



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104812396 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201380034978. 3

(22) 申请日 2013. 03. 14

(30) 优先权数据

61/640397 2012. 04. 30 US

61/640842 2012. 05. 01 US

61/640834 2012. 05. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 12. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/031606 2013. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/165591 EN 2013. 11. 07

(71) 申请人 生物治疗公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 W. J. 格罗斯曼 M. A. 安东尼萨米

R. M. 沃尔什 M. I. 纳尔逊 N. 波斯

M. E. 丹尼尔森 K. S. 米切尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 杜艳玲 彭昶

(51) Int. Cl.

A61K 31/716(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书2页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

$\beta$ -葡聚糖免疫治疗方法

(57) 摘要

本公开描述,在一个方面,用于鉴定与对象免疫细胞结合的 $\beta$ -葡聚糖的方法。通常,该方法包括获得来自对象的血液样品,该血液样品包含免疫细胞,向血液样品的至少一部分加入 $\beta$ -葡聚糖,在允许 $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物,并检测与免疫细胞结合的 $\beta$ -葡聚糖。在另一个方面,本公开描述的方法通常包括确定对象为 $\beta$ -葡聚糖的低结合者,并给对象联合施用可溶性 $\beta$ -葡聚糖和能使对象由低结合者转变为高结合者的抗体制备物。

1. 鉴定与对象的免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖的方法,所述方法包括:  
从对象获得血液样品,所述血液样品包含免疫细胞;  
向血液样品的至少一部分加入可溶性  $\beta$ -葡聚糖并在允许可溶性  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物;以及  
检测与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖来源于酵母。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖。
4. 前述任一项权利要求的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ (1,6)-[聚-(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$ (1,3)-D-吡喃葡萄糖。
5. 前述任一项权利要求的方法,其中检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖包括使样品与特异性结合  $\beta$ -葡聚糖的单克隆抗体接触。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述单克隆抗体包含 BfD I、BfD II、BfD III 或 BfD IV。
7. 前述任一项权利要求的方法,进一步包括:  
从对象获得第二份血液样品,所述血液样品包含免疫细胞;  
向血液样品的至少一部分加入可溶性  $\beta$ -葡聚糖并在允许可溶性  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物;以及  
检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖。
8. 改善用于对象的  $\beta$ -葡聚糖免疫治疗的方法,所述方法包括:  
鉴定对象为低结合者;以及  
给对象联合施用能使对象从低结合者转变为高结合者的可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物。
9. 权利要求 8 的方法,其中鉴定对象为低结合者包括:  
从对象获得血液样品,所述样品包含抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度;  
测量血液样品的至少一部分的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度;以及  
如果抗- $\beta$ -葡聚糖 IgG 抗体滴度小于 20,000,则鉴定对象为低结合者。
10. 权利要求 8 的方法,其中鉴定对象为低结合者包括:  
从对象获得血液样品,所述样品包含免疫细胞;  
向血液样品的至少一部分加入可溶性  $\beta$ -葡聚糖,并在允许可溶性  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物;  
检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖;并且  
如果  $\beta$ -葡聚糖与不超过 10% 的免疫细胞结合,则鉴定对象为低结合者。
11. 权利要求 8-10 任一项的方法,其中所述抗体制备物包含来自高结合者的血清。
12. 权利要求 8-10 任一项的方法,其中所述抗体制备物包含与可溶性  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的单克隆抗体。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述单克隆抗体包含 BfD I、BfD II、BfD III 或 BfD IV。
14. 权利要求 8-13 任一项的方法,其中所述抗体制备物包含静脉内免疫球蛋白。
15. 权利要求 8-14 任一项的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物被同时联合施用。

16. 权利要求 8-14 任一项的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物在不同的时间被联合施用。

17. 权利要求 8-14 任一项的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物在不同的部位被联合施用。

18. 权利要求 8-16 任一项的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖来源于酵母。

19. 权利要求 8-18 任一项的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖。

20. 权利要求 9-19 任一项的方法,其中所述可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ (1,6)-[聚-(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$ (1,3)-D-吡喃葡萄糖。

## $\beta$ -葡聚糖免疫治疗方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

本申请要求 2012 年 5 月 1 日提交的美国临时专利申请序号 61/640, 834 和 2012 年 4 月 30 日提交的美国临时专利申请序号 61/640, 397 的优先权, 其中每个都通过引用合并入本文。

[0002] 简述

本公开描述, 在一个方面, 用于鉴定与对象免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖的方法。通常, 该方法包括获得来自对象的血液样品, 该血液样品包含免疫细胞, 向血液样品的至少一部分加入  $\beta$ -葡聚糖, 和在允许  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物, 并检测与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖。

[0003] 在一些实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖可以来源于酵母。在一些实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖可以包括  $\beta$ -1, 3/1, 6 葡聚糖如  $\beta$  (1, 6)-[聚-(1, 3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$  (1, 3)-D-吡喃葡萄糖。

[0004] 在一些实施方案中, 检测与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖可以包括使样品与特异性结合  $\beta$ -葡聚糖的单克隆抗体接触。在这些实施方案的一些中, 单克隆抗体包括 BfD I、BfD II、BfD III 或 BfD IV。

[0005] 在一些实施方案中, 该方法可以进一步包括获得来自对象的第二份血液样品, 该血液样品包含免疫细胞, 向第二份血液样品的至少一部分加入  $\beta$ -葡聚糖, 在允许  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物, 并检测与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖。

[0006] 在另一个方面, 本公开描述改善用于对象的  $\beta$ -葡聚糖免疫治疗的方法。通常, 该方法包括鉴定对象为低结合者 (low binder), 并给对象联合施用  $\beta$ -葡聚糖和能将对象从低结合者转变为高结合者 (high binder) 的抗体制备物。在一些实施方案中, 鉴定对象为低结合者可以包括获得来自对象的血液样品, 该样品包含抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度, 测量血液样品的至少一部分的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度, 以及, 如果抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度小于预定水平, 则鉴定对象为低结合者。在其它实施方案中, 鉴定对象为低结合者可以包括获得来自对象的血液样品, 该样品包含免疫细胞, 向血液样品的至少一部分加入  $\beta$ -葡聚糖并在允许  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物, 并检测与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖, 以及, 如果  $\beta$ -葡聚糖与不超过 10% 的免疫细胞结合, 则鉴定对象为低结合者。

[0007] 在一些实施方案中, 抗体制备物可以包括来自高结合者的血清。在一些实施方案中, 抗体制备物可以包括与  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的单克隆抗体如 BfD I、BfD II、BfD III 或 BfD IV。在一些实施方案中, 抗体制备物可以包括静脉内免疫球蛋白。在一些实施方案中, 抗体制备物可以包括与抗体或抗体片段如 Fc 部分缀合的  $\beta$ -葡聚糖分子。

[0008] 在一些实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物被同时联合施用。在其它实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物在不同的时间被联合施用。在一些实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物在不同的部位被联合施用。

[0009] 在一些实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖可以来源于酵母。在一些实施方案中,  $\beta$ -葡聚糖可以包括  $\beta$ -1, 3/1, 6 葡聚糖如  $\beta$  (1, 6)-[聚-(1, 3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$  (1, 3)-D-吡

喃葡萄糖。

[0010] 上述本发明的简述并非意在描述本发明的每一个公开的实施方案或每个实现。下面的描述更具体举例说明了阐释性的实施方案。在整个申请的几个地方,通过列举实例来提供指导,这些实例可被用于不同组合中。在每个例子中,所述的列表仅仅是充当代表性的组,而不应当被理解为是排他的列表。

[0011] 附图简述

图 1. 显示  $\beta$ -葡聚糖 (PGG) 与健康人全血中多形核白细胞差异性结合的流式细胞术数据。

[0012] 图 2. 显示  $\beta$ -葡聚糖与健康人全血中中性粒细胞差异性结合的数据。

[0013] 图 3. 显示  $\beta$ -葡聚糖与健康人全血中单核细胞差异性结合的数据。

[0014] 图 4. 比较低结合者和高结合者的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度的数据。

[0015] 图 5. 两组开放标记的随机多中心研究中对照和研究组中患者治疗的平均天数的比较。

[0016] 图 6. 显示高结合者血清可以增加  $\beta$ -葡聚糖与得自低结合者的 PMN 结合的数据。

[0017] 图 7. 显示抗- $\beta$ -葡聚糖抗体可以增加  $\beta$ -葡聚糖与来自低结合者的 PMN 结合的数据。

[0018] 图 8. 显示静脉内免疫球蛋白可增加  $\beta$ -葡聚糖与来自低结合者的 PMN 结合的数据。

[0019] 图 9. 显示 PGG-抗体缀合物与 PMN 结合的数据。

[0020] 图 10. 显示 PGG-IVIG 缀合物与 PMN 结合的数据。

[0021] 说明性实施方案的详细描述

本公开描述的方法涉及可溶性  $\beta$ -葡聚糖作为免疫治疗组分的使用。本文描述的方法利用了有关在不同健康人群中  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞的差异性结合的观察结果。令人惊讶地,  $\beta$ -葡聚糖的“高结合者”比“低结合者”显示出更高的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度。因此,本公开描述了筛选个体以鉴定“高结合者”和“低结合者”的方法。本公开还描述了这样的方法,其通常包括将“低结合者”转变为“高结合者”并由此增加那些基于  $\beta$ -葡聚糖的免疫治疗可能会对其有效的人群。本公开还描述了治疗方案,其包括定期监测对象当前的“高结合者”或“低结合者”状态,并且,如果需要的话,对提供给该对象的治疗进行调整,以促使获得或保持“高结合者”状态。

[0022]  $\beta$ -葡聚糖是葡萄糖聚合物,其来源于多种微生物和植物来源,包括,例如,酵母、细菌、藻类、海藻、蘑菇、燕麦和大麦。其中酵母  $\beta$ -葡聚糖已被广泛评价其免疫调节性质。酵母  $\beta$ -葡聚糖可以多种形式呈现诸如,例如,完整酵母、酵母聚糖、纯化的完整葡聚糖颗粒、可溶性酵母聚糖多糖,或不同分子量的高度纯化的可溶性  $\beta$ -葡聚糖。在结构上,酵母  $\beta$ -葡聚糖由葡萄糖单体构成,结构组织为  $\beta$ -(1,3)-连接的吡喃葡萄糖骨架,并且重复性  $\beta$ -(1,3) 吡喃葡萄糖分支与骨架通过  $\beta$ -(1,6) 糖苷键相连。不同形式的酵母  $\beta$ -葡聚糖的功能可能彼此不同。酵母  $\beta$ -葡聚糖行使其免疫调节效果的机制可受到不同形式  $\beta$ -葡聚糖之间结构差异的影响诸如,例如它的颗粒或可溶性质、三级构象、主链长度、侧链长度和侧链频度。酵母  $\beta$ -葡聚糖的免疫刺激功能还依赖于不同物种中的不同细胞类型中涉及的受体,其还依赖于  $\beta$ -葡聚糖的结构特性。

[0023] 通常,  $\beta$ -葡聚糖免疫治疗可以包括给对象施用任何适当形式的  $\beta$ -葡聚糖或两种或更多种形式的  $\beta$ -葡聚糖的任何组合。来自于其天然来源的适当的  $\beta$ -葡聚糖和适当的  $\beta$ -葡聚糖的制备物在例如美国专利申请公开号 US2008/0103112 A1 中描述。在一些情况下,  $\beta$ -葡聚糖可以来源于酵母, 例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。在某些情况下,  $\beta$ -葡聚糖可以是或者可以衍生自  $\beta$  (1, 6)-[ 聚-(1, 3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$  (1, 3)-D-吡喃葡萄糖, 其在本文中也称为 PGG (IMPRIME PGG, Biothera, Eagan, MN), 一种高度纯化并被很好表征的可溶性酵母来源的  $\beta$ -葡聚糖形式。而且, 基于  $\beta$ -葡聚糖的免疫治疗可以包括, 例如修饰的和 / 或衍生化的  $\beta$ -葡聚糖的使用, 如在国际专利申请号 PCT/US12/36795 中描述的那些。在其它情况下,  $\beta$ -葡聚糖免疫治疗可以包括施用, 例如微粒-可溶性  $\beta$ -葡聚糖或微粒-可溶性  $\beta$ -葡聚糖制备物, 其每一个在例如美国专利号 7, 981, 447 中描述。

[0024] 如上所述, 酵母  $\beta$ -葡聚糖已被广泛评价其免疫调节性质。特别是 PGG  $\beta$ -葡聚糖已证明当与肿瘤相关单克隆抗体 (mAbs) 组合施用, 针对各种癌症类型具有临床前活性。癌症的示例性类型和它们相关的肿瘤相关 mAbs 包括, 例如 T-细胞淋巴瘤 (抗-MUC1, 抗-GD2)、肺癌 (抗-MUC1)、乳腺腺癌 (抗-MMTV)、卵巢癌 (贝伐单抗)、非小细胞肺癌 (贝伐单抗、西妥昔单抗)、结肠直肠癌 (西妥昔单抗)、慢性淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤 (利妥昔单抗) 和胰腺癌 (西妥昔单抗, 抗-MUC1)。  $\beta$ -葡聚糖可以刺激中性粒细胞, 中性粒细胞然后被募集到用肿瘤相关抗体标记的肿瘤处。募集的中性粒细胞被补体受体 3 (CR3) 通过 iC3b/C3b—位于 mAb 标记的肿瘤细胞的表面—与融合的  $\beta$ -葡聚糖的双重连接激活, 以杀死肿瘤细胞。

[0025] 但是, 我们发现, 存在不同的个体人群: 一种人群表现出相对高的  $\beta$ -葡聚糖与全血中天然免疫细胞结合的能力; 另一种人群表现出相对低的  $\beta$ -葡聚糖与全血中天然免疫细胞结合的能力。这种观察结果根据来自免疫小鼠模型和涉及分离的人免疫细胞的研究的数据是完全无法预料的。许多个体显示出一定水平的与天然的, 低水平暴露于  $\beta$ -葡聚糖的免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖。(例如, 图 1, “从头开始”)。当外源  $\beta$ -葡聚糖被施用的时候, “低结合者”表现出与  $\beta$ -葡聚糖结合的免疫细胞百分比的温和增加, 而“高结合者”表现出与  $\beta$ -葡聚糖结合的免疫细胞百分比的显著增加。(图 1, “+ 外源 PGG”)。图 1 和图 2 显示了反映  $\beta$ -葡聚糖与多形核白细胞 (PMNs) 结合的数据, 而图 3 (单核细胞) 显示差异性结合也适用于其它天然免疫细胞群体。此外, “高结合者”还倾向于产生更多的趋化性细胞因子和趋化因子如 IL-8、MCP、MIP-1 等。

[0026] 如本文所使用的, “高结合者”状态指显示出预定百分比的与外源提供的  $\beta$ -葡聚糖结合的特定免疫细胞群体的个体。用于确定个体是否是“高结合者”或“低结合者”的免疫细胞群体可以是, 例如, 多形核白细胞 (PMNs) 或单核细胞。如果个体血液样品中至少 10% 的 PMNs 或单核细胞与外源提供的  $\beta$ -葡聚糖结合, 那么该个体可以被认为是“高结合者”。因此, 如果个体血液样品中至少 10%, 至少 12%, 至少 15%, 或至少 40% 的 PMNs 或单核细胞与外源提供的  $\beta$ -葡聚糖结合, 那么该个体可以是“高结合者”。(参见, 例如图 2 和图 3)。在一些情况中, 外源提供的  $\beta$ -葡聚糖可以包括浓度为 10  $\mu$ g/mL-100  $\mu$ g/mL 的 PGG。“低结合者”状态指未能显示出“高结合者”状态的个体。

[0027] 而且, “高结合者”可以表现出比“低结合者”高的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度。(图

4)。典型的“高结合者”的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度可以是至少 25,000 如,例如,至少 30,000、至少 35,000、至少 40,000、至少 45,000、至少 50,000、至少 55,000 或至少 60,000 的滴度。(参见,例如,图 4)。抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度典型地指 IgG。在一些情况中,然而,IgM 的存在可以补偿较低的 IgG 滴度,以帮助建立“高结合者”状态。如下文更详细描述,“高结合者”状态可以影响个体对  $\beta$ -葡聚糖治疗的反应。可以通过给个体提供抗- $\beta$ -葡聚糖抗体作为  $\beta$ -葡聚糖治疗的一部分,来人工诱导天然的“低结合者”对  $\beta$ -葡聚糖治疗显示出“高结合者”样的反应。

[0028] 因此,在一个方面,本公开描述对个体进行筛选以确定该个体,在该时间点,是否显示出“高结合者”或“低结合者”状态。该方法通常包括获得来自个体的血液样品,向样品的至少一部分加入  $\beta$ -葡聚糖,在允许  $\beta$ -葡聚糖结合免疫细胞的条件下孵育混合物,并检测与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖。

[0029] 血液样品包括足够的包括免疫细胞的血液部分。因此,在一些实施方案中,血液样品可以是全血。在其它实施方案中,血液样品可以被至少部分加工以除去全血中的筛选检测所不必需的一种或多种组分如,例如,红细胞。因此,在一些实施方案中,血液样品可以包括血液产品如,例如,至少包括一部分血沉棕黄层的任何血液级分。

[0030] 在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖可以来源于酵母如,例如酿酒酵母。在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖可以包括  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖如,例如, $\beta$ (1,6)-[聚-(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$ (1,3)-D-吡喃葡萄糖。

[0031] 在一些实施方案中,与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖可以通过使样品与特异性结合  $\beta$ -葡聚糖的单克隆抗体接触而被检测。单克隆抗体可以是任何与  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的单克隆抗体。如本文所使用的,“特异性的”及其变形形式指对于特定的靶标具有某种程度上的有差别的或非一般性的(即非特异性的)亲和性。与  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的示例性单克隆抗体包括,例如,被鉴定为 BfD I、BfD II、BfD III 和 / 或 BfD IV (Biothera, Eagan, MN) 的单克隆抗体,其每种描述于美国专利号 6,294,321。

[0032] 为了帮助检测结合与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体,抗- $\beta$ -葡聚糖可以包括可检测标记。或者,结合的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体可以通过使用标记的二级抗体检测。在这两种情况的任一种中,合适的标记包括,例如,荧光标记、酶标记、比色标记或放射标记。

[0033] 该方法可以进一步包括将结合  $\beta$ -葡聚糖的免疫细胞固定在基质上。在一些情况中,免疫细胞可以在与  $\beta$ -葡聚糖接触之前被固定—例如,通过在使血液样品与  $\beta$ -葡聚糖接触之前使血液样品的至少一部分与基质接触。在其它实施方案中,免疫细胞可以在与  $\beta$ -葡聚糖接触之后被固定。在两种情况的任一种中,免疫细胞可以使用任何适合的材料如,例如,与所期望的免疫细胞群体特异性结合的固定化抗体固定。

[0034] 在一些实施方案中,该方法包括洗涤步骤以除去未结合的测定组分。例如,一些实施方案可以包括从结合  $\beta$ -葡聚糖的免疫细胞洗去未结合的  $\beta$ -葡聚糖和 / 或未结合的血液样品组分的步骤。作为另一个实例,一些实施方案可以包括从基质洗去未结合的免疫细胞的步骤,如果存在的话。作为另一个实例,一些实施方案可以包括从与免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖洗去未结合的  $\beta$ -葡聚糖-特异性抗体。

[0035] 在一些实施方案中,该方法可以包括对对象进行纵向重复筛查以监测对象随着时

间作为“高结合者”或“低结合者”的状态。当进行重复  $\beta$ -葡聚糖给药时,一些接受  $\beta$ -葡聚糖免疫治疗的癌症患者随着时间显示出抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度的降低。这些患者还显示出结合  $\beta$ -葡聚糖的免疫细胞(例如外周 PMNs)的纵向降低。这种观察结果可能是因为,至少部分因为,结合  $\beta$ -葡聚糖的免疫细胞被募集到循环之外并进入肿瘤微环境中。或者,其可能是因为,至少部分因为,影响与循环免疫细胞结合的  $\beta$ -葡聚糖的血浆因子的变化(例如,随着时间抗- $\beta$ -葡聚糖抗体降低)。

[0036] 在另一方面,本公开描述了将“低结合者”转变为“高结合者”的方法。在两组,开放标记的,随机,多中心研究中,在经过至少两次先前的化疗治疗之后,795 名具有复发性/进行性结肠直肠癌的对象被分为对照组和研究组。对照组的对象接受西妥昔单抗的治疗。研究组的对象接受西妥昔单抗 + 4 mg/kg PGG  $\beta$ -葡聚糖的治疗。图 5 显示虽然接受  $\beta$ -葡聚糖作为其免疫治疗的一部分的对象保持治疗的平均时间比仅接受西妥昔单抗的对象更长。但在那些“高结合者”的对象中,效果是最好的。在此背景下,治疗的时间长度是治疗成功的表示,从而较长的治疗时间表示积极的治疗结果,而较短的治疗时间表示欠佳的结果。因此,“高结合者”状态相对于“低结合者”状态具有临床后果。

[0037] 这种表现出“高结合者”状态相对于表现出“低结合者”状态的临床后果意味着能够使个体从“低结合者”转变为“高结合者”,可以对于该个体来说具有临床后果。图 6 显示“高结合者”血清可以增加  $\beta$ -葡聚糖与“低结合者”的免疫细胞(例如 PMNs)的结合。递增量的抗- $\beta$ -葡聚糖单克隆抗体也可以增加  $\beta$ -葡聚糖与“低结合者”的血清中的免疫细胞(例如 PMNs)的结合(图 7)。还有,静脉内免疫球蛋白(IVIG),一种含有来自很多供体(典型地数百个,甚至数千个供体并从而天然含有抗- $\beta$ -葡聚糖抗体)的合并的多价 IgG 的血液产品,也可以增加  $\beta$ -葡聚糖与“低结合者”的血清中的免疫细胞(例如 PMNs)的结合(图 8)。因此,作为免疫治疗的组分,可以通过给个体提供  $\beta$ -葡聚糖和包括抗- $\beta$ -葡聚糖抗体的制备物的组合,使该个体从表现出“低结合者”状态转变为表现出“高结合者”状态。显著地,个体从“低结合者”状态向“高结合者”状态的转变可以改善免疫治疗的临床后果。

[0038] 因此,该方法包括联合施用能够使对象从低结合者转变为高结合者的  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物。如本文所使用的,“联合施用”是指被施用的组合的两种或更多种组分使得该组合的治疗或预防效果比任一组分单独施用的治疗或预防效果好。两种组分可以同时或顺序地联合施用。同时联合施用组分可以在一种或多种药物组合物中提供。两种或更多种组分的顺序联合施用包括这样的情况:其中组分被施用以使得两种组分在两者被施用后是同时生物可利用的。不管组分是同时还是顺序地联合施用,组分可以在单一部位或在不同的部位被联合施用。

[0039] 通过给对象施用包括与任何抗体或抗体的一部分缀合的  $\beta$ -葡聚糖部分的组合物,可以发生类似的由“低结合者”向“高结合者”状态的转变。图 9 显示了说明通过使 PGG 与 BTH1704(抗-MUC1,美国专利号 6,204,366, Biothera, Inc, Eagan, MN, 第三小图)或 ERBITUX(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN, 第四小图)抗肿瘤抗体缀合,使相对低的 PGG 与全血中 PMNs 的结合(Imp Ref, 第二小图)转变为高结合状态的数据。图 10 也说明通过使 PGG 与静脉内免疫球蛋白(IVIG, Biologend, San Diego, CA)缀合,使相对低的 PGG 与全血中 PMNs 的结合(Imp Ref, 第二小图)转变为高结合状态。

[0040] 因此,在另一个方面,该方法包括给对象施用包括与抗体,治疗性抗体,抗肿瘤抗体,或抗体片段如抗体的 Fc 部分缀合的  $\beta$ -葡聚糖部分的组合物。修饰的和/或衍生化的 PGG,包括 PGG 部分和抗体的 PGG 缀合物,其描述于国际专利申请号 PCT/US12/36795,其也可以被应用于抗体片段缀合物。PGG 分子可以是或衍生自  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖。在此背景下,“衍生自”是指缀合物必须通过产生替换 PGG  $\beta$ -葡聚糖的一个或多个原子的共价键来制备。如本文所使用的,“衍生自  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖”是指在替换 PGG 的一个或多个原子以形成缀合物的共价键之后,PGG  $\beta$ -葡聚糖的一部分仍然作为缀合物的一部分。

[0041] 如本文所使用的,“能使低结合者转变为高结合者”指使个体的结合者状态从“低结合者”(例如低于预定阈值)改变为“高结合者”(例如高于预定阈值)的性质。对象的“低结合者”或“高结合者”状态可以根据  $\beta$ -葡聚糖与从对象获得的血液样品的至少一部分中的免疫细胞结合的程度来确定。或者,对象的结合者状态可以根据在从对象获得的血液样品的至少一部分中测量的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度来确定。

[0042] 在一些实施方案中,抗体制备物可以包括来自高结合者的血清。

[0043] 在其它实施方案中,抗体制备物可以包括静脉内免疫球蛋白。在又其它的实施方案中,抗体制备物可以包括与  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的单克隆抗体。与  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的示例性单克隆抗体包括,例如,BfD I、BfD II、BfD III 或 BfD IV。

[0044]  $\beta$ -葡聚糖,抗体制备物,和/或两种组分的组合可以与“载体”一起配制成组合物。如本文所使用的,“载体”包括任何溶剂、分散介质、媒介物、包衣、稀释剂、抗细菌剂和/或抗真菌剂、等张剂、吸收延缓剂、缓冲剂、载体溶液、悬液、胶质等等。这些介质和/或试剂用于药学活性物质的使用是本领域熟知的。除非在任何传统介质或试剂与  $\beta$ -葡聚糖或抗体不相容的限度内,它在治疗组合物中的使用都会被考虑。补加的活性成分也可以被掺入到组合物中。

[0045] “药学可接受的”是指并非是在生物上或其它方面不合需要的物质,即可以与  $\beta$ -葡聚糖和/或抗体一同给个体施用,而不会引起任何不良生物学效果或以有害的方式与药物组合物所含有的其它组分发生相互作用的物质。

[0046]  $\beta$ -葡聚糖,抗体制备物,和/或两种组分的组合可以被配制成药物组合物。在一些实施方案中, $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物可以在单一的制剂中被提供。在其它实施方案中, $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物可以在分开的制剂中被提供。药物组合物可以配制成适合于一种或多种优选的施用途径的各种和/或多种形式。因此,药物组合物可以通过一种或多种已知的路线被施用,包括,例如,口服、肠胃外(例如皮内、经皮、皮下、肌内、静脉内、腹膜内等等)、或局部(例如鼻内、肺内、乳房内、阴道内、子宫内、皮肤内、经皮、直肠给药等等)。药物组合物,或其部分,可以被施用到粘膜表面,例如被施用到,例如鼻或呼吸道粘膜(例如通过喷雾或气溶胶)。药物组合物,或其部分,还可以通过持续释放或延缓释放被施用。

[0047] 制剂可以方便地以单位剂型的形式呈现,并可以通过药学领域熟知的方法制备。用药学可接受的载体制备组合物方法包括将  $\beta$ -葡聚糖和/或抗体制备物与包含一种或多种助剂的载体结合的步骤。通常,可以通过均匀地和/或紧密地使活性化合物与液体载体,微细固体载体,或二者结合,并然后,如果需要的话,使产物成型为所期望的制剂。

[0048]  $\beta$ -葡聚糖,抗体制备物,和/或两种组分的组合可以以任何适当的形式提供,包括但不限于溶液,悬液、乳液、喷雾、气溶胶或任何形式的混合物。组合物可以以含有任何药

学可接受的赋形剂、载体或媒介物的制剂的形式被递送。例如，制剂可以以传统的局部剂型如，例如，乳膏、软膏、气溶胶制剂、非气溶胶喷雾、凝胶、洗剂等的形式被递送。制剂可以进一步包括一种或多种添加剂，包括如，例如，佐剂、皮肤渗透增强剂、着色剂、香料、调味剂、保湿剂、增稠剂等。

[0049] 在一些实施方案中， $\beta$ -葡聚糖可以来源于酵母如，例如，酿酒酵母。在一些实施方案中， $\beta$ -葡聚糖可以包括 $\beta$ -1,3/1,6葡聚糖如，例如， $\beta$ (1,6)-[聚-(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$ (1,3)-D-吡喃葡萄糖。

[0050] 在一些实施方案中，该方法可以包括给对象施用足够量的 $\beta$ -葡聚糖以提供，例如，大约100 ng/kg至大约50 mg/kg的剂量，虽然在一些实施方案中，该方法可以通过以此范围外的剂量施用 $\beta$ -葡聚糖实施。在一些实施方案中，该方法包括给对象施用足够量的 $\beta$ -葡聚糖以提供大约10  $\mu$ g/kg至大约10 mg/kg的剂量，诸如，例如，大约1 mg/kg、大约2 mg/kg、大约3 mg/kg、大约4 mg/kg、大约5 mg/kg、大约6 mg/kg、大约7 mg/kg、大约8 mg/kg、大约9 mg/kg或大约10 mg/kg的剂量。在一个特定的实施方案中，该方法包括施用足够量的 $\beta$ -葡聚糖以提供大约4 mg/kg的剂量。

[0051] 或者，可以使用在疗程正要开始之前获得的实际体重计算剂量。对于用这种方式计算的剂量，在疗程开始之前使用Dubois方法计算身体表面积( $m^2$ ): $m^2 = (wt \text{ kg}^{0.425} \times \text{高度 cm}^{0.725}) \times 0.007184$ 。在一些实施方案中，因此，该方法可以包括施用足够量的 $\beta$ -葡聚糖以提供例如大约0.01  $mg/m^2$ 至大约10  $mg/m^2$ 的剂量。

[0052] 在一些实施方案中，该方法可以包括给对象施用足够量的特异性结合 $\beta$ -葡聚糖的抗体以提供，例如，大约100 ng/kg至大约50 mg/kg的剂量，虽然在一些实施方案中，该方法可以通过以此范围外的剂量施用 $\beta$ -葡聚糖实施。在一些实施方案中，该方法包括给对象施用足够量的抗体以提供大约10  $\mu$ g/kg至大约5 mg/kg的剂量，例如，大约100  $\mu$ g/kg至大约1 mg/kg的剂量。在一些实施方案中，特异性结合 $\beta$ -葡聚糖的抗体可以以静脉内免疫球蛋白(IVIG)，一种含有来自很多供体(典型地数百个，甚至数千个供体并从而天然含有抗 $\beta$ -葡聚糖抗体)的合并的多价IgG的血液产品的形式被施用。在这样的实施方案中，IVIG可以以大约0.1 g/kg至大约2.0 g/kg如，例如，0.1 g/kg、0.2 g/kg、0.3 g/kg、0.4 g/kg、0.5 g/kg、0.6 g/kg、0.7 g/kg、0.8 g/kg、0.9 g/kg、1.0 g/kg、1.1 g/kg、1.2 g/kg、1.3 g/kg、1.4 g/kg、1.5 g/kg、1.6 g/kg、1.7 g/kg、1.8 g/kg、1.9 g/kg或2.0 g/kg的剂量被施用。在某些实施方案中，IVIG可以被施用以提供大约0.4 g/kg至大约1.0 g/kg的剂量。

[0053] 或者，可以使用在疗程正要开始之前获得的实际体重计算剂量。对于用这种方式计算的剂量，在疗程开始之前使用Dubois方法计算身体表面积( $m^2$ ): $m^2 = (wt \text{ kg}^{0.425} \times \text{高度 cm}^{0.725}) \times 0.007184$ 。在一些实施方案中，因此，该方法可以包括给对象施用足够量的抗体以提供例如大约0.01  $mg/m^2$ 至大约10  $mg/m^2$ 的剂量。

[0054] 在一些实施方案中， $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物可以被联合施用，例如，从每周单剂量至每周多剂量，虽然在一些实施方案中，该方法可以通过以该范围之外的频率进行 $\beta$ -葡聚糖和抗体的联合施用被实施。在某些实施方案中， $\beta$ -葡聚糖和抗体的施用可以是大约每年1次至每周1次。

[0055] 在一些实施方案中，该方法进一步包括给对象提供免疫治疗。免疫治疗可以包括

施用一种或多种肿瘤相关抗体（例如西妥昔单抗，贝伐单抗，抗-MUC1）。在此背景下， $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物的联合施用可以增加免疫治疗的效率。

[0056] 如本文所使用的，术语“和 / 或”指一个或全部所列出的要素或任意两个或更多个所列出的要素的组合；术语“包含”及其变形形式在说明书和权利要求中这些术语出现的地方不具有限制的意义，除非另有说明；“一 (a、an)”，“这 (the)”和“至少一个”可互换使用，并且指一个或多于一个；用端点描述的数值范围的记载包括纳入该范围内的所述数值（例如，1-5 包括 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5 等）。

[0057] 在前面的描述中，为清楚起见，特定的实施方案可以孤立地被描述。除非另有明确说明，特定实施方案的特征与另一个实施方案的特征不相容，某些实施方案可以包括本文描述的与一个或多个实施方案有关的相容特征的组合。

[0058] 对于本文公开的包括不连续步骤的任何方法，其步骤可以以任何可能的顺序进行。并且，在适当的时候，两个或多个步骤的任意组合可以同时进行。

[0059] 本发明通过下述实施例进行具体说明。应当理解，根据本文所述的本发明的范围和精神，特定的实施例、材料、量和程序应当被宽泛解释。

## 实施例

### [0060] 实施例 1

#### 材料

以不含防腐剂的，可溶性  $\beta$ -葡聚糖制剂的形式提供 Imprime PGG (Biothera, Eagan, MN)，其被制备为浓度为 1 mg/mL，在 0.8% 氯化钠和 0.2% 柠檬酸二氢钠中，pH 为 6.4。化合物被储存于 4-8°C 直至使用。

#### [0061] 样品制备

**全血.** 新鲜全血得自在捐献之前提供了知情同意的健康志愿者 (New England Institutional Review Board, May 2007)。血液被收集在含有 158 USP 单位冻干肝素钠 (BD Biosciences; San Jose, CA) 的 Vacutainer® 中。

[0062] **血清和血浆.** 全血通过用血清分离器 (顶部红色) 或肝素钠 (顶部绿色) 试管收集的 Vacutainer® 试管 (BD Biosciences; San Jose, CA) 被加工为血清或血浆。试管被充分混合，并在室温孵育 30 分钟，然后在 2000 rpm ( $\sim 1150 \times g$ ) 离心 10 分钟。上清 (血清或血浆) 然后被转移至新鲜的聚碳酸酯储存圆锥管中。

#### [0063] 抗-BG ELISA 方法

使用由猴抗- $\beta$ -葡聚糖方法 (Noss 等, 2012 *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 157:98-108) 修改的初步 ELISA 方法测试人血清样品。Costar 通用结合板用 50  $\mu$ L 的稀释在纯水中的纯化  $\beta$ -葡聚糖形成的 1  $\mu$ g/mL  $\beta$ -葡聚糖包被，并在 37°C 孵育 30 分钟。包被的板然后在室温暴露于  $>1500 \mu$ W/cm<sup>2</sup> 的高强度的紫外线 5 分钟，并被放置于 50°C 的强制对流型烘箱中直至干燥，然后第二次在室温暴露于  $>1500 \mu$ W/cm<sup>2</sup> 的高强度的紫外线 5 分钟。板然后用 0.5% 的牛血清清蛋白封闭  $> 30$  分钟，随后用洗涤缓冲液 (具有 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲盐水 [PBS]) 洗涤。人血清样品被稀释至加入到板中的洗涤缓冲液中，并然后在板上的洗涤缓冲液中被连续稀释。1:400 稀释的试验样品被吸取至具有七个额外的连续 1:2 稀释液 (在 1:400 和 1:12,800 之间的血清稀释液) 的测试板上。样品在

室温孵育 30 分钟以使人 IgG 与结合板的  $\beta$ -葡聚糖抗原结合。孵育之后,用洗涤缓冲液洗涤孔,并在孔中孵育酶标二级抗体(辣根过氧化物酶缀合的亲纯化的山羊抗人 IgG, Fc  $\gamma$  特异性的)以结合与  $\beta$ -葡聚糖抗原结合的人 IgG。在用洗涤缓冲液洗涤之前允许二级抗体孵育 30 分钟。在从孔中除去全部洗涤缓冲液之后,在孔中孵育过氧化物酶底物并在显色 5 分钟时用  $\sim 1$  M 磷酸淬灭显色。使用微量滴定板读板仪测量 450 nm 的光密度 (OD)。

[0064] *确定抗- $\beta$ -葡聚糖 Ab 滴度*

对从重复的孔中获得的 OD 求平均,并减去平均测定背景。给出大于或等于 0.100 的背景调整的 OD 的最大稀释被认为是样品滴度并表示为该稀释的倒数。对于测定性能的定义,将一个值赋予标准参考血清,并在每个测定板上构建参考曲线。例如给出 0.100 的背景调整的 OD 的稀释度为 1:12,800 的测试样品被认为具有 12,800 的滴度。如果样品多次测试,而它们的滴度的平均值落入从 1:400 开始的连续 1:2 滴度水平,则下一个最低滴度水平被报告作为其滴度。例如,来自四次捐献的一个供体的血清在五个分开的测定中被测试,得到的平均滴度为 28,160;其滴度被报告为 25,600。

[0065] *检测标准曲线*. 每 mL 160 任意单位 (AU/mL) 的值被赋予标准人抗  $\beta$ -葡聚糖。因此测定方法中 1:400 的稀释比得到 400 mAU/mL 的值,作为标准稀释曲线的最高点,在测定板上制备另外的连续 1:2 稀释物。测定对照在 ELISA 洗涤缓冲液中进行 1:100 稀释用于测试。进一步,每个对照水平的两个稀释物被独立地制备,用于在每个板上进行平行测试。

[0066] *统计分析*. 绘制以 mAU/mL 表示的标准浓度相对于平均背景修正的光密度的曲线,获得标准参考曲线。使用 ELISA 软件由标准剂量反应曲线进行 4-参数拟合计算,以确定样品、对照和测试血清的未知值。落在标准曲线的最高和最低反应点之间(线性部分)的测定反应值被用于确定样品测试值。为了计算变异系数 (%CV);用一组值的标准偏差除以同一组值的平均值,并将结果乘以 100。

[0067] *PGG 与全血 (WB) 细胞的结合*

来自健康供体的一百微升的 WB 被等分至 5 mL 的聚苯乙烯荧光激活细胞分选仪 (FACS) 管中。这些 WB 样品用 Imprime PGG (10  $\mu$ g/mL 或 100  $\mu$ g/mL) 或柠檬酸盐缓冲液(媒介物对照)进行刺激。含有样品的 FACS 管被松散地盖上相应的盖子,并在 37°C 在潮湿的培养箱 (5% CO<sub>2</sub>) 中孵育 30 分钟或 2 小时。

[0068] 表 1. 用于染色全血样品的抗体混合物

抗体	公司；克隆号 #	稀释比或终浓度	鉴别为：
抗-CD15	Biologend; W6D3	0.2 $\mu$ g/mL	中性粒细胞
抗-CD19	Biologend; HIB19	0.63 $\mu$ g/mL	B 细胞
抗-CD14	Biologend; HCD14	5 $\mu$ g/mL	单核细胞
抗-CD14	Invitrogen; Tük4	1:50	单核细胞
抗-CD3	Biologend; HIT3a	0.25 $\mu$ g/mL	T 细胞
抗-CD45	Biologend; HI30	0.25 $\mu$ g/mL	不包括红细胞和血小板的造血细胞
山羊 F(ab') <sub>2</sub> 抗-小鼠 IgM	Jackson Immunolab	5 $\mu$ g/mL	小鼠抗- $\beta$ 葡聚糖抗体

与抗- $\beta$ -葡聚糖抗体 BfD IV 一起进行孵育,细胞与含有用于识别 BfD IV 的二级抗体以及用于识别各种细胞表面标记的抗体的抗体混合物一起孵育。

[0069] 孵育之后,加入 2 mL 的  $1\times$  Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) 洗涤所有样品,并在  $4^{\circ}\text{C}$  以 1500-1700 rpm 离心 5 分钟。经过两轮洗涤和抽吸之后,将 5  $\mu\text{L}$  的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体 BfD IV ( $\sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 混合到每个管中,并在室温孵育 30 分钟。这种一级抗体用如上所述的  $1\times$  DPBS 洗去两次,加入含有二级抗体以及特定的细胞表面标记 (表 1) 的抗体混合物,并在黑暗中在室温孵育 30 分钟。为了溶解红细胞,向每个样品加入 2 mL 的  $1\times$  BD 裂解溶液 (BD Biosciences; San Jose, CA) 并轻轻进行涡旋震荡。在室温孵育一个小时的时间之后,样品在  $4^{\circ}\text{C}$  以 1500-1700 rpm 离心 5 分钟。吸出 BD 裂解溶液并用  $1\times$  DPBS 洗涤细胞一次,并如上所述吸出。对于固定,向每个样品加入 300-400  $\mu\text{L}$  的 1% 多聚甲醛。在 20 小时的固定内在 LSR II (BD Biosciences; San Jose, CA) 上获得样品。使用 FlowJo 软件 (Tree Star, Ashland, OR) 分析数据。

#### [0070] 实施例 2

##### 材料

以不含防腐剂的,可溶性  $\beta$ -葡聚糖制剂的形式提供 Imprime PGG (Biothera, Eagan, MN),其被制备为浓度为  $1 \text{ mg}/\text{mL}$ ,在 0.8% 氯化钠和 0.2% 柠檬酸二氢钠中,pH 为 6.4。化合物被储存于  $4-8^{\circ}\text{C}$  直至使用。

#### [0071] 全血 (WB) 结合测定

新鲜 WB 得自在捐献之前提供了知情同意的健康志愿者 (New England Institutional Review Board. Blood Donation Protocol No. 07-124)。血液被收集在含有 158 USP 单位冻干肝素钠 (BD Biosciences; San Jose, CA) 的 Vacutainer<sup>®</sup> 中。血清被收集在含有基于凝血酶的凝块活化剂 (BD Biosciences; San Jose, CA) 的 Vacutainer<sup>®</sup> 中。大约收集后 20 分钟,在室温将小瓶以 2000rpm 离心 10 分钟。从该小瓶中收获血清并对于 8 小时内使用储存于  $4^{\circ}\text{C}$ ,或者对于在 8 小时后使用储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0072] 通过将全血样品与 Imprime PGG 在潮湿的培养箱中在  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 30 分钟或 2 小时进行全血结合测定。用  $1\times$  Dulbecco 氏磷酸盐缓冲盐水 (DPBS) 洗涤之后,加入 BfDIV (小鼠抗- $\beta$ -葡聚糖抗体) 并与 WB 在室温孵育 30 分钟。在更多轮洗涤之后,加入包括山羊抗-小鼠检测抗体和针对表面分子的抗体的抗体混合物,并在黑暗中在室温孵育 30 分钟。用 BD Lyse 裂解红细胞并将样品重悬于 1% 多聚甲醛中。在流式细胞仪上获得样品并用 FlowJo 软件 (Ashland, OR) 分析。

#### [0073] WB 和血清交叉研究

对于血清交叉研究,全血以 1200 rpm 离心 10 分钟并除去血浆。血液细胞用  $1\times$  DPBS 洗涤 1-2 次以除去剩余的血浆。加入 50  $\mu\text{L}$  血清并在加入 Imprime 之前混合。

[0074] 对于与抗- $\beta$ -葡聚糖 IgG (BioSupplies, Australia) 的孵育。冻干的抗体用  $1\times$  DPBS 重悬至  $1 \text{ mg}/\text{mL}$  并储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  或  $4^{\circ}\text{C}$  作为储液。在被加入血液样品之前,储液被 1:10 地稀释至  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,并且 10  $\mu\text{L}$  该溶液被加入到 100  $\mu\text{L}$  血液中。对于与 IVIG 的孵育,10% IVIG ( $100 \text{ mg}/\text{mL}$ ) (PRIVIGEN, CSL Behring, King of Prussia, PA) 以所指出的终浓度被加入到全血样品中。

#### [0075] 示例性实施方案

实施方案 1. 鉴定与对象的免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖的方法,所述方法包括:

从对象获得血液样品,所述血液样品包含免疫细胞;

向血液样品的至少一部分加入可溶性  $\beta$ -葡聚糖并在允许可溶性  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物;以及

检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖。

[0076] 实施方案 2. 实施方案 1 的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖来自于酵母。

[0077] 实施方案 3. 实施方案 1 或实施方案 2 的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖。

[0078] 实施方案 4. 任何前述实施方案的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ (1,6)-[聚-(1,3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$ (1,3)-D-吡喃葡萄糖。

[0079] 实施方案 5. 任何前述实施方案的方法,其中检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖包括使样品与特异性结合  $\beta$ -葡聚糖的单克隆抗体接触。

[0080] 实施方案 6. 实施方案 5 的方法,其中单克隆抗体包含 BfD I、BfD II、BfD III 或 BfD IV。

[0081] 实施方案 7. 任何前述实施方案的方法,进一步包括:

从对象获得第二份血液样品,所述血液样品包含免疫细胞;

向血液样品的至少一部分加入可溶性  $\beta$ -葡聚糖并在允许可溶性  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物;以及

检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖。

[0082] 实施方案 8. 改善对对象的  $\beta$ -葡聚糖免疫治疗的方法,所述方法包括:

鉴定对象为低结合者;以及

给对象联合施用可溶性  $\beta$ -葡聚糖和能使对象从低结合者转变为高结合者的抗体制备物。

[0083] 实施方案 9. 实施方案 8 的方法,其中鉴定对象为低结合者包括:

从对象获得血液样品,所述样品包含抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度;

测量血液样品的至少一部分的抗- $\beta$ -葡聚糖抗体滴度;以及

如果抗- $\beta$ -葡聚糖 IgG 抗体滴度小于 20,000,则鉴定对象为低结合者。

[0084] 实施方案 10. 实施方案 8 的方法,其中鉴定对象为低结合者包括:

从对象获得血液样品,所述样品包含免疫细胞;

向血液样品的至少一部分加入可溶性  $\beta$ -葡聚糖,并在允许可溶性  $\beta$ -葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物;

检测与免疫细胞结合的可溶性  $\beta$ -葡聚糖;并且

如果  $\beta$ -葡聚糖与不超过 10% 的免疫细胞结合,则鉴定对象为低结合者。

[0085] 实施方案 11. 实施方案 8-10 任一个的方法,其中抗体制备物包含来自高结合者的血清。

[0086] 实施方案 12. 实施方案 8-10 任一个的方法,其中抗体制备物包含与可溶性  $\beta$ -葡聚糖特异性结合的单克隆抗体。

[0087] 实施方案 13. 实施方案 12 的方法,其中单克隆抗体包含 BfD I、BfD II、BfD

III 或 BfD IV。

[0088] 实施方案 14. 实施方案 8-13 任一个的方法,其中抗体制备物包含静脉内免疫球蛋白。

[0089] 实施方案 15. 实施方案 8-14 任一个的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物被同时联合施用。

[0090] 实施方案 16. 实施方案 8-14 任一个的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物在不同的时间被联合施用。

[0091] 实施方案 17. 实施方案 8-14 任一个的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖和抗体制备物在不同的部位被联合施用。

[0092] 实施方案 18. 实施方案 8-16 任一个的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖来自于酵母。

[0093] 实施方案 19. 实施方案 8-18 任一个的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$ -1, 3/1, 6 葡聚糖。

[0094] 实施方案 20. 实施方案 9-19 任一个的方法,其中可溶性  $\beta$ -葡聚糖包含  $\beta$  (1, 6)-[ 聚-(1, 3)-D-吡喃葡萄糖基]-聚- $\beta$  (1, 3)-D-吡喃葡萄糖。

[0095] 本文引用的所有专利,专利申请,和出版物,和电子可用材料(包括,例如,例如 GenBank 和 RefSeq 中提交的核苷酸序列,和例如 SwissProt, PIR, PRF, PDB 中提交的氨基酸序列,以及 GenBank 和 RefSeq 中注释的编码区的翻译)的全部公开内容通过引用将其整体合并入本文。在本申请的公开内容和通过引用被合并入本文的任何文献公开的内容之间存在任何矛盾的情况下,将以本申请公开的内容为准。前述详细说明和实施例仅仅是为了清楚理解而给出。从中不应理解出不必要的限制。本发明不限于所显示的和所描述的确切细节,对于本领域技术人员来说显而易见的变化将被包括在由权利要求定义的本发明内。

[0096] 除非另外指出,说明书和权利要求中使用的表示组分数,分子量等等的所有数值应当被理解为在所有情况下受到术语“大约”的修饰。相应地,除非另有相反地说明,说明书和权利要求中的数值参数为近似值,其可以根据本发明寻求获得的所期望的特性而改变。至少,并且并非是要试图限制权利要求范围的等同原则,每个数值参数至少应当根据所报告的有效数字的数值并应用普通四舍五入技术来解释。

[0097] 尽管说明本发明的宽范围的数值范围和参数是近似值,特定实施例中描述的数值被尽可能精确地报告。但是,所有的数值,固有地包括在其各自的测试测量中发现的标准偏差所必然导致的范围。

[0098] 所有的标题是为了读者的方便,不应被用于限制标题之后跟随的文字部分的意义,除非有这样的说明。

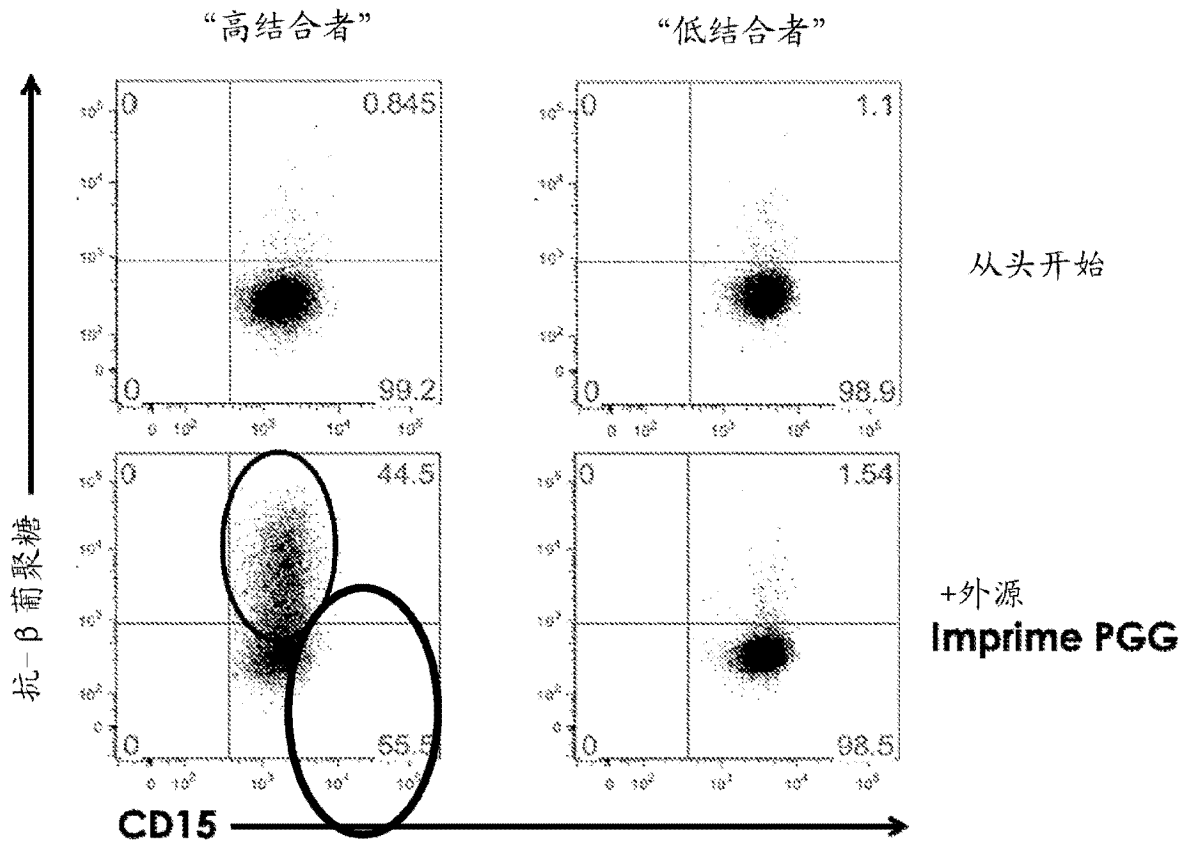


图 1



PGG-结合的单核细胞

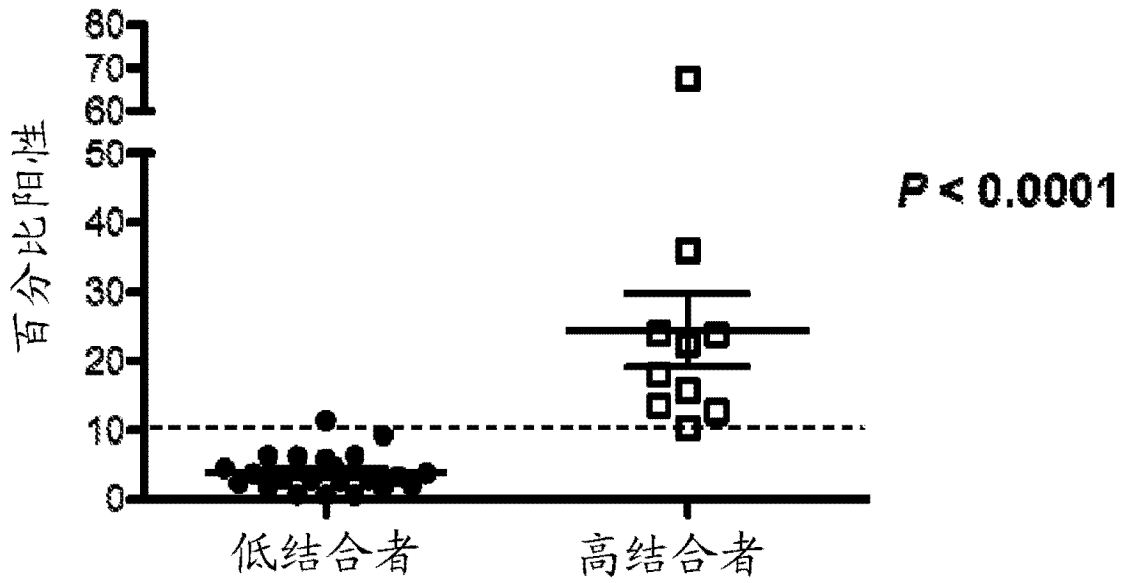


图 3

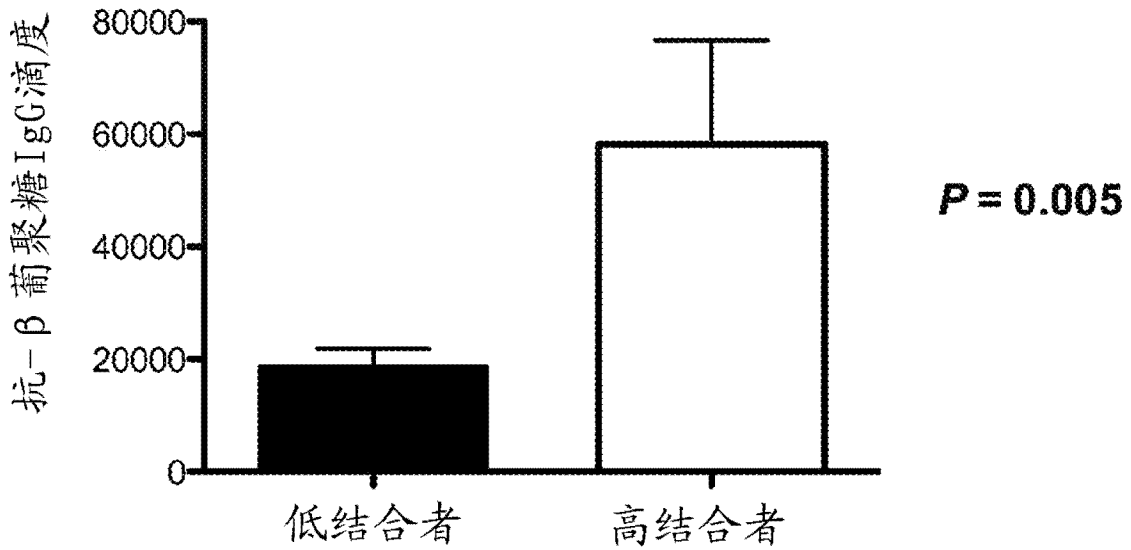


图 4

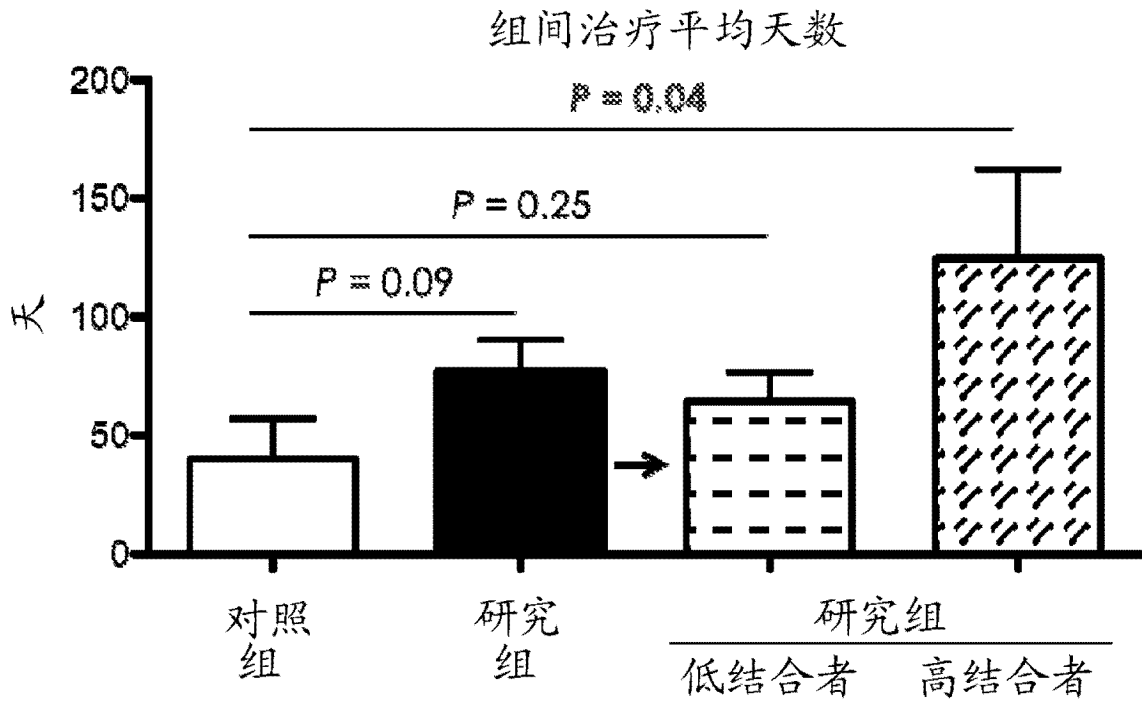


图 5

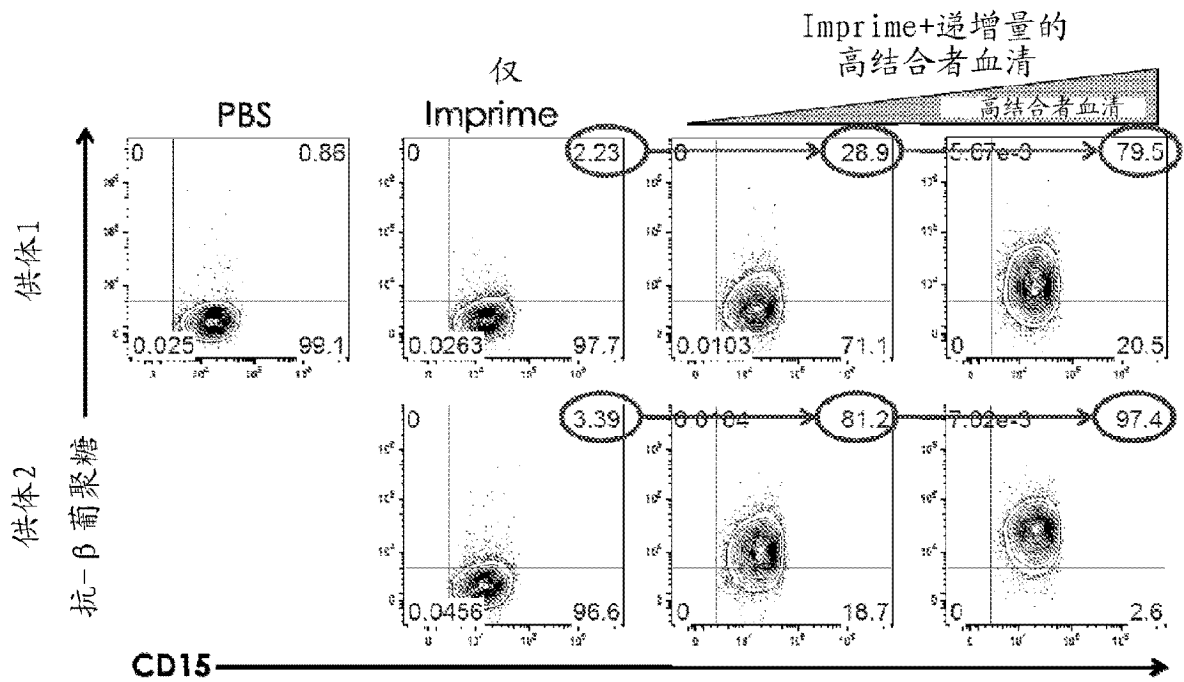


图 6

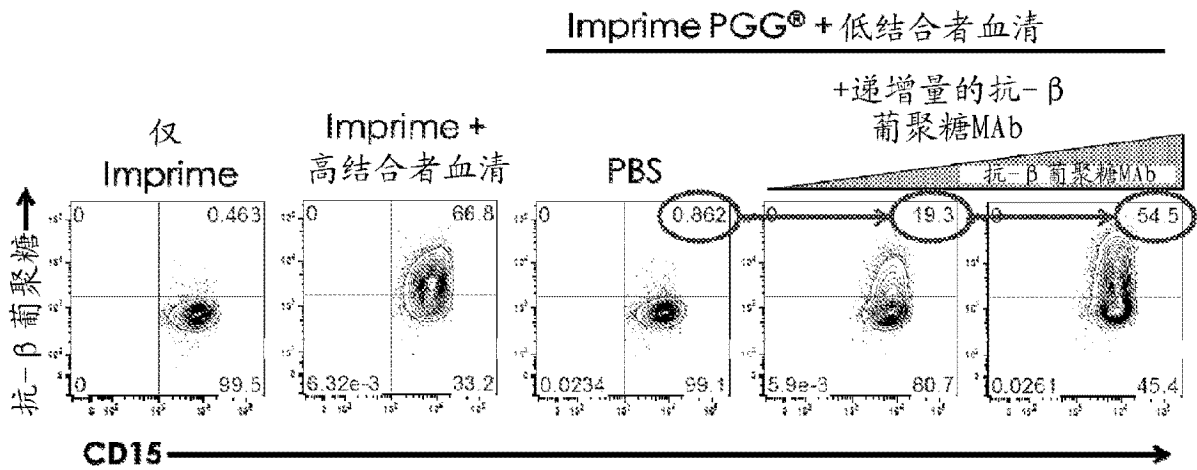


图 7

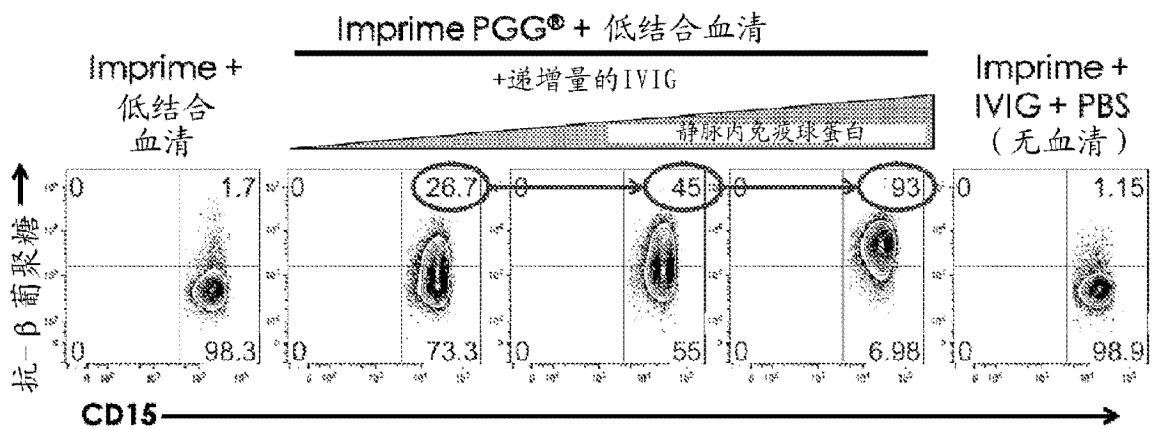


图 8

LB的WB中 Imp缀合物与PMN的结合

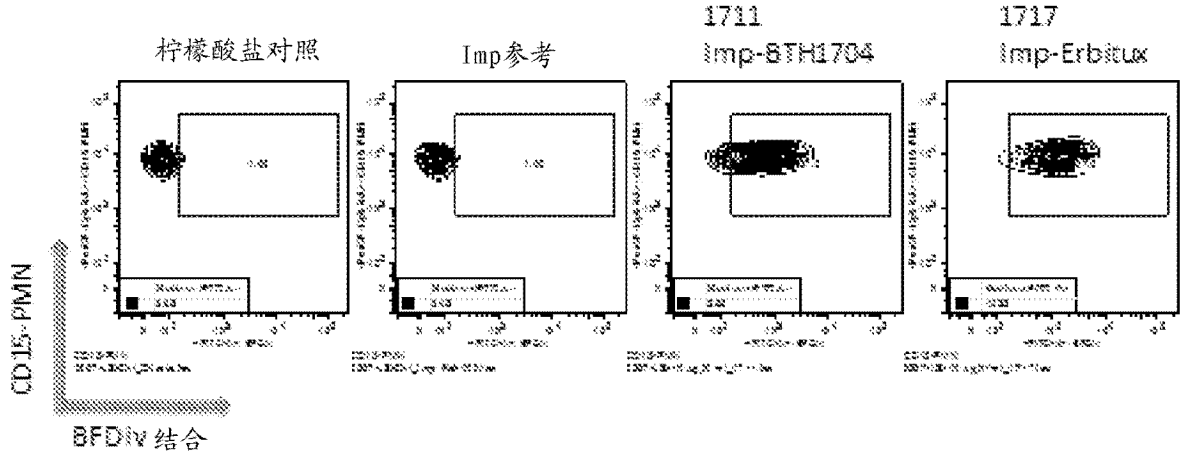


图 9

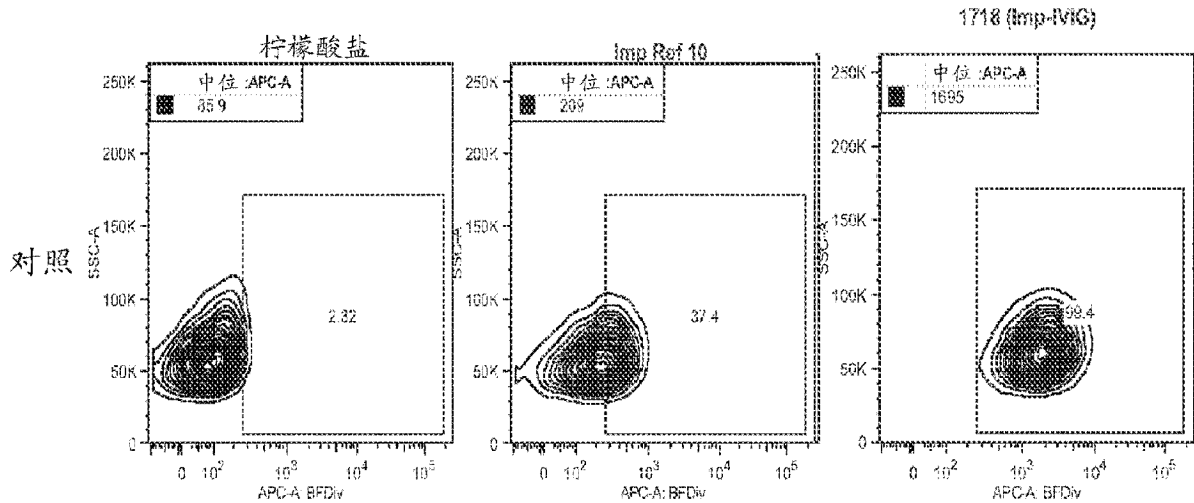


图 10

专利名称(译)	β-葡聚糖免疫治疗方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104812396A</a>	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201380034978.3	申请日	2013-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	生物治疗公司		
申请(专利权)人(译)	生物治疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物治疗公司		
[标]发明人	W J 格罗斯曼 M A 安东尼萨米 R M 沃尔什 M I 纳尔逊 N 波斯 M E 丹尼尔森 K S 米切尔		
发明人	W.J.格罗斯曼 M.A.安东尼萨米 R.M.沃尔什 M.I.纳尔逊 N.波斯 M.E.丹尼尔森 K.S.米切尔		
IPC分类号	A61K31/716 C07K16/18 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/14 A61K39/39 G01N2400/02 G01N2400/24 G01N33/56966 A61K39/39558 A61K45/06 A61K39/39583 A61K47/48507 A61K31/716 A61K2039/55583 G01N33/56972 A61K39/39575 C07K16 /12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 A61K47/6835 G01N33/554 A61K2300 /00 A61K39/395 G01N33/53		
代理人(译)	杜艳玲 彭昶		
优先权	61/640397 2012-04-30 US 61/640842 2012-05-01 US 61/640834 2012-05-01 US		
其他公开文献	CN104812396B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本公开描述，在一个方面，用于鉴定与对象免疫细胞结合的β-葡聚糖的方法。通常，该方法包括获得来自对象的血液样品，该血液样品包含免疫细胞，向血液样品的至少一部分加入β-葡聚糖，在允许β-葡聚糖与免疫细胞结合的条件下孵育混合物，并检测与免疫细胞结合的β-葡聚糖。在另一个方面，本公开描述的方法通常包括确定对象为β-葡聚糖的低结合者，并给对象联合施用可溶性β-葡聚糖和能使对象由低结合者转变为高结合者的抗体制备物。

LB的WB中Imp级合物与PMN的结合

