇を示す可能性があり、IgG4関連疾患と見なすことができる。

20

30

【0073】

本明細書に記載した方法またはキットは、IgG4関連疾患の炎症マーカーであるVEGF、IL-10、TGF- β 、Th2サイトカインなどを同時にアッセイすることを含んでいてもよい。

【0074】

IgG4アイソアロタイプK409の存在は、通常は、PCRとPCR後の分析などの方法を使用して検査される。対象が二倍体K409変異を持っている場合、検出すべきIgG4混合ハイブリッド分子は存在しないであろう。対象が半数体K409変異を持っている場合、IgG4混合ハイブリッド分子とIgG4単独型軽鎖分子の割合は崩れて低下するであろう。図6Aは、IgG4混合ハイブリッド分子に対するIgG4の比を検出するときの異常値をはっきりと示している。したがってこれら異常値を同定することを使用して、半数体K409変異を持つ対象であるか二倍体K409変異を持つ対象であるかを同定することができる。

40

【0075】

この方法はまた、合成抗体調製物(例えば、免疫療法のための生物学的薬剤として作製されるモノクローナル抗体)中の軽鎖抗体および軽鎖抗体の両方に結合するIgG4重鎖クラスの量または割合を決定するために使用され得る。この方法は、合成抗体調製物のサンプル中で、

(i) 軽鎖および軽鎖の両方に結合したIgG4重鎖クラス;

および場合によっては、

(ii) 同じ重鎖クラスを有するが、軽鎖のみ、または軽鎖のみに結合した免疫グロブリン

50

を有する、2つ以上の免疫グロブリンの相対量の比を検出することを含み、
前記方法は、

(i) 前記免疫グロブリンを前記免疫グロブリンに特異的な結合剤に結合させ、ここで前記結合剤は、基材に固定化されているか、レポーター分子と複合化されており、

(ii) 前記結合剤に結合した、又はレポーター分子と複合化された免疫グロブリンを検出する、標識化された検出剤を使用すること
を含む結合アッセイによる、前記免疫グロブリンの定量的検出を含む。

【0076】

ポリクローナル抗体を使用することが好ましく、それに加えてモノクローナルも使用することができる。ポリクローナル抗体により、例えば同じクラスの異なる免疫グロブリンをモニタリングするための改良されたアッセイを実現することが可能になる。ポリクローナル抗体により、複数の異なる抗体を、特定のIgG重鎖-軽鎖の組み合わせのための異なるエピトープに対して生成させることが可能になる。こうすることで、異なる免疫グロブリン同士がわずかに異なるようにできるが、それでも同じIgG重鎖-軽鎖の組み合わせを含んでいる。本発明のさまざまな側面で用いるポリクローナル抗体は、WO97/17372に示した方法によって作製することができる。こうすることで、非常に特異的なポリクローナル抗体を作製することが可能になる。

10

【0077】

サンプルは、そのサンプル中の遊離した 軽鎖または遊離した 軽鎖を測定することによってさらに特徴づけがなされてもよい。遊離した 軽鎖または遊離した 軽鎖の全量も測定することができる。遊離した 軽鎖に対する遊離した 軽鎖の比も得ることができる。これは、遊離した 軽鎖または遊離した 軽鎖に特異的な抗体（例えばThe Binding Site Ltd社（パーミンガム、イギリス）によって商標Freelite（商標）とCombylite（商標）のもとで市販されている抗体）を用いて実施することが好ましい。

20

【0078】

全IgGまたは特定のIgG重鎖サブクラスの検出と、 軽鎖と 軽鎖の両方に特異的に結合するIgG重鎖サブクラスの検出から得られる比の値を、各種のIgG4関連疾患に関する正常な範囲または基準値と比較することができる。正常な範囲は、典型的には、比の中央値が0.328、比の平均値が0.358であり、標準偏差は0.1272である。この比の値を使用して、1つのタイプのIgG4関連疾患の特徴を、その疾患に特有の範囲に応じてさらに明確にするのにも使用できる。

30

【0079】

本発明のさらに別の側面により、

(i) 特定の軽鎖クラスに結合するIgG4重鎖クラスに特異的な結合剤と；

(ii) 反対側の軽鎖クラスに特異的な結合剤と；場合によっては

(iii) IgG4に特異的な結合剤と、1つのIgG重鎖クラスに特異的な結合剤

を含むアッセイキット、好ましくはELISAが提供される。

【0080】

キットのさらに別の側面は、所定量のIgG4 / 混合ハイブリッド較正剤を含むことができる。

40

【0081】

反対側の軽鎖クラスは、前記IgG4重鎖クラスに特異的な結合剤が 軽鎖に結合するときには であると考えられ、反対側の軽鎖は、前記IgG4重鎖クラスに特異的な結合剤が 軽鎖に結合するときには であると考えられる。

【0082】

当該キットのさらに別の側面は、全IgG4に対するIgG4 / 混合ハイブリッドの比、または全IgGに対するIgG4 / 混合ハイブリッドの比を、

(i) IgG重鎖クラスに特異的な少なくとも1つの結合剤；および

a) 軽鎖に結合するIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、 軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および/または

50

b) 軽鎖に結合するIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、軽鎖に特異的な結合剤の組み合わせ；および/または

c) 軽鎖に結合するIgG重鎖クラスに特異的な結合剤と、軽鎖に結合するIgG重鎖クラスに特異的な結合剤の組み合わせ
を有する、2つ以上の免疫グロブリンの相対量の間で検出する方法において使用するためのキットである。

【0083】

このキットのさらに別の側面は、IgG / 混合ハイブリッド分子の量を検出し、校正剤と比較する方法における使用であり、このキットは、

(a) 軽鎖に特異的な結合剤と；

(b) 軽鎖に特異的な結合剤と；

(c) 所定量のIgG4 / 混合ハイブリッド校正剤を含んでいる。

【0084】

校正剤は、アッセイを校正するために使用される。典型的には、実質的に純粋なハイブリッドIgG / を適切な緩衝液で希釈して校正剤を形成する。

【0085】

キットの中に含める結合剤または検出剤として、抗原特異的なアプタマー、抗体、その抗原特異的なフラグメントが可能である。

【0086】

抗体、標識などは、上に説明したようなものであることが好ましい。

【0087】

IgG重鎖クラスに特異的な抗体、または特定の軽鎖クラスに結合したIgG4重鎖クラスに特異的な抗体は、基材に固定化されることが好ましい。基材としてビーズでもよいが、マイクロタイタープレートウェルであることが好ましい。

【0088】

1つ以上の抗体が、検出可能な標識を備えていることが好ましい。酵素（例えばアルカリホスファターゼ、西洋ワサビのペルオキシダーゼ）などの間接的標識を用いることができ、³⁵Sなどの放射性標識も可能である。例えばマルチプレックスアッセイで組み合わせる場合には、それぞれのタイプの検出抗体に異なる検出可能な標識を標識することができる。

【0089】

1つ以上の対照（または校正剤）、例えば既知量の所定のモノクローナルタンパク質（精製したIgG、IgG4、IgG4 / 、またはそのフラグメントなど）を、このELISAとまったく別のELISA、フローサイトメトリー、Luminex（商標）、本明細書に記載した他のアッセイに提供することができる。校正剤は、典型的には、国際標準濃度と結びついている。校正剤として、例えば、IgG4 またはIgG4 が存在しない少なくとも98%w/wの純粋な混合ハイブリッドIgG4 / が可能である。アッセイは、これらの値と比較し、標準単位で報告することができる。フラグメントは、使用するとき、例えばクラスおよび/または軽鎖タイプを検出するための抗原決定基を保持することになる。

【0090】

捕獲ビーズとLuminexビーズを備えたフローサイトメトリーキットも提供される。これらのキットは、抗体またはそのフラグメント、またはそれに加えてアプタマーのうちで、IgG重鎖クラスおよび/またはIgG重鎖サブクラスに特異的なもの、および/または特定の軽鎖クラスに結合するIgG4重鎖クラスに特異的なものを含むことが好ましい。異なる抗体のタイプのそれぞれは、組み合わせる場合、異なるサイズのビーズに付着させる。キットは、本発明の方法の抗体を通じてビーズに結合したサンプルに由来する抗体の存在を検出するための標識した抗体をさらに含むことが好ましい。

【0091】

競合アッセイ、ラテラルフロー免疫クロマトグラフィアッセイ、HTRFプラットフォーム

10

20

30

40

50

アッセイも提供される。

【0092】

本発明のキットは、遊離した 軽鎖または遊離した 軽鎖に特異的な抗体をさらに含むことができる。あるいは全遊離軽鎖（FLC）の濃度を測定するための全抗FLC抗体を、例えば所定の基準に対する全FLCをさらに測定するために提供すること、または使用することができる。

【0093】

キットはさらに、このキット、基材、緩衝液、標識、保存剤、対照を使用するための1つ以上の指示を含むことができる。

【0094】

ここで本発明を、以下の図面を参照しつつ、単なる例示として記述することにする。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1-1】図1-1は、IgG4半分子交換の模式図を示している。

【図1-2】図1-2（表1）は、正常なヒトの血清から精製したポリクローナルのIgG4、IgG4、混合軽鎖IgG4ハイブリッドをイムノアッセイによって定量した結果を示している（Young他、2014年から引用）。IgG / ハイブリッドは、両方のHevylite Gアッセイで明確に検出される。

【図2a】図2aは、抗IgG4 捕獲抗体と抗 検出抗体、または抗IgG4 捕獲抗体と抗 検出抗体を組み合わせてIgG / 混合ハイブリッドを検出する2つの実例を示している。

【図2b】図2bは、抗IgG4 捕獲抗体と抗 検出抗体、または抗IgG4 捕獲抗体と抗 検出抗体を組み合わせてIgG / 混合ハイブリッドを検出する2つの実例を示している。

【図3】図3は、本発明で最適化したアッセイパラメータを用いた5点較正曲線を示している。動作範囲は、1/5000サンプル希釈液を用いると18.5～1500 mg/lである。較正剤は、（Optilite G4アッセイによって定量した）純粋な精製IgG4MMであり、較正剤希釈剤は、IgG4が欠乏した血清を1/5000に希釈したものであり、サンプル希釈剤は、標準ELISA緩衝液T271であり、共役体は、a- -Peroxを1/3000に希釈したものである。すべての工程が室温で30分間実施される。

【図4】図4は、試験した3つのサンプルが較正曲線の下部、中央部、上部に対応することを示す。サンプルセット内の変動係数CVの値を示してある。これは、アッセイ間で精度がよく一致していることを示している。較正曲線の3つの領域（25、85、580 mg/l IgG4MM）が標的となり、サンプルごとに同じものを16通り用意した。

【図5A】図5Aは、EIAを使用して90人の健康な対照で求めた全IgG4のレベルを示す（異常値は除外）。

【図5B】図5Bは、EIAを使用して90人の健康な対照で求めた全IgG4 / 混合ハイブリッドのレベルを示す（異常値は除外）。

【図5C】図5Cは、EIAを使用して90人の健康な対照で求めた全IgG4のレベルに対する全IgG4 / 混合ハイブリッドのレベルの比を示す（異常値は除外）。

【図6A】図6Aは、全IgG4と全IgG4 / 混合ハイブリッドの直線プロットを、同定された異常値を含めて示している。

【図6B】図6Bは、全IgG4と全IgG4 / 混合ハイブリッドの直線プロットを、同定された異常値を除外して示している。

【図7】図7は、既知のIgG4関連疾患（天疱瘡 / 類天疱瘡と1型自己免疫膵炎（AIP））を有する患者に由来する臨床サンプルでEIAを使用して求めた全IgG4 / 混合ハイブリッドに対する全IgG4の比を示す。

【実施例】

【0096】

酵素イムノアッセイ（EIA）

抗原捕獲EIAを使用してIgG4 / ハイブリッドのレベルを測定した。22 の湿潤な箱の中で、EIAプレート（Maxisorp（商標）平底透明96ウエルプレート；Nunc社、ロスキルデ

10

20

30

40

50

、デンマーク国)を、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ のIgG4を含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で一晩被覆した。その被覆溶液を除去した後、Stabicoat(商標)(SurModics社、エデン・プレリー、ミネソタ州、アメリカ合衆国)を22℃で30分間用いてプレートをブロックした。ブロックの除去後、プレートを真空下で乾燥させ、乾燥剤の袋を収容したホイル製パウチの中に密封した。希釈した患者サンプルを、2通り用意したすべてのストリップに添加した。IgG4が欠乏した血清中の精製IgG4 / ハイブリッド($1/5000$)を校正剤として用い、3回希釈して 300 ng/ml から 3.7 ng/ml にした。 0.1% Tween(商標)(PBS-T)サンプル希釈剤を含むPBSの中で血清サンプルを $1/5000$ に希釈し、22℃で30分間インキュベートした。 0.1% Tween(商標)-Tを含むPBSで洗浄(Bio-Teck instruments Inc社、ヴァーモント州、アメリカ合衆国)した後、結合したIgG4 / ハイブリッドを、 10% StabiZyme-HRP(SurModics社)を含む生理食塩水の中で $1/3000$ に希釈した抗-HRP(BindingSite社、イギリス)によって検出した。さらに30分間インキュベートして洗浄した後、テトラメチルベンジジン(TMB、SurModics社)溶液を用いてプレートを現像し、吸光度を 450 nm で測定した(Bio-Teck EL800マイクロプレートリーダー)。得られた校正範囲は、 $18.5 \sim 1500 \text{ mg/l}$ である。

【0097】

抗原捕獲EIAを使用してIgG4のレベルを測定した。22℃の湿潤な箱の中で、EIAプレートを、 $5.0 \mu\text{g/ml}$ のモノクローナル抗IgG4クローンHP6025(Sigma Aldrich社)を含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で被覆した。その被覆溶液を除去した後、Stabilcoat(商標)を22℃で30分間用いてプレートをブロックした。ブロックを除去した後、プレートを真空下で乾燥させ、乾燥剤の袋を収容したホイル製パウチの中に密封した。希釈した患者サンプルを、2通り用意したすべてのストリップに添加した。濁度測定IgG4校正流体をサンプル希釈剤の中で希釈し、 $339.33 \text{ ng/ml} \sim 1.40 \text{ ng/ml}$ の範囲にした。血清サンプルを、 0.1% Tween(商標)(PBS-T)サンプル希釈剤を含むPBSの中で $1/20000$ に希釈し、22℃で30分間インキュベートした。 0.1% Tween(商標)-Tを含むPBSで洗浄した後、結合したIgG4を、 10% StabiZyme-HRPを含む生理食塩水の中で $1/8000$ に希釈した抗IgG-HRP(BindingSite社、イギリス)によって検出した。さらに30分間インキュベートして洗浄した後、TMB溶液を用いてプレートを現像し、吸光度を 450 nm で測定した(Bio-Teck EL800マイクロプレートリーダー)。得られた校正範囲は、 $27.93 \sim 6787 \text{ mg/l}$ に等しい。

【0098】

結果

EIAを使用して90人の健康な対象で全IgG4とIgG4 / ハイブリッドのレベル(異常値は除外)を求めた(図5A~図5C)。全IgG4の濃度は 17.25 mg/l と 1587.7 mg/l の間であり、中央値は 267.44 mg/l 、平均値は 350.217 mg/l 、標準偏差は 290.587 である(図5A)。非パラメトリック百分位数法(CLSI C28-A3)によって求めた95%基準範囲は $28.9 \sim 1603 \text{ mg/l}$ であり、この値は血清IgG4に関して公開されている予想範囲内である。IgG4 / ハイブリッドのレベルは 16.309 mg/l と 494.3 mg/l の間であり、中央値は 84.085 mg/l 、平均値は 108.284 mg/l 、標準偏差は 82.7324 である(図5B)。非パラメトリック百分位数法(CLSI C28-A3)によって求めた95%基準範囲は $20.3 \sim 460 \text{ mg/l}$ である。全IgG4に対するIgG4 / ハイブリッドの比は 0.163 と 0.9450 の間の範囲であり、中央値は 0.328 、平均値は 0.353 、標準偏差は 0.127525 であった(図5C)。全IgG4とIgG4 / ハイブリッドの直線プロットに同定された異常値を含めたもの(図6A)または含めないもの(図6B)は、 R^2 値が 0.95 、勾配が 0.27 と 0.28 の間であった。この勾配は、全ポリクローナルIgG4の27~28%がIgG4 / ハイブリッド分子で構成されていることを示している。これは、ポリクローナルIgG4の精製、分画、定量によって得られた公開値とよく一致している(Young他、2014年)。この分析により、IgG4 / ハイブリッドなしの3つのサンプルが同定された。これらは、Fabアーム交換を受けていないIgG4のK409アイソアロタイプ変異体を有する人たちに由来する可能性が大きい(Brusco他、1998年)。

【0099】

既知のIgG4関連疾患(天疱瘡/類天疱瘡と1型自己免疫膵炎(AIP))からの臨床サンブ

ルでも、全IgG4とIgG4 / ハイブリッドのEIAを使用した(図7)。天疱瘡/類天疱瘡の6つの患者サンプルでは、全IgG4は141.3 mg/lと429.3 mg/lの間であり、中央値は234.2 mg/l、平均値は257.9 mg/l、標準偏差は118.7であることがわかった。IgG4 / ハイブリッドのレベルは28.35 mg/lと111.2 mg/lの間であり、中央値は57.33 mg/l、平均値は66.18 mg/l、標準偏差は30.89であることがわかった。全IgG4に対するIgG4 / ハイブリッドの比は0.2000と0.3400の間の範囲であり、中央値は0.2500、平均値は0.2580、標準偏差は0.05119であった。全IgG4に対するIgG4 / ハイブリッドの比は、天疱瘡/類天疱瘡サンプルでは健康な正常者と比べて有意に小さかった(P=0.0003、マン-ホイットニー-U検定)。IgG4とIgG4 / ハイブリッドのEIAを使用して9つのAIPサンプルを分析した。全IgG4は16138 mg/lと59478 mg/lの間であり、中央値は26405 mg/l、平均値は35421 mg/l、標準偏差は117514であることがわかった。IgG4 / ハイブリッドのレベルは4100 mg/lと18711 mg/lの間であり、中央値は7929 mg/l、平均値は9996 mg/l、標準偏差は5359であることがわかった。全IgG4に対するIgG4 / ハイブリッドの比は0.2400と0.3100の間の範囲であり、中央値は0.2800、平均値は0.2778、標準偏差は0.02635であった。全IgG4に対するIgG4 / ハイブリッドの比は、AIPサンプルでは健康な正常者と比べてわずかに小さかった(P=0.0347、マン-ホイットニー-U検定)。

10

【0100】

参考文献

【表 1】

Young E, Lock E, Ward DG, Cook A, Harding S, Wallis GL. Estimation of polyclonal IgG4 hybrids in normal human serum. *Immunology*. 2014. Jul;142(3):406-13. doi: 10.1111/imm.12265. PubMed PMID: 24512211.

Karagiannis P, Gilbert AE, Josephs DH, Ali N, Dodev T, Saul L, Correa I, Roberts L, Beddowes E, Koers A, Hobbs C, Ferreira S, Geh JL, Healy C, Harries M, Acland KM, Blower PJ, Mitchell T, Fear DJ, Spicer JF, Lacy KE, Nestle FO, Karagiannis SN. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J Clin Invest*. 2013 Apr;123(4):1457-74. PubMed PMID: 23454746;

10

Karagiannis P, Gilbert AE, Nestle FO, Karagiannis SN. IgG4 antibodies and cancer-associated inflammation: Insights into a novel mechanism of immune escape. *Oncoimmunology*. 2013 Jul 1;2(7):e24889. Epub 2013 May 7. PubMed PMID: 24073371;

20

Silva JP, Vetterlein O, Jose J, Peters S, Kirby H. The S228P Mutation Prevents in Vivo and in Vitro IgG4 Fab-arm Exchange as Demonstrated using a Combination of Novel Quantitative Immunoassays and Physiological Matrix Preparation. *J Biol Chem*. 2015 Feb 27;290(9):5462-9. doi: 10.1074/jbc.M114.600973. Epub 2015 Jan 7. PubMed PMID: 25568323; PubMed Central PMCID: PMC4342462.

Ahmad M, Mahajan VS, Mattoo H, Stone JH, Pillai S. Individuals with IgG4-related disease do not have an increased frequency of the K409 variant of IgG4 that compromises Fab-arm exchange. *J Rheumatol*. 2014 Jan;41(1):185-7. doi: 10.3899/jrheum.131017. PubMed PMID: 24382929.

30

【表 2】

Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, Verwilligen AY, Bleeker WK, Thorpe SJ, Killestein J, Polman CH, Aalberse RC, Schuurman J, van de Winkel JG, Parren PW. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol.* 2009 Aug;27(8):767-71. doi: 10.1038/nbt.1553. Epub 2009 Jul 20. PubMed PMID: 19620983.

van der Neut Kolfshoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martínez-Martínez P, Vermeulen E, den Bleker TH, Wiegman L, Vink T, Aarden LA, De Baets MH, van de Winkel JG, Aalberse RC, Parren PW. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science.* 2007 Sep 14;317(5844):1554-7. PubMed PMID: 17872445.

10

Inoue D, Yoshida K, Yoneda N, Ozaki K, Matsubara T, Nagai K, Okumura K, Toshima F, Toyama J, Minami T, Matsui O, Gabata T, Zen Y. IgG4-Related Disease: Dataset of 235 Consecutive Patients. *Medicine.* 2015 Apr 94(15):e680. doi: 10.1097/MD.0000000000000680. PubMed PMID: 25881845.

20

Xiaoyu Yang, Ying Zhang, Fengqiang Wang, Larry Wang, Daisy Richardson, Mohammed Shameem, Alexandre Ambrogelly. Analysis and Purification of IgG4 Bispecific Antibodies by a Mixed-Mode Chromatography. *Anal. Biochem. Anal Biochem* 2015 Jun 16. Epub 2015 Jun 16.

【 図 1 - 1 】

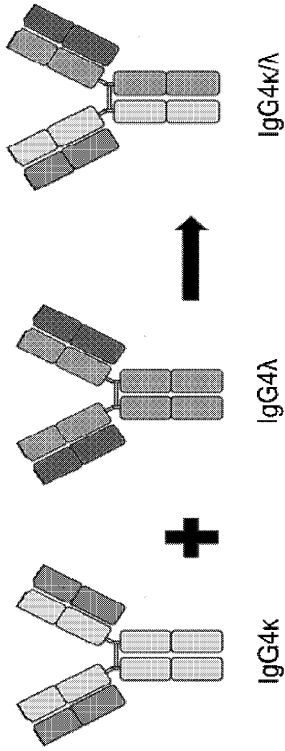


Figure 1

【 図 1 - 2 】

サンプル	全 IgG (g L ⁻¹)	Hevlyte IgG K (g L ⁻¹)	Hevlyte IgG L (g L ⁻¹)
プール 1	IgG4 K	0.409	0.472
	IgG4 L	0.234	<0.086
	IgG4 K/λハイブリッド	0.333	0.238
単独ドナー 3	IgG4 K	0.377	0.418
	IgG4 L	0.172	<0.086
	IgG4 K/λハイブリッド	0.196	0.124
単独ドナー 4	IgG4 K	0.463	0.47
	IgG4 L	0.350	<0.086
	IgG4 K/λハイブリッド	0.336	0.237
単独ドナー 5	IgG4 K	0.617	0.599
	IgG4 L	0.714	<0.086
	IgG4 K/λハイブリッド	0.264	0.196

表 1

【 図 2 a 】

ステージ	シナリオ 1 (ヒト IgG4κ)	シナリオ 2 (ヒト IgG4λ)	シナリオ 3 (ヒト IgG4κ/λ)
EIAプレートを重鎖/軽鎖特異的抗ヒトIgG4κ抗体で被覆する			
抗体を含む患者サンプルを添加する			
ペルオキシダーゼで標識した抗ヒトλ抗体を添加する			
結果:	結合した患者抗体は、ペルオキシダーゼで標識したヒトλ抗ヒトλ抗体によって検出されないため、シグナルはない。	患者サンプル中の抗体は結合せず、したがって洗い流されるため、シグナルはない。	ヒトIgG4κ/λ抗体にヒト抗ヒトIgG4κ抗体とペルオキシダーゼで標識したヒトλ抗ヒトλ抗体が結合するため、プラスのシグナルが発生する。

図 2a

【 図 2 b 】

ステージ	シナリオ 1 (ヒト IgG4κ)	シナリオ 2 (ヒト IgG4λ)	シナリオ 3 (ヒト IgG4κ/λ)
EIAプレートを重鎖/軽鎖特異的抗ヒトIgG4λ抗体で被覆する			
抗体を含む患者サンプルを添加する			
ペルオキシダーゼで標識した抗ヒトκ抗体を添加する			
結果:	患者サンプル中の抗体は結合せず、したがって洗い流されるため、シグナルはない。	結合した患者抗体は、ペルオキシダーゼで標識したヒトκ抗ヒトκ抗体によって検出されないため、シグナルはない。	ヒトIgG4κ/λ抗体にヒト抗ヒトIgG4λ抗体とペルオキシダーゼで標識したヒトκ抗ヒトκ抗体が結合するため、プラスのシグナルが発生する。

図 2b

【 図 3 】

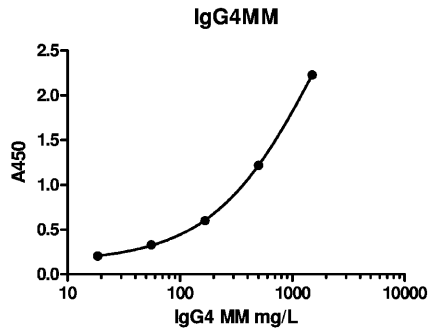


Figure 3.

【 図 4 】

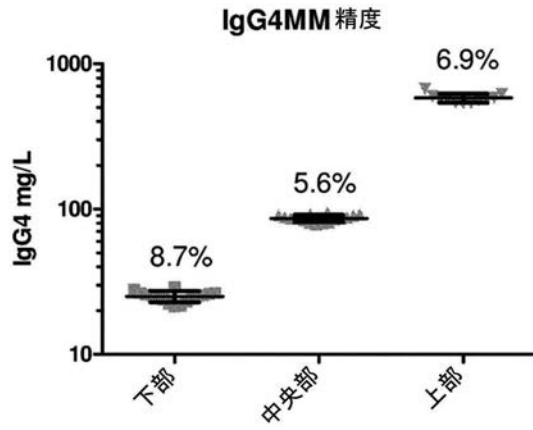


図4.

【 図 5 A 】

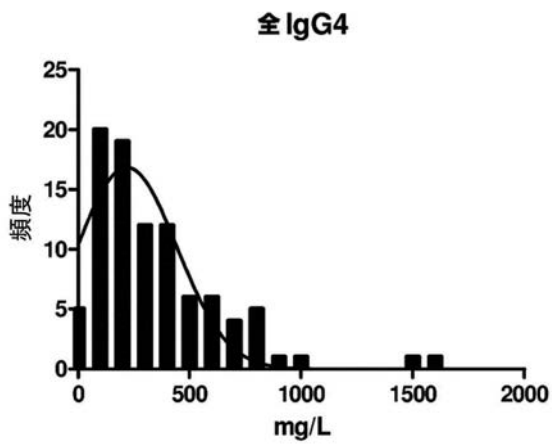


図5A.

【 図 5 B 】

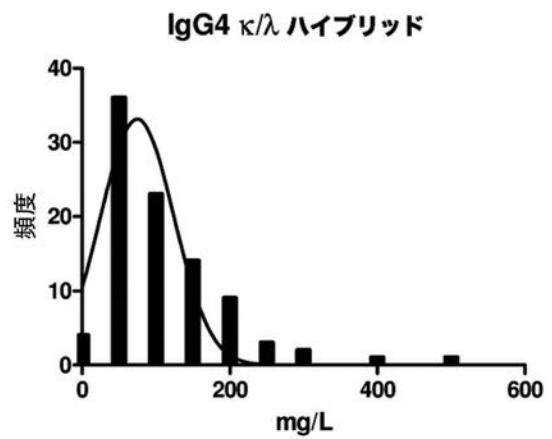


図5B.

【 図 5 C 】

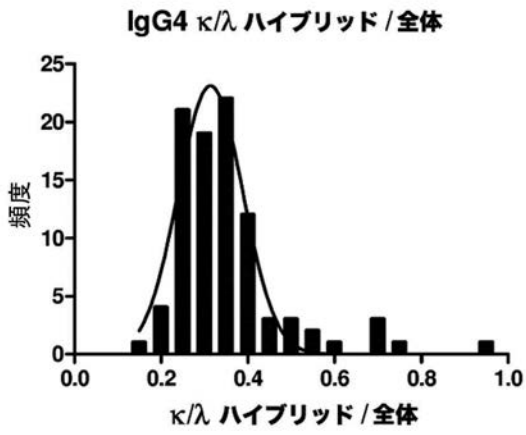


図 5C.

【 図 6 A 】

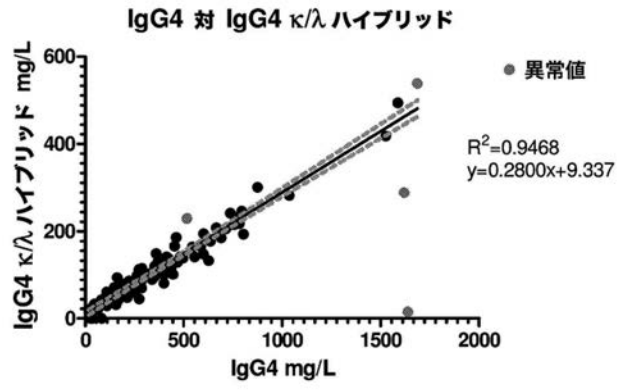


図 6A.

【 図 6 B 】

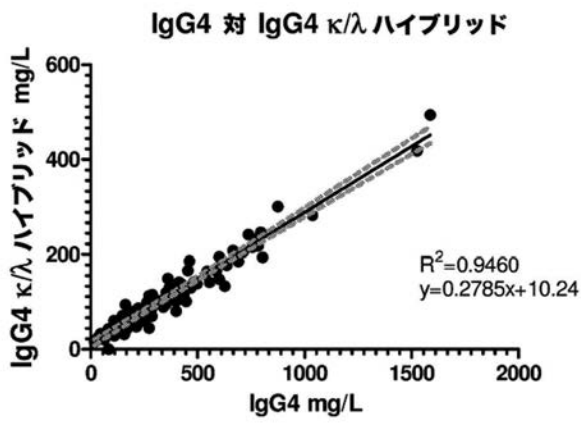


図 6B.

【 図 7 】

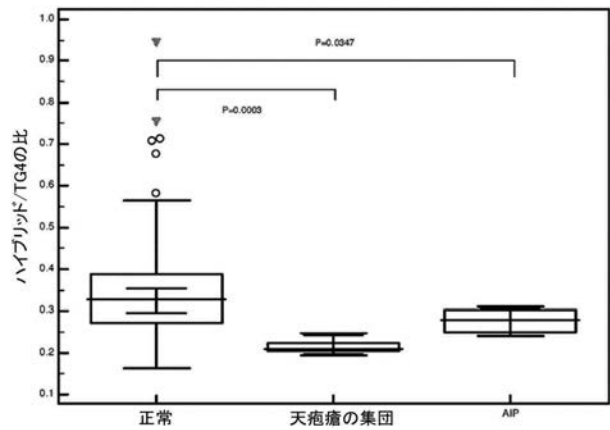


図 7.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2016/051939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 C07K16/42 C07K16/46 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 C07K		
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, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. A. LEKCHNOV ET AL: "Human placenta: relative content of antibodies of different classes and subclasses (IgG1-IgG4) containing lambda- and kappa-light chains and chimeric lambda-kappa-immunoglobulins", INTERNATIONAL IMMUNOLOGY., vol. 27, no. 6, 1 June 2015 (2015-06-01), pages 297-306, XP055300773, GB	2,4-7,9, 17,19-21
Y	ISSN: 0953-8178, DOI: 10.1093/intimm/dxv003 p. 298, co. 2, par. 4 p. 300, par. 2 fig. 4 table 4	12-15
	----- -/--	
<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 8 September 2016		Date of mailing of the international search report 21/09/2016
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 Schalich, Juliane

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2016/051939

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/079816 A1 (BINDING SITE LTD [GB]; BRADWELL ARTHUR RANDELL [GB]) 3 August 2006 (2006-08-03) cited in the application	16
Y	p. 8, par. 3 till p. 9, par. 4 and claim 23 p. 5, par. 3	12-14
X	----- WENLI LI ET AL: "A New Type of Natural Bispecific Antibody With Potential Protective Effect in Hashimoto Thyroiditis", JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 99, no. 9, 1 September 2014 (2014-09-01), pages E1602-E1609, XP055300775, US ISSN: 0021-972X, DOI: 10.1210/jc.2013-4108 p. E1603, co. 2, par. 2; p. E1604, co. 1, par. 3; p. E1605, co. 2, par. 2; table 1	1,4,5,7, 8,10
Y	----- RENÉE I. SHAPIRO ET AL: "Development and validation of immunoassays to quantify the half-antibody exchange of an IgG4 antibody, natalizumab (Tysabri) with endogenous IgG4", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, vol. 55, no. 1, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 168-175, XP055153188, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2011.01.006 abstract	15
X	----- ELIZABETH YOUNG ET AL: "Estimation of polyclonal IgG4 hybrids in normal human serum", IMMUNOLOGY, vol. 142, no. 3, 10 July 2014 (2014-07-10) , pages 406-413, XP055300777, GB ISSN: 0019-2805, DOI: 10.1111/imm.12265 -----	3

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2016/051939

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006079816 A1	03-08-2006	AT 502302 T	15-04-2011
		DK 2306202 T3	10-02-2014
		EP 1842071 A1	10-10-2007
		EP 2306202 A1	06-04-2011
		ES 2365626 T3	07-10-2011
		ES 2455440 T3	15-04-2014
		JP 5431674 B2	05-03-2014
		JP 5715671 B2	13-05-2015
		JP 2008528995 A	31-07-2008
		JP 2013147499 A	01-08-2013
		JP 2014025950 A	06-02-2014
		PT 2306202 E	27-02-2014
		US 2008166742 A1	10-07-2008
		US 2011177535 A1	21-07-2011
		US 2011177977 A1	21-07-2011
		WO 2006079816 A1	03-08-2006

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

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100164563
弁理士 佐々木 貴英

(72)発明者 グレッグ ウォリス
イギリス国, ウェスト ミッドランズ ビー 1 5 1 キューティアー, パーミンガム, エッジバストーン, カルソープ ロード 8, シーノオーザ バインディング サイト グループ リミテッド

(72)発明者 スティーブン ハーディング
イギリス国, ウェスト ミッドランズ ビー 1 5 1 キューティアー, パーミンガム, エッジバストーン, カルソープ ロード 8, シーノオーザ バインディング サイト グループ リミテッド

专利名称(译)	通过检测IgG4κ/λ杂合抗体检测或监测IgG4相关疾病的方法		
公开(公告)号	JP2018519525A	公开(公告)日	2018-07-19
申请号	JP2017568262	申请日	2016-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	结合点集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	结合位点组Rimitido		
[标]发明人	グレッグウォリス スティーブンハーディング		
发明人	グレッグ ウォリス スティーブン ハーディング		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6854 C07K16/42		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎 隆英佐佐木		
优先权	2015011364 2015-06-29 GB		

摘要(译)

进一步的特征在于包含抗体或结合剂(例如,与一个κ轻链类别,一个λ轻链类别或多个轻链类别结合的IgG类和重链亚类)提供了使用对免疫球蛋白具有特异性的抗体来检测或监测IgG4相关疾病的方法和检测试剂盒。可以检测到此类免疫球蛋白的总量,或者免疫球蛋白属于相同的IgG类和重链亚类,但与一个kappa轻链类或一个lambda轻链类结合,或可以检测结合到一种κ和一种λ轻链类别的免疫球蛋白之间的比率。

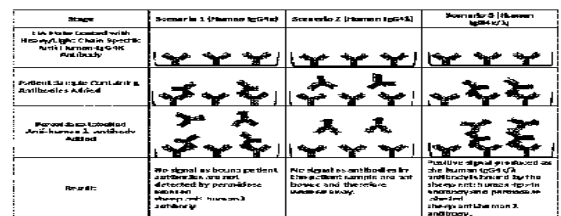


Figure 2a

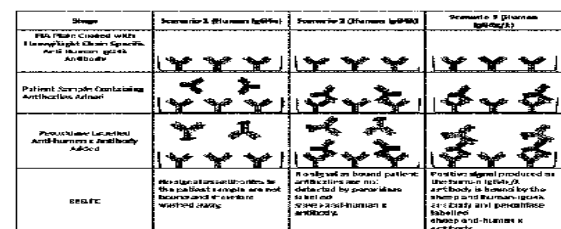


Figure 2b