

(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2015-517115

(P2015-517115A)

(43) 公表日 平成27年6月18日(2015.6.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/66 (2006.01)	GO 1 N 33/66 A	2GO45
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	4BO63
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4CO85
A 6 1 K 31/716 (2006.01)	A 6 1 K 31/716	4CO86
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4CO87
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-510271 (P2015-510271)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年12月26日 (2014. 12. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/031606
 (87) 国際公開番号 W02013/165591
 (87) 国際公開日 平成25年11月7日 (2013. 11. 7)
 (31) 優先権主張番号 61/640, 834
 (32) 優先日 平成24年5月1日 (2012. 5. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/640, 397
 (32) 優先日 平成24年4月30日 (2012. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/640, 842
 (32) 優先日 平成24年5月1日 (2012. 5. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508367740
 バイオセラ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ミネソタ州 55121
 イーガン マイク コリンズ ドライヴ
 3388
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β-グルカン免疫治療方法

(57) 【要約】

本発明は、β-グルカン免疫治療方法に関し、β-グルカンにおいて、対象の免疫細胞に結合するβ-グルカンを同定する方法を開示する。通常、本願方法は、免疫細胞を含んでなる血液試料を対象から得ること、可溶性β-グルカンを少なくとも血液試料の一部に添加し、可溶性β-グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で混合物をインキュベートすること、並びに免疫細胞に結合された可溶性β-グルカンを検出することを含む。他の態様において、本願は、通常、対象をβ-グルカンの低バインダーとして同定し、対象へ可溶性β-グルカン及び対象を低バインダーから高バインダーへ変換することが可能な抗体調製物を同時投与することを含む方法を記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の免疫細胞に結合する可溶性 α -グルカンを同定する方法であって、
上記対象から免疫細胞を含んでなる血液試料を得る工程、
少なくとも血液試料の一部に可溶性 α -グルカンを添加し、可溶性 α -グルカンが免疫細胞
に結合することが可能な条件下で、混合物をインキュベートする工程、並びに
免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程、
を含んでなる、方法。

【請求項 2】

前記可溶性 α -グルカンが酵母に由来する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記可溶性 α -グルカンが α -1,3/1,6グルカンを含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載の
方法。

【請求項 4】

前記可溶性 α -グルカンが、 α -（1,6）- [ポリ-（1,3）-D-グルコピラノシル] -ポリ-
（1,3）-D-グルコピラノースを含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程が、特異的に α -グルカン
に結合するモノクローナル抗体に試料を接触させる工程を含んでなる、請求項 1 ~ 4 のい
ずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、BfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含んでなる、請求項
5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象由来の免疫細胞を含んでなる第二の血液試料を得る工程、
可溶性 α -グルカンを少なくとも第二の血液試料の一部に添加し、可溶性 α -グルカンが免
疫細胞に結合することが可能な条件下で、混合物をインキュベートする工程、並びに
免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程、
をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

対象のための α -グルカン免疫療法を改善する方法であって、
対象を低バインダーとして同定する工程、並びに
可溶性 α -グルカンと、対象を低バインダーから高バインダーへ変換可能な抗体調製物を
対象へ同時投与する工程、
を含んでなる、方法。

30

【請求項 9】

前記対象を低バインダーとして同定する工程が、
抗 α -グルカン抗体価を含んでなる血液試料を対象から得る工程、
少なくとも血液試料の一部の抗 α -グルカン抗体価を測定する工程、並びに
抗 α -グルカンIgG抗体価が20,000未満の場合に、対象を低バインダーとして同定する工程
、
を含んでなる、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記対象を低バインダーとして同定する工程が、
免疫細胞を含んでなる血液試料を対象から得る工程、
少なくとも血液試料の一部に可溶性 α -グルカンを添加し、可溶性 α -グルカンが免疫細胞
に結合することが可能な条件下で、混合物をインキュベートする工程、
免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程、並びに
 α -グルカンが10%以下の免疫細胞に結合される場合に、対象を低バインダーとして同定す
る工程、

50

を含んでなる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記抗体調製物が、高バインダー由来の血清を含んでなる、請求項 8 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記抗体調製物が、可溶性 α -グルカンに特異的に結合するモノクローナル抗体を含んでなる、請求項 8 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記モノクローナル抗体が、BfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含んでなる、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記抗体調製物が、静注用免疫グロブリンを含んでなる、請求項 8 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記可溶性 α -グルカン及び抗体調製物が、同時に同時投与される、請求項 8 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記可溶性 α -グルカン及び抗体調製物が、異なる時間に同時投与される、請求項 8 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記可溶性 α -グルカン及び抗体調製物が、異なる部位に同時投与される、請求項 8 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記可溶性 α -グルカンが酵母に由来する、請求項 8 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 α -グルカンが、 α -1,3/1,6グルカンを含んでなる、請求項 8 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記可溶性 α -グルカンが、(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グルコピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースを含んでなる、請求項 9 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年5月1日付けで出願された米国仮出願第61/640,834号、及び2012年4月30日付けで出願された米国仮出願第61/640,397号の優先権を主張する。前記仮出願は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

本願は、一態様において、対象の免疫細胞に結合する α -グルカンを同定する方法を記載する。通常、斯かる方法は、免疫細胞を含んでなる血液試料を対象から得ること、 α -グルカンを少なくとも血液試料の一部に添加し、 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で混合物をインキュベートすること、並びに免疫細胞に結合された α -グルカンを検出することを含む。

【発明の概要】

【0003】

一部の実施形態において、 α -グルカンは、酵母に由来してよい。一部の実施形態において、 α -グルカンは α -1,3/1,6グルカン、例えば、(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グル

10

20

30

40

50

コピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースを含むことができる。

【0004】

一部の実施形態において、免疫細胞に結合された α -グルカンを検出することは、 α -グルカンに特異的に結合するモノクローナル抗体と試料を接触させることを含むことができる。これらの実施形態の一部において、モノクローナル抗体はBfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含んでなる。

【0005】

一部の実施形態において、本願の方法は、対象由来の免疫細胞を含んでなる第二の血液試料を得ること、 α -グルカンを第二の血液試料の少なくとも一部に添加すること、 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で斯かる混合物をインキュベートすること、及び免疫細胞に結合された α -グルカンを検出することをさらに含むことができる。

10

【0006】

他の態様において、本願は、対象のための α -グルカン免疫療法を改善する方法を記載する。通常、斯かる方法は、対象を低バインダーとして同定すること、及び α -グルカンと、対象を低バインダーから高バインダーへ変換可能な抗体調製物とを対象へ同時投与することを含む。一部の実施形態において、対象を低バインダーとして同定することは、抗 α -グルカン抗体価を含んでなる血液試料を対象から得る工程、少なくとも血液試料の一部の抗 α -グルカン抗体価を測定する工程、及び抗 α -グルカン抗体価が所定のレベル未満の場合に、対象を低バインダーとして同定する工程を含むことができる。他の実施形態において、対象を低バインダーとして同定することは、免疫細胞を含んでなる血液試料を対象から得る工程、少なくとも血液試料の一部に α -グルカンを添加し、 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で混合物をインキュベートする工程、免疫細胞に結合された α -グルカンを検出する工程、並びに α -グルカンが10%以下の免疫細胞に結合される場合に、対象を低バインダーとして同定する工程を含むことができる。

20

【0007】

一部の実施形態において、抗体調製物は、高バインダー由来の血清を含むことができる。一部の実施形態において、抗体調製物が、 α -グルカンを特異的に結合するモノクローナル抗体、例えば、BfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含むことができる。一部の実施形態において、抗体調製物は、静注用免疫グロブリンを含むことができる。一部の実施形態において、抗体調製物は、抗体又は抗体断片、例えば、Fc部分に結合された α -グルカン部分を含むことができる。

30

【0008】

一部の実施形態において、 α -グルカン及び抗体調製物は、同時に同時投与される。他の実施形態において、 α -グルカン及び抗体調製物は異なる時間に同時投与される。一部の実施形態において、 α -グルカン及び抗体調製物は、異なる部位に同時投与される。

【0009】

一部の実施形態において、 α -グルカンは、酵母に由来してよい。一部の実施形態において、 α -グルカンは、 α -1,3/1,6グルカン、例えば、(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グルコピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースを含むことができる。

【0010】

本願発明の上記要約は、全実施形態又は本願発明の全実施を記載することを目的とするものではない。以下により詳細に説明する記載は、実施形態を示す。本願の各箇所において、様々な組合せで使用可能な例のリストを介してガイダンスが提供される。各例示において示されるリストは代表群としてのみ機能し、排他的なリストとして解釈されるべきではない。

40

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、健康な人の全血中の多形核白血球に結合した特異的な α -グルカン(PGG)を示すフローサイトメトリーデータを表す。

【図2】図2は、健康な人の全血中の好中球に結合した特異的な α -グルカンを示すデー

50

タを表す。

【図3】図3は、健康な人の全血中の単球に結合した特異的な α -グルカンを示すデータを表す。

【図4】図4は、低バインダーと高バインダーの抗 α -グルカン抗体価を比較したデータを表す。

【図5】図5は、two-armed、open-label、無作為化、多施設共同研究の対照及び試験群における、患者の平均治療日数の比較を表す。

【図6】図6は、高バインダー血清が、低バインダーから得られたPMNに結合した α -グルカンを増加できることを示すデータを表す。

【図7】図7は、抗 α -グルカン抗体が、低バインダー由来のPMNに結合した α -グルカンを増加できることを示すデータを表す。

【図8】図8は、静注用免疫グロブリンが、低バインダー由来のPMNに結合した α -グルカンを増加できることを示すデータを表す。

【図9】図9は、PGG-抗体の結合がPMNに結合することを示すデータを表す。

【図10】図10は、PGG-IVIGの結合がPMNに結合することを示すデータを表す。

【0012】

代表的な実施形態の詳細な記載

本願は、免疫療法の成分としての可溶性 α -グルカンの使用に関する方法を記載する。

本明細書に記載の方法は、健常者の異なる群における免疫細胞による α -グルカンの特異的な結合の観察を利用する。驚いたことに、 α -グルカンの「高バインダー」は、抗 α -グルカン抗体の「低バインダー」より高い力価を示す。よって、本明細書は、個体をスクリーニングし、「高バインダー」及び「低バインダー」を同定する方法を記載する。本明細書はまた、「低バインダー」を「高バインダー」へ変換することを通常含む方法を記載し、 α -グルカンベースの免疫療法が有効となり得る群を増大する。本明細書はまた、現在の「高バインダー」又は「低バインダー」状態に関して対象を定期的にモニタリングし、対象への治療を調整し、必要ならば、「高バインダー」状態の達成又は維持を促進することを含む治療計画を記載する。

【0013】

α -グルカンは、様々な微生物、並びに例えば、酵母、細菌、藻類、海藻、キノコ、オート麦、及び大麦を含む植物源に由来するグルコースのポリマーである。これらの内、酵母 α -グルカンは、その免疫調節特性が広範囲に調査されている。酵母 α -グルカンは、様々な形態、例えば、インタクト酵母、ザイモサン、精製全グルカン粒子、可溶化ザイモサン多糖、又は異なる分子量の高精製可溶性 α -グルカンで存在し得る。構造的に、酵母 α -グルカンは、 α - $(1,6)$ グリコシド結合を介して骨格に結合された過 α - $(1,3)$ グルコピラノース分枝を有する、 α - $(1,3)$ -結合グルコピラノース骨格として構成されるグルコースモノマーから成る。酵母 α -グルカンの異なる形態は、互いに異なって機能し得る。酵母 α -グルカンがその免疫調節効果を発揮するメカニズムは、 α -グルカンの異なる形態間の構造差、例えば、その粒子性又は可溶性特性、三次元構造、主鎖の長さ、側鎖の長さ、及び側鎖の頻度によって影響される。酵母 α -グルカンの免疫刺激機能は、異なる種の異なる細胞型に關与する受容体にも依存し、これは再度、 α -グルカンの構造特性に依存し得る。

【0014】

一般的に、 α -グルカン免疫療法は、対象へ任意の適した形態の α -グルカン又は α -グルカンの2又は3以上の形態の任意の組合せを投与することを含むことができる。適した α -グルカン及び自然源の適した α -グルカンの調製物は、例えば、米国特許出願第2008/0103112 A1号に記載される。場合により、 α -グルカンは酵母、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来してよい。場合により、 α -グルカンは、本願明細書において、可溶性酵母由来の α -グルカンの高精製及び特徴がはっきりした形態である、PGG (IM PRIME PGG, Biothera, Eagan, MN) と呼ぶ、 α - $(1,6)$ -[ポリ- α - $(1,3)$ -D-グルコピラノシル]-ポリ- α - $(1,3)$ -D-グルコピラノースである又はそれに由来してよい。さらに、

10

20

30

40

50

-グルカン-ベースの免疫療法は、例えば、修飾及び/又は誘導体化 -グルカン、例えば、国際特許出願第PCT/US12/36795号に記載されるものの使用を含むことができる。他の場合、 -グルカン免疫療法は、例えば、米国特許第7,981,447号に記載の粒子性可溶性 -グルカン又は粒子性可溶性 -グルカン調製物を投与することを含むことができる。

【0015】

上述の通り、酵母 -グルカンは、免疫調節特性に関して広範囲で調査されてきた。特に、PGG -グルカンは、腫瘍関連モノクローナル抗体 (mAbs) と組合せて投与される場合の、様々な癌型に対する前臨床活性が証明された。癌の典型的な型及びその関連した腫瘍関連mAbsは、例えば、T細胞リンパ腫 (抗MUC1、抗GD2)、肺癌 (抗MUC1)、乳腺癌 (抗MMTV) 卵巣癌 (ベバシズマブ)、非小細胞肺癌 (ベバシズマブ、セツキシマブ)、結腸直腸癌 (セツキシマブ)、慢性リンパ性白血病及び非ホジキンリンパ腫 (リツキシマブ)、及び膵臓癌 (セツキシマブ、抗MUC1) を含む。 -グルカンは、好中球を刺激することができ、続いて、腫瘍関連抗体を特徴とする腫瘍に好中球は補充される。補充された好中球は、mAb-標識腫瘍細胞の表面で、補体 受容体3 (CR3) の二重連結、iC3b/C3b、及び注入 -グルカンによって活性化され、腫瘍細胞を死滅させる。

10

【0016】

しかしながら、今回我々は、異なる個体群が存在することを発見した。1群は、全血中の自然免疫細胞に結合する -グルカンの相対的に高い能力を示し、他の群は、全血中の自然免疫細胞に結合する -グルカンの相対的に低い能力を示す。この観察は、免疫のマウスモデル及び単離ヒト免疫細胞を含む試験由来のデータに基づき、全く想定外であった。多くの個体は、天然由来の -グルカンへの低レベルの曝露から、免疫細胞に結合した -グルカンのある程度のレベルを示す (例えば、図1、「デノボ」)。外因性 -グルカンが投与される場合、「低バインダー」は、 -グルカンを結合する免疫細胞の割合において中程度の増大を示し、一方、「高バインダー」は、自然 -グルカンを結合する免疫細胞の割合において、標識の増加を示す (図1、「+外因性PGG」)。図1及び図2は、多形核白血球 (PMNs) に結合した -グルカンを反映したデータを示し、図3 (単球) は同じく、特異的な結合が他の自然免疫細胞群にあてはまることを示す。さらに、「高バインダー」はまた、より化学誘引物質サイトカイン及びケモカイン、例えば、IL-8、MCP、MIP-1等を生成する傾向がある。

20

【0017】

本願明細書において、「高バインダー」状態は、外因的に供された -グルカンを結合する特定の免疫細胞群の所定の割合を示す個体を意味する。個体が「高バインダー」又は「低バインダー」であるかを決定するために使用される免疫細胞群は、例えば、多形核リンパ球 (PMNs) 又は単球とすることができる。個体は、個体由来の血液試料の少なくとも10%のPMNs又は単球が、外因的に供された -グルカンに結合する場合、「高バインダー」と考えられる。よって、個体は、個体由来の血液試料中の少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも15%又は少なくとも40%のPMNs又は単球が、外因的に供された -グルカンに結合する場合に、「高バインダー」とすることができる (例えば、図2及び図3)。場合により、外因的に供された -グルカンは、最終濃度10 µg/mL ~ 100 µg/mLに供されたPGGを含むことができる。「低バインダー」の状態は、「高バインダー」状態を示すことができない個体を意味する。

30

40

【0018】

さらに、「高バインダー」は、抗 -グルカン抗体の「低バインダー」より高い力価を示すことができる (図4)。「高バインダー」に関する典型的な抗 -グルカン抗体価は、少なくとも25,000、例えば、少なくとも30,000、少なくとも35,000、少なくとも40,000、少なくとも45,000、少なくとも50,000、少なくとも55,000又は少なくとも60,000力価とすることができる (例えば、図4)。抗 -グルカン抗体価は、典型的にIgGを意味する。しかしながら、場合により、IgMの存在は、低IgG力価を補足し、「高バインダー」状態の確立を補助することができる。以下により詳細に記載するように、「高バインダー」状態は、 -グルカンの治療への個体の応答に影響しうる。個々の抗 -グルカン抗体を -グル

50

カン治療の一部として供することによって、 α -グルカン治療へ「高バインダー」様応答を示す自然の「低バインダー」を人工的に誘発できる。

【0019】

よって、一態様において、本願は、個体をスクリーニングし、個体が、その時点で「高バインダー」又は「低バインダー」状態を示すかを同定することを記載する。通常斯かる方法は、対象から血液試料を得る工程、少なくとも試料の一部に α -グルカンを添加し、 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で、混合物をインキュベートする工程、並びに免疫細胞に結合された α -グルカンを検出する工程を含む。

【0020】

血液試料は、免疫細胞を含むための血液の十分な量を含む。よって、一部の実施形態において、血液試料は全血とすることができる。他の実施形態において、血液試料は、スクリーニングアッセイに必須でない1又は2以上の全血成分、例えば、赤血球を除去するために少なくとも部分的に加工されてよい。よって、一部の実施形態において、血液試料は、血液産物、例えば、パフィーコートのも少なくとも一部を含む任意の血液画分を含むことができる。

10

【0021】

一部の実施形態において、 α -グルカンは、酵母、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来してよい。一部の実施形態において、 α -グルカンは、 α -1,3/1,6グルカン、例えば、 α -(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グルコピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースを含むことができる。

20

【0022】

一部の実施形態において、免疫細胞に結合された α -グルカンは、 α -グルカンに特異的に結合するモノクローナル抗体と試料を接触させることによって検出できる。モノクローナル抗体は、特異的に α -グルカンに結合する任意のモノクローナル抗体としてよい。本願明細書において、「特異的」及びその変形は、特定の標的に関して特異的な又は非一般的(すなわち、非特異的)結合性のある程度有することを意味する。 α -グルカンを特異的に結合する代表的なモノクローナル抗体は、例えば、米国特許第6,294,321号に記載のBfD I、BfD II、BfD III及び/又はBfD IV (Biothera, Eagan, MN)として特定されるモノクローナル抗体を含む。

【0023】

免疫細胞結合 α -グルカンに結合する抗 α -グルカン抗体の検出を補助するために、抗 α -グルカン抗体は、検出可能な標識を含むことができる。或いは、結合抗 α -グルカン抗体は、標識された第二の抗体を使用して検出できる。いずれの場合にも、適した標識は、例えば、蛍光標識、酵素標識、比色標識又は放射標識を含む。

30

【0024】

本願の方法は、基質に α -グルカン結合免疫細胞を固定化することをさらに含むことができる。場合により、免疫細胞は、 α -グルカンと接触させる前に、例えば、血液試料を α -グルカンと接触させる前に、少なくとも血液試料の一部を基質と接触させることによって固定化できる。他の実施形態において、免疫細胞は、 α -グルカンと接触させた後に固定化できる。いずれの場合にも、免疫細胞は、任意の適した材料、例えば、特異的に所望の免疫細胞群に結合する固定化された抗体を使用して固定化できる。

40

【0025】

一部の実施形態において、本願の方法は、非結合アッセイ成分を除去するために洗浄工程を含むことができる。例えば、一部の実施形態は、 α -グルカン結合免疫細胞由来の非結合 α -グルカン及び/又は非結合血液試料成分を洗浄する工程を含むことができる。他の例として、一部の実施形態は、存在する場合、基質由来の非結合免疫細胞を洗浄する工程を含むことができる。さらに他の例として、一部の実施形態は、免疫細胞に結合された α -グルカン由来の非結合 α -グルカン特異的抗体の洗浄を含むことができる。

【0026】

一部の実施形態において、本願の方法は、対象の状態を長期的に「高バインダー」又は

50

「低バインダー」として時間と共にモニターする、対象の反復スクリーニングを含むことができる。 -グルカン免疫療法を受けている一部の癌患者は、反復 -グルカン投薬で抗 -グルカン抗体価の低下を時間と共に示す。これらの患者はまた、 -グルカン結合免疫細胞（例えば、末梢PMNs）の長期の低下を示し得る。斯かる観察は、少なくとも一部において、 -グルカン結合免疫細胞の循環外へ及び腫瘍微小環境への補充に起因し得る。或いは、少なくとも一部において、循環免疫細胞に結合する -グルカンに影響する血漿因子の変化（例えば、時間と共に低下された抗 -グルカン抗体）に起因し得る。

【0027】

他の態様において、本願は、「低バインダー」を「高バインダー」へ変換させる方法を記載する。two-armed、open-label、無作為化、多施設共同試験において、少なくとも2つの以前の化学治療後の再発性/進行性結腸直腸癌を有する795人の対象を、対照群及び試験群に分類した。対照群の対象は、セツキシマブでの治療を受けた。試験群の対象は、セツキシマブ+ 4 mg/kg PGG -グルカンでの治療を受けた。図5は、免疫療法の一部として -グルカンを受けている対象は、セツキシマブのみを受けている対象より平均して長期間治療状態であったが、効果は「高バインダー」であった対象において最も偉大であったことを示す。ここで、治療の長さは治療の成功を示し、よってより長期の治療時間は正の治療結果を示し、一方、短い治療の長さは不十分な結果を示す。よって、「低バインダー」状態に対する「高バインダー」状態の臨床的結果が存在する。

10

【0028】

「低バインダー」状態に対する「高バインダー」状態の斯かる臨床的結果は、個体を「低バインダー」から「高バインダー」へ変換することが個人に対して臨床的結果を有しうることを意味する。図6は、「高バインダー」血清が、「低バインダー」の免疫細胞に結合した -グルカン（例えば、PMNs）を増加できることを示す。抗 -グルカンモノクローナル抗体の増加量はまた、「低バインダー」由来の血清中で免疫細胞に結合した -グルカン（例えば、PMNs）を増加できる（図7）。また、静注用免疫グロブリン（IVIg）、多くのドナー（典型的に数百、さらに数千のドナー、よって、自然に抗 -グルカン抗体を含有する）由来のプールされた多価IgGを含有する血液産物はまた、「低バインダー」由来の血清中で免疫細胞に結合した -グルカン（例えば、PMNs）を増加できる（図8）。その結果、個体に、免疫療法の成分として、 -グルカンと抗 -グルカン抗体を含む調製物の組合せを供することによって、個体を「低バインダー」状態から「高バインダー」状態へ変換することができる。顕著に、個体の「低バインダー」状態から「高バインダー」状態への変換は、免疫療法の臨床結果を改善できる。

20

30

【0029】

よって、本願の方法は、 -グルカンと、対象を低バインダーから高バインダーへ変換が可能な抗体調製物の同時投与を含む。本願明細書において、「同時投与」は、投与される組合せの2又は3以上の成分を意味し、組合せの治療又は予防効果は、単独投与の成分各々の治療又は予防効果より増大し得る。2つの成分は、同時に同時投与されても、連続して同時投与されてもよい。同時に投与される成分は、1又は2以上の医薬組成物中に供されてよい。2又は3以上の成分の連続同時投与は、両成分が投与された後に両成分が同時に生体利用可能なように成分が投与される場合を含む。成分が同時に同時投与される又は連続して同時投与されるかにかかわらず、成分は単一部位又は異なる部位に同時投与されてよい。

40

【0030】

「低バインダー」から「高バインダー」への同様の状態変換は、任意の抗体又は抗体の一部に結合された -グルカン部分を含む組成物を対象へ投与することによって生じうる。図9は、全血中のPMNsによる相対的に低いPGG結合から（Imp Ref, 第二のパネル）、PGGをBTH1704（抗MUC1, 米国特許第6,204,366号, Biothera, Inc, Eagan, MN, 第3パネル）又はアーピタックス（Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN, 第4パネル）抗腫瘍抗体に結合することによる高結合状態への変化を説明しているデータを示す。図10はまた、全血中のPMNsによる相対的に低いPGG結合（Imp Ref, 第二のパネル）から、PGGを静注用免疫

50

グロブリンへ結合することによる高結合状態 (IVIG, Biolegend, San Diego, CA) への変化を説明する。

【0031】

よって、他の態様において、本願の方法は、対象へ、抗体、治療抗体、抗腫瘍抗体又は抗体断片、例えば、抗体のFc部分に結合された α -グルカン部分を含む組成物を投与することを含む。PGG部分と抗体のPGG複合物を含む修飾及び/又は誘導体化PGGは、国際特許出願PCT/US12/36795に記載され、抗体断片の複合物に適用されても良い。PGG部分は、 α -1,3/1,6グルカンであってもそれに由来してもよい。ここで、「由来する」とは、複合物が必ずPGG α -グルカンの1又は2以上の原子を取り換える共有結合を創造することによって調製されることを意味する。本願明細書において、「 α -1,3/1,6グルカンに由来」とは、PGGの1又は2以上の原子を取り換え複合物の共有結合を創生した後に、複合物の一部として残存するPGG α -グルカンの一部を意味する。

10

【0032】

本願明細書において、「低バインダーを高バインダーへ変換することが可能」とは、「低バインダー」(例えば、所定の閾値以下)から「高バインダー」(例えば、所定の閾値以上)への、個体のバインダー状態の変更特性を意味する。「低バインダー」又は「高バインダー」としての対象の状態は、対象から得られた少なくとも血液試料の一部において α -グルカンが免疫細胞に結合する程度を参照して決定されて良い。或いは、対象のバインダー状態は、対象から得られた少なくとも血液試料の一部中において測定された抗 α -グルカン抗体価に関して決定されて良い。

20

【0033】

一部の実施形態において、抗体調製物は高バインダー由来の血清を含むことができる。

【0034】

他の実施形態において、抗体調製物は、静注用免疫グロブリンを含むことができる。さらに他の実施形態において、抗体調製物は、 α -グルカンを特異的に結合するモノクローナル抗体を含むことができる。 α -グルカンに特異的に結合する代表的なモノクローナル抗体は、例えば、BfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含む。

【0035】

α -グルカン、抗体調製物、及び/又は両成分の組合せは、「担体」と共に組成物中で調製されてよい。本願明細書において、「担体」は、分散媒、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、抗菌剤及び/又は抗真菌薬、等張剤、吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、サスペンション、コロイド等の任意の溶媒を含む。斯かる医薬活性物質のための媒体及び/又は剤の使用は、当技術分野で周知である。任意の従来の媒体又は薬剤が α -グルカン又は抗体と適合しない場合を除き、治療組成物中でのその使用が検討される。補足の活性成分はまた、組成物中に組み込むことが出来る。

30

【0036】

「医薬的に許容」は、生物学的に望ましくない又はその他の望ましくない物質でないことを意味し、すなわち、含有される医薬組成物の任意の他の成分と共に、任意の望ましくない生物学的効果を生じることなく又は有害態様で相互作用することなく α -グルカン及び/又は抗体と共に個体に投与されてよい。

40

【0037】

α -グルカン、抗体調製物、及び/又は両成分の組合せは、医薬組成物中に調製されてよい。一部の実施形態において、 α -グルカン及び抗体調製物は単一製剤中に供されてよい。他の実施形態において、 α -グルカン及び抗体調製物は、別々の製剤中に供されてよい。医薬組成物は、1又は2以上の好ましい投与経路に適合される様々な及び/又は多数の形態中に調製されてよい。よって、例えば、経口、非経口(例えば、皮内、経皮、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内等)又は局所(例えば、鼻腔内、肺内、乳房内、腔内、子宮内、皮内、経皮、直腸性等)を含む1又は2以上の周知の経路を介して医薬組成物は投与できる。医薬組成物又はその一部は、例えば、経鼻又は呼吸粘膜への投与によって(例えば、スプレー又はエアロゾルによって)粘膜面に投与できる。医薬組成物又はその一部は

50

また、徐放又は 遅延放出を介して投与できる。

【 0 0 3 8 】

製剤は、好都合に単位剤形に表すことができ、薬学分野の周知の方法によって調製されてよい。医薬的に許容される担体での組成物の調製方法は、 α -グルカン及び/又は抗体調製物を1又は2以上の補足的な成分を構成する担体と結合させる工程を含む。一般的に、製剤は、均一に及び/又は密に活性化化合物を液体担体、微粉化した固体担体又は双方と結合させ、続いて必要ならば、産物を所望の製剤に整形化することによって調製されてよい。

【 0 0 3 9 】

α -グルカン、抗体調製物、及び/又は両成分の組合せは、溶液、懸濁液、エマルジョン、スプレー、エアロゾル又は任意の混合物の形態を含むがそれらに限定されない任意の適した形態中に供されてよい。組成物は、任意の医薬的に許容される賦形剤、担体又はビヒクルと共に製剤中に送達されてよい。例えば、製剤は、従来の局所剤形、例えば、クリーム、軟膏、エアロゾル製剤、非エアゾールスプレー、ゲル、ローション等の中に送達されてよい。製剤は、例えば、アジュバント、皮膚浸透促進剤、着色剤、香料、風味剤、保湿剤、増粘剤等を含む1又は2以上の添加物をさらに含んでよい。

10

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態において、 α -グルカンは、酵母、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来してよい。一部の実施形態において、 α -グルカンは、 α -1,3/1,6グルカン、例えば、(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グルコピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースを含むことができる。

20

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態において、本願の方法は、例えば、約100 ng/kg ~ 約50 mg/kgの用量を供する十分な α -グルカンを対象へ投与することを含むことができるが、一方一部の実施形態において、本願の方法は、斯かる範囲外の用量で α -グルカンを投与することによって実施できる。一部の実施形態において、本願の方法は、約10 μ g/kg ~ 約10 mg/kgの用量、例えば、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg又は約10 mg/kgの用量を対象へ供するために、十分な α -グルカンを投与することを含む。特定の1実施形態において、本願の方法は、約4 mg/kgの用量を供する十分な α -グルカンを投与することを含む。

30

【 0 0 4 2 】

或いは、用量は、治療過程の開始の直前に得られる実際の体重を使用して算出されてよい。このように算出される投与量に関して、体表面積 (m^2) は、Dubois方法: $m^2 = (wt \text{ kg}^{0.425} \times \text{高さ cm}^{0.725}) \times 0.007184$ を使用して治療過程の開始の前に算出される。一部の実施形態において、よって、本願の方法は、例えば、約0.01 mg/ m^2 ~ 約10 mg/ m^2 の用量を供するために、十分な α -グルカンを投与することを含むことができる。

【 0 0 4 3 】

一部の実施形態において、本願の方法は、例えば、約100 ng/kg ~ 約50 mg/kgの用量を供するために、 α -グルカンを特異的に結合する十分な抗体を対象へ投与することを含むことができるが、一方一部の実施形態で、本願の方法は斯かる範囲外の用量で抗体を投与することによって実施できる。一部の実施形態において、本願の方法は、約10 μ g/kg ~ 約5 mg/kgの用量、例えば、約100 μ g/kg ~ 約1 mg/kgの用量を供するための十分な抗体を対象へ投与することを含む。一部の実施形態において、 α -グルカンを特異的に結合する抗体は、静注用免疫グロブリン (IVIG)、プールされた多価IgGを含有する、多くのドナー由来 (典型的には数百、さらに数千のドナー由来、よって、自然に抗 α -グルカン抗体を含有) の血液産物の形態で投与できる。斯かる実施形態において、IVIGは、約0.1 g/kg ~ 約2.0 g/kg 例えば、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又は2.0 g/kgの用量で投与されてよい。特定の実施形態において、IVIGは、約0.4 g/kg ~ 約1.0 g/kgの用量を供するために

40

50

投与されてよい。

【0044】

或いは、用量は、治療過程の開始直前に得られる実際の体重を使用して算出されてよい。このように算出される用量に関して、体表面積 (m^2) は、Dubois方法: $m^2 = (wt \text{ kg}^{0.425} \times \text{高さ cm}^{0.725}) \times 0.007184$ を使用して、治療過程の開始の前に算出される。一部の実施形態において、よって、本願の方法は、例えば、約0.01 mg/ m^2 ~ 約10 mg/ m^2 の用量を供するために、十分な抗体を投与することを含むことができる。

【0045】

一部の実施形態において、 α -グルカン及び抗体調製物は、例えば、1週間に単一用量 ~ 複数回用量で同時投与されてよいが、一方一部の実施形態において、本願の方法は、
10
斯かる範囲外の頻度で α -グルカン及び抗体の同時投与によって実施されてよい。特定の
実施形態において、 α -グルカン及び抗体は、約1年に1回 ~ 1週間に1回投与されてよい。

【0046】

一部の実施形態において、本願の方法は、対象に免疫療法を供することをさらにを含む。免疫療法は、1又は2以上の腫瘍関連抗体（例えば、セツキシマブ、ペバシズマブ、抗MUC1）を投与することを含むことができる。ここで、 α -グルカン及び抗体調製物の同時投与は、免疫療法の有効性を増加できる。

【0047】

本願明細書において、用語「及び/又は」は、1又は全リストされたエレメント又はリストされたエレメントの任意の2又は3以上の組合せを意味し；用語「含んでなる」及びその変形は、これらの用語が明細書の記載及び請求項に現れる場合に限定的な意味を有さず；他に特定されない限り、「a」「an」「the」及び「少なくとも1つ」は、互換的に使用され、1又は2以上を意味し；エンドポイントによる数値範囲の列挙は、斯かる範囲内に含まれる全数値を含む（例えば、1~5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等を含む）
20

【0048】

上記記載において、特定の実施形態は、明確化のため分離して記載されてよい。特定の
実施形態の特徴が他の実施形態の特徴と適合しないと他に明確に特定されない限り、特定の
実施形態は、1又は2以上の実施形態に関連して本明細書に記載の適合する特徴の組合
30
せを含むことができる。

【0049】

別々の工程を含む本明細書に開示される任意の方法に関して、斯かる工程は任意の実行可能な順で行われて良い。また、必要に応じて、2又は3以上の工程の任意の組合せが同時に
40
行われて良い。

【0050】

本願発明は、以下の実施例によって説明される。特定の実施例、材料、量、及び手順は、
実施例は本願で説明されるように発明の趣旨及び範囲に従って広く解釈されるべきである、と
理解されるべきである。

【実施例】

【0051】

実施例 1

材料

Imprime PGG (Biothera, Eagan, MN) を、0.8% 塩化ナトリウム及び0.2% クエン酸一ナトリウム (sodium citrate monobasic) 中の1 mg/mLの濃度でpH of 6.4で調製された防腐剤の
40
入っていない可溶性 α -グルカン製剤中に供した。斯かる化合物を使用まで4-8°Cで保存した。

【0052】

試料の調製

全血。フレッシュな全血を、提供の前にインフォームドコンセントに供した健常なボラン
50

ティアから得た (New England Institutional Review Board, May 2007)。血液を、158 USP Units Freeze-Driedヘパリンナトリウム (BD Biosciences; San Jose, CA) 含有のパキュテナー (登録商標) 中に回収した。

【0053】

血清及び血漿。血清セパレーター (red top) 又はヘパリンナトリウム (green top) チューブを使用した、パキュテナー (登録商標) チューブ (BD Biosciences; San Jose, CA) 回収によって、全血を血清又は血漿に加工した。チューブを十分に混合し、室温で30分間インキュベートし、続いて2000 rpm ($\sim 1150 \times g$) で10分間遠心分離した。上清 (血清又は血漿) を続いてフレッシュなポリカーボネート保存円錐チューブに移した。

【0054】

抗BG ELISA方法

サル抗 β -グルカン方法から改良した予備のELISA方法 (Noss et al., 2012 Int. Arch. Allergy Immunol., 157:98-108) を、ヒト血清試料を試験するために使用した。Costar universal結合プレートを精製水中に希釈した1 $\mu\text{g/mL}$ の精製 β -グルカン濃度で50 μL の β -グルカンでコーティングし、37°Cで30分間インキュベートした。コーティングしたプレートを、続いて高強度の $>1500 \mu\text{W/cm}^2$ の紫外線に5分間室温で曝露し、50°Cの強制空気オープン中に静置し乾燥させ、第二の紫外線曝露を $>1500 \mu\text{W/cm}^2$ で5分間室温で行った。プレートを続いてウシ血清アルブミンの0.5%溶液で >30 分間ブロックし、洗浄緩衝剤で洗浄した (0.05% Tween-20のリン酸緩衝食塩水 [PBS])。ヒト血清試料を洗浄緩衝剤中に希釈し、プレートに添加し、続いて連続的にプレート上で洗浄緩衝剤中に希釈した。1:400に希釈した試験試料を7回のさらなる段階1:2希釈で試験プレートにピペットで採取した (1:400~1:12,800の血清希釈)。試料を室温で30分間インキュベートし、ヒトIgGをプレート結合 β -グルカン抗原に結合させた。インキュベーションに続いて、ウェルを洗浄緩衝剤で洗浄し、酵素標識された第二の抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼが結合されたアフィニティー精製ヤギ抗ヒトIgG、Fcガンマ特異的) を、ウェル中でインキュベートし、 β -グルカン抗原に結合されたヒトIgGと結合させた。第二の抗体を30分間インキュベーションし、洗浄緩衝剤で洗浄した。全洗浄緩衝剤をウェルから除去した後、ペルオキシダーゼ基質をウェル中でインキュベートし、5分発色現象において発色現象を $\sim 1 \text{ M}$ リン酸でクエンチした。マイクロタイタープレートリーダーを使用して、450 nmでの光学密度 (OD) を測定した。

【0055】

抗 β -グルカンAb力価の測定

反復試験ウェルから得られるODの平均値を求め、平均アッセイバックグラウンドを減算した。0.100以上のバックグラウンド調整ODを供する最大希釈を試料力価と見なし、斯かる希釈の逆数として表した。アッセイパフォーマンスの決定に関して、値を標準基準血清に割り当て、基準曲線を各アッセイプレート上に作成した。実施例に関して、1:12,800の希釈で0.100のバックグラウンド調整ODを供する試験試料を、12,800の力価を有すると見なした。試料を複数回試験し、それらの力価の平均が1:400から段階1:2力価レベルに位置する場合、次の最低力価レベルをその力価として表した。例えば、4つの提供から1人のドナーの血清を、5つの別個のアッセイ中で試験し28,160の平均力価を生じ; その力価を25,600と表した。

【0056】

アッセイ検量線。1 mLあたりの160の任意単位の値 (AU/mL) を、標準ヒト抗 β -グルカンに割り当てた。よって、アッセイ方法における1:400希釈は、標準希釈曲線の最高点として400 mAU/mLの値をもたらし、さらなる段階1:2希釈をアッセイプレート上で調製した。アッセイ対照をELISA洗浄緩衝剤中に試験のために1:100に希釈した。各対照レベルのさらなる2つの希釈を、各プレート上での同時の試験のために各々調製した。

【0057】

統計分析。平均バックグラウンド補正光学密度に対する単位mAU/mLのプロットング標準濃度から、標準基準曲線が得られた。ELISAソフトウェアを使用して、4-parameter fitを

10

20

30

40

50

標準用量応答曲線から算出し、試料、対照及び試験血清に関して未知値を決定した。検量線の上下の屈曲点に位置するアッセイ応答値（直線部）を、使用し、試料試験値を決定した。変動係数（%CV）を算出するために、一連の値の標準偏差を同一の一連の値の平均で割り、結果に100をかけた。

【0058】

PGGの全血（WB）細胞への結合

健常ドナー由来のWBの100マイクロリットルを、5 mLのポリスチレン蛍光標示式細胞分取器（FACS）チューブ中に分注した。これらのWB試料を、Imprime PGG（10 $\mu\text{g/mL}$ 若しくは100 $\mu\text{g/mL}$ ）又はクエン酸緩衝液、ビヒクル対照で刺激した。試料含有FACSチューブを、緩く対応のキャップでカバーし、30分間又は2時間、37°Cで加湿インキュベーター（5% CO_2 ）中でインキュベートした。

10

【0059】

表1. 全血試料の染色のために使用した抗体混合物

【0060】

【表1】

抗体	社名; クローン #	希釈又は最終濃度	同定目的
抗CD15	Biolegend; W6D3	0.2 $\mu\text{g/mL}$	好中球
抗CD19	Biolegend; H1B19	0.63 $\mu\text{g/mL}$	B細胞
抗CD14	Biolegend; HCD14	5 $\mu\text{g/mL}$	単球
抗CD14	Invitrogen; TuK4	1:50	単球
抗CD3	Biolegend; HIT3a	0.25 $\mu\text{g/mL}$	T細胞
抗CD45	Biolegend; HI30	0.25 $\mu\text{g/mL}$	赤血球及び血小板を除外した造血細胞
Goat F (ab') ₂ 抗マウスIgM	Jackson Immunolab	5 $\mu\text{g/mL}$	マウス抗 β グルカン抗体

20

インキュベーションを抗 β -グルカン抗体BfD IVで進め、BfD IVの認識のための第二の抗体及び様々な細胞表面標識の認識のための抗体を含有する抗体混合物で細胞をインキュベートした。

30

【0061】

インキュベーション後に、全試料を2 mLの1×Dulbeccoのリン酸緩衝食塩水（DPBS）を添加することによって洗浄し、1500-1700 rpmで4°Cで5分間遠心分離した。洗浄及び吸引の2ラウンド後に、5 μL の抗 β -グルカン抗体BfD IV（ $\sim 100 \mu\text{g/mL}$ ）を、各チューブ中に混合させ、室温で30分間インキュベートした。上記のように斯かる一次抗体を1×DPBSで2度洗い落とし、第二の抗体及び特異的細胞表面標識含有の抗体の混合物（表1）を添加し、30分間室温で暗室でインキュベートした。赤血球を溶解するために、2 mLの1×BD溶解溶液（BD Biosciences; San Jose, CA）を各試料に添加し、穏やかにボルテックスした。室温での1時間のインキュベーション期間の後に、試料を1500-1700 rpmで4°Cで5分間遠心分離した。BD溶解溶液を吸引し、細胞を1×DPBSで一度洗浄し、上記の通り吸引した。固定のため、300-400 μL の1% パラホルムアルデヒドを各試料に添加した。固定20時間内にLSR II（BD Biosciences; San Jose, CA）上で試料を得た。データをFlowJoソフトウェア（Tree Star, Ashland, OR）を使用して分析した。

40

【0062】

実施例2

材料

Imprime PGG（Biothera, Eagan, MN）を、0.8% 塩化ナトリウム及び0.2% クエン酸ナトリウム（sodium citrate monobasic）中にpH6.4で1 mg/mLの濃度で調製された防腐剤の入っていない、可溶性 β -グルカン製剤中に供した。4-8°Cで使用まで斯かる化合物を保存した。

50

【 0 0 6 3 】

全血 (WB) 結合アッセイ

フレッシュなWBを、提供の前にインフォームドコンセント供された健常なボランティアから得た (New England Institutional Review Board, Blood Donation Protocol No. 07-124)。血液を、158 USP Units Freeze-Driedヘパリンナトリウム (BD Biosciences; San Jose, CA) 含有のパキュテナー (登録商標) 中に回収した。血清を、トロンピンベースの血餅アクチベーター (BD Biosciences; San Jose, CA) 含有のパキュテナー (登録商標) 中に回収した。回収の約20分後に、バイアルを2000rpmで10分間室温で遠心分離した。血清を斯かるバイアルから回収し、8時間以内の使用のために4°Cで又は8時間後の使用のために-80°Cで保存した。

10

【 0 0 6 4 】

全血結合アッセイを、全血試料を30分間又は2時間37°Cで加湿インキュベーター中でImprime PGGでインキュベートすることによって実施した。1×Dulbeccoのリン酸緩衝食塩水 (DPBS) で洗浄後、BfDIV、マウス抗 α -グルカン抗体を添加しWBで30分間室温でインキュベートした。洗浄のさらなるラウンド後に、ヤギ抗マウス検出抗体及び表面分子への抗体を含む抗体混合物を添加し、室温で暗室で30分間インキュベートした。赤血球をBD Lyseで溶解し、1%パラホルムアルデヒド中に試料を再懸濁した。試料をフローサイトメーター上で得て、FlowJoソフトウェア (Ashland, OR) を使用して分析した。

【 0 0 6 5 】

WB及び血清クロスオーバー研究

血清クロスオーバー研究のために、1200 rpmで10分間全血を沈降させ、血漿を除去した。血液細胞を1-2回1×DPBSで洗浄し、残存血漿を除去した。50 μ Lの血清を添加し、混合し、Imprimeを添加した。

20

【 0 0 6 6 】

抗 α -グルカンIgG (BioSupplies, Australia) でのインキュベーションのために、凍結乾燥抗体を1×DPBSで1 mg/mLに再懸濁し、-80°C又は4°Cで保存溶液として保存した。血液試料へ添加する前に、斯かる保存溶液を1:10~100 μ g/mLに希釈し、10 μ Lの斯かる溶液を100 μ Lの血液に添加した。IVIGでのインキュベーションのために、10% IVIG (100 mg/mL) (PRIVIGEN, CSL Behring, King of Prussia, PA) を全血試料に指示最終濃度で添加した。

30

【 0 0 6 7 】

代表的な実施形態

実施形態1.

対象の免疫細胞に結合する可溶性 α -グルカンを同定する方法であって、上記対象から免疫細胞を含んでなる血液試料を得る工程、少なくとも血液試料の一部に可溶性 α -グルカンを添加し、可溶性 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で、混合物をインキュベートする工程、並びに免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程、を含んでなる方法。

【 0 0 6 8 】

実施形態2. 前記可溶性 α -グルカンが酵母に由来する、実施形態1に記載の方法。

40

【 0 0 6 9 】

実施形態3. 前記可溶性 α -グルカンが α -1,3/1,6グルカンを含んでなる、実施形態1又は2に記載の方法。

【 0 0 7 0 】

実施形態4. 前記可溶性 α -グルカンが、(1,6)-[ポリ-(1,3)-D-グルコピラノシル]-ポリ-(1,3)-D-グルコピラノースを含んでなる、実施形態1~3のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 1 】

実施形態5. 免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程が、試料を α -グ

50

ルカンに特異的に結合するモノクローナル抗体に接触させる工程を含んでなる、実施形態 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 2 】

実施形態 6. 前記モノクローナル抗体が、BfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含んでなる、実施形態 5 に記載の方法。

【 0 0 7 3 】

実施形態 7. 前記対象由来の免疫細胞を含んでなる第二の血液試料を得る工程、可溶性 α -グルカンを第二の血液試料の少なくとも一部に添加し、可溶性 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で混合物をインキュベートする工程、並びに免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程、
をさらに含んでなる、実施形態 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

10

【 0 0 7 4 】

実施形態 8. 対象のための α -グルカン免疫療法を改善する方法であって、対象を低バインダーとして同定する工程、並びに可溶性 α -グルカンと、対象を低バインダーから高バインダーへ変換可能な抗体調製物を対象へ同時投与する工程、
を含んでなる、方法。

【 0 0 7 5 】

実施形態 9. 対象を低バインダーとして同定することが、抗 α -グルカン抗体価を含んでなる血液試料を対象から得る工程、
少なくとも血液試料の一部の抗 α -グルカン抗体価を測定する工程、並びに抗 α -グルカン IgG 抗体価が 20,000 未満の場合に、対象を低バインダーとして同定する工程、
を含んでなる、実施形態 8 に記載の方法。

20

【 0 0 7 6 】

実施形態 10. 前記対象を低バインダーとして同定する工程が、免疫細胞を含んでなる血液試料を対象から得る工程、
少なくとも血液試料の一部に可溶性 α -グルカンを添加し、可溶性 α -グルカンが免疫細胞に結合することが可能な条件下で、混合物をインキュベートする工程、
免疫細胞に結合された可溶性 α -グルカンを検出する工程、並びに
 α -グルカンが 10% 以下の免疫細胞に結合される場合に、対象を低バインダーとして同定する工程、
を含んでなる、実施形態 8 に記載の方法。

30

【 0 0 7 7 】

実施形態 11. 前記抗体調製物が、高バインダー由来の血清を含んでなる、実施形態 8 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 8 】

実施形態 12. 前記抗体調製物が、可溶性 α -グルカンを特異的に結合するモノクローナル抗体を含んでなる、実施形態 8 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 7 9 】

実施形態 13. 前記モノクローナル抗体が、BfD I、BfD II、BfD III又はBfD IVを含んでなる、実施形態 12 に記載の方法。

40

【 0 0 8 0 】

実施形態 14. 前記抗体調製物が、静注用免疫グロブリンを含んでなる、実施形態 8 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 8 1 】

実施形態 15. 前記可溶性 α -グルカン及び抗体調製物が、同時に同時投与される、実施形態 8 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 8 2 】

実施形態 16. 前記可溶性 α -グルカン及び抗体調製物が、異なる時間に同時投与される

50

、実施形態 8 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【0083】

実施形態 17. 前記可溶性 - グルカン及び抗体調製物が、異なる部位に同時投与される、実施形態 8 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【0084】

実施形態 18. 前記可溶性 - グルカンが酵母に由来する、実施形態 8 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

【0085】

実施形態 19. 前記可溶性 - グルカンが、 -1,3/1,6 グルカンを含んでなる、実施形態 8 ~ 18 のいずれかに記載の方法。

【0086】

実施形態 20. 前記可溶性 - グルカンが、 (1,6) - [ポリ - (1,3) - D - グルコピラノシル] - ポリ - (1,3) - D - グルコピラノースを含んでなる、実施形態 9 ~ 19 のいずれかに記載の方法。

【0087】

本明細書中に記載される、全特許、特許出願、及び公表、及び電子的に利用可能な材料（例えば、GenBank及びRefSeq中のヌクレオチド配列寄託、及び例えば、SwissProt、PIR、PRF、PDB中のアミノ酸配列寄託、並びにGenBank及びRefSeq中の注釈コード領域からの翻訳を含む）の全開示は、参照により本明細書にその全体が組み込まれる。本願の開示と参照により本明細書に組み込まれる任意の文献の開示との間に矛盾が存在する場合には、本願の開示が優先される。上述の詳細な説明及び実施例は、理解の明確化のためにのみ供される。それらに限定される必要性はない。本願発明は、請求項によって定義される発明に含まれるであろう当業者に明らかな変形のために示され記載される正確な 1 つ 1 つに限定されない。

【0088】

他に表示しない限り、成分量、分子量を表している全ての数値、及び明細書及び請求項で使用されるそれらは、用語「約」によって全ての例において変更されると理解されるべきである。従って、他に逆に表示しない限り、明細書及び請求項に記載の数値パラメータは、本願発明によって得ようとする所望の特性に非常に依存的となり得る近似である。少なくとも、請求項の範囲への均等論の限定を試みるものではなく、各数値パラメータは、表される重要な数字の数を考慮して且つ通常の見捨五入技術の適用によって少なくとも解釈されるべきである。

【0089】

本願発明の広範な範囲を説明する数値範囲及びパラメータは近似値であるに関わらず、具体的な実施例に記載の数値は可能な限り正確に表される。しかしながら、全数値は本質的に、各々の試験測定において見られる標準偏差から必ず得られる範囲を含む。

【0090】

全ての見出しは、読者の利便性のためであり、特定されない限り、見出しに続く文書の意味を限定するために使用されるべきでない。

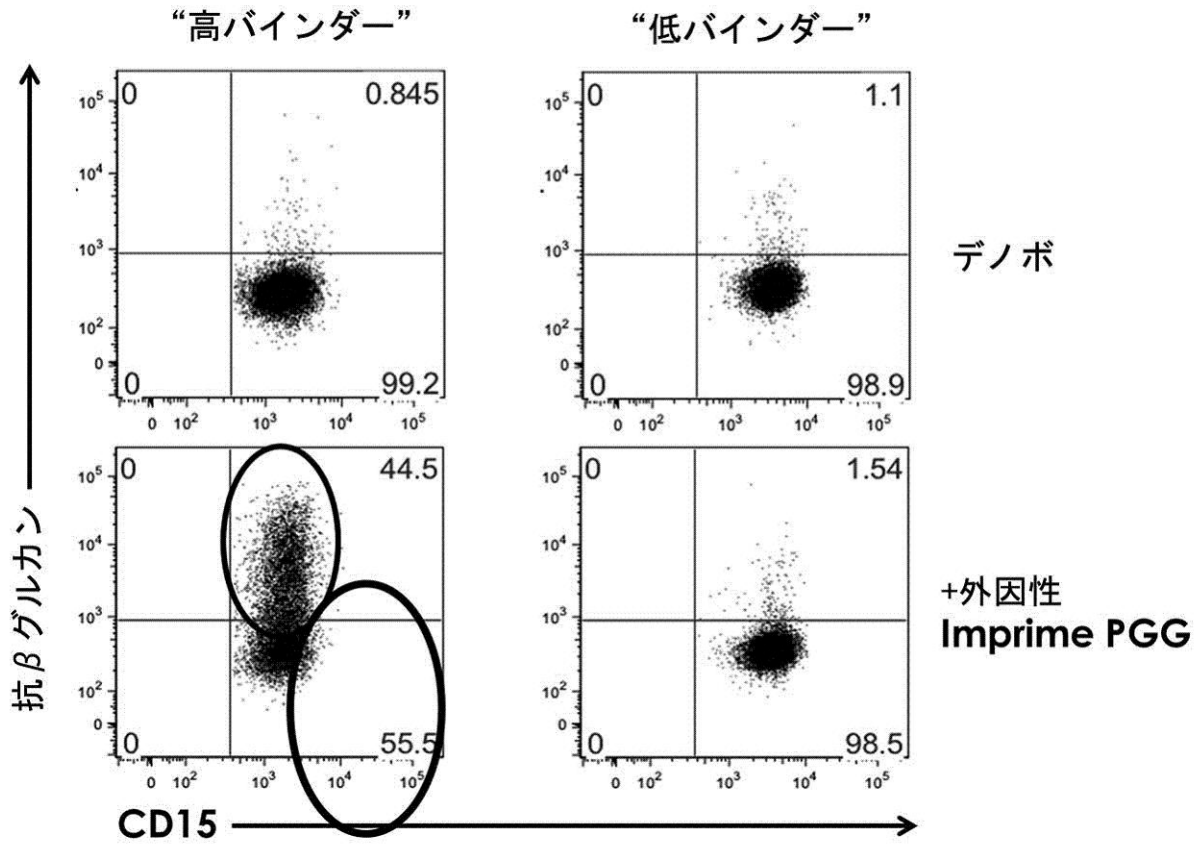
10

20

30

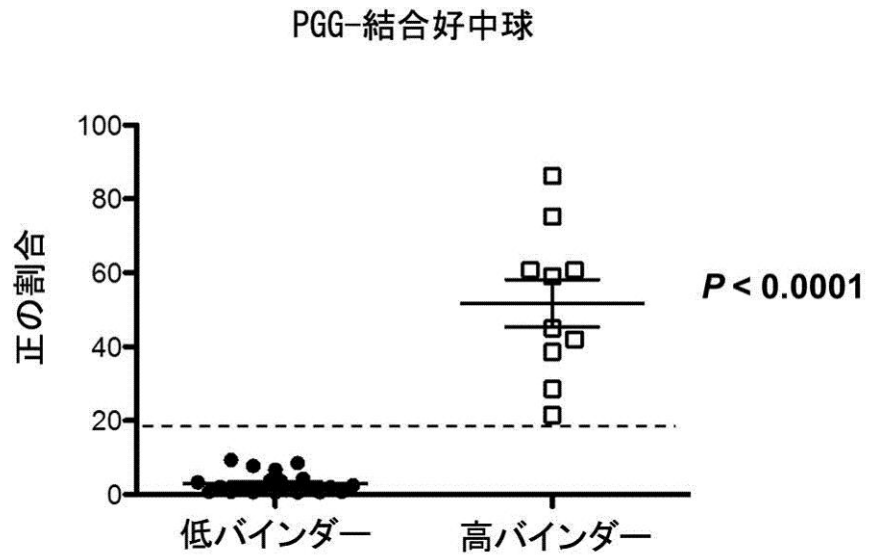
【図 1】

Figure 1



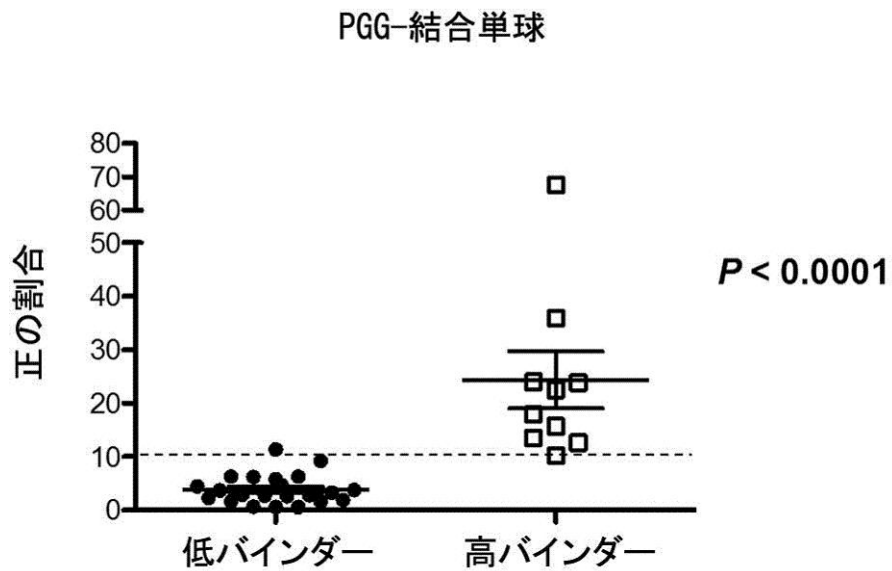
【図2】

Figure 2



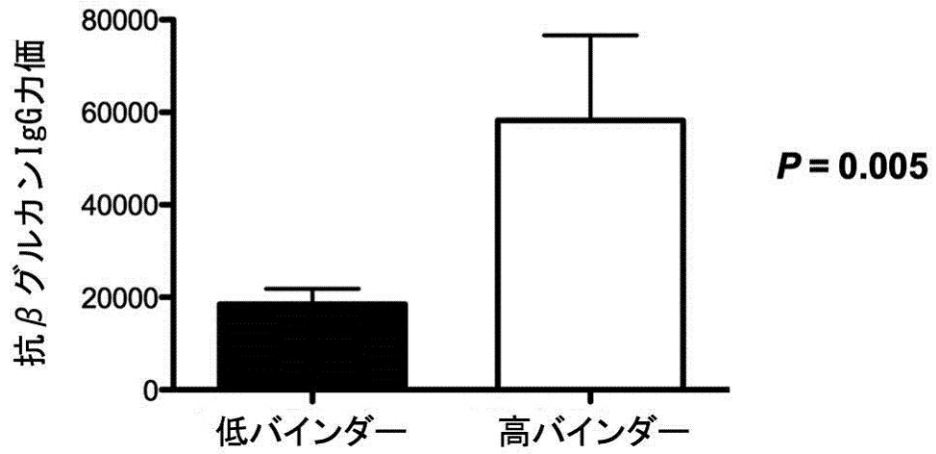
【図3】

Figure 3



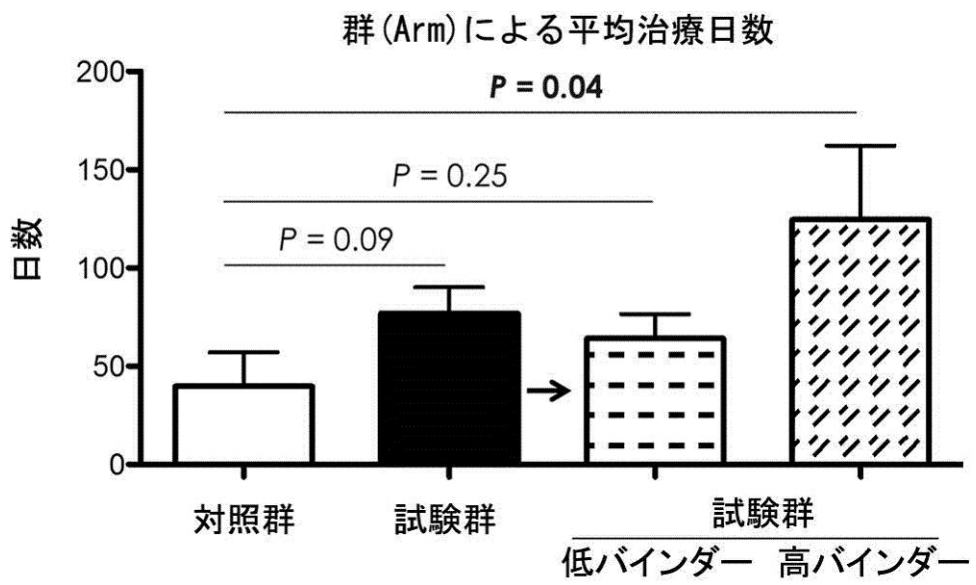
【 図 4 】

Figure 4



【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

Figure 6

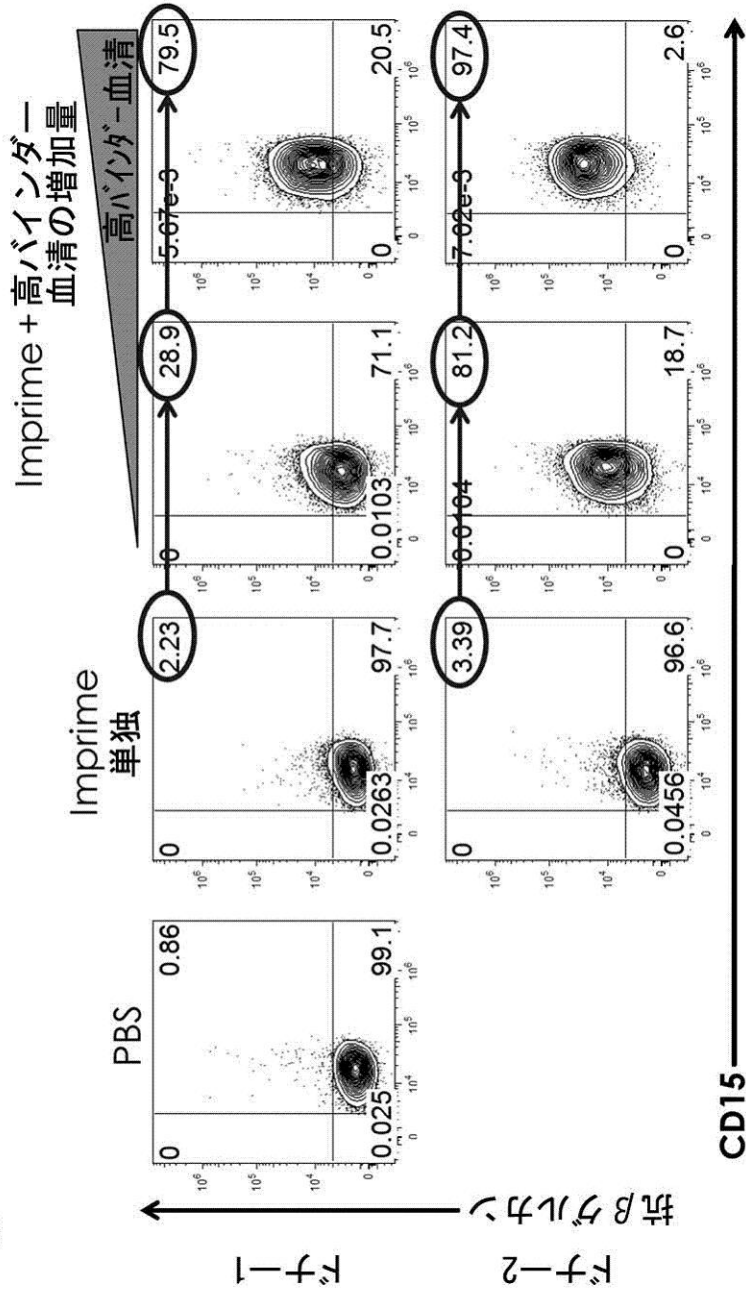


Figure 7

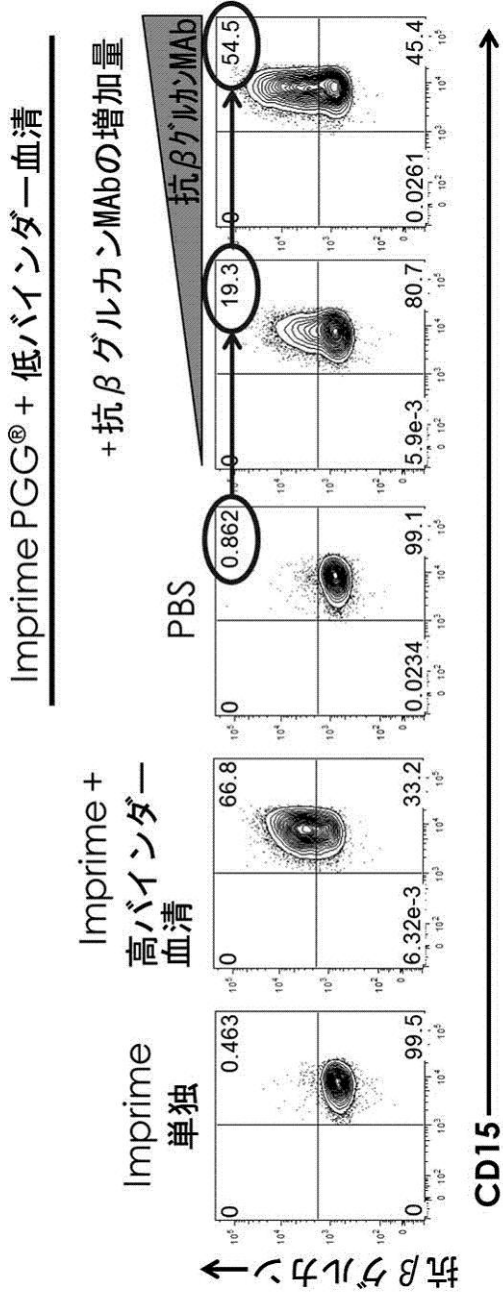
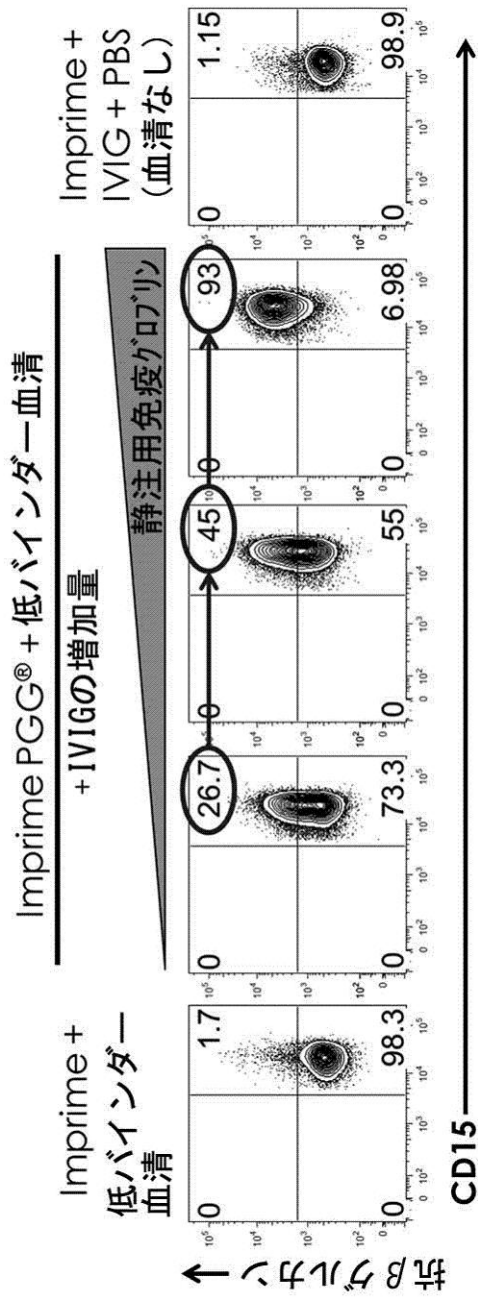


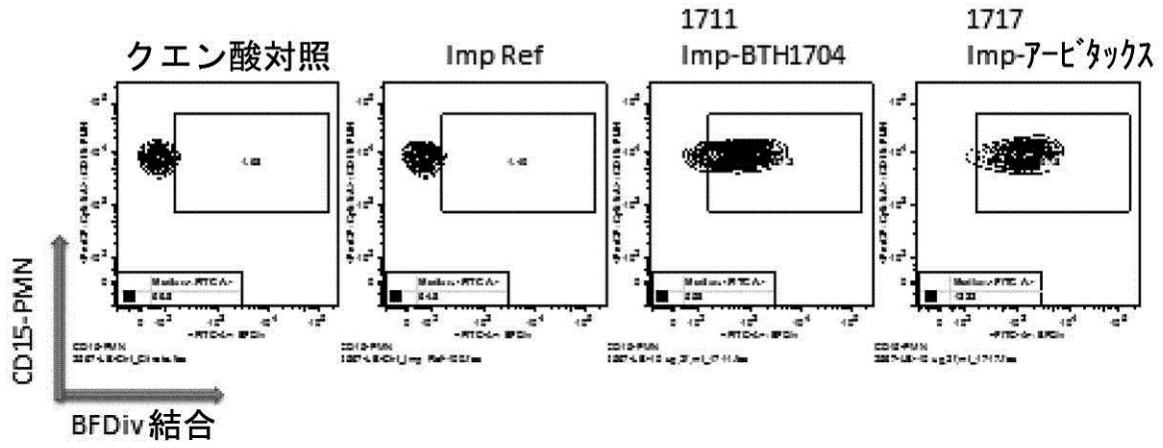
Figure 8



【図9】

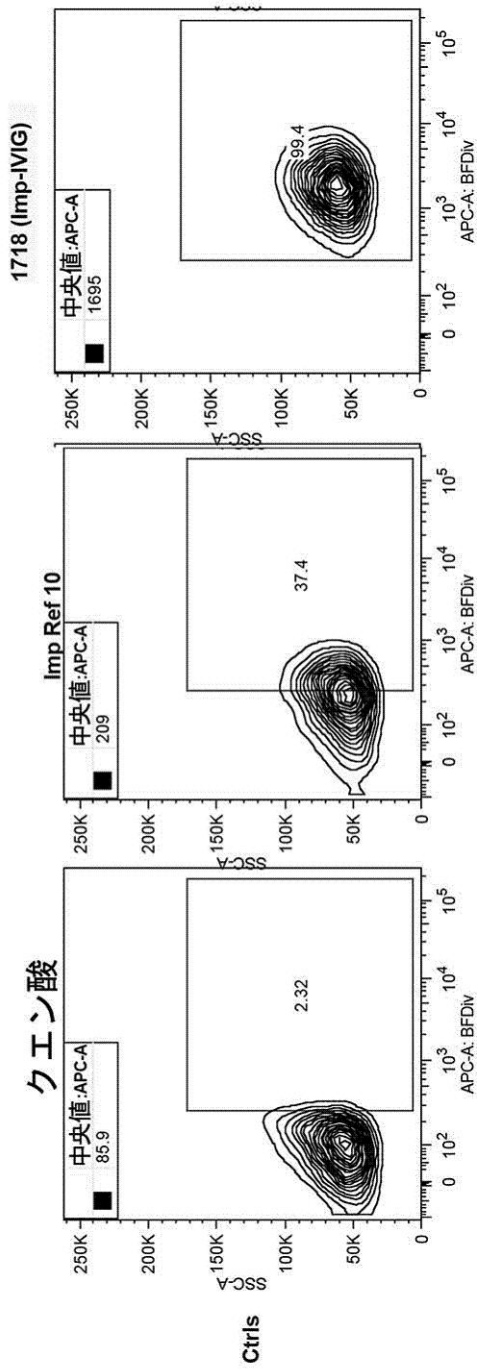
Figure 9

LBの全血中の、PMNへのImp複合物の結合



【 図 1 0 】

Figure 10



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 13/31606
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/716; C07K 16/18; G01N 33/53 (2013.01) USPC - 424/137.1, 435/7.1; 536/123.12 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) IPC(8) - A61K 31/716; C07K 16/18; G01N 33/53 (2013.01) USPC - 424/137.1, 435/7.1; 536/123.12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - A61K 31/716; C07K 16/18; G01N 33/53; G01N 33/566 (2013.01) USPC - 424/137.1, 435/7.1; 536/123.12; 424/130.1; 436/501; Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) *** Databases: WEST; Patbase; Google *** Search Terms Used: Biothera, beta-glucan, Lentinan, measure, detect, identify, bind, binding, immune cells, macrophage, leukocyte, Dectin, btd, intravenous immunoglobulin, IVIG, immunotherapy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — A	Goodridge et al., "Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a phagocytic synapse", (2011). Nature, Vol. 472, No. 7344, Pg. 471-476; especially pg 471, col 2, para 1; pg 476, col 1, para 1 to col 2, para 1	1-3 — 8-13
A	Isoda et al., "Clinical efficacy of superfine dispersed lentinan (beta-1,3-glucan) in patients with hepatocellular carcinoma", (2009). Hepatogastroenterology, Vol. 56, No. 90, Pg. 437-41; especially pg 440, col 2, para 1 to pg 441, col 1, para 1	8-13
A	US 6,355,625 B1 (Pavliak et al.) 12 March 2002 (12.03.2002), entire document	8-13
P,A	WO 2012/154818 A1 (Bose et al.) 15 November 2012 (15.11.2012), entire document	8-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 10 May 2013 (10.05.2013)		Date of mailing of the international search report 04 JUN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/31606

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 4-7 and 14-20
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/16 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 K 36/062 (2006.01)	A 6 1 K 35/16	
	C 1 2 Q 1/02	
	A 6 1 K 36/062	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 ウィリアム ジェイ・グロスマン

アメリカ合衆国, イリノイ 60030, サード レイク, メインセール ドライブ 208

(72)発明者 メアリー エー・アントニーサミー

アメリカ合衆国, ミネソタ 55129, ウッドベリー, ウォーターフロント ドライブ 10293

(72)発明者 リチャード エム・ウォルシュ

アメリカ合衆国, ミネソタ 55014, リノ レイクス, ブラック ダック サウス 6551

(72)発明者 マリアナ アイ・ネルソン

アメリカ合衆国, ミネソタ 55068, ローズマウント, ブリリアント ゲム アベニュー 13426

(72)発明者 ナンディタ ポーズ

アメリカ合衆国, ミネソタ 55446, プリマス, メリマック レーン 4390

(72)発明者 マイケル イー・ダニエルソン

アメリカ合衆国, ミネソタ 55116, セントポール, シェファール アベニュー 1445

(72)発明者 カイル エス・ミッシェル

アメリカ合衆国, ミネソタ 55123, イーガン, テムズ アベニュー 3926

Fターム(参考) 2G045 AA02 CA25 DA30

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ04 QQ08 QQ67 QQ96 QR48 QS02 QS12

QS16 QS32 QX01

4C085 AA13 AA14 BB31 BB50 CC13 CC22 CC23 EE03 GG02

4C086 AA01 AA02 EA20 MA02 MA04 NA05 ZB07

4C087 AA01 AA02 BB35 BC04 CA14 MA02 MA66 NA05 ZB07

专利名称(译)	β-葡聚糖免疫疗法		
公开(公告)号	JP2015517115A	公开(公告)日	2015-06-18
申请号	JP2015510271	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)	Baiosera公司		
[标]发明人	ウィリアムジェイグロスマン メアリーエーアントニーサミー リチャードエムウォルシュ マリアナアイネルソン ナンディタボーズ マイケルイーダニエルソン カイルエスミッシェル		
发明人	ウィリアム ジェイ.グロスマン メアリー エー.アントニーサミー リチャード エム.ウォルシュ マリアナ アイ.ネルソン ナンディタ ボーズ マイケル イー.ダニエルソン カイル エス.ミッシェル		
IPC分类号	G01N33/66 G01N33/53 A61P37/02 A61K31/716 A61K39/395 A61K35/16 C12Q1/02 A61K36/062		
CPC分类号	A61K31/716 A61K45/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 A61K47/6835 C07K16/12 C07K16/14 G01N33/554 G01N2400/24 A61K2300/00 A61K39/395 G01N33/53 A61K39/39 A61K39/39558 A61K39/39575 A61K39/39583 A61K2039/55583 G01N33/56966		
FI分类号	G01N33/66.A G01N33/53.S A61P37/02 A61K31/716 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K39/395.V A61K35/16 C12Q1/02 A61K36/062		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/CA25 2G045/DA30 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ04 4B063/QQ08 4B063/QQ67 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS02 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS32 4B063/QX01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/BB50 4C085/CC13 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE03 4C085/GG02 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA20 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB07 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB35 4C087/BC04 4C087/CA14 4C087/MA02 4C087/MA66 4C087/NA05 4C087/ZB07		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	61/640834 2012-05-01 US 61/640397 2012-04-30 US 61/640842 2012-05-01 US		
其他公开文献	JP6416751B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

在一个方面，本公开描述了用于鉴定β-葡聚糖与受试者的免疫细胞结合的方法。通常，该方法包括从受试者获得血液样品，血液样品包含免疫细胞，将可溶性β-葡聚糖添加到至少一部分血液样品中并在允许可溶性β-葡聚糖结合到血液样品的条件下孵育混合物。免疫细胞，并检测与免疫细胞结合的可溶性β-葡聚糖。在另一方面，本公开内容描述了一种方法，其通常包括将受试者鉴定为β-葡聚糖的低结合剂，并向受试者共同施用可溶性β-葡聚糖和能够将受试者从低粘剂转化为高粘剂。

抗体	社名; クローン #	希釈又は最終濃度	同定目的
抗CD15	Biolegend; W6D3	0.2 μg/mL	好中球
抗CD19	Biolegend; HI19	0.63 μg/mL	B細胞
抗CD14	Biolegend; HCD14	5 μg/mL	単球
抗CD14	Invitrogen; TuK4	1:50	単球
抗CD3	Biolegend; HIT3a	0.25 μg/mL	T細胞
抗CD45	Biolegend; HI30	0.25 μg/mL	赤血球及び血小板を除外した造血細胞
Goat F(ab') ₂ 抗マウスIgM	Jackson Immunolab	5 μg/mL	マウス抗β-グルカン抗体

インキュベーションを抗β-グルカン抗体BFD-IVで進め、BFD-IVの認識のための第二の抗体及び様々な細胞表面標識の認識のための抗体を含有する抗体混合物で細胞をインキュベートした。